Cultivo de Tejidos en la Agricultura

Fundamentos y Aplicaciones

William M. Roca
Luis A. Mroginski
Editores técnicos

CIAT
Centro Internacional de Agricultura Tropical

Digitized by Google

ISBN 958-9183-15-8

Cultivo de Tejidos en la Agricultura

Fundamentos y Aplicaciones

William M. Roca
Luis A. Mroginski
Editores técnicos

CIAT Centro Internacional de Agricultura Tropical

Digitized by Google

Centro Internacional de Agricultura Tropical
Apartado aéreo 6713
Cali, Colombia

Publicación CIAT No. 151
ISBN 958-9183-15-8
Tiraje: 1000 ejemplares
Impreso en Colombia
Mayo 1991
Reimpresión, agosto 1993

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Roca, W. M. y Mroginski, L. A. (eds.). Cali, Colombia. p. xii, 970.

1. Tejidos vegetales — Cultivo — Ensayos, conferencias, etc. 2. Biología molecular de las plantas — Ensayos, conferencias, etc. 3. Germoplasma vegetal — Ensayos, conferencias, etc. I. Roca, William M. II. Mroginski, Luis A. III. Centro Internacional de Agricultura Tropical.

Digitized by Google

Contenido

Página

Prólogo ix

Parte A
Principios Básicos, Metodologías y Técnicas del Cultivo de Tejidos Vegetales

Capítulo 1
Establecimiento de un laboratorio para el cultivo de tejidos vegetales
W. M Roca, L. A. Mroginski 1

Capítulo 2
Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales in vitro
L. A. Mroginski, W. M. Roca 19

Capítulo 3
Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación
A. D. Krikorian 41

Capítulo 4
Agentes gelatinizadores en el cultivo de tejidos
L. Szabados, V. M. Núñez, L. M Tello, G. Maf la, J. Roa,
W. M. Roca 79

Capítulo 5
Propagación clonal in vitro
A. D. Krikorian 95

Capítulo 6
Micropropagación: conceptos, metodología y resultados
V M. Villalobos, T. A. Thorpe 127

Digitized by Google

Capítulo 7
Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis
R. E. Litz, R. L. Jarret 143

Capítulo 8
Suspensiones celulares: descripción, manipulación y aplicaciones
L. Szabados, L. A. Mroginski, W. M Roca 173

Capítulo 9
Biosíntesis y bioconversión de metabolitos secundarios por células cultivadas in vitro
M. L. Roben, J. Reyes, V M. Loyola 211

Capítulo 10
Protoplastos: aislamiento, cultivo y regeneración de plantas
L. Szabados 239

Capítulo 11
Cultivo de anteras y mejoramiento de plantas
W. M. Roca, V. M Núñez, K Mornan 271

Capítulo 12
Cultivo de embriones y óvulos
R. E Litz 295

Capítulo 13
Estabilidad genotípica en células, tejidos y plantas derivadas de cultivos in vitro
A. D. Krikorian 313

Capítulo 14
Variación somaclonal y su aplicación al mejoramiento de cultivos
E. Tabares, J. Pachón, W. M. Roca 339

Digitized by Google

Capítulo 15
Variabilidad y selección de poblaciones generadas in vitro
J. A. Mariotti 361

Capítulo 16
Análisis e interpretación estadística de la experimentación in vitro
J. A. Izquierdo, Y. López F. 375

Parte B
Aplicaciones del Cultivo de Tejidos a Especies Vegetales Económicamente Importantes 401

Capítulo 17
Eliminación de virus y propagación de clones en la yuca (Manihot esculenta Crantz)
W. M. Roca, B. Nolt, G. Mafia, J. Roa, R. Reyes 403

Capítulo 18
Cultivo de tejidos de camote
R. L. Jarret 421

Capítulo 19
Cultivo de tejidos para la producción de semilla básica de papa
L. Lago Castro 447

Capítulo 20
Micropropagación de aráceas comestibles
S. Salazar S. 469

Capítulo 21
Cultivo de tejidos y material de propagación libre de enfermedades en el ñame
S. H Mantell, S. Q. Hague, F L. Chandler 481

Capítulo 22
Micropropagación de plátanos y bananos
A. Angarita, M. Perea 495

Digitized by Google

Capítulo 23
Frutales libres de virus partiendo de ápices meristemáticos cultivados in vitro
L. C. Mosella Ch., L. Ascui M. 513

Capítulo 24
Cultivo de anteras de arroz
F. J. Zapata, L. B. Torrizo, R. O. Romero, S. T. Mercy 533

Capítulo 25
Cultivo de tejidos en la caña de azúcar
J. Pérez Ponce 543

Capítulo 26
Multiplicación vegetativa de café, hevea y cacao
P. Dublin 577

Capítulo 27
Propagación in vitro del café
M. R. Sondahl, T. Nakamura, W. R. Sharp 621

Capítulo 28
Micropropagación de opuntias y agaves
V. M. Villalobos A., J M. Mejía M., H. A. Escobar A. 643

Capítulo 29
Propagación masiva de piretro y guanto mediante el cultivo de tejidos
L. W. Levy, P. E. Levy 651

Capítulo 30
Pruebas de detección de virus, viroides y organismos fitopatógenos sistémicos aplicadas al cultivo de tejidos
S. F. Nome 663

Capítulo 31
Métodos de conservación in vitro del germoplasma
W. M. Roca, D. I. Arias, R. Chávez 697

Digitized by Google

Capítulo 32
Crioconservación del germoplasma
L. A. Mroginski, W. M. Roca, K K Kartha 715

Parte C

Aplicaciones de Técnicas Bioquímicas y Moleculares al Cultivo de Tejidos Vegetales 731

Capítulo 33
Ingeniería genética y cultivo de tejidos
A. Calderón, W. M. Roca, J. Jaynes 733

Capítulo 34
Manipulaciones genéticas con protoplastos
L. Szabados 755

Capítulo 35
Protoplastos para la investigación de los virus que afectan las plantas
A. L. Fuentes K. 801

Capítulo 36
Técnicas moleculares para evaluar y mejorar el germoplasma vegetal
H Ramírez, A. Calderón, W. M. Roca 825

Capítulo 37
Isoenzimas como marcadores genéticos para identificar híbridos en el cultivo de tejidos
C. F. Quirós 857

Capítulo 38
Detección de viroides y virus con técnicas de ADN recombinante
L. F. Salazar

Digitized by Google

Parte D

Apéndices 887

Apéndice A. Abreviaturas y acrónimos 889

Apéndice B. Unidades de medida y notación decimal 893

Apéndice C. Acrónimos de virus y otros patógenos 894

Apéndice D. Terminología técnica más usada en el cultivo de tejidos 896

Apéndice E. Costo mínimo de un laboratorio de cultivo de tejidos vegetales 912

Apéndice F. Medios de cultivo más usados 921

Apéndice G. Casa de malla de tipo II para adaptación de las plantas 925

Apéndice H. Breve cronología de la biotecnología molecular 933

Apéndice I. Desarrollo de la biotecnología agrícola en América Latina y el Caribe

Apéndice J. Investigadores que contribuyen a esta obra 947

Indice 953

Digitized by Google

Prólogo

En el avance logrado por las ciencias biológicas en las últimas dos décadas se han desarrollado técnicas que posibilitan el estudio de las plantas a nivel celular y molecular. Estos nuevos enfoques, conocidos colectivamente como biotecnología, se están convirtiendo en herramientas poderosas para el mejoramiento de las plantas y el progreso de la agricultura.

La biotecnología vegetal experimenta hoy una evolución rápida que ha suscitado gran interés en la mayor parte de las naciones del mundo. El impacto de la biotecnología afectará a todas las especies cultivadas, y su mayor potencial, en términos de desarrollo tecnológico, se concentrará en los trópicos. Sin embargo, la brecha entre la investigación básica en biología celular y molecular y sus aplicaciones tecnológicas es generalmente grande en los países tropicales; en éstos, el difícil acceso a la información científica y tecnológica es una causa importante de esa situación.

El objetivo del libro **Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones** es precisamente contribuir a cerrar esa brecha en América Latina. En efecto, es éste el primer libro que, escrito, editado en idioma español y producido para la región latinoamericana, trata ampliamente el tema del cultivo de tejidos vegetales. La idea de este trabajo se originó en el Curso Internacional sobre Cultivo de Tejidos Vegetales organizado por los editores (W. M. Roca y L. A. Mroginski) en Tucumán, Argentina, en 1983; este curso fue auspiciado por el Panel de Biología Celular y Biotecnología de la Organización Internacional de Investigaciones Celulares (ICRO, en inglés) de la UNESCO, del cual estaba a cargo el Dr. T. A. Thorpe, de la Universidad de Calgary, Canadá. El proyecto inicial del libro fue enriquecido luego con otros manuscritos, y el conjunto cubre un rango amplio de investigaciones y aplicaciones en esta área. El propósito común ha sido producir una obra valiosa, ante todo, para los científicos y técnicos que actualmente investigan el cultivo de tejidos vegetales y lo aplican al mejoramiento de las plantas, y útil además para estudiantes universitarios, profesores, técnicos agrícolas, y otros profesionales que deseen familiarizarse con esta actividad.

El cultivo de tejidos es importante no sólo porque es el área de la biotecnología que tiene actualmente mayor aplicación práctica en la agricultura, sino por ser una herramienta versátil para el estudio de los

Digitized by Google

problemas básicos y aplicados de la biología de las plantas; constituye, en efecto, el puente necesario para llevar las manipulaciones genéticas desde el laboratorio hasta el campo.

El libro contiene 38 capítulos, distribuidos en cuatro partes. La parte A comprende 16 capítulos que tratan de los conceptos básicos y de la metodología y las técnicas del cultivo de tejidos vegetales, tales como el establecimiento de un laboratorio y la preparación de medios de cultivo, la propagación clonal y la regeneración, el cultivo de suspensiones celulares y de protoplastos, la estabilidad genética de los cultivos in vitro, y el manejo de los métodos estadísticos.

La parte B contiene 16 capítulos sobre las aplicaciones del cultivo de tejidos a un número considerable de especies cultivadas que interesan a los países de América Latina. Se estudian en ellas los problemas relacionados con la eliminación de patógenos, la propagación y la producción de haploides, la explotación de la variación somaclonal, y la conservación de recursos genéticos.

La parte C del libro asocia el cultivo de tejidos con los avances más recientes de la biología molecular y de la ingeniería genética de plantas, enfatizando aquellas técnicas que más contribuyen al mejoramiento de las especies vegetales.

La sección final del libro ofrece, como apéndices, algunos elementos útiles para el trabajo con el cultivo de tejidos —como unidades de medida y medios de cultivo más usados— además de reseñas breves tanto del desarrollo histórico de la biotecnología como de la situación actual —y de la proyección futura— de la biotecnología agrícola en América Latina.

Esta obra se realizó gracias a la entusiasta participación de los autores de los diferentes capítulos, quienes contribuyen así a la difusión de las nuevas tecnologías biológicas en la región latinoamericana; los editores expresan, como colegas y amigos, su gratitud a cada uno de ellos. Agradecen también al Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), sin cuya colaboración y apoyo no se hubiera podido culminar este trabajo. En especial, a Francisco Motta y a otros miembros de la Unidad de Publicación por su colaboración en la traducción al español de algunos manuscritos (hecha por el programa ENGSPAN) y por su trabajo en la edición y producción del libro; también a la bióloga Diana Isabel Arias, de la Unidad de Investigación en Biotecnología, por su ayuda en el ajuste final de los textos, en la organización de los capítulos de la obra y en la coordinación del índice.

Digitized by Google

Finalmente, los editores desean manifestar la satisfacción de haber participado en la preparación de esta obra que, a pesar de cualquier omisión o falla que pueda afectarla, beneficiará sin duda a quienes la usen.

William M. Roca
Unidad de Investigación en
Biotecnología, CIAT
Cali, Colombia

Luis A. Mroginski
Instituto de Botánica del
Nordeste
Corrientes, Argentina

Digitized by Google

Parte A

Principios Básicos, Metodologías y Técnicas del Cultivo de Tejidos Vegetales

Digitized by Google

Capítulo 1

Establecimiento de un laboratorio para el cultivo de tejidos vegetales

W. M. Roca*
L. A. Mroginski**

* Unidad de Investigación en Biotecnología (UIB), Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia.
** Facultad de Ciencias Agrarias, Instituto de Botánica del Nordeste, Corrientes, Argentina.

Digitized by Google

Introducción

El cultivo de tejidos, como técnica, consiste esencialmente en aislar una porción de la planta (explante) y proporcionarle artificialmente las condiciones físicas y químicas apropiadas para que las células expresen su potencial intrínseco o inducido. Es necesario además adoptar procedimientos de asepsia para mantener los cultivos libres de contaminación microbiana.

Aunque estos principios son básicamente invariables en todos los laboratorios de cultivo de tejidos vegetales, su aplicación puede presentar variaciones en magnitud y complejidad, dependiendo de los objetivos del laboratorio; así, mientras que un laboratorio de investigación puede ser pequeño en tamaño pero muy especializado en equipos e instalaciones, uno de producción comercial tiende a ser más grande y simple. Un laboratorio de investigación puede también tener un rol de enseñanza y, en este caso, es frecuente que se asignen en él áreas especiales para la enseñanza y la demostración.

Por otra parte, la investigación en cultivo de tejidos puede cubrir un rango amplio de actividades; por ejemplo, desde la investigación básica sobre los procesos bioquímicos y morfológicos de la diferenciación celular, hasta la que realizan aquellos laboratorios que se dedican a la investigación aplicada y al desarrollo de tecnologías para utilizar esta investigación en la propagación clonal, o en el mejoramiento genético de las plantas. En estos últimos laboratorios las instalaciones físicas, los equipos y otros suministros para el cultivo de tejidos serán de una magnitud intermedia entre el laboratorio de investigación básica y el de producción comercial.

El laboratorio de cultivo de tejidos debe disponer de un área destinada al establecimiento, crecimiento y multiplicación de las plantas producidas; esta área es especialmente necesaria en los laboratorios de investigación y desarrollo y en los de producción comercial. Aquellos laboratorios que se dedican a la producción y distribución de materiales de sanidad certificada, por ejemplo, deben incluir además facilidades para la cuarentena y para la evaluación fitosanitaria.

Finalmente, la decisión de establecer un laboratorio de cultivo de tejidos requiere de un estudio y análisis crítico acerca de la necesidad de hacerlo, dentro de un contexto integral del desarrollo de la investigación y la producción agrícola o forestal de una región o país. Por lo tanto, el establecimiento y funcionamiento del laboratorio debe ser, idealmente, el producto de esfuerzos multidisciplinarios.

Digitized by Google

Teniendo en cuenta estos conceptos y la relatividad de cualquier diseño o recomendación para el establecimiento de un laboratorio de cultivo de tejidos, a continuación se presenta una descripción general de lo que puede ser dicho laboratorio y de las necesidades de equipos y otros suministros de carácter estándar; por último, se presenta una breve discusión sobre diferentes métodos para prevenir la contaminación microbiana de los cultivos.

Existen recomendaciones para la planificación de ciertos tipos de laboratorio; como ejemplos se pueden mencionar las relacionadas con la propagación masiva de fresas (Boxus et al., 1984), con la producción de semilla básica de papa (Van Uyen et al., 1983), con los estudios de fijación de nitrógeno in vitro (Rupela et al., 1984), y con otros aspectos relacionados con el establecimiento del laboratorio (Biondi et al., 1981; Bonga, 1982).

Organización del Laboratorio

Un laboratorio de cultivo de tejidos se puede dividir esquemáticamente en áreas separadas para las diferentes funciones que se desarrollan en él (Figura 1.1); en la práctica, sin embargo, algunas de las funciones pueden desarrollarse en un mismo ambiente. Las áreas o secciones principales son:

1. **Area de preparación**. Se utiliza principalmente para preparar los medios de cultivo, pero debe proveer también un espacio para almacenar los materiales de vidrio y de plástico, y los reactivos químicos. Este ambiente debe contar con mesas de trabajo para la preparación de los medios y para colocar las balanzas, el medidor de pH, los platos calientes con agitación, y otros elementos; también debe incluir vitrinas, estanterías y espacio para el equipo de refrigeración, y para la incubadora o la cámara de crecimiento (o para ambas).

2. **Area de lavado y de esterilización**. Puede estar constituida por dos áreas conectadas entre sí, o por un solo ambiente, y puede estar localizada dentro del área general de preparación.

   El área de lavado debe incluir por lo menos un lavadero grande con agua caliente y agua fría y una fuente de agua de alto grado de pureza, preferiblemente agua doblemente destilada; para el efecto se debe usar un destilador de vidrio o de material no tóxico y un desionizador de

Digitized by Google

agua colocado entre el destilador y el lavadero. Esta área debe disponer de un espacio para almacenar agua destilada en botellas de plástico; también debe proveer basureros adecuados para el material vegetal, inorgánico y de vidrio que se deseche.

El área de esterilización debe tener espacio para el autoclave vertical u horizontal, el cual puede ser pequeño (olla de presión) o grande (de carga frontal y de enfriamiento lento y rápido), según sea el volumen del material que se procese. Esta área también puede incluir espacio para estufas, secadores y un lavadero con agua caliente y fría.

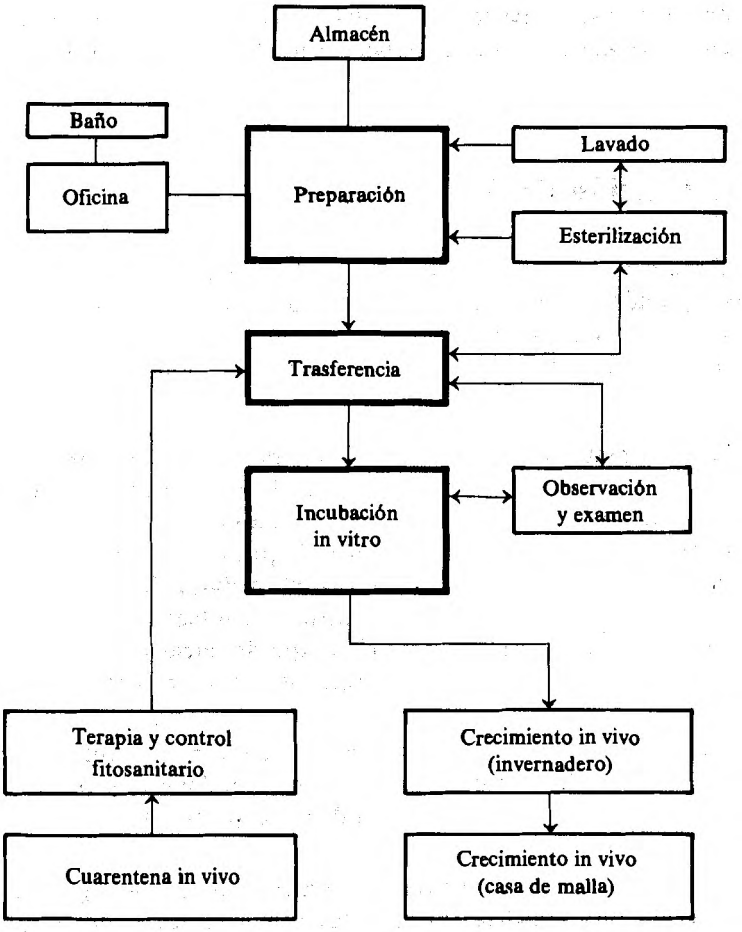


Figura 1.1. Diferentes áreas de un laboratorio de cultivo de tejidos.

Digitized by Google

3. **Area de trasferencia.** En esta área del laboratorio se realiza el trabajo de excisión, inoculación y trasferencia de los explantes a los medios de cultivo. Dado que este trabajo demanda los más altos niveles de limpieza ambiental, se recomienda la instalación de gabinetes de flujo horizontal o vertical de aire filtrado bajo presión, o la construcción de cuartos de trasferencia. Sin embargo, ciertas operaciones de inoculación, como la excisión y el cultivo de ápices y meristemas en tubos de ensayo de boca angosta, se pueden realizar sobre una mesa limpia, ubicada en un lugar del laboratorio libre de corrientes de aire y polvo.

   Los gabinetes de flujo laminar deben ubicarse, en lo posible, en un lugar alejado de las puertas y con un mínimo de corriente de aire, con el fin de prolongar la vida útil de los filtros.

4. **Area de incubación.** Los cultivos se incuban en un cuarto apropiado o en gabinetes o cámaras de crecimiento; éstas pueden ser más eficientes en cuanto al control ambiental, pero son más costosas. El área de incubación o crecimiento in vitro debe proporcionar un buen control de la temperatura (20-28 °C), de la iluminación (variable, según las necesidades: 1000 a 5000 lux) y de la humedad relativa (70%-80%).

   En el cuarto de incubación se instalan estanterías metálicas o de madera para colocar los cultivos. Estas estanterías pueden tener dimensiones variables: el ancho entre 0.30 m y 1.00 m, el largo de acuerdo con el tamaño del cuarto, y la altura total de 1.80 a 2.20 m; la distancia entre entrepaños es de 0.20 a 0.50 m.

   Esta área debe incluir, además, un espacio para cultivos en agitación y para cultivos estáticos en oscuridad.

   Es necesario propiciar una buena distribución del aire en este cuarto para evitar zonas de recalentamiento por efecto de las luces. Cuando se utilizan tubos fluorescentes, es conveniente sacar los balastros fuera de este cuarto.

   La regulación de la temperatura se puede lograr por medio de aparatos de aire acondicionado de pared o de un sistema central. En cualquier caso, es necesario tomar precauciones para evitar el calentamiento excesivo, instalando alarmas y controles para cortar la iluminación cuando falle el aire acondicionado.

5. **Area de observación y examen.** Generalmente los microscopios (estéreo, compuesto, invertido y otros) se localizan tanto en el área de incubación como en la de trasferencia, pero opcionalmente pueden

Digitized by Google

estar en un área separada. El objetivo de esta área es realizar observaciones periódicas de los cultivos, tanto en medios semisólidos como en líquidos.

Las áreas arriba descritas se pueden considerar como el núcleo del laboratorio de cultivo de tejidos. Los laboratorios de investigación y desarrollo y los de producción comercial deben contar, además, con las siguientes instalaciones:

6. **Area de crecimiento.** Las plantas que se regeneran en el área de incubación se pueden acondicionar o aclimatar y luego trasplantar en macetas, bandejas o camas apropiadas. Estas operaciones se pueden llevar a cabo en tinglados, casas de malla o invernaderos, dependiendo de las condiciones climáticas del lugar donde está ubicado el laboratorio y de los requerimientos de aislamiento de los materiales por razones fitosanitarias.

   Después del trasplante, las plantas generalmente necesitan un acondicionamiento gradual a las condiciones de campo, lo cual se puede lograr usando nebulización, cámaras húmedas de plástico, etc.

7. **Areas de cuarentena y de control fitosanitario.** Cuando la función del laboratorio es la producción de materiales elites de sanidad certificada, se hace necesario contar con un área para la recepción de las muestras o plantas destinadas a la limpieza clonal, generalmente protegida contra insectos. Esta área de cuarentena debe estar separada del resto del laboratorio pero cercana al área de control fitosanitario.

   En el área de control sanitario se realizan las pruebas necesarias para comprobar la sanidad del material vegetal, especialmente de enfermedades causadas por virus, bacterias y hongos. La mayor o menor complejidad del equipo usado para realizar estas pruebas depende del conocimiento de la patología de la especie y del grado de garantía fitosanitaria que se demanda o se desea ofrecer con el material vegetal.

8. **Area de oficina.** En ésta se deben ubicar el mobiliario de oficina como escritorios, archivos y almacenamiento de datos, los libros de referencia y de control del laboratorio, los catálogos y otros documentos. También se coloca en ella el equipo de cálculo o computación.

La seguridad física del personal del laboratorio es importante; por esta razón se deben tomar precauciones para ubicar estratégicamente en el laboratorio equipos de primeros auxilios, extintores de incendios y frazadas contra fuego, así como duchas para baños del cuerpo entero y de los ojos. Lo más indicado es prevenir los accidentes con medidas de seguridad

Digitized by Google

como el uso de compartimientos especiales para almacenar reactivos peligrosos (solventes orgánicos, ácidos, alcohol, nitrógeno líquido) ubicados en el área general de preparación y en otras áreas del laboratorio; la capacitación del personal en las técnicas de manipulación y uso apropiado del equipo, material de vidrio, reactivos, y otros elementos es la mejor forma de prevenir accidentes en el laboratorio.

Para la construcción del laboratorio de cultivo de tejidos se pueden utilizar estructuras (muros, paredes, pisos, puertas, servicios, etc.) ya existentes. Sin embargo, puede ser necesario levantar dichas estructuras, y en este caso se recomienda hacer una grande, dentro de la cual se puedan instalar divisiones o paredes con material liviano prefabricado como planchas de triplex o de cartón piedra; así se facilita el diseño de las áreas 1 a 4 y el de la oficina, ajustándola en espacio a los requerimientos inmediatos del laboratorio. Esta estrategia de construcción también facilita futuros cambios en el tamaño de los espacios.

Equipo para el Laboratorio

Suponiendo que se establecerá un laboratorio de cultivo de tejidos de tamaño medio, se requieren, para ponerlo en funcionamiento, las siguientes piezas de equipo estándar:

1. En el área de preparación: Refrigerador, balanzas (una macrobalanza y una de precisión), potenciómetro, plancha eléctrica con agitador magnético, frascos Erlenmeyer (125, 250 y 500 ml), botellas y material de vidrio o plástico (Figura 1.2, A).

2. En el área de lavado y esterilización: Autoclave manual o automático (grande o de mesa, Figuras 1.2, B y 1.2, C), destilador de vidrio, gradillas para secado, bandejas de aluminio y de plástico de varios tamaños, recipientes de plástico grandes, estufas para esterilización y secado.

3. En el área de trasferencia: Gabinete de flujo laminar (Figura 1.2, E); microscopio de disección con luz incidente, e instrumentos de disección: cuchillas no. 10 y no. 11, mangos para cuchillas, agujas de disección, pinzas, tijeras, navaja de afeitar (Figura 1.2, D). También se necesitan frascos con alcohol, mechero de alcohol, máscaras, guantes, marcadores a prueba de agua, bandejas, y tacho para basuras.

4. En el área de incubación: Un cuarto con temperatura, iluminación y humedad relativa controladas; estanterías con iluminación para los

Digitized by Google

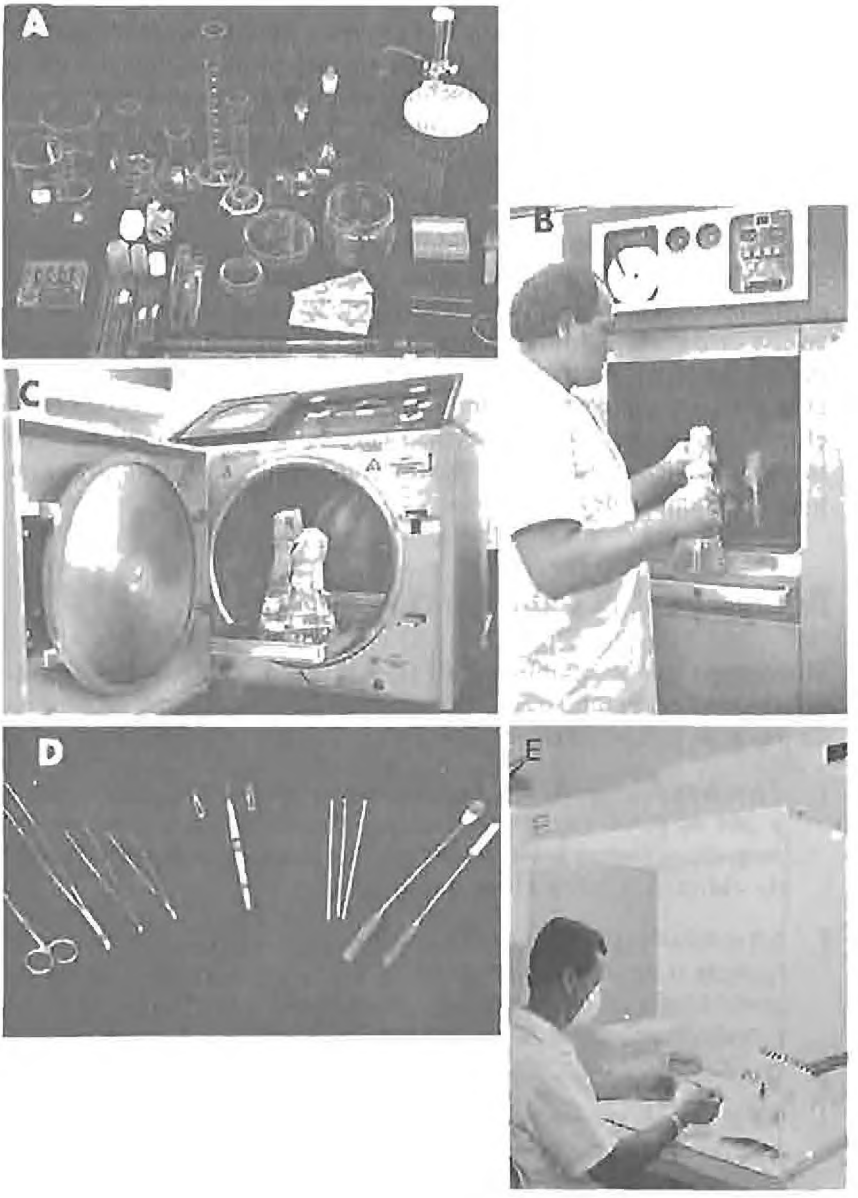


Figura 1.2. Equipo básico, y componentes opcionales, para un laboratorio de cultivo de tejidos: A. piezas de vidriería, distribuidor automático (manual) de medios, tapones, homogeneizadores, y papel parafinado; B. un autoclave (esterilizador) grande de control automático; C. un autoclave de mesa de control automático; D. instrumentos de disección; E. un gabinete de flujo laminar horizontal en funcionamiento.

Digitized by Google

cultivos (Figura 1.3, A), bandejas, termómetros de máxima y mínima, y gradillas para tubos de varios tamaños.

5. En el área de examinación: Microscopio estereoscópico (Figura 1.3, B), microscopio compuesto, lentes de aumento, y elementos ópticos complementarios.

6. En el área de crecimiento in vivo: Macetas, suelo, bandejas, cámaras de alta humedad (Figura 1.3, C).

Aunque no es esencial, otro equipo útil para algunas tareas del laboratorio o para trabajos de investigación y desarrollo incluye: microscopio invertido (Figura 1.3, D), microscopio compuesto con objetivo de inmersión, agitador (horizontal y el auxiliar de Steward) para cultivos en suspensión (Figuras 1.3, E y 1.3, F), centrífuga de mesa, sistema de filtración para producir agua tipo reactivo, filtros para la esterilización de medios de cultivo, gabinete para el secado por aire caliente, lavadora de pipetas, desionizador de agua, gabinete para guardar solventes, y congeladora. También se deben considerar las jeringas, pipetas y cajas Petri desechables, las pipetas Pasteur y automáticas, y los distribuidores automáticos. Son útiles además el horno de microondas, el extractor de vapores, las cámaras de crecimiento controladas, y el propagador de nebulización. La instalación de una fuente de energía de emergencia, bien sea de electricidad, de gas o de aire a presión, complementan el equipo adicional del laboratorio.

Control Preventivo de la Contaminación Microbiana

Uno de los requisitos básicos para el éxito de la técnica de cultivo de tejidos es mantener los cultivos libres de microorganismos contaminadores.

Las siguientes son las fuentes de donde proceden los contaminadores; cada una requiere diversas medidas de prevención:

Los tejidos. Pueden llevar contaminadores en su superficie o en su interior, o en ambas partes. Los que lleva el explante sobre su superficie se pueden eliminar mediante la desinfección, pero los que se encuentran dentro del tejido son difíciles de eliminar. En este último caso puede ser útil la inclusión de fungistáticos o bacteriostáticos en el medio de cultivo; el sulfato de gentamicina, la penicilina y el sulfato de estreptomicina (10 a 50 mg/litro), son algunos de los productos de amplio espectro que se pueden usar. El tratamiento de las plantas donantes del explante por medio de altas temperaturas (35 a 40 ^{0}C) también es

Digitized by Google

Figura 1.3. Equipamiento básico, y componentes opcionales, para un laboratorio de cultivo de tejidos (cont.): A. estantería iluminada que contiene varias clases de frascos de vidrio y plástico para la incubación de los cultivos; B. un estereoscopio para excisión de explantes (embriones, meristemas) y observación de los cultivos; C. una cámara plástica para mantener las plantas en alta humedad después del trasplante; D. un microscopio invertido para observación de cultivos en suspensión (células, protoplastos, embriones); E. un agitador rotatorio horizontal de tres pisos para cultivos en suspensión; F. 'Auxofitón' de Steward para rotación vertical de cultivos en suspensión en frascos especiales.

Digitized by Google

efectivo para la obtención de segmentos de tejido libres de bacterias y hongos sistémicos.

El área de trabajo. Los contaminadores más comunes son aquí las bacterias y las esporas de hongos que habitan en el ambiente. La utilización de cabinas o cuartos adaptados con un sistema de flujo laminar de aire, el cual penetra a través de filtros a prueba de microbios, permite mantener la asepsia durante el trabajo. Si el área de trabajo carece de estas instalaciones, se hace necesario limpiar las paredes y las mesas con desinfectantes y trabajar en lo posible durante cortos períodos de tiempo.

Los instrumentos. Los instrumentos de trabajo se deben esterilizar antes de usarlos. Se debe tener en cuenta, sin embargo, que los instrumentos inicialmente estériles pueden contaminarse con microbios del aire, de superficies vegetales mal desinfectadas, de las manos o de la exhalación del investigador.

Lo más aconsejable es trabajar con varios juegos de las mismas herramientas y mantener la asepsia de las que se han usado, colocando los instrumentos en alcohol etílico al 70% de 2 a 3 minutos, y 'flameándolos' luego cuidadosamente. La exposición excesiva a la llama (flameo) hace que el metal pierda temple y se oxide; además, se propicia la acumulación en el metal de materia orgánica carbonizada difícil de remover. Por lo tanto, se debe alternar el flameo hecho después de la inmersión de los instrumentos en alcohol, con la colocación de los mismos contra la corriente de aire de la cabina de trabajo para mantener su esterilidad mientras que el alcohol residual se evapora.

El exterior de los recipientes de cultivo. Existe la posibilidad de que, durante el tiempo trascurrido entre la esterilización de los recipientes con los medios de cultivo y el momento de usarlos, se localicen en su exterior ciertos contaminadores, de tal manera que se mantenga estéril sólo el interior de los tubos; por lo tanto, se debe flamear obligatoriamente la boca de cada tubo antes y después de sembrar el explante.

El investigador. El investigador es una fuente primaria de contaminadores. El uso de batas de laboratorio y de guantes limpios y la protección del cabello, la boca y la nariz reducen la contaminación. Las batas limpias y las máscaras son necesarias sobre todo cuando se trabaja en un laboratorio sin flujo laminar de aire. Es esencial que el investigador se limpie bien las manos y los brazos (lavándolos con jabón y agua y enjuagándolos con alcohol al 70%) antes de iniciar una sesión de trabajo.

Digitized by Google

Esterilización

La esterilización es el proceso mediante el cual cualquier material, sitio o superficie se libera completamente de cualquier microorganismo vivo o espora. Se dice que tales materiales o sitios son estériles o se han esterilizado. En la terminología médica se utiliza generalmente la palabra asepsia para designar la condición en la que están ausentes los microorganismos patógenos; quienes trabajan en el cultivo de tejidos de plantas utilizan la palabra *aséptico* como sinónimo de estéril.

La desinfección se limita generalmente al proceso de destrucción de los microorganismos mediante métodos químicos; la esterilización se refiere a menudo al método físico para la destrucción de los microorganismos. Se utiliza la palabra *axénico* para las preparaciones que están libres de virus, viroides o micoplasmas.

Preparación del explante

Generalmente se considera que los tejidos de las plantas intactas y sanas son asépticos internamente y que la principal tarea de limpieza del material para explantes está limitada a la esterilización superficial. Si esta generalización se justifica o no, es debatible, pero en esta breve discusión se supone que tal es el caso. Por tanto, no trataremos de discutir los medios utilizados para la eliminación de virus, viroides, micoplasmas o, incluso, de microorganismos endógenos.

La solución de hipoclorito de sodio (NaOCl), en concentraciones de 1% a 3%, es una de las preparaciones más útiles como germicida y agente oxidante. Sirve para la esterilización superficial de materiales de todo tipo, siempre y cuando no se produzcan lesiones debido a su acción blanqueadora. Durante muchos años se ha utilizado el NaOCl como un esterilizante superficial en los tejidos de las plantas (Wilson, 1915). Se supone que tiene la ventaja de que se enjuaga más fácilmente de las superficies después de la esterilización y así se eliminan los residuos oxidantes indeseables. A causa de la indeseable alcalinidad de cualquier hipoclorito residual, en algunas situaciones podría ser útil un enjuague rápido con agua acidulada (HCl en una solución muy diluida y en cantidad suficiente para neutralizar cualquier exceso de bases).

Como esterilizante superficial también se utiliza la solución de bicloruro de mercurio ($HgCl_2$). Sin embargo, este producto es altamente tóxico y se debe utilizar con mucha cautela; generalmente, basta con una solución acuosa entre 0.1% a 1.5% (p/v) y una exposición de 3 a 10 minutos para

Digitized by Google

que la esterilización tenga efecto. El problema principal del bicloruro de mercurio no sólo es su naturaleza altamente venenosa y corrosiva, sino la dificultad para removerlo mediante el enjuague; a pesar de esto, tiene su valor en la esterilización (Yao et al., 1981). Para más detalles, véase el Capítulo 2.

Procedimiento de esterilización

El calor es uno de los agentes que se utiliza con más frecuencia en la esterilización. Se puede usar en forma de llama directa, de calor húmedo (vapor) o de calor seco (aire caliente); cuando se utiliza el calor húmedo, puede ser en forma de vapor abierto o de vapor bajo presión. Ocasionalmente se puede usar agua caliente pero no hirviendo.

Como es bien conocido, el éxito en el logro de esterilidad en cualquier preparación depende de muchos factores, como son la naturaleza de la sustancia que se esteriliza, el volumen contenido en cada unidad, el tamaño del recipiente y el número de unidades que se pueden manejar en una sola operación. Por consiguiente, no se pueden dar instrucciones específicas relacionadas con el método de esterilización que se utiliza para una preparación individual; en contraposición, se presentan sugerencias generales relacionadas con los procedimientos de esterilización.

Calor seco. Los recipientes de vidrio secos que se utilizan para operaciones estériles se pueden esterilizar por medio de aire caliente; para el efecto se colocan en una estufa de aire caliente a una temperatura mínima de 170 °C, preferiblemente durante dos horas, pero nunca menos de una hora. El algodón (debidamente envasado) a menudo se esteriliza por intervalos más largos, ya que tiende a contener esporas altamente resistentes; puesto que tanto el algodón como el papel toman un color marrón a temperaturas de 190 °C o superiores, para estos materiales se debe usar una temperatura menor de 170 °C, manteniéndolos bajo ella por lo menos durante una hora.

Es obvio que todos los materiales esterilizados mediante calor seco deberán estar limpios, e incluso libres de trazas de materia orgánica.

Vapor bajo presión (autoclave). El vapor bajo presión es muy eficiente para destruir todas las formas de bacterias y hongos y sus esporas, y es el método más utilizado para esterilizar diferentes materiales incluyendo los medios de cultivo (siempre y cuando no contengan componentes termolábiles).

El autoclave más utilizado actualmente en el laboratorio es la contraparte de mayor tamaño de la olla de presión común. Al utilizarlo, es

Digitized by Google

necesario extraer todo el aire antes de empezar el proceso de esterilización ya que, a presiones iguales, la temperatura de una mezcla de aire y vapor no es tan alta como la del vapor puro; la extracción del aire se logra automáticamente al permitir que el vapor expulse el aire del aparato, antes de cerrar la válvula correspondiente. La temperatura dentro del autoclave se regula mediante la presión y es directamente proporcional a ésta; la presión se lee en un manómetro que forma parte del autoclave.

Para esterilizar los materiales relacionados con el cultivo de tejidos se acostumbra usar una presión de 15 lb durante 20 minutos; a esta presión la temperatura del vapor es aproximadamente 121 °C, suficiente para matar virtualmente todas las formas de vida en cinco minutos. Sin embargo, se debe recalcar que el tiempo de exposición requerido dependerá tanto del tipo del material que se va a esterilizar como de su cantidad. Si se desea que la esterilización sea completa, el calor debe penetrar en cada porción del material; ninguna sustancia es estéril si queda en ella un organismo viable o espora. La siguiente es una guía para presiones variables:

10 lb de presión (115.5 °C) durante 30 minutos
15 lb de presión (121.5 °C) durante 20 minutos
20 lb de presión (126.5 °C) durante 15 minutos

Para las operaciones mayores se recomienda colocar detectores de esterilización en diferentes puntos dentro del autoclave o dentro de la masa de material que se trata, para asegurarse de que todas las partes han alcanzado la temperatura deseada.

Calor húmedo a 100 °C. Con este método probablemente sea suficiente una sola exposición de 15 minutos al calor vivo (100 °C) para matar todas las formas vegetativas microbianas. Sin embargo, así no se matan necesariamente todas las formas de esporas y puede ser práctico, por consiguiente, efectuar la esterilización intermitente, siempre y cuando se disponga de cierto equipo. En este caso, la exposición puede ser de 30 a 60 minutos y se repite diariamente durante tres días consecutivos, conservando el material a la temperatura del cuarto o en una incubadora entre una exposición y otra. Teóricamente la primera exposición destruye todas las formas microbianas; durante las próximas 24 horas, generalmente germinan las esporas convirtiéndose en formas vegetativas que mueren en la segunda exposición; la tercera exposición es simplemente un medio de prevención para destruir las esporas vivas que hayan podido tener una germinación lenta.

A veces el procedimiento se modifica utilizando temperaturas inferiores a la del agua hirviendo y aumentando el número de las exposiciones hasta

Digitized by Google

cuando haya una seguridad razonable de esterilidad. Se utilizan temperaturas de 60 a 80 °C y se repiten sucesivamente las exposiciones durante 4 a 7 días.

Este método del calor húmedo a 100 °C, conocido como 'método de Koch' se utiliza en la esterilización de medios que contienen componentes capaces de soportar la exposición a temperaturas de vapor vivo, pero no a las temperaturas mayores que tiene el vapor bajo presión. No obstante, este método no está exento de problemas; las esporas pueden no desarrollarse en las soluciones no nutritivas como el agua corriente, por lo cual se recomienda reemplazarlo, cuando sea posible, por el método de filtración; sin embargo se menciona, incluso en este caso, como una alternativa cuando no se dispone de las instalaciones o medios para esterilizar por filtración.

En términos generales, los medios para el cultivo de tejidos de plantas son bastante ricos en componentes que pueden servir de sustento a los microorganismos y existe la posibilidad de que los contaminantes aparezcan durante los intervalos sucesivos.

Filtración. La esterilización de líquidos va acompañada rutinariamente de la filtración a través de filtros especiales a prueba de hongos y bacterias. Es claro que los filtros y otros aparatos se deben esterilizar antes de tratar de utilizarlos para remover los contaminantes de un líquido.

Obviamente el tamaño del poro es el principal factor en la capacidad de retención de bacterias de estos filtros; otros factores que afectan la penetrabilidad del filtro por los microorganismos son el pH, la carga eléctrica del material filtrado, la temperatura, la presión y la duración del procedimiento de filtración así como el efecto de la absorción de proteínas y otras sustancias en el filtro; también puede haber contaminación en el filtrado a causa de una presión excesiva en el filtro o de fugas de las líneas al vacío cuando se utiliza presión negativa.

En el mercado se encuentra una amplia gama de aparatos de filtración entre los cuales está el 'Millipore'. Se encuentran disponibles además los filtros desechables que, aunque costosos, pueden ahorrar tiempo y son pre-esterilizados.

Limpieza de los Recipientes de Vidrio

La limpieza de los recipientes de vidrio y otros utensilios es de importancia vital en el trabajo de cultivo de tejidos vegetales. Nunca se debe utilizar

Digitized by Google

jabón; cuando sea posible, se deben adoptar detergentes que se laven y enjuaguen fácilmente. Se debe utilizar agua caliente con el detergente, enjuagar luego con agua caliente sola, hacerlo después con agua desionizada y finalmente con agua destilada.

Bajo circunstancias especiales puede ser necesario exponer los recipientes de vidrio a soluciones limpiadoras de ácido crómico, durante varias horas. Pero es necesario reconocer que sería imposible remover los iones de cromato residuales y que éstos a su vez serían dañinos o tóxicos para las células y tejidos de las plantas (Richards, 1936; Henry et al., 1946; Butler et al., 1954). Adicionalmente, las soluciones limpiadoras son peligrosas y se deben utilizar con cautela para evitar quemaduras y problemas de contaminación ambiental. Los residuos de iones de cromo se podrían remover lavando con detergente, pero el proceso de limpieza se volvería más intensivo en el uso de recursos humanos.

También existen soluciones inorgánicas para el lavado, las cuales son tan efectivas como las soluciones de ácido crómico y, a diferencia de ellas, se dice que son inocuas para el medio ambiente. El Nochromix se encuentra disponible en los Laboratorios Godax, 6 Varick Street, New York, New York, 10013; es una fórmula preempacada de propiedad de estos laboratorios. Simplemente se añade ácido sulfúrico concentrado, generalmente 1 ó 2 paquetes para una botella de ácido de 9 lb (Goda, 1970).

Referencias

Biondi, S. y Thorpe, T. A. 1981. Requirements for a tissue culture facility. En: Thorpe, T. A. (ed.). Plant tissue culture: Methods and applications in agriculture. Academic Press, Nueva York. p. 1-20.

Bonga, J. M. 1982. Tissue culture techniques. En: Bonga, J. M. y Durzan, D. J. (eds.). Tissue culture in forestry. Martinus Nijhoff and W. Junk Publishers, Boston. p. 4-35.

Boxus, P.; Damiano, C. y Brasser, E. 1984. Strawberry. En: Ammirato, P. V.; Evans, D. A.; Sharp, W. R. y Yamada,Y. (eds.). Handbook of plant cell culture; 3: Crop species. MacMillan Publishing, Nueva York. p. 453-486.

Butler, E. B. y Johnston, W. H. 1954. Retention of chromium by glass following treatment with cleaning solution. Science 120:543-544.

Goda, G. 1970. A new glass-cleaning solution. American Laboratory (agosto 1970), p. 69.

Digitized by Google

Henry, R. J. y Smith, E. C. 1946. Use of sulfuric acid-dichromate mixture in cleaning glassware. Science 104:426-427.

Richards, O. W. 1936. Killing organisms with chromium as from incompletely washed bichromate-sulfuric acid-cleaned glassware. Physiological Zoology 9:246-253.

Rupela, D. P.; Dart, P. J.; Toomsan, B.; Singh, D. V.; Subramaniam, D. y Sharma, B. K. 1984. Facility for growing plants in tubes at ICRISAT (International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics). Information bulletin no. 18. ICRISAT, Patancheru, India.

Van Uyen, N. y Van der Zaag, P. 1983. Vietnamese farmers use tissue culture for commercial potato production. Am. Potato. J. 66:873-879.

Wilson, J. K. 1915. Calcium hypochlorite as a seed sterilizer. Amer. J. Bot. 2:420-427.

Yao, D. y Krikorian, A. D. 1981. Multiplication of rice (*Oryza sativa* L.) from aseptically cultured nodes. Ann. Bot. 48:255-259.

Digitized by Google

Capítulo 2

Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales in vitro

L. A. Mroginski*
W. M. Roca**

* Facultad de Ciencias Agrarias, Instituto de Botánica del Nordeste, Corrientes, Argentina.
** Unidad de Investigación en Biotecnología (UIB), Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia.

Digitized by Google

Introducción

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

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

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

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

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

Digitized by Google

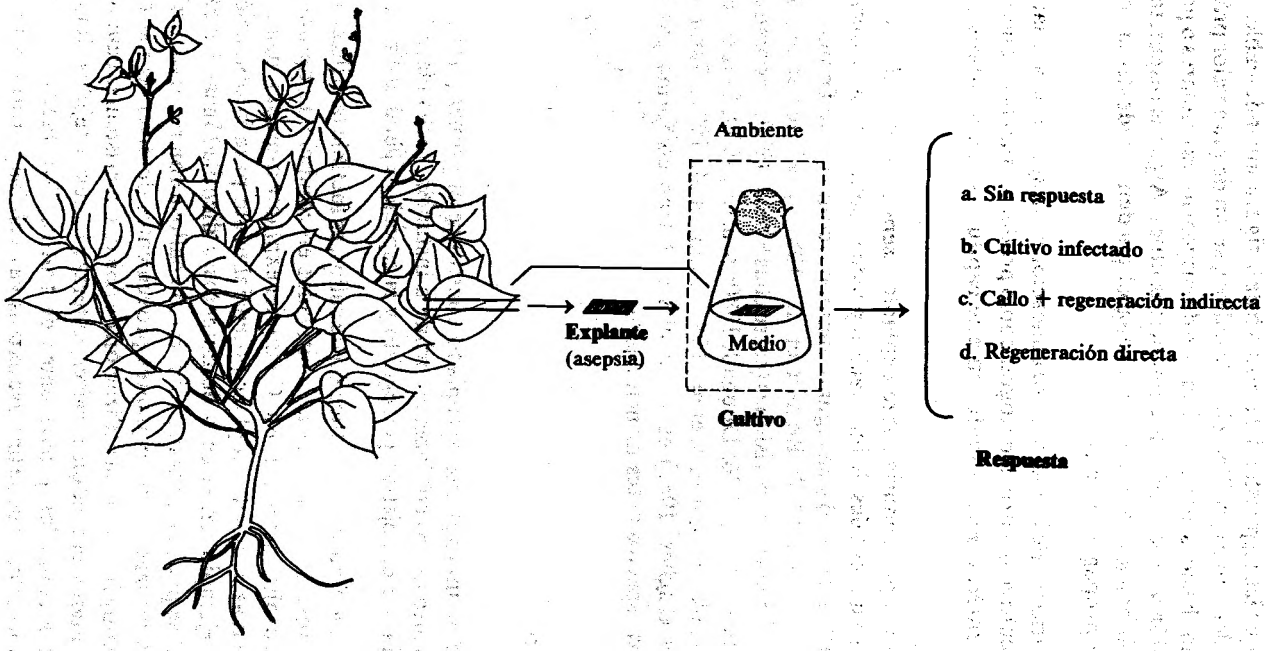


Figura 2.1. Respuestas morfogenéticas de cultivos vegetales in vitro.

Digitized by Google

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

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

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

Explante

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

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

Digitized by Google

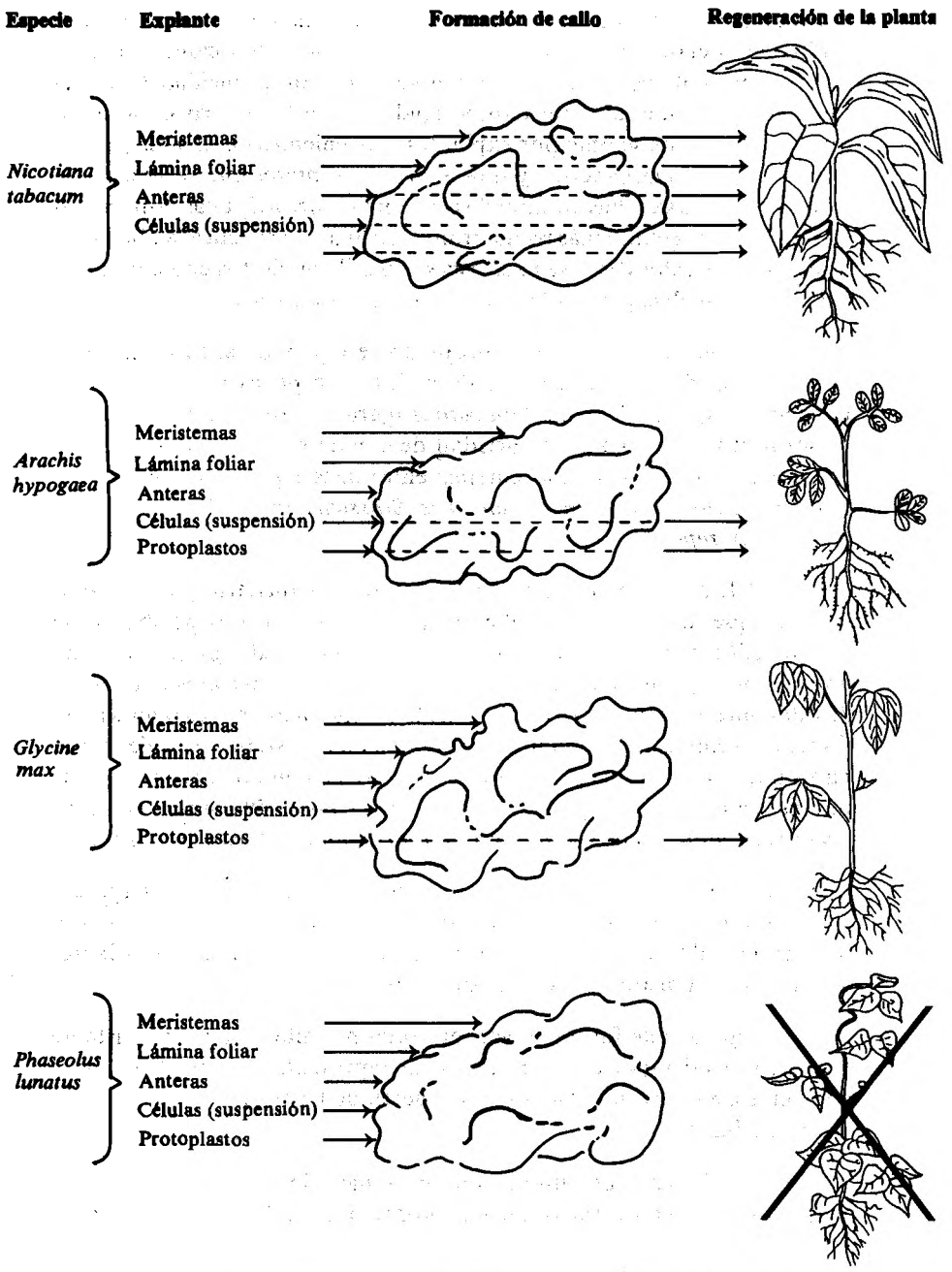


Figura 2.2. Inducción de callos y regeneración de plantas en el cultivo in vitro de diferentes explantes de cuatro especies de dicotiledóneas herbáceas.

Digitized by Google

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

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

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

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

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

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

1. Rubluo et al. Información sin publicar.

Digitized by Google

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

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

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

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

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

2. Mroginski. Información sin publicar.

Digitized by Google

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

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

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

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

Asepsia

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

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

Digitized by Google

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

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

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

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

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

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

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

Digitized by Google

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

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

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

Digitized by Google

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

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

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

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

1) Antes de comenzar a trabajar, desinfectar la mesa y las paredes de la cámara con etanol 70%. Igualmente es conveniente desinfectar la parte externa de los recipientes que contienen los medios de cultivo o el agua estéril, antes de introducirlos en la cámara.

2) Es necesario que las manos y, eventualmente, los antebrazos del cultivador sean desinfectados con etanol 70%. El uso de máscaras y gorros no es imprescindible, pero reduce la contaminación si se opera en flujos laminares de aire estéril.

3) Los instrumentos metálicos empleados se deben flamear previamente con etanol 95%. El material de vidrio utilizado como soporte para las

Digitized by Google

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

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

Para más detalles sobre estos temas, ver Capítulo 1.

Medios de Cultivo

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

Componentes del medio

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

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

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

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

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

Digitized by Google

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

Componentes	Contenidos en cada medio (mg/ litro)[a]			
	MS	B5	N6	Wh
NH_4NO_3	1650	—	—	—
KNO_3	1900	2500	2830	80
KH_2PO_4	170	—	400	—
$CaCl_2.2H_2O$	440	150	166	—
$MgSO_4.7H_2O$	370	250	185	737
$(NH_4)_2SO_4$	—	134	463	—
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	—	—	—	288
$NaH_2PO_4.H_2O$	—	150	—	19
KCl	—	—	—	65
Na_2SO_4	—	—	—	200
KI	0.83	0.75	0.80	0.75
H_3BO_3	6.20	3.00	1.60	1.50
$MnSO_4.H_2O$	—	10.00	—	—
$MnSO_4.4H_2O$	22.30	—	4.40	6.65
$ZnSO_4.7H_2O$	8.60	2.00	1.50	2.67
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25	0.25	—	—
H_2MoO_4	—	—	—	0.001
$CuSO_4.5H_2O$	0.025	0.025	—	0.01
$Fe_2(SO_4)_3$	—	—	—	2.50
$FeSO_4.7H_2O$	27.80	27.80	27.85	—
Na_2EDTA	37.30	37.30	37.25	—
$CoCl_2.6H_2O$	0.025	0.025	—	—
Glicina	2.00	—	2.00	3.00
Tiamina-HCl	0.10	10.00	1.00	0.10
Piridoxina-HCl	0.50	1.00	0.50	0.10
Acido nicotínico	0.50	1.00	0.50	0.50
Mioinositol	100.00	100.00	—	100.00
Sacarosa	30,000	20,000	50,000	20,000
pH	5.7	5.5	5.8	5.5

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

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

Digitized by Google

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Digitized by Google

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

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

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

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

Preparación del medio de cultivo

Es necesario preparar el medio utilizando agua bidestilada o agua desmineralizada-destilada (H_2O, DD) (ver Capítulo 1). Se debe evitar el almacenamiento prolongado del medio para evitar la acumulación de contaminantes; todas las sustancias químicas usadas para su preparación deben ser de un alto grado de pureza.

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

a. Medios semisólidos sin sustancias termolábiles; su preparación consta de los siguientes pasos:

   1) Incorporación del medio basal (MB), de los reguladores de crecimiento o de otros compuestos. Ajuste del pH.

   2) Adición y disolución del agar. Distribución en los recipientes de cultivo (tubos de ensayo, cajas Petri, etc.).

   3) Esterilización en el autoclave (ver Capítulo 1).

b. Medios líquidos con o sin sustancias termolábiles. Para su preparación se sigue el mismo procedimiento de a., pero sin adicionar agar, y haciendo la esterilización por filtración (ver Capítulo 1) en el caso de medios que contengan sustancias termolábiles.

Digitized by Google

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

1) Incorporación de los compuestos que pueden ser esterilizados en el autoclave (tanto los del MB como los reguladores de crecimiento u otros compuestos). Ajuste del pH.

2) Adición y disolución del agar.

3) Esterilización en el autoclave.

4) Incorporación (operando en la cámara de trasferencia) de la(s) sustancia(s) termolábil(es), previamente esterilizada(s) por filtración (ver Capítulo 1). Los componentes esterilizados (paso 3) se deben mantener a una temperatura entre 40 y 50 °C.

5) Distribución (operando en la cámara de trasferencia) del medio en los recipientes de cultivo (tubos de ensayo, cajas Petri, etc.) previamente esterilizados en el autoclave.

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

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

NH_4NO_3	16,500 mg
KNO_3	19,000 mg
KH_2PO_4	1,700 mg
$MgSO_4.7H_2O$	3,700 mg

Disolver en aproximadamente 300 ml de H_2O, DD.

2) Adicionar 10 ml de una solución de $CaCl_2.2H_2O$ (44 g/100 ml de H_2O, DD).

3) Adicionar 10 ml de una solución que contenga 3.73 g de Na_2EDTA y 2.78 g de $FeSO_4.7H_2O$, disueltos en 100 ml de H_2O, DD. Esta solución se debe guardar en el refrigerador.

Digitized by Google

4) Adicionar 10 ml de una solución de KI (83 mg/100 ml de H_2O, DD). Esta solución se debe conservar en el refrigerador, en frascos a prueba de luz.

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

H_3BO_3	620 mg/100 ml H_2O, DD
$MnSO_4.4H_2O$	2,230 mg/100 ml H_2O, DD
$ZnSO_4.7H_2O$	860 mg/100 ml H_2O, DD
$Na_2MoO_4.2H_2O$	25 mg/100 ml H_2O, DD
$CuSO_4.5H_2O$	2.5 mg/100 ml H_2O, DD
$CoCl_2.6H_2O$	2.5 mg/100 ml H_2O, DD

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

Glicina	200 mg/100 ml H_2O, DD
Tiamina-HCl	10 mg/100 ml H_2O, DD
Piridoxina-HCl	50 mg/100 ml H_2O, DD
Acido nicotínico	50 mg/100 ml H_2O, DD
Mioinositol	10,000 mg/100 ml H_2O, DD

7) Adicionar 300 g de sacarosa.

8) Completar hasta 1000 ml con H_2O, DD.

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

Condiciones Ambientales para la Incubación

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

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

Digitized by Google

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

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

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

a. Fotoperíodo de 16 horas.
b. Numerador = temperatura durante el fotoperíodo; denominador = temperatura durante el escotoperíodo.
c. El símbolo (—) indica tratamientos no ensayados.

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

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

Referencias

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

Digitized by Google

Biondi, S. y Thorpe, T. A. 1981. Requirements for a tissue culture facility. En: Thorpe, T. A. (ed.). Plant tissue culture: Methods and applications in agriculture. Academic Press, Nueva York. p. 1-20.

Bonga, J. M. 1980. Plant propagation through tissue culture, emphasizing woody species. En: Sala, F.; Parisi, B.; Cella, R. y Ciferri, O. (eds.). Plant cell cultures: Results and perspectives. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, Holanda. p. 253-264.

Bovo, O. A. y Quarín, C. L. 1983. Obtención de plantas de *Paspalum almum* (*Gramineae*) a partir del cultivo *in vitro* de ovarios jóvenes. Phyton 43:29-34.

Boxus, P. H.; Quoirin, M. y Laine, J. M. 1977. Large scale propagation of strawberry plants from tissue culture. En: Reinert, J. y Bajaj, Y. P. S. (eds.). Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture. Springer-Verlag, Berlín, Alemania. p. 130-143.

Chu, C. C.; Wang, C. C.; Sun, C. S.; Hsu, C.; Yin, K. C. y Chu, C. Y. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. Sci. Sinica 18:659-668.

Clapham, D. H. 1977. Haploid induction in cereals. En: Reinert, J. y Bajaj, Y. P. S. (eds.). Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture. Springer-Verlag, Berlín, Alemania. p. 279-298.

Debergh, P. 1982. Physical properties of culture media. En: Fujiwara, A. (ed.). Plant tissue culture 1982. Jap. Assoc. Plant Tissue Culture, Tokio. p. 135-136.

Dodds, J. H. y Roberts, L. W. 1982. Experiments in plant tissue culture. Cambridge University Press, Cambridge. 178 p.

———. 1983. Tissue culture of hardwoods. En: Dodds, J. H. (ed.). Tissue culture of trees. AVI Publishing. Co. Westport, Connecticut, E.U. p. 22-28.

Dougall, D. K. 1980. Nutrition and metabolism. En: Staba, E. J. (ed.). Plant tissue culture as a source of biochemicals. CRC Press, Boca Ratón, Florida, E.U. p. 21-58.

Evans, D. A.; Sharp, W. R. y Flick, C. E. 1981. Growth and behavior of cell cultures: Embryogenesis and organogenesis. En: Thorpe, T. A. (ed.). Plant tissue culture: Methods and applications in agriculture. Academic Press, New York. p. 45-113.

Frankenberger, E. A.; Hasegawa, P. M. y Tigchelaar, E. C. 1981a. Influence of environment and developmental state on the shoot-forming capacity of tomato genotypes. Z. Pflanzenphysiol. 102:221-232.

———; ——— y ———. 1981b. Diallel analysis of shoot-forming capacity among selected tomato genotypes. Z. Pflanzenphysiol. 102:233-242.

Digitized by Google

Gamborg, O. L.; Miller, R. A. y Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50:151-158.

———; Murashige, T.; Thorpe, T. A. y Vasil, I. K. 1976. Plant tissue culture media. In vitro 12:473-478.

——— y Shyluk, J. P. 1981. Nutrition, media and characteristics of plant cell and tissue cultures. En: Thorpe, T. A. (ed.). Plant tissue culture: Methods and applications in agriculture. Academic Press, Nueva York. p. 21-44.

Gautheret, R. J. 1959. La culture des tissus végétaux: Techniques et réalisations. Masson, París. 863 p.

Hu, C. Y. y Wang, P. J. 1983. Meristem, shoot tip, and bud cultures. En: Evans, D. A.; Sharp, W. R.; Ammirato, P. V. y Yamada, R. (eds.). Handbook of plant cell culture. MacMillan Publishing, Nueva York. v. 1, p. 177-227.

Hughes, K. W. 1981. In vitro ecology; exogenous factors affecting growth and morphogenesis in plant culture systems. Env. Exp. Bot. 21:281-288.

Jensen, C. J. 1977. Monoploid production by chromosome elimination. En: Reinert, J. y Bajaj, Y. P. S. (eds.). Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture. Springer-Verlag, Berlín. p. 299-330.

Jones, O. P.; Hopgood, M. E. y O'Farrell, D. 1977. Propagation in vitro of M.26 apple rootstocks. J. Hort. Sci. 52:235-238.

Kao, K. N. y Michayluk, M. R. 1980. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of alfalfa. Z. Pflanzenphysiol. 96:135-141.

——— y ———. 1981. Embryoid formation in alfalfa cell suspension cultures from different plants. In vitro 17:645-648.

Kartha, K. K.; Gamborg, O. L.; Shyluk, J. P. y Constabel, F. 1976. Morphogenetic investigations on in vitro leaf culture of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Starfire) and high frequency plant regeneration. Z. Pflanzenphysiol. 77:292-301.

———; Champoux, S.; Gamborg, O. L. y Pahl, K. 1977. In vitro propagation of tomato by shoot apical meristem culture. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 102:346-349.

———; Mroginski, L. A.; Pahl, K. y Leung, N. L. 1981. Germplasm preservation of coffee (*Coffea arabica* L.) by in vitro culture of shoot apical meristems. Plant Sci. Lett. 22:301-307.

———; Pahl, K.; Leung, N. L. y Mroginski, L. A. 1981. Plant regeneration from meristems of grain legumes: Soybean, cowpea, peanut, chickpea, and bean. Can. J. Bot. 59:1671-1679.

Litz, R. E. y Conover, R. A. 1979. Development of systems for obtaining parasexual *Carica* hybrids. Proc. Fla. State Hort. Soc. 92:281-283.

Digitized by Google

——— y ———. 1981. In vitro polyembryony in *Carica papaya* L. ovules. Z. Pflanzenphysiol. 104:285-288.

Martin, S. M. 1980. Environmental factors; B: Temperature, aeration, and pH. En: Staba, J. E. (ed.). Plant tissue culture as a source of biochemicals. CRC Press, Boca Ratón, Florida, E.U. p. 143-148.

Monnier, M. 1976. Culture in vitro de l'embryon immature de *Capsella bursa-pastoris* Moench. Rev. Cyt. Biol. Végét. 39:1-120.

Mroginski, L. A. 1975. Plantas haploides de *Nicotiana* spp. obtenidas por cultivo in vitro de anteras. En: Memorias de la Segunda Reunión Nacional Técnica del Tabaco. Corrientes, Argentina. v. 1, p. 97-111.

——— y Fernández, A. 1979. Cultivo in vitro de anteras de especies de *Arachis* (Leguminosae). Oléagineux 34:243-248.

——— y Kartha, K. K. 1981a. Regeneration of plants from callus tissue of the forage legume *Stylosanthes guianensis*. Plant Sci. Lett. 23:245-251.

———y ———. 1981b. Regeneration of pea (*Pisum sativum* L. cv. Century) plants by in vitro culture of immature leaflets. Plant Cell Rep. 1:64-66.

———; ——— y Shyluk, J. P. 1981. Regeneration of peanut (*Arachis hypogaea*) plantlets by in vitro culture of immature leaves. Can. J. Bot. 59:826-830.

Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.

Nitsch, J. P. 1969. Experimental androgenesis in *Nicotiana*. Phytomorphology 19:389-404.

Oono, K. 1981. In vitro methods applied to rice. En: Thorpe, T. A. (ed.). Plant tissue culture: Methods and applications in agriculture. Academic Press, Nueva York. p. 273-298.

Pittman, R. N.; Banks, D. J.; Kirby, J. S.; Mitchell, E. D. y Richardson, P. E. 1983. In vitro culture of immature peanut (*Arachis* spp.) leaves: Morphogenesis and plantlet regeneration. Peanut Sci. 10:21-25.

Reinert, J. y Yeoman, M. M. 1982. Plant cell and tissue culture: A laboratory manual. Springer-Verlag, Berlín. 83 p.

Rey, H. Y. y Mroginski, L. A. 1978. Cultivo in vitro de ápices caulinares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). Phyton 36:171-176.

———; ——— y Fernández, A. 1980. Inducción de callos y raíces en explantos de seis cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). Phyton 39:161-170.

Rubluo, A.; Mroginski, L. A. y Kartha, K. 1982. Morphogenetic responses of pea leaflets cultured in vitro. En: Fujiwara, A. (ed.). Plant tissue culture 1982. Jap. Assoc. Plant Tissue Culture, Tokio. p. 151-152.

Digitized by Google

Seabrook, J. E. A. 1980. Laboratory culture. En: Staba, E. J. (ed.). Plant tissue culture as a source of biochemicals. CRC Press, Boca Ratón, Florida, E.U. p. 1-20.

Seibert, M. y Kadkade, P. G. 1980. Environmental factors; A: Light. En: Staba, E. J. (ed.). Plant tissue culture as a source of biochemicals. CRC Press, Boca Ratón, Florida, E.U. p. 123-141.

Singh, M. y Krikorian, A. D. 1981. White's standard nutrient solution. Ann. of Bot. 47:133-139.

Sondahl, M. R.; Spahlinger, D. A. y Sharp, W. R. 1979. A histological study of high frequency and low frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. Z. Pflanzenphysiol. 94:101-108.

Steward, F. C. 1983. Reflections on aseptic culture. En: Evans, D. A.; Sharp, W. R.; Ammirato, P. V. y Yamada, R. (eds.). Handbook of plant cell culture. MacMillan Publishing, Nueva York. v. 1, p. 1-10.

Street, H. E. 1977a. Introduction. En: Street, H. E. (ed.). Plant tissue and cell culture. University of California Press, Berkeley, California, E.U. p. 1-10.

———. 1977b. Cell (suspension) cultures-techniques. En: Street, H. E. (ed.). Plant tissue and cell culture. University of California Press, Berkeley, California, E.U. p. 61-102.

Styer, D. J. y Chin, C. K. 1983. Meristem and shoot-tip culture for propagation, pathogen elimination, and germplasm preservation. Hort. Rev. 5:221-277.

Sunderland, N. 1974. Anther culture as a means of haploid induction. En: Kasha, K. J. (ed.). Haploids in higher plants: Advances and potential. The University of Guelph, Guelph, Canadá. p. 91-122.

Thomas, E. y Davey, M. R. 1975. From single cells to plants. Wykeham Publ., Londres. 171 p.

Wetter, L. R. y Constabel, F. 1982. Plant tissue culture methods. National Research Council of Canada, Saskatoon, Canadá. 145 p.

White, P. R. 1943. A handbook of plant tissue culture. The Ronald Press, Nueva York. 261 p.

Xu, Z. y Sunderland, N. 1982. Inoculation density in the culture of barley anthers. Scientia Sinica (ser. B) 25:961-969.

Yeoman, M. M. y MacLeod, A. J. 1977. Tissue (callus) culture-techniques. En: Street, H. E. (ed.). Plant tissue and cell culture. University of California Press, Berkeley, California, E.U. p. 31-59.

Yeung, E. C.; Thorpe, T. A. y Jensen, C. J. 1981. In vitro fertilization and embryo culture. En: Thorpe, T. A. (ed.). Plant tissue culture: Methods and applications in agriculture. Academic Press, Nueva York. p. 253-271.

Digitized by Google

Capítulo 3

Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación

A. D. Krikorian*

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

Digitized by Google

Principios Generales y Estrategias de Diseño

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

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

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

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

Digitized by Google

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

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

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

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

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

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

Digitized by Google

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

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

Medio Basal: Elementos Minerales

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

En los primeros tiempos del estudio de la nutrición mineral, los investigadores solían suministrar los elementos por medio de soluciones de cultivo de 'tres sales': KH_2PO_4, $Ca(NO_3)_2$ y $MgSO_4$; se incluía un poco de hierro, generalmente como fosfato ferroso $Fe_3(PO_4)_2$. Actualmente se sabe que los microelementos se suministraban involuntariamente como contaminantes. El conocimiento acerca de los requerimientos de nutrimentos minerales y de la formulación de las soluciones ha progresado mucho desde esos primeros tiempos (Hewitt, 1966; Lauchli et al., 1983; Saric et al., 1983), pero cabe recordar la base tan antigua de las fórmulas más recientes.

Nomenclatura general

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

Digitized by Google

Con el fin de evitar cualquier posible confusión se definirán aquí las **sales minerales** como el medio basal; una B mayúscula indica que se trata de sales minerales. Si se utiliza la fórmula de sales minerales de Murashige et al. (1962), la designamos como B_{MS}; si se utilizan las sales minerales de White entonces escribimos B_W; las de Shenck y Hildebrandt (1972) se reducen a B_{SH} y así sucesivamente. Si la concentración de las sales se disminuye a un cuarto o a la mitad, o si se aumenta al doble o a otro factor, se deben hacer los respectivos ajustes al subíndice; por ejemplo: $B_{MS\frac{1}{4}}$, o $B_{MS\frac{1}{2}+}$ o B_{MSx2}.

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

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

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

Nota: si se forma un precipitado, deberá preparar una solución más diluida (por ejemplo 10X). Cuando se utiliza Na_2EDTA (anhidro), sólo se requieren 6.72 g.

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

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

Digitized by Google

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

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

Componentes del medio de cultivo

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

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

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

Digitized by Google

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

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

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

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

El medio de Braun et al. (1962) es un medio de White modificado, ya que contiene 845 mg/litro de KCl, 1800 mg/litro de $NaNO_3$, 300 mg/litro de $NaH_2PO_4.H_2O$ y 790 mg/litro de $(NH_4)_2SO_4$, además de lo que se encuentra en un medio (mineral) basal de White. También se añaden algunos suplementos orgánicos, por ejemplo la glutamina y la asparagina, y los dos nucleótidos ácido cítidílico y ácido guanílico; el inositol también está presente (100 mg/litro).

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

Digitized by Google

también que el efecto del NH_4^+ en el crecimiento de las células era sorprendente; cuando éste se añadía al medio básico que contenía niveles elevados de KCl, $NaNO_3$ y NaH_2PO_4 (como también KIN e inositol), el crecimiento era el doble del que se encontraba en un medio similar con $(NH_4)_2SO_4$.

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

El medio 'revisado' que propusieron Murashige y Skoog es esencialmente una modificación de la fórmula basal original de White, a la que se añadieron 1650 mg/litro de NH_4NO_3 al igual que 170 mg/litro de KH_2PO_4. El $CaCl_2$ remplazó al $Ca(NO_3)_2$; por consiguiente, este medio es de alta salinidad y puede esperarse que sustente el crecimiento de ciertos cultivos que requieren concentraciones más altas de iones.

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

Microelementos suplementarios

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

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

Digitized by Google

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

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

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

Compuesto	Cantidad (mg/litro)
$ZnSO_4.7H_2O$	1000
H_3BO_3	1000
$MnSO_4.4H_2O$	0.010
$CuSO_4.5H_2O$	0.030
$AlCl_3$	0.030
$NiCl_2.6H_2O$	0.030
KI	0.010
$Na_2MoO_4.2H_2O$[b]	0.250

a. Usar 1 ml de esta solución madre por litro de medio basal.
b. Este compuesto no forma parte de la fórmula original de Heller.

FUENTE: Heller, 1954.

Agua de Coco (AC) y Otros Endospermas Líquidos

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

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

Digitized by Google

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

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

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

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

Composición del AC

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

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

Digitized by Google

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

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

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

Digitized by Google

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

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

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

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

Digitized by Google

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

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

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

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

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

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

Digitized by Google

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

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

Preparación del AC para el medio de cultivo

El procedimiento es el siguiente:

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

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

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

Digitized by Google

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

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

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

Aminoácidos como Suplementos del Medio Basal

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

Se puede encontrar una fácil explicación para tales contradicciones. Frecuentemente, y por razones que no son claras, los aminoácidos adicionados al medio de cultivo corresponden a la forma DL, la cual es a menudo inhibidora, mientras la forma L es benéfica; además, obtener muestras estrictamente puras de muchas de estas sustancias es más difícil de lo que se espera. Por otra parte, si los aminoácidos se esterilizan en un autoclave en contacto con un medio de cultivo, a menudo los compuestos de nitrógeno simples producen muchos otros que pueden ser inhibidores. Por ejemplo, la urea, ensayada como urea-C^{14}, produjo por lo menos 25 sustancias, una de las cuales es poderosa inhibidora de la división celular (Pollard, 1962);

Digitized by Google

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

Algunos aminoácidos y sus efectos

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

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

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

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

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

Digitized by Google

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

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

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

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

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

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

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

Digitized by Google

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

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

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

FUENTE: Singh et al., 1981.

Caseína hidrolizada (CH)

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

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

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

Digitized by Google

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

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

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

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

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

Digitized by Google

Además, ya que la CH puede tener contenidos bajos de algunos aminoácidos como la metionina, el triptófano y la fenilalanina, éstos se pueden añadir a los cultivos recalcitrantes (3 mg/litro de L-metionina, 4 mg/litro de L-triptófano, y 5 mg/litro de L-fenilalanina).

Levadura y extracto de malta

La levadura y el extracto de malta de cebada generalmente se suministran en concentraciones respectivas de 0.5% hasta 1% y de 0.1% v/v. Estas dos sustancias se pueden considerar también como buenas fuentes de nitrógeno reducido, de precursores potenciales de las adenil-citocininas, e incluso de las mismas adenil-citocininas. Van Staden et al. (1975) identificaron en el extracto de malta Difco la ZEA y los compuestos relacionados; pero Sandstedt et al. (1960) ensayaron los L-aminoácidos en el cultivo de tejidos de tabaco, en las proporciones presentes en el extracto de levadura Bacto, y encontraron que los ácidos aspártico y glutámico podían por sí solos sustituir a la mezcla entera.

Muchos investigadores encontraron que el extracto de malta de cebada era benéfico cuando se utilizaba como un suplemento (Lowenberg et al., 1952; Gautheret, 1959). Sin embargo, en otros casos, cuando el extracto de malta de cebada se utilizaba como una fuente de nitrógeno reducido en los cultivos, los tejidos podían oscurecerse y morir. Por otra parte, las maltas de otros cereales pueden ocasionar diferentes respuestas; por ejemplo la malta del ragi (*Eleusine coracana*), un cereal ampliamente utilizado en la India, ha mostrado ser una fuerte estimuladora de algunos tejidos (Murthy Reddy et al., 1973). Por consiguiente, esto refuerza el hecho de que diversos tejidos responden diferentemente a varios suplementos.

Vitaminas

Las plantas verdes se consideran normalmente autótrofas para las vitaminas, pero puede ser necesario añadir al medio algunas de ellas, hasta cuando los cultivos crezcan o se hayan vuelto verdes. En la mayoría de los medios, la tiamina, la piridoxina y el ácido nicotínico se consideran benéficas y se añaden de forma rutinaria, por conveniencia. Desde hace mucho tiempo se sabe que las puntas radicales escindidas son incapaces de sintetizar la tiamina y presentan un requerimiento definitivo por la misma cuando se van a cultivar continuamente. En realidad, en la planta intacta las raíces deben obtener su tiamina del vástago donde es sintetizada.

Digitized by Google

Otras vitaminas (ácido pantoténico, biotina, riboflavina y colina) pueden ser útiles pero no absolutamente necesarias. El ácido ascórbico (10 a 100 mg/litro) se considera benéfico en algunos casos, debido probablemente a su capacidad para actuar como un agente reductor y para retrasar la formación de sustancias similares a la melanina, que inhiben el crecimiento, y no debido a su papel como 'vitamina'. También se ha sugerido que los efectos estimuladores del crecimiento que tiene el jugo de tomate (Vacin et al., 1949; Nitsch, 1954) probablemente se deben a una respuesta de este tipo, y no a la presencia de alguna sustancia de división celular (Arditti, 1966).

El ácido ascórbico no parece ser tan bueno como el glutatión (10 a 100 mg/litro) para retrasar el oscurecimiento de algunos tejidos recalcitrantes, ya que se autooxida más rápidamente que este último. Otros afirman que la vitamina B12 es benéfica para el establecimiento de los cultivos de tejidos y células (Reinert et al., 1956).

En cualquiera de los suplementos mencionados hay que tener en cuenta su termolabilidad. La glutamina, la asparagina, la hipoxantina y el ácido ascórbico deben considerarse termolábiles en cualquier experimento; es decir, deberán esterilizarse por filtración y añadirse separadamente al medio enfriado, teniendo las precauciones adecuadas para mantener la esterilidad. El pantotenato de calcio, la tiamina HCl, la riboflavina, y el triptófano también se encuentran afectados por el calor, aunque su degradación se considera leve.

Purinas y Pirimidinas

Generalmente se ha reconocido que la levadura, la malta y los extractos selectos de tejidos, al igual que el endosperma líquido, pueden suministrar purinas o pirimidinas. Del extracto del endosperma líquido del maíz se ha logrado el aislamiento masal de las purinas, adenina, adenosina, uracilo, xantina e isoguanina; éstas son activas separadamente o en combinación con otras fracciones del extracto de maíz (Shantz et al., 1964). Las purinas, la adenina y el uracilo también se han aislado, en forma cristalina, del AC.

Un trabajo anterior mostró que, generalmente, es posible aumentar levemente las propiedades estimuladoras del crecimiento del AC entera añadiendo adenina, adenosina o ácido adenílico. Los experimentos diseñados para determinar si la actividad de varios tipos de compuestos promotores del crecimiento se podía aumentar al combinarlos con una

Digitized by Google

mezcla general de purina, mostraron que cantidades equimolares de adenina, guanina, ácido adenílico, guanosina, xantina, hipoxantina, adenosina y ácido guanílico no tenían un efecto promotor del crecimiento cuando se añadían al medio basal en concentraciones de 20 mg/litro.

Al añadir la mezcla de purina a los compuestos estimuladores (difenilurea, *Aesculus*-leucoantocianina, ácido indol-3-acético, y ácido benzotiazolil-2-oxiacético) tampoco se aumentó de manera significativa la respuesta del crecimiento, a excepción de la correspondiente al ácido benzotiazolil-2-oxiacético. Con este último la mezcla de purina parecía ser significativamente sinergística, aunque en presencia de la CH este efecto desapareció notoriamente.

Por lo tanto, aunque parece que no hay razón para pensar que cualquiera de los promotores específicos de la división celular corresponden directamente a cualquiera de las purinas libres o a las sustancias relacionadas con las pirimidinas que ocurren naturalmente, es dogma corriente que las sustancias asociadas con el metabolismo del ácido nucleico pueden, al menos, ser limitantes, y que por tanto se puede requerir su suministro para asegurar el crecimiento de los cultivos.

Sería razonable añadir ciertos precursores como el ácido orótico, la glicina y los compuestos de amonio. Igualmente, pueden ensayarse los derivados del ácido nucleico o análogos suyos como la KIN (6-furfurilaminopurina, 6-anilinopurina, 6-succinilaminopurina), o sustancias comprometidas en la biosíntesis del ácido nucleico (por ejemplo, el ácido nicotínico o el ácido fólico) en casos especiales en que los tejidos son recalcitrantes.

El Cuadro 3.6 da la composición de tres soluciones de tales compuestos, ideadas de manera arbitraria. Se han elaborado como soluciones madre 10X en agua destilada, para usarlas en concentraciones de 1, 10 y 50 ml de solución por litro de medio basal.

En algunos casos no se observa un beneficio aparente al añadir cualquiera de los suplementos por separado o en combinación; en otros casos parece presentarse un efecto tóxico que se manifiesta por el oscurecimiento de los tejidos, y en otros casos se observa un efecto benéfico. Por consiguiente, pueden existir casos en los que combinaciones sutiles de los compuestos presentados en el Cuadro 3.6 (lo que llamamos nuestro 'coctel purina-pirimidina') resulten benéficas, pero siempre y cuando se añadan en cantidades extremadamente diluidas.

Digitized by Google

Cuadro 3.6. Mezclas de purinas y pirimidinas[a] que se pueden añadir a los medios de cultivo.

Solución A		**Solución B**	
Componentes	Contenido (mg/litro)	Componentes	Contenido (mg/litro)
Hipoxantina	25.00	Acido 5-metildesoxicitidílico	0.10
Adenosina	10.00	Acido orótico	5.00
Citocina	10.00	Acido citidílico	2.00
Uridina	0.20	Acido guanílico	5.00
Uracilo	5.00	Acido adenílico	2.00
Xantina	5.00	Acido desoxiadenílico	0.20
Guanosina	1.00	Acido desoxicitidílico	0.02
Desoxinosina	0.10	Acido desoxiguanílico	0.20

Solución C	
Componentes	Contenido (mg/litro)
Cloruro de colina	10.00
Sulfato de citidina	0.5
5-metilcitocina	0.1
5-metildesoxicitidina-HCl	0.1
Timidilato de calcio	5.0

a. Pueden elaborarse como soluciones 10X en agua destilada y emplearse solas o en combinación, usando concentraciones de 1, 10 y 50 ml por litro de medio basal. Todas las soluciones se esterilizan por filtración.

Auxinas, Citocininas y Otros Reguladores del Crecimiento

Se sabe que las líneas habituadas y los tumores son capaces de proliferar en un medio compuesto estrictamente de sales inorgánicas, una fuente de carbono y una o dos vitaminas. Por otra parte, hay una gran cantidad de tejidos que no crecen en este medio mínimo; estos últimos tejidos, que se supone son 'normales', sólo crecerán cuando se les suministre alguna sustancia reguladora del crecimiento. Las sustancias reguladoras se pueden suministrar en forma de endospermas líquidos como el AC o de compuestos químicos más definidos.

En el trabajo de cultivo de tejidos, el uso de promotores del crecimiento naturales y sintéticos está bien documentado. No se pretende revisar esta literatura tan voluminosa (Steward et al., 1971; Abeles, 1973; Crozier, 1981; Addicott, 1983; Nickell, 1983; Scott, 1984; MacMillan, 1984); sin

Digitized by Google

embargo, se harán algunas consideraciones generales sobre las diversas clases de sustancias promotoras del crecimiento que se han encontrado útiles para el establecimiento y mantenimiento de cultivos de tejidos.

Auxinas

Las auxinas comprenden una gran familia de sustancias que tienen en común la capacidad de producir un agrandamiento y alargamiento celular; sin embargo, se ha encontrado al mismo tiempo que promueven la división celular en el cultivo de tejidos.

Existen varias auxinas llamadas 'naturales', que incluyen AIA, indol-3-acetonitrilo, etilindol-3-acetato, indol-3-carboxialdehido, indol-3-acetaldehido, indol-3-acetamida, ácido indol-3-carboxílico, ácido indol-3-propiónico, ácido 5-hidroxiindol-3-acético, ácido indol-3-acetilaspártico, y otras; es probable que, a medida que se realicen más investigaciones, se descubran más sustancias de esta naturaleza. De las auxinas 'naturales', el AIA es el compuesto de mayor utilización (Scott, 1984).

También se utiliza ampliamente un buen número de sustancias que provocan un efecto fisiológico similar y que se han producido sintéticamente; son las llamadas 'auxinas sintéticas', entre las cuales el 2,4-D, el ANA y el AIB se encuentran ampliamente disponibles y se utilizan comúnmente. También existen muchos compuestos que son derivados de los ácidos fenilacético o fenoxiacético (clorosustituidos) y han encontrado una amplia utilización.

En la práctica, el uso de las auxinas es un arte. No es posible establecer una concentración particular de la auxina que se debe utilizar en un solo caso. Sin embargo, en general se utiliza el AIA en concentraciones que varían de 0.001 a 10 mg/litro, con un punto óptimo alrededor de 0.1 a 1 mg/litro; el 2,4-D se utiliza en concentraciones que varían de 0.1 a 10 mg/litro, con un punto óptimo que frecuentemente se encuentra alrededor de 1 a 5 mg/litro; el ANA generalmente se utiliza en concentraciones levemente mayores (1 a 10 mg/litro), con un punto óptimo cerca de 2 mg/litro.

Cabe mencionar que existe una gran cantidad de literatura sobre las concentraciones adecuadas de auxinas que pueden ser necesarias para iniciar el cultivo de tejidos o de células de una determinada especie de planta (Durbin, 1979; Pierik, 1979; Evans et al., 1983; Sharp et al., 1984; Ammirato et al., 1984).

Digitized by Google

A menudo es necesaria una concentración de auxinas sustancialmente menor para mantener los cultivos. Uno de los mejores ejemplos que se conocen de un cambio nominalmente 'permanente', en relación con el requerimiento de auxina en los tejidos cultivados, es el de la 'habituación' a esta sustancia; en esta situación, tejidos que originalmente requerían un suministro exógeno de auxina para el crecimiento, pierden gradualmente este requerimiento (Gautheret, 1955; 1959). Lo mismo se aplica a las citocininas (Meins et al., 1978).

Steward et al. (1955) encontraron que el ácido benzotiazol-2-oxiacético (BTOA) es muy activo en la estimulación de la división celular en tejidos tanto de raíz de zanahoria como del tubérculo de alcachofa de Jerusalén (*Helianthus tuberosus*). El BTOA incluso sobrepasó la actividad del AC entera cuando se aplicó a explantes de la alcachofa de Jerusalén en un medio con agar.

Desde esa primera observación, el BTOA se ha ensayado rutinariamente para establecer nuevos cultivos, en concentraciones que varían de 0.4 mg/litro a unos 10 mg/litro (con su punto óptimo alrededor de 2 a 5 mg/litro). El BTOA nunca ha mostrado un efecto realmente sinergístico con el AC, como es el caso de 2,4-D o de ANA, pero en algunos casos puede promover un mejor crecimiento en presencia del AC.

Generalmente sólo se utiliza una auxina cada vez. Sin embargo, para algunos investigadores (Mahlberg, 1959) ocasionalmente ha sido útil el uso simultáneo de 2,4-D y ANA, por ejemplo, para el crecimiento de cultivos de *Euphorbia marginata*. Ya que varias auxinas parecen tener diferentes sitios de acción, en ciertos casos podría ser conveniente ensayarlas, incluso en combinaciones más extensivas.

En algunos casos, la adición de una de las auxinas al medio basal puede ser suficiente para iniciar y sustentar el crecimiento. Sin embargo, desde hace mucho tiempo se sabe que se puede obtener un efecto sinergístico entre una auxina y los factores de crecimiento como los encontrados en el AC (Steward et al., 1951). Por lo tanto, en la práctica sería deseable, por lo menos al principio cuando se está tratando de iniciar nuevos cultivos, contar con una serie de tratamientos con AC y otros sin esta sustancia.

Citocininas y sustancias similares

Skoog et al. (1955) propusieron el término cinina como un nombre genérico para sustancias naturales y sintéticas que presentaban los mismos tipos de actividad biológica que la KIN (6-furfuril-aminopurina) (Miller et

Digitized by Google

al., 1956). Con el fin de evitar confusión con el término cinina, según se utiliza en los sistemas animales, un poco más tarde se adoptó la palabra citocinina para designar las sustancias de división celular.

La KIN ha recibido mucha atención como una sustancia estimuladora de la división celular; no se ha demostrado que esté presente como un compuesto natural y generalmente se reconoce como un artefacto. Desde el aislamiento de la KIN, en 1955, se han aislado varias sustancias a partir de preparaciones de ADN, las cuales ocurren naturalmente y están relacionadas con la KIN. Actualmente comprenden la sustancia más conocida de división celular, sustancias promotoras, y las adenilcitocininas. La ZEA (6-[4-hidroxi- ε -metil but-trans-2-enilamino] purina) se considera generalmente como el prototipo de las adenilcitocininas que ocurren naturalmente; es unas 10 veces más potente que la KIN.

Otra citocinina sintética, el BAP, se utiliza actualmente tal vez más que la KIN o la ZEA. Es un compuesto muy activo y se encuentra disponible fácilmente, a un costo más o menos razonable. Cuando se las ensayó en los sistemas del bioensayo de zanahoria y de médula de tabaco, los resultados con estas citocininas indicaron que la KIN y otras adenilcitocininas sólo tienen actividad en presencia de una auxina como AIA. En el bioensayo de zanahoria, generalmente, su actividad es pequeña comparada con el AC entera; en el tejido de alcachofa de Jerusalén, su actividad es insignificante. Sin embargo, todavía se han encontrado otras sustancias relacionadas con la azacinetina, que tienen una notable capacidad para simular el efecto del AC en tejidos de zanahoria, cuando se utilizan en presencia tanto de AIA como de CH.

En una serie de experimentos diseñados para ensayar veinte purinas sustituidas en N6-, ninguno de los compuestos mostró una actividad pronunciada en ausencia de AIA; cuando se ensayaron en combinación con 0.5 mg/litro de AIA, varios de los compuestos fueron extremadamente activos a concentraciones tan bajas como 0.01 mg/litro. Basándose en el incremento de peso fresco, se determinó que seis de estas sustancias podían clasificarse como altamente activas, con respuestas en presencia de AIA que variaban de 50 a 100% del crecimiento de los testigos con AC.

Estos compuestos altamente activos fueron: 6-anilinopurina, 6-m-cloroanilinopurina, 6-butilaminopurina, 6-hexilaminopurina, 6-cloro-hexil-metilaminopurina y 6-(3-fenoxi-propil)-aminopurina. La mayoría de los compuestos restantes mostraron una actividad leve pero significativa.

Digitized by Google

Aunque se encontró que la KIN, la ZEA, o la BAP eran necesarias para el crecimiento de tejidos escindidos de médula de tabaco, se ha encontrado que las células de tabaco crecen más vigorosamente en presencia de AC. En general, y según la experiencia del autor al utilizar la zanahoria, no se ha encontrado que las citocininas tengan ningún efecto diferente al de la AC, en relación con las propiedades estimuladoras del crecimiento; en realidad, las citocininas tienen un efecto débil o incluso inhibidor en algunos clones. Cuando se usa la KIN en concentraciones de alrededor de 0.1 a 2.0 mg/litro, generalmente se añade AIA y 6-anilinopurina en concentraciones que varían de 0.1 a 1 mg/litro del primero y 0.5 a 1 mg/litro del segundo componente. La ZEA y la BAP se utilizan generalmente a niveles similares; la ZEA se utiliza con más frecuencia a niveles más bajos, ya que es bastante activa.

Giberelinas

Luego de su aislamiento a partir del hongo *Gibberella fujikuroi*, el ácido giberélico (AG) se convirtió en un tema de intensa investigación, aunque la adición de este compuesto a los medios de cultivo de tejidos ha sido ocasional a pesar de sus efectos fisiológicos tan amplios. Se sabe que hay varias giberelinas, relacionadas con el AG, que son productos complejos del metabolismo del hongo o de plantas superiores, y que son capaces de intervenir en el crecimiento de muchas plantas ocasionando especialmente un alargamiento celular, que de otra forma no ocurriría (Crosier, 1981; MacMillan, 1984). Particularmente, éste es el caso cuando se aplica AG a plantas genéticamente enanas, y en este aspecto las giberelinas difieren de las auxinas.

Cuando se ensaya el AG en el sistema de bioensayo de la zanahoria, estimula la división celular en lugar de producir alargamiento, especialmente en presencia de CH. También se encontró en el bioensayo de zanahoria que el AG se comporta en una forma similar a la 'fracción activa' del AC, aunque cuantitativamente menor, a pesar de que dicha fracción no contiene AG. Incluso en presencia de la 'fracción activa', el AG induce algunas divisiones celulares; puede, de hecho, acentuar el efecto de tal fracción, para que cuando se use en combinación produzca muchas más células pequeñas que cualquier sustancia que actúe por sí sola.

Se ha publicado (Steward et al., 1964) una evaluación de algunas giberelinas en cultivos de zanahoria. Ya que el AG se encuentra muy disponible y ha mostrado ser bastante activo, generalmente es el que se utiliza cuando se desea usar una giberelina; la concentración varía entre 0.01 a 1 mg/litro con un punto óptimo alrededor de 0.1 mg/litro. Schroeder et al. (1957)

Digitized by Google

encontraron que el AG (25 mg/litro) en combinación con el AIA (1 mg/litro) estimulaba la formación de callo en tejidos escindidos del mesocarpo del fruto del limón maduro (*Citrus medica*).

En la mayoría de los cultivos, los niveles de AG superiores a 1.0 mg/litro son tóxicos; por ejemplo, Blakely (1963) encontró que el AG era tóxico para los cultivos de *Haplopappus*. En resumen, las giberelinas deberían utilizarse en bajos niveles y con cautela; son termolábiles y deberían esterilizarse con filtros (van Bragt et al., 1971a).

Compuestos Polifenólicos

En la etapa apropiada de desarrollo, tanto el endosperma sólido como el líquido de los frutos inmaduros de *Aesculus woerlitzensis* (Hippocastanaceae) producen extractos promotores del crecimiento (List et al., 1965). Los extractos de las dos regiones morfológicas deben sus propiedades promotoras del crecimiento a dos tipos de sustancias diferentes.

El endosperma más sólido se distingue porque contiene cantidades relativamente grandes de sustancias complejas que pertenecen al grupo de las leucoantocianinas; aunque no son tan activas como las sustancias del endosperma líquido, en la composición global pueden representar una actividad promotora del crecimiento muy potente. Todas las características químicas de estas sustancias, que son difíciles de purificar y no se han obtenido en forma cristalina, son consistentes con las fórmulas químicas publicadas (Steward et al., 1972).

Una vez establecido que estos compuestos promueven el crecimiento, se ensayaron un gran número de otras preparaciones de leucoantocianina, o de sus productos hidrolíticos. En un gran número de casos, las sustancias polifenólicas muestran alguna actividad en la promoción de la división celular en el sistema de ensayo de la zanahoria. Parece que se requiere un monoglucósido para un máximo de actividad, y que esta sustancia debe existir en la forma leuco, ya que la antocianina coloreada y la cianidina son relativamente inactivas.

Puesto que sería demasiado largo discutir todos los resultados acumulados de estas pruebas a través de los años, a continuación se presenta un resumen de los principales de ellos.

De un total de 166 pruebas con 63 compuestos, 123 dieron una respuesta positiva, mientras que 40 no dieron respuesta o fueron negativos. El incremento promedio en el peso fresco total sobre los testigos fue de 26%.

Digitized by Google

Sin embargo, se observó un efecto más significativo cuando las sustancias de las pruebas se clasificaron en compuestos sintéticos y preparaciones de fuentes naturales. En 46 pruebas, con 21 compuestos polifenólicos sintéticos diferentes, la respuesta total del crecimiento promedio fue de -0.3% en comparación con los testigos; en 120 pruebas con preparaciones de fuentes naturales, la respuesta promedio total fue de +37% sobre la de los testigos. Parece que las sustancias de esta naturaleza general que ocurren naturalmente (leucoantocianinas, catecoles, ácido colinérgico) pueden desempeñar un papel pequeño pero significativo en la estimulación del crecimiento en los tejidos de explantes, mediante la división celular (Nitsch et al., 1962; Lee et al., 1965; Paulet, 1970).

En resumen, existe una lógica bien documentada tras el uso de los compuestos polifenólicos en los medios de cultivo de tejidos, medios que pueden ensayarse en ciertos casos en que los tejidos son particularmente recalcitrantes. Ya que con el uso individual de estas sustancias se obtiene poco efecto por encima del esperado con el endosperma líquido de *Aesculus*, generalmente es más conveniente utilizar este último extracto.

Aunque lo dicho se relaciona predominantemente con endospermas líquidos como el de *Aesculus woerlitzensis*, las generalidades y especificidades deberían ser válidas para las sustancias de otros líquidos que se encuentran en forma natural. En realidad, se puede anticipar que los investigadores en los trópicos y subtrópicos tendrán acceso a una amplia gama de líquidos estimuladores del crecimiento que son de origen novedoso, distintivo o incluso morfológicamente único (Steward et al., 1959; Shantz, 1966).

Otras Observaciones

Relaciones entre los componentes del medio. A menudo es difícil ver las relaciones estructurales entre los varios compuestos químicos que poseen una actividad fisiológica, según se ha encontrado en pruebas de crecimiento ampliamente diferentes; el hecho de que tales compuestos puedan funcionar en algunos casos sugiere que se ensayen por lo menos en casos difíciles.

La mayor parte del trabajo realizado sobre cultivo de tejidos ha girado alrededor del uso del AC en presencia o en ausencia de AIA, ANA, 2,4-D o BTOA. En los casos en que los tejidos son especialmente recalcitrantes, se debería ensayar también una amplia gama de otros compuestos conocidos por sus propiedades estimuladoras del crecimiento.

Digitized by Google

El pH y otras condiciones del cultivo. Narayanaswamy et al. (1964) y Raghavan (1966; 1976) han revisado exhaustivamente la literatura en relación con los efectos del pH del medio, de la temperatura y la luz y de los gases en cultivos de embriones; lo mismo se aplica también a los cultivos de células y tejidos. Es suficiente decir que una especie particular puede reaccionar favorablemente a un conjunto de condiciones mientras que otras pueden no hacerlo; por consiguiente, la tarea de decidir las condiciones de cultivo adecuadas puede requerir, en algunos casos, una decisión por el método de ensayo y error (Seibert et al., 1980; Martín, 1980).

Aunque generalmente se supone que los cultivos de tejidos de plantas pueden sobrevivir en un amplio rango de pH, Steward et al. (1952b), encontraron que un medio levemente ácido (pH 6.25) era óptimo para los cultivos de zanahoria. Los pH iniciales de la mayoría de los medios son generalmente de 4.0 a 5.5, en ausencia de varios suplementos de crecimiento. En la mayoría de los casos se requerirá ajustar el pH, aumentándolo con una solución 0.01 ó 0.1 N de hidróxido de potasio o de sodio; normalmente, el ajuste del pH se hace a 5.5, 5.8 ó 6.3. Las orquídeas generalmente se desempeñan mejor en un medio levemente más ácido (Arditti, 1977).

Referencias

Abeles, F. B. 1973. Ethylene in plant biology. Academic Press, Nueva York.

Addicott, F. T. (ed.). 1983. Abscicic acid. Praeger Publishers, Nueva York.

Ammirato, P. V.; Evans, D. A.; Sharp, W. R. y Yamada, Y. (eds.). 1984. Handbook of plant cell culture; 3: Crop species. MacMillan Publishing, Nueva York.

Arditti, J. 1966. The effect of tomato juice and its fractions on the germination of orchid seeds and on seedling growth. American Orchid Society Bulletin 35(3):175-182.

———. 1977. Clonal propagation of orchids by means of tissue culture: A manual. En: Arditti, J. (ed.). Orchid biology; 1: Reviews and perspectives. Cornell University Press, Nueva York. p. 203-293.

Ball, E. 1946. Development in sterile culture of stem tips and subadjacent regions of *Tropaeolum majus* L. and of *Lupinus albus* L. Am. J. Bot. 33:301-318.

Bidwell, R. G. S.; Barr, R. A. y Steward, F. C. 1964. Protein synthesis and the fate of the protein breakdown products. Nature 203:367-373.

Digitized by Google

Blakeley, L. M. 1963. Growth and variation of cultured plant cells. Tesis (Ph.D.). Cornell University, Ann Arbor, Michigan.

Braun, A. C. y Wood, H. N. 1962. On the activation of certain essential biosynthetic systems in cells of *Vinca rosea* L. Proc. Nat. Acad. Sci. 48:1776-1782.

Caplin, S. M. y Steward, F. C. 1948. Effect of coconut milk on the growth of explants from carrot root. Science 108:655-657.

Crozier, A. 1981. Aspects of metabolism and physiology of gibberellins. Adv. Bot. Res. 9:33-149.

De Fossard, R. A. 1984. Tissue culture for plant propagators. 2 ed. University of New England, Department of Botany, Armidale, Australia.

Dougall, D. K. 1972. Cultivation of plant cells. En: Rothblat, G. H. y Cristofalo, J. (eds.). Growth, nutrition and metabolism of cells in culture. Academic Press, Nueva York. p. 371-406.

Durbin, R. D. (ed.) 1979. *Nicotiana*, procedures for experimental use. Technical bulletin 1586. U.S. Department of Agriculture, Beltsville, Maryland, E.U.

Durzan, D. J. y Steward, F. C. 1983. Nitrogen metabolism. En: Steward, F. C. y Bidwell, R. G. S. (eds.). Plant physiology: A treatise. Academic Press, Nueva York. v. 8, p. 55-265.

Eskew, D. L.; Welch, R. M. y Cary, E. E. 1984. Nickel: An essential micronutrient for legumes and possibly all higher plants. Science 222:621-623.

Evans, D. A.; Sharp, W. R.; Ammirato, P. V. y Yamada, Y. (eds.). 1983. Handbook of plant cell culture; 1: Techniques and applications. MacMillan Publishing, Nueva York.

Gamborg, O. L.; Murashige, T.; Thorpe, T. A. y Vasil, I. K. 1976. Plant tissue culture media. In vitro 12:473-478.

Gautheret, R. J. 1955. The nutrition of plant tissue cultures. Ann. Rev. Plant Physiol. 6:433-484.

———. 1959. La culture des tissus végétaux. Masson, París.

George, E. F. y Sherrington, P. D. 1984. Plant propagation by tissue culture: Handbook and directory of commercial operations. Exegetisa, Eversley, Inglaterra.

Heller, R. 1954. Les besoins mineraux des tissus en culture. Année Biolog. 30:260-281.

Hewitt, E. J. 1966. Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. 2 ed. Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, Bucks, Inglaterra.

Digitized by Google

Kruse, P. F. y Patterson, M. K. (eds.). 1973. Tissue culture: Methods and applications. Academic Press, Nueva York.

Lauchli, A. y Bieleski, R. L. (eds.). 1983. Inorganic plant nutrition. Encyclopedia of plant physiology, new series. Springer-Verlag, Nueva York. v. 15, A y B.

Lee, T. T. y Skoog, F. 1965. Effects of substituted phenols on bud formation and growth of tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 18:386-402.

Letham, D. S. 1958. Cultivation of apple-fruit tissue in vitro. Nature 182:473-474.

———. 1960. Growth requirements of some pome fruit tissues. Nature 188:425-426.

———. 1974. Regulators of cell division in plant tissues; 20: The cytokinins of coconut milk. Physiol. Plant. 2:66-70.

———; Goodwin, P. B. y Higgins, T. J. V. (eds.). 1978. Phytohormones and related compounds: A comprehensive treatise; 2: Phytohormones and the development of higher plants. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Nueva York.

Lin, M. y Staba, E. J. 1962. Peppermint and spearmint tissue cultures; 1: Callus formation and submerged culture. Lloydia 24:139-145.

Linsmaier, E. M. y Skoog, F. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 18:100-127.

List, A. y Steward, F. C. 1965. The nucellus, embryo sac, endosperm and embryo of *Aesculus* and their interdependence during growth. Ann. Bot. 29:1-15.

Lowenberg, J. R. y Skoog, F. 1952. Pine tissue cultures. Physiol. Plant. 5:33-36.

MacMillan, J. (ed.). 1984. Hormonal regulation of development; I: Molecular aspects of plant hormones. Encyclopedia of plant physiology, new series. Springer-Verlag, Nueva York. v. 9.

Mahlberg, P. G. 1959. Development of the non-articulated laticifer in proliferated embryos of *Euphorbia marginata* Pursh. Phytomorphology 9:156-162.

Martin, S. M. 1980. Environmental factors; B: Temperature, aeration and pH. En: Staba, E. J. (ed.). Plant tissue culture as a source of biochemicals. CRC Press, Boca Ratón, Florida, E.U. p. 143-148.

Meins, F. y Binns, A. N. 1978. Epigenetic variation in the requirement of plant cells for cytokinins. En: Subtelny, S. y Sussex, I. M. (eds.). The clonal basis of development: Symposium of the Society for Developmental Biology, 35th. Memorias. Academic Press, Nueva York. p. 185-201.

Miller, C. O.; Skoog, F.; Okamura, F. S.; von Saltza, M. H. y Strong, F. M. 1956. The isolation, structure and synthesis of kinetin, a substance promoting cell division. J. Am. Chem. Soc. 78:1375-1380.

Digitized by Google

Morel, G. y Wetmore, R. 1951. Tissue culture of monocotyledons. Amer. J. Bot. 38:138-140.

Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.

Murthy Reddy, K. B. S. y Narayana, R. 1973. Ragi malt, a growth factor for *Vigna sinensis* Endl. callus tissues. Plant Cell Physiol. 14:803-814.

Narayanaswamy, S. y Norstog, K. 1964. Plant embryo culture. Botan. Rev. 30:587-628.

Nickell, L. G. (ed.) 1983. Plant growth regulating chemicals. CRC Press, Boca Ratón, Florida, E.U.

Nitsch, J. P. 1951. Growth and development in vitro of excised ovaries. Amer. J. Bot. 38:566-577.

———. 1954. Action du jus de tomate sur la croissance de certains tissus et organes végétaux. Bull. Soc. Bot. France 101:433-440.

——— y Nitsch, C. 1957. Auxin-dependent growth of excised *Helianthus tuberosus* tissues; 2: Organic nitrogenous compounds. Amer. J. Bot. 44:550-564.

——— y ———. 1962. Composés phenoliques et croissance végétale. Ann. Physiol. Veg. 4:211-225.

——— y ———. 1969. Haploid plants from pollen grains. Science 163:85-87.

Paulet, P. 1970. Role des composés phenoliques dans l'organogénése: Mémoires 1970. Societé Botanique de France, p. 91-94.

Pierik, R. L. M. 1979. In vitro culture of higher plants: Bibliography. Kniphorst Scientific Bookshop, Wageningen, Holanda.

Pollard, J. K. 1962. The use of ^{14}C-labelled compounds in metabolic studies: Effects due to autoclaving ^{14}C-urea. En: Holden, J. T. (ed.). Amino acid pools. Elsevier Press, Amsterdam, Holanda. p. 69-70.

———; Shantz, E. M. y Steward, F. C. 1961. Hexitols in coconut milk: Their role in nurture of dividing cells. Plant Physiol. 36:492-501.

Raghavan, V. 1966. Nutrition, growth and morphogenesis of plant embryos. Biol. Rev. 41:1-58.

———. 1976. Experimental embryogenesis in vascular plants. Academic Press, Nueva York.

Rechcigl, M. (ed.). 1977. CRC handbook series in nutrition and food; G: Diets, culture media, food supplements; 4: Culture media for cells, organs and embryos. CRC Press, Cleveland, Ohio, E.U.

Digitized by Google

———. 1978. CRC handbook series in nutrition and food; G: Diets, culture media, food supplements; 3: Culture media for microorganisms and plants. CRC Press, Cleveland, Ohio, E.U.

Reinert, J. y White, P. R. 1956. The cultivation in vitro of tumor tissues and normal tissues of *Picea glauca*. Physiol. Plant. 9:177-189.

Risser, P. G. y White, P. R. 1964. Nutritional requirements of spruce tumor cells in vitro. Physiol. Plant. 17:620-635.

Sandstedt, R. y Skoog, F. 1960. Effects of amino acid components of yeast extract on the growth of tobacco tissues in vitro. Physiol. Plant. 13:250-256.

Saric, M. R. y Loughman, B. C. (eds.). 1983. Genetic aspects of plant nutrition. Martinus Nijhoff/W. Junk, La Haya, Holanda.

Schenk, R. U. y Hildebrandt, A. C. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Can. J. Bot. 50:199-204.

Schroeder, C. A. y Spector, C. 1957. Effect of gibberellic acid and indoleacetic acid on growth of excised fruit tissue. Science 126:701-702.

Scott, T. K. (ed.). 1984. Hormonal regulation of development; 2: The function of hormones from the level of the cell to the whole plant. Encyclopedia of plant physiology, new series. Springer-Verlag, Nueva York. v. 10.

Seibert, N. y Kadkade, P. G. 1980. Environmental factors; A: Light. En: Staba, E. J. (ed.). Plant tissue culture as a source of biochemicals. CRC Press, Boca Ratón, Florida, E.U. p. 123-141.

Shantz, E. M. 1966. Chemistry of naturally-occurring growth-regulatory substances. Ann. Rev. Pl. Physiol. 17:409-438.

——— y Steward, F. C. 1959. Investigations on growth and metabolism of plant cells; 7: Sources of nitrogen for tissue cultures under optimal conditions for their growth. Ann. Bot. 23:371-390.

——— y ———. 1964. Growth promoting substances from the environment of the embryo; 2: The growth stimulating complexes of coconut milk, corn and *Aesculus* extracts. En: Nitsch, J. P. (ed.). Les régulateurs naturels de croissance végétale. Centre National de la Recherche Scientifique, París. p. 59-75.

Sharp, W. R.; Evans, D. A.; Ammirato, P. V. y Yamada, Y. (eds.). 1984. Handbook of plant cell culture; 2: Crop species. MacMillan Publishing, Nueva York.

Singh, M. y Krikorian, A. D. 1980. Related iron in culture media. Ann. Bot. 46:807-809.

——— y ———. 1981. White's standard nutrient solution. Ann. Bot. 47:133-139.

Digitized by Google

Skoog, F. y Miller, C. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. Symp. Soc. Exp. Biol. 11:118-131.

Steward, F. C. y Bleichert, E. F. 1972. Partial and complete growth promoting systems for cultured carrot explants: Synergistic and inhibitory interactions. En: Carr, D. J. (ed.). Plant growth substances. Springer-Verlag, Berlín. p. 668-678.

——— y Caplin, S. M. 1951. A tissue culture from potato tuber: The synergistic action of 2,4-D and coconut milk. Science 113:518-520.

——— y ———. 1952. Investigations on growth and metabolism of plant cells; 4: Evidence on the role of the coconut-milk factor in development. Ann. Bot. 16:491-504.

——— y ———. 1954. The growth of carrot tissue explants and its relation to the growth factors present in coconut milk; 1: The development of the quantitative method and the factors affecting the growth of carrot tissue explants. Année Biologique 30:385-394.

———; ——— y Millar, F. K. 1952. Investigations on growth and metabolism of plant cells; 1: New techniques for the investigation of metabolism, nutrition, and growth in undifferentiated cells. Ann. Bot. 16:57-77.

——— y Krikorian, A. D. 1971. Plants, chemicals and growth. Academic Press, Nueva York.

———; Neumann, K. H. y Rao, K. V. N. 1968. Investigations on the growth and metabolism of cultured explants of *Daucus carota*; II: Effects of iron, molybdenum and manganese on metabolism. Planta (Berlín) 81:351-371.

———; Pollard, J. K.; Patchett, A. A. y Witkop, B. 1958. The effects of selected nitrogen compounds on the growth of plant tissue cultures. Biochem. Biophys. Acta 28:308-317.

——— y Shantz, E. M. 1954. The growth of carrot tissue explants and its relation to the growth factors in coconut milk; 2: The growth-promoting properties of coconut milk for plant tissue cultures. Année Biol. 30:399-415.

——— y ———. 1955. The chemical nature of growth-promoting substances in coconut milk and similar fluids: The present position. En: Wain, R. L. y Wightman, F. (eds.). The chemistry and mode of action of growth substances. Butterworths, Londres. p. 173-186.

——— y ———. 1959. The chemical regulation of growth: Some substances and extracts which induce growth and morphogenesis. Ann. Rev. Pl. Physiol. 10:379-404.

———; ———; Mapes, M. O.; Kent, A. E. y Holsten, R. D. 1964. The growth-promotion substances from the environment of the embryo; 1: The criteria and measurements of growth-promoting activity and the responses induced.

Digitized by Google

En: Nitsch, J. P. (ed.). Les régulateurs naturels de la croissance végétale. CNRS Colloque International 123. Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), París. p. 45-58.

Street, H. E. (ed.). 1977. Plant tissue and cell culture. 2 ed. Botanical monographs. University of California Press, Los Angeles, E.U. v. 2.

Thorpe, T. A. (ed.). 1981. Plant tissue culture, methods and application in agriculture: Proceedings of a symposium based on the UNESCO training course on plant tissue cultures, São Paulo, Brasil, 1978. Memorias. Academic Press, Nueva York.

Vacin, E. F. y Went, F. W. 1949. Use of tomato juice in the asymbiotic germination of orchid seeds. Botan. Gaz. 111:175-183.

Van Bragt, J. y Pierik, R. L. M. 1971a. The effect of autoclaving on the gibberellin activity of aqueous solutions containing gibberellin A3. Misc. Papers Landbouwhogeschool Wageningen 9:133-137.

———; Mossel, D. A. A.; Pierik, R. L. M. y Veldstra, H. 1971b. Effects of sterilization on components in nutrient media. Misc. Papers Landbouwhogeschool Wageningen 9:1-147.

Van Overbeek, J. 1942. Hormonal control of embryo and seedling growth. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 10:126-134.

———; Conklin, M. E. y Blakeslee, A. F. 1942. Cultivation in vitro of small *Datura* embryos. Amer. J. Bot. 29:472-477.

Van Staden, J. y Drewes, S. E. 1974. Identification of cell division inducing compounds from coconut milk. Physiol. Plant. 32:347-352.

——— y ———. 1975. Isolation and identification of zeatin from malt extract. Plant Sci. Letters 4:391-394.

Vasil, I. K. (ed.). 1984. Cell culture and somatic cell genetics of plants; 1: Laboratory procedures and applications. Academic Press, Nueva York.

———. 1985. Cell culture and somatic cell genetics of plants; 2: Growth, nutrition and preservation. Academic Press, Nueva York.

———. 1986. Cell culture and somatic cell genetics; 3: Plant regeneration and genetic variability. Academic Press, Nueva York.

Waris, H. 1962. Neomorphosis in seed plants induced by amino acids. Physiol. Plant. 15:736-752.

White, P. R. 1939. Glycine in the nutrition of excised tomato roots. Plant Physiol. 14:527-538.

Digitized by Google

Capítulo 4

Agentes gelatinizadores en el cultivo de tejidos

L. Szabados*
V. M. Núñez**
L. M. Tello***
G. Mafla***
J. Roa***
W. M. Roca***

* Unidad de Investigación en Biotecnología (UIB), Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. Dirección actual: Biological Research Center, Institute of Plant Physiology, Szeged, Hungría.
** Department of Agronomy and Plant Genetics, St. Paul, Minnesota, E. U.
*** Unidad de Investigación en Biotecnología (UIB), Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia.

Digitized by Google

Introducción

El éxito del cultivo de tejidos vegetales depende sustancialmente del medio de cultivo empleado. Para establecer un sistema de cultivo de tejidos, se elabora primero un medio de cultivo óptimo que se ajuste a los principales requerimientos nutricionales de la especie vegetal, al tipo de explante, y al sistema de cultivo. La efectividad de un cultivo depende tanto de los ingredientes básicos —nutrimentos, azúcar y hormonas—como del agente gelatinizador (Romberger y Tabor, 1971; Bending, 1974; Lorz et al., 1983).

El agar comercial contiene muchas impurezas que pueden alterar las características químicas y físicas del medio, afectando así directamente los tejidos y células cultivados (Kohlembach y Wernicke, 1978; Singha et al., 1985).

Se han sugerido varias alternativas para el agar en el cultivo de tejidos. Los agentes gelatinizadores propuestos para el cultivo de protoplastos son, p. ej., agarosa (Lorz et al., 1983; Adams y Townsend, 1983; Shillito et al., 1983; Thompson et al., 1986), alginato (Adaoha-Mbanaso y Roscoe, 1982), y gelrita (en inglés, Gelrite) (Szabados y Roca, 1986). En el cultivo de anteras de arroz, un medio líquido resultó mucho mejor que el medio sólido de agar (Sunderland y Roberts, 1979; Wernicke y Kohlembach, 1976). El algodón como soporte en medio líquido afectó especialmente el crecimiento y el endurecimiento in vitro de las plantas, en comparación con el agar (Sakina, 1984). El medio líquido suele usarse cuando el agar se considera una limitación en algunos sistemas de cultivo (Kohlembach y Wernicke, 1978; Lee et al., 1986).

Estos resultados indican que el tipo y la concentración de los agentes gelatinizadores pueden afectar sustancialmente la efectividad de varios cultivos de tejidos y sistemas de cultivo como la micropropagación, la inducción de raíces, el cultivo de protoplastos, y el cultivo de anteras.

Se investigó el efecto que varios agentes gelatinizadores tenían en el éxito de los siguientes cultivos de tejidos y de células: la iniciación del cultivo de meristemas; la micropropagación, la sobrevivencia y el crecimiento del callo; la regeneración de callos derivados del cultivo de anteras; y la eficiencia del 'plaqueo' en los cultivos de suspensión celular y en las colonias derivadas de protoplastos. Se halló que la gelrita (Kelco Div. de Merck & Co.) es un agente gelatinizador efectivo para solidificar los medios de cultivo de tejidos en los sistemas ensayados y en las especies estudiadas: estilosantes o 'stylo' (*Stylosanthes guianensis*), yuca (*Manihot esculenta*), y arroz (*Oryza sativa*).

Digitized by Google

Stylosanthes

Cultivos de callos y de suspensiones celulares

Se hicieron cultivos de callos y de suspensiones celulares de *S. guianensis*, accesiones CIAT 136 y CIAT 184, y se establecieron según los procedimientos descritos anteriormente (Meijer y Broughton, 1981; Meijer y Steinbiss, 1983; Szabados y Roca, 1986). Los cultivos de callos derivados de hojas se iniciaron y mantuvieron en medios de inducción de callo (Medio MD-A), bajo 12 horas de iluminación diaria (3000 lux de tubos fluorescentes Sylvania). El medio de inducción de callo contenía sales MS (Murashige y Skoog, 1962) y vitaminas B5 (Gamborg et al., 1968), y fue complementado con 1 mg/litro de ANA y 1 mg/litro de BAP, y solidificado con agar Difco al 0.7%, a menos que se especifique otro contenido. Los cultivos de suspensión de células provenían de callos friables y se mantuvieron en un medio líquido MS-A, con agitación continua (12 rpm). Para el plaqueo de los cultivos de suspensión celular, se mezcló 1 ml de esa suspensión (de dos días de edad) con 9 ml del medio sólido MS-A, previamente derretido a 40 °C, y la mezcla se trasfirió de inmediato a cajas Petri. Se registró el número de colonias celulares en desarrollo en las cajas Petri y la eficiencia de plaqueo se calculó 3 semanas después de la siembra en placa.

Regeneración de plantas

Trozos de callo de 3 a 5 mm de *S. guianensis* de 30 días de edad se trasfirieron a un medio de regeneración MS-B sólido (Meijer y Broughton, 1981) y se cultivaron en las mismas condiciones de cultivo que los callos. Este medio de regeneración contenía sales MS, vitaminas B5, y 1 mg/litro de BAP, y fue solidificado con agar al 0.7%, a menos que se indique otra cosa. Se contó el número de callos que formaron brotes, y la frecuencia de regeneración se calculó después de 30 días de incubación.

Cultivo de protoplastos

Los protoplastos de *S. guianensis* CIAT 136 se aislaron del mesófilo foliar de plantas germinadas in vitro. Los protoplastos aislados se cultivaron en un medio D2a líquido, en la oscuridad y a 27 °C, como se describió en Szabados y Roca (1986). Las colonias derivadas de protoplastos fueron trasferidas a un medio sólido 3 semanas después de la iniciación de los cultivos. Se contaron las colonias celulares en crecimiento y la eficiencia del plaqueo se calculó 3 semanas después de la siembra en placa.

Digitized by Google

Yuca

Cultivo de meristemas y micropropagación

Los cultivos de meristemas de yuca (*Manihot esculenta*) provenían de yemas apicales de plantas de dos variedades, M Col 22 y M Col 1505, cultivadas en invernadero. Después de la excisión, los meristemas de 0.2 mm se cultivaron en un medio de micropropagación estándar (Roca, 1984). Este medio contenía macronutrimentos y micronutrimentos MS junto con 1 mg/litro de tiamina-HCl, 100 mg/litro de m-inositol, 2% de sacarosa, 0.02 mg/litro de ANA, 0.05 mg/litro de BAP, y 0.05 mg/litro de AG_3. El medio se solidificó con agar Difco al 0.6%, a menos que se especifique otra cosa. Los cultivos de meristemas se desarrollaron en fotoperídos de 12 h (3000 lux de tubos fluorescentes Sylvania), a 28 °C durante el período de luz y a 25 °C durante el período de oscuridad. Las plantitas se micropropagaron mediante cortes nodales, cada 2 meses. Roca (1984) describe los procedimientos detallados para el cultivo de meristemas y para la micropropagación.

La evaluación de los cultivos de meristemas se basó en mediciones de peso fresco de plantitas regeneradas. La micropropagación se evaluó por el peso fresco y la longitud de los brotes, y por el número de nudos y raíces de las plantitas. Estas evaluaciones se hicieron en cultivos de 30 días.

Embriogénesis somática

La inducción de la embriogénesis somática se basó en procedimientos descritos anteriormente (Szabados et al., 1987). Se incubaron hojitas inmaduras de plantas propagadas in vitro en un medio de inducción, a 27 °C, en la oscuridad. El medio de inducción era un medio MS semisólido, complementado con 8 mg/litro de 2,4-D.

Arroz

Cultivo de anteras

La técnica del cultivo de anteras de arroz fue la de Nuñez et al. (1987). Anteras de cinco variedades de arroz (*Oryza sativa*) se sometieron inicialmente a un tratamiento frío en el medio de inducción (8 °C durante 10 días). Luego los cultivos se incubaron durante 5 semanas a 25 °C, en la

Digitized by Google

oscuridad. El medio de inducción contenía papa al 10%, 4 mg/litro de ANA, 1 mg/litro de KIN, y 5% de sacarosa. Después de 30 días, microcallos de un tamaño de 1 a 2 mm fueron trasferidos a un medio de regeneración e incubados bajo 16 horas de iluminación diaria (2500 lux de tubos fluorescentes Sylvania), a 25 °C. El medio de regeneración era MS semisólido, complementado con 1 mg/litro de ANA, 4 mg/litro de KIN, y 3% de sacarosa. La tasa de supervivencia de los callos trasferidos y la frecuencia de regeneración de plantas se evaluó después de 30 días de incubación en un medio de regeneración.

Preparación de Medios de Cultivo

Se utilizó casi siempre un medio basal MS (Murashige y Skoog, 1962) que contenía diferentes combinaciones de reguladores del crecimiento y de otros aditivos. Los agentes de solidificación se agregaron a los medios ya preparados antes de la esterilización de éstos. Se usaron los siguientes agentes gelatinizadores:

a: Bacto-agar (Difco), 0.7%;
a-3: Bacto-agar (Difco), 0.8%; purificado en tres lavados consecutivos de agua destilada;
as: Agarosa (Sigma, tipo VII), 0.6%;
ge: Gelrita (Gelrite, Kelco, Division of Merck), 0.12%;
li: Medio líquido, con soporte de algodón o de papel filtro.

Todos los medios fueron esterilizados en el autoclave durante 15 min, a 260 °C, y a 20 libras de presión.

Resultados

Crecimiento del callo de *Stylosanthes guianensis*

Los cultivos de callo procedían de trozos de hoja joven que se mantuvieron en un medio MS semisólido. Los aumentos de peso fresco y de peso seco se determinaron después de 30 días de crecimiento. Cuando se compararon varios agentes gelatinizadores, se detectaron diferencias notorias en el crecimiento del callo tanto en peso fresco como en peso seco. La gelrita y la agarosa resultaron ser significativamente superiores a cualquiera de los otros agentes gelatinizadores. El agar tres veces lavado propició un crecimiento mejor que el agar sin lavar, aunque no tan bueno como el obtenido con gelrita (Figura 4.1, A).

Digitized by Google

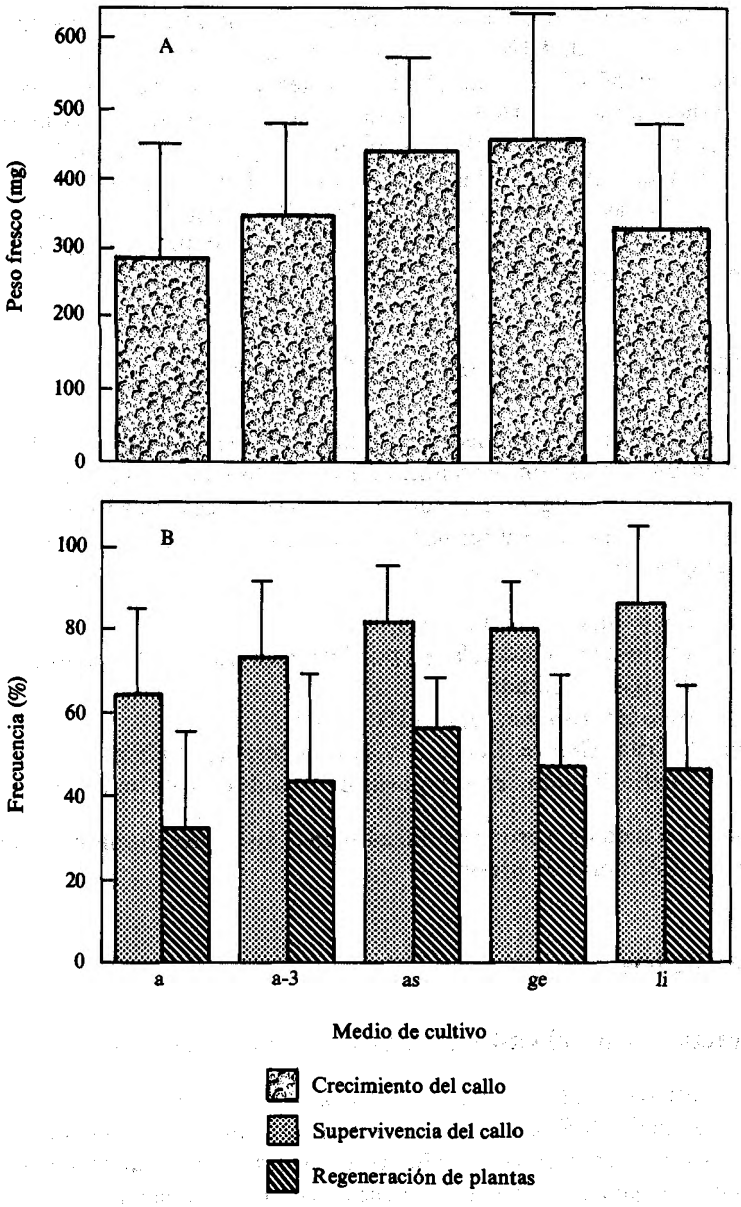


Figura 4.1. Efecto de varios agentes gelatinizadores en el crecimiento del callo de *S. guianensis* y en la regeneración de plantas de esa leguminosa. A) Incremento de peso fresco del callo después de 30 días de cultivo. B) Supervivencia del callo y porcentaje de regeneración de plantas. a = agar; a-3 = agar lavado tres veces; as = agarosa; ge = gelrita; li = medio líquido con soporte de algodón.

Digitized by Google

Regeneración de plantas de *S. guianensis*

La regeneración del callo de *S. guianensis* se indujo al trasferir trozos pequeños de callo a un medio MS semisólido. La agarosa, la gelrita y los medios líquidos se consideraron superiores al agar tanto para lograr la supervivencia del callo como para elevar la eficiencia de su regeneración (Figura 4.1, B).

Plaqueo de suspensiones celulares de *S. guianensis*

Cuando las suspensiones celulares finas y gruesas se aplicaban en placa, en medio sólido, la eficiencia del plaqueo de la suspensión gruesa fue siempre mayor que la de la suspensión fina. Sin embargo, la eficiencia de plaqueo de ambas suspensiones celulares fue afectada por el agente gelatinizador empleado. Con gelrita se obtuvo la eficiencia de plaqueo más alta, y con agar sin purificar de Difco la más baja. El agar comercial lavado produjo un aumento de la eficiencia de plaqueo similar al de la agarosa. El efecto favorable de la purificación del agar sugiere que la baja eficiencia del plaqueo obtenida con el agar comercial es causada, en parte, por las impurezas que éste contiene.

La gelrita fue siempre mejor que otros agentes solidificadores. Cuando se comparó con el agar, la gelrita cuadruplicó la eficiencia de plaqueo de la suspensión celular fina y elevó en 4% la de la suspensión celular gruesa (Figura 4.2, A). El efecto de diferentes agentes gelatinizadores fue siempre más notorio en suspensiones celulares finas; en las suspensiones celulares gruesas se obtuvo sólo un pequeño porcentaje de aumento en la eficiencia del plaqueo cuando se usó agar purificado o agarosa (Figura 4.2, B). La concentración de gelrita de 0.045% a 0.14% no afectó significativamente la eficiencia del plaqueo.

Plaqueo de las colonias celulares derivadas de protoplastos de *S. guianensis*

Se usó un medio líquido en el período inicial de cultivo de los protoplastos; luego, las microcolonias fueron trasferidas a un medio sólido.

La eficiencia del plaqueo de las colonias celulares derivadas de protoplastos fue afectada enormemente por el tipo de agente de solidificación. El Bacto-agar comercial fue inferior a cualquiera de los otros agentes gelatinizadores; aunque el lavado de este agar mejoró significativamente la eficiencia de laminación de las colonias celulares, fue sin embargo, menos

Digitized by Google

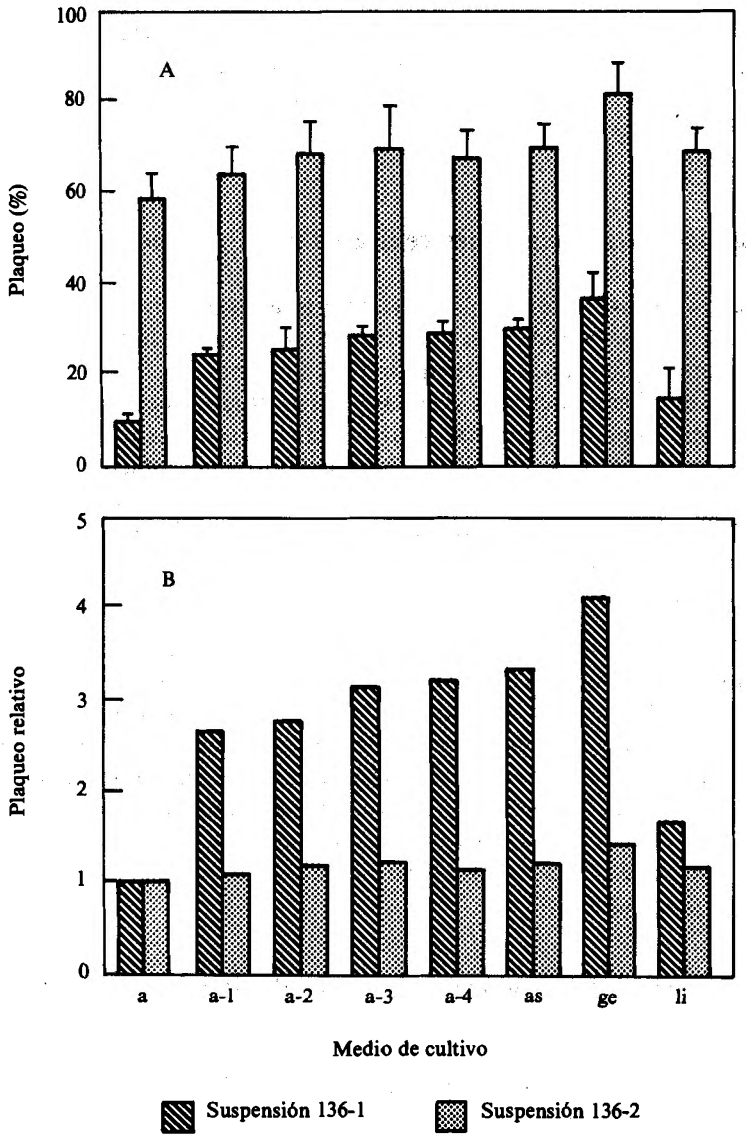


Figura 4.2. Eficiencia de 'plaqueo' (A) y 'plaqueo' relativo (B) de una suspensión celular fina (136-1) y de otra gruesa (136-2) de *S. guianensis*, cultivadas en medios que contenían diferentes agentes gelatinizadores (a, a-3, etc., ver Figura 4.1; a-1, a-2, a-4 = agar lavado una, dos, o cuatro veces).

Digitized by Google

eficiente que la gelrita. La agarosa, el agar purificado y el medio líquido con soporte de papel filtro mostraron una efectividad similar (Figura 4.3).

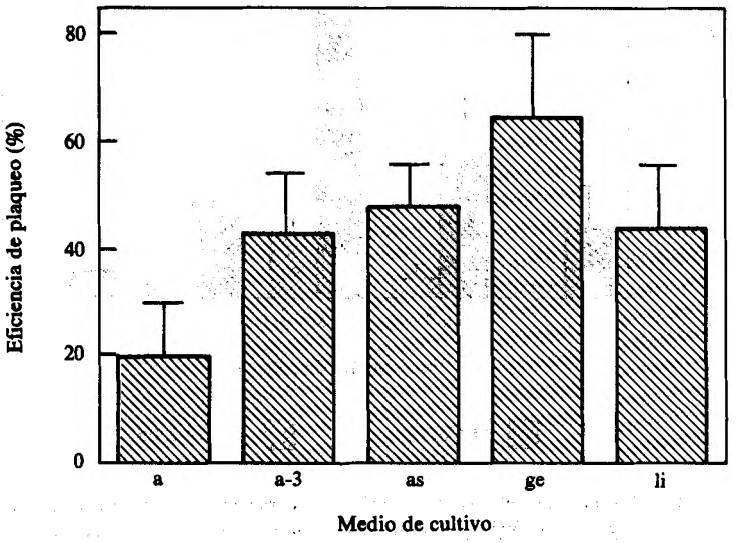


Figura 4.3. Eficiencia de plaqueo de las colonias celulares de *S. guianensis* derivadas de protoplastos obtenidos del mesófilo foliar, en medios solidificados con cuatro agentes gelatinizadores diferentes (a, a-3, etc., ver Figura 4.1).

Cultivo de meristemas de yuca

Se aislaron meristemas de yuca de plantas cultivadas en invernadero y se cultivaron en medios con diferente agente de solidificación. Se hallaron diferencias altamente significativas en el aumento de peso fresco de los brotes obtenidos de los dos genotipos examinados: M Col 22 y M Col 1505 (Figura 4.4). Aunque los meristemas de M Col 22 crecieron mucho más rápidamente que los de M Col 1505, en ambos la solidificación con agarosa resultó superior pues el aumento de peso fresco fue de cuatro a cinco veces más rápido con ésta que con el agar. La solidificación con gelrita y con el medio líquido fueron también mejores que con el agar, pero no alcanzaron la eficiencia de la agarosa.

Digitized by Google

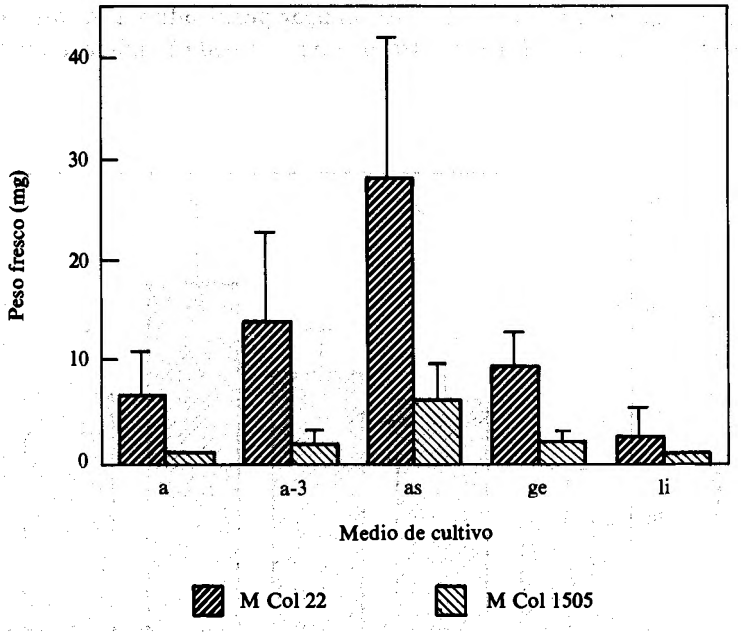


Figura 4.4. Diferencias en el peso fresco de la parte aérea de dos variedades de yuca (M Col 22 y M Col 1505) que se desarrollaron de ápices meristemáticos en medios solidificados con cuatro agentes gelatinizadores (a, a-3, etc., ver Figura 4.1).

Micropropagación de la yuca

Cultivos de ápices de yema de la yuca fueron micropropagados mediante esquejes de nudo, y se evaluó el efecto de los agentes gelatinizadores en la tasa de propagación en términos del peso fresco de los brotes, de su longitud, del número de nudos y del número de raíces formadas durante 4 semanas de cultivo (datos no presentados). Se hallaron diferencias significativas en el peso fresco y en la longitud de los brotes. La gelrita y la agarosa estimularon mejor el crecimiento de estos cultivos. Ninguna diferencia significativa se detectó en el número de nudos y de raíces formadas. Estas observaciones sugieren que, aunque los cultivos de yuca pueden crecer con más vigor en medios con agarosa y gelrita, el agente gelatinizador no afecta la tasa final de propagación.

Digitized by Google

Embriogénesis somática de la yuca

Se indujo la formación de embriones somáticos en las hojas inmaduras de yuca en un medio de alto contenido de 2,4-D. Leves diferencias se observaron en la frecuencia de formación de embriones cuando ésta dependía de la acción de diferentes agentes gelatinizadores. La desviación estándar de las frecuencias de formación de embriones fue siempre muy alta, y no fue posible establecer diferencias significativas entre los diferentes agentes gelatinizadores (Figura 4.5).

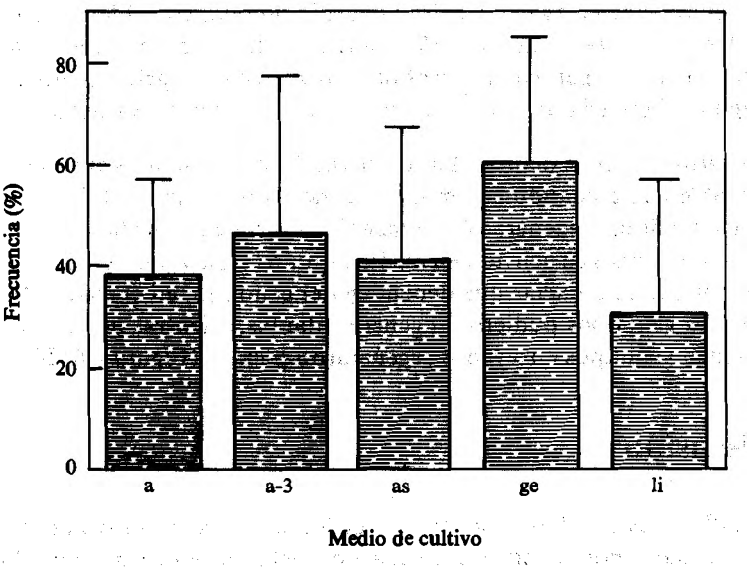


Figura 4.5. Frecuencia de formación de embriones somáticos en explantes foliares inmaduros de yuca cultivados con diferentes agentes gelatinizadores (a, a-3, etc., ver Figura 4.1).

Cultivo de anteras de arroz

Se trasfirieron individualmente callos derivados de anteras de arroz a un medio de regeneración, solidificado mediante diversos agentes gelatinizadores.

Tanto la supervivencia de los callos trasferidos como la frecuencia de regeneración de las plantas revelaron diferencias notorias al estar aquéllos expuestos a diferentes agentes gelatinizadores.

Digitized by Google

Supervivencia de callos de anteras. La supervivencia de los callos de todos los genotipos de yuca ensayados aumentó cuando se usó agarosa o gelrita como agente de solidificación o un medio líquido con soporte de algodón, con respecto a esa supervivencia en el cultivo desarrollado en medio de agar solidificado. La tasa promedio de supervivencia del callo fue aproximadamente 1.7 veces mayor en agarosa y 1.5 veces mayor en gelrita y en el medio líquido que en el agar estándar (Figura 4.6, A).

Se observaron diferencias en la supervivencia de los callos, y éstas dependían del genotipo; las más grandes se detectaron en los callos de la línea pura (Col 1 x M312A), cuya supervivencia aumentó más de diez veces si se cultivaban en agarosa, gelrita o medio líquido. Una diferencia menor se detectó en la línea Tox 1010-4-1: sólo un pequeño porcentaje de aumento de la supervivencia se obtuvo en agarosa o en gelrita, y no se halló ninguna diferencia (respecto al agar estándar) del cultivo en medio líquido.

Regeneración de plantas. La regeneración de las plantas aumentó considerablemente cuando se empleó un medio de agarosa. La frecuencia promedio de esa regeneración aumentó 2.3 veces en el medio de agarosa y de 1.8 a 2.0 veces en gelrita y en medio líquido (Figura 4.6, A). También se han hallado diferencias que dependen del genotipo; en el medio de agar sólo tres genotipos pudieron regenerar plantas, mientras que en agarosa los cinco genotipos ensayados regeneraron plantas (Figura 4.6, B).

Discusión

Se halló en este trabajo que muchos de los sistemas de cultivo ensayados son afectados por la naturaleza del agente gelatinizador empleado. Mejoras significativas se lograron en siete tipos diferentes de cultivo, además de los nueve ensayados, cuando el agar usado tradicionalmente fue remplazado por agarosa o gelrita o cuando se lavó el agar con agua destilada. En todos los experimentos, la gelrita o la agarosa parecían ser mucho mejores como agentes gelatinizadores.

Se halló en este ensayo que 0.15% de gelrita podía solidificar eficazmente el medio MS que se usaba con más frecuencia. El cambio de la concentración de gelrita entre 0.045% y 0.2% no afectó la eficiencia de plaqueo de los cultivos de células de *S. guianensis*. Esta observación contrasta con la que se hizo en el medio de agar al 0.7%: las diversas concentraciones de agar redujeron la formación de brotes y la tasa de propagación de diversas especies (Romberger y Tabor, 1971; Debergh, 1933; Singha, 1984).

Digitized by Google

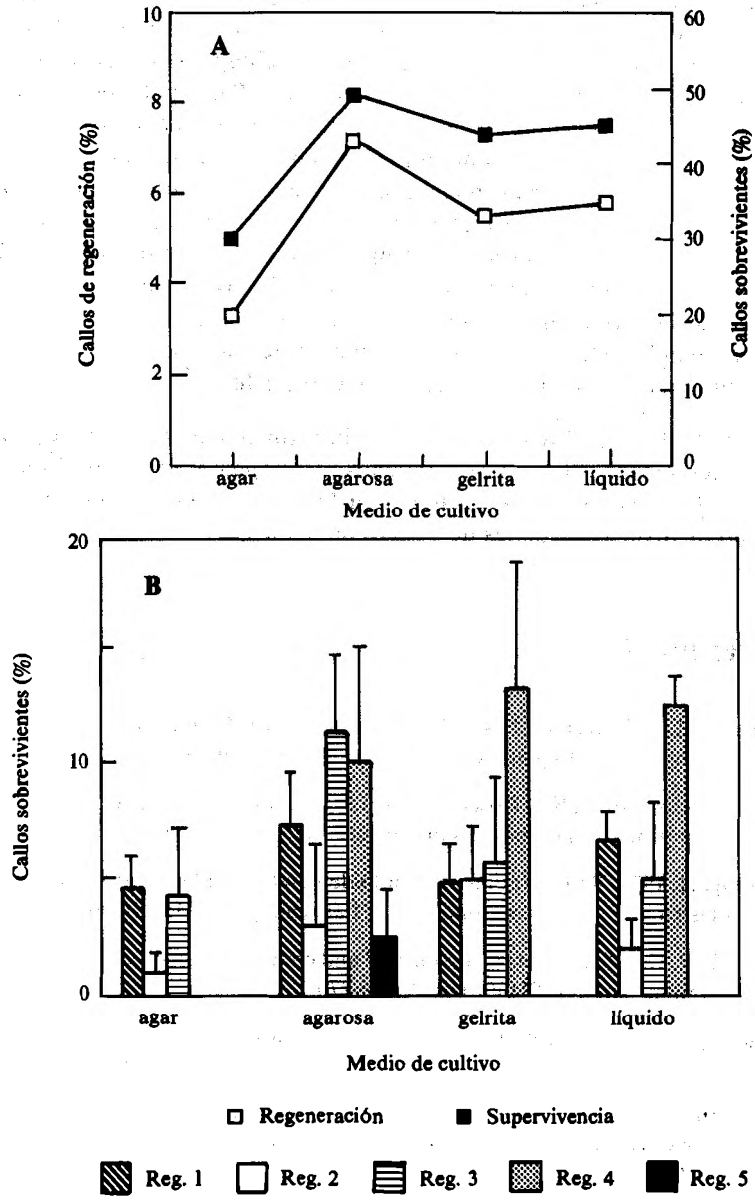


Figura 4.6. **Efecto de tres agentes gelatinizadores en un cultivo de anteras de arroz. A) Supervivencia del callo y callo de regeneración. B) Callo de regeneración de cinco líneas F1 (en medio líquido con soporte de algodón). Reg. = regeneración.**

Digitized by Google

Los cambios hechos en la concentración del agar pueden afectar la eficiencia de los cultivos de tejidos vegetales porque alteran las tasas de difusión y, por ende, la disponibilidad de los componentes del medio de cultivo (Romberger y Tabor, 1971; Debergh, 1983; Singha et al., 1985). Aparentemente, la gelrita no ejerce ese efecto en las células cultivadas en el rango de concentración examinado. En algunos sistemas de cultivo, los medios líquidos favorecieron mayores eficiencias de plaqueo que el medio sólido (Kohlembach y Wernicke, 1978; Lee et al., 1986). En muchos de los sistemas de cultivo ensayados se emplearon medios líquidos que tenían papel filtro o algodón como soporte físico de los tejidos. Este sistema ofrecería algunas incomodidades en el manejo de los cultivos, como removerlos cuando están enraizados, o tener difícil acceso a meristemas o explantes delicados que se sumerjan en el soporte.

Los resultados obtenidos en este laboratorio sugieren que la gelrita puede remplazar eficazmente a muchos otros agentes gelatinizadores y a medios líquidos, sin afectar —antes bien, bien mejorando— la eficiencia de cultivo de diversos sistemas de cultivo de tejidos.

Referencias

Adams, T. L. y Townsend, J. A. 1983. A new procedure for increasing efficiency of protoplast planting and clone selection. Plant Cell Reports 2:165-168.

Adaoha-Mbanaso, E. N. y Roscoe, D. H. 1982. Alginate: An alternative to agar in plant protoplast culture. Plant Science Letters 25:61-66.

Bending, H. 1974. Regeneration von haploiden und diploiden pflanzen aus protoplasten von *Petunia hybrida* L. Z. Pflanzenphysiol. 74:327-356.

Debergh, P. C. 1983. Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. Physiol. Plantarum 59:270-276.

Gamborg, O. L.; Miller, R. A. y Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50:151-158.

Kohlembach, H. W. y Wernicke, W. 1978. Investigation on the inhibitory effect of agar and the function of active carbon in anther culture. Z. Pflanzenphysiol. 86:463-472.

Lee, M.; Wetzstein, H. Y. y Sommer, H. E. 1986. The effect of agar vs. liquid medium on rooting in tissue-cultured sweetgum. HortScience 21:317-318.

Lorz, H.; Larking, P. J. y Scowcroft, W. R. 1983. Improved protoplast culture and agarose media. Plant Cell Tissue Organ Culture 2:217-226.

Digitized by Google

Meijer, E. G. M. y Broughton, W. J. 1981. Regeneration of whole plants from hypocotyl-, root-, and leaf-derived tissue cultures of the pasture legume *Stylosanthes guyanensis*. Physiol. Plant. 52:280-284.

——— y Steinbiss, H. H. 1983. Plantlet regeneration from suspension and protoplast cultures of the tropical pasture legume *Stylosanthes guyanensis* (Aubl.) Sw. Ann. Bot. 52:305-310.

Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.

Nuñez, V. M.; Martínez, C. P.; Narváez, J. y Roca, W. M. 1987. Obtención de líneas homocigotas de arroz (*Oryza sativa* L.) tolerantes a la toxicidad de aluminio utilizando el cultivo de anteras. Soc. Ing. Agron. del Llano (Colombia) 4:47-54.

Roca, W. M. 1984. El cultivo de meristemas para la conservación de germoplasma de yuca in vitro: Guía de estudio. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. 44 p.

Romberger, J. A. y Tabor, C. A. 1971. The *Picea abis* shoot apical meristem in culture: Agar and autoclaving effects. Amer. J. Bot. 58:131-140.

Sakina, K. 1984. The effect of BA on *in vitro* plant regeneration from shoot meristems of cassava. Department of Crop Science, University of Zimbabwe.

Shillito, R. D.; Paszkowski, J. y Potrykus, I. 1983. Agarose plating and bead type culture technique enable and stimulate development of protoplast derived colonies in a number of plant species. Plant Cell Reports 2:244-247.

Singha, S. 1984. Influence of two commercial agars on *in vitro* shoot proliferation of "Almey" crabapple and "seckel" pear. HortScience 19:227-228.

———; Townsend, E. C. y Oberly, G. H. 1985. Mineral nutrient status of crabapple and pear shoots cultured *in vitro* on varying concentration of three commercial agars. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 110:407-411.

Sunderland, N. y Roberts, M. 1979. Cold pretreatment of excised flower buds in float culture of tobacco anthers. Ann. Bot. 43:405-414.

Szabados, L. y Roca, W. M. 1986. Regeneration of isolated mesophyll and cell suspension protoplasts to plants in *Stylosanthes guianensis*, a tropical forage legume. Plant Cell Reports 5:174-177.

———; Hoyos, R. y Roca, W. M. 1987. *In vitro* somatic embryogenesis and plant regeneration of cassava. Plant Cell Reports 6:248-251.

Thompson, J. A.; Abdullah, R. y Cocking, E. C. 1986. Protoplast culture of rice (*Oryza sativa*) using media solidified with agarose. Plant Science 47:123-133.

Wernicke, W. y Kohlembach, H. W. 1976. Investigations on liquid culture medium as a means of anther culture in *Nicotiana*. Z. Pflanzenphysiol. 31:330-340.

Digitized by Google

Capítulo 5

Propagación clonal in vitro

A. D. Krikorian*

Agradecimientos

A través de los años, varios asociados de investigación, asistentes y científicos visitantes han participado en diferentes proyectos de cultivo de tejidos en este laboratorio y, aunque no los mencionó por su nombre, merecen un especial reconocimiento. Agradezco especialmente a Robert P. Kann. Quiero reconocer el apoyo financiero suministrado por la NASA durante gran número de años. Finalmente, agradezco a la Cambridge Philosophical Society por permitirme utilizar extractos, algunos modificados, otros no, de Krikorian (1982).

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

Digitized by Google

Origen y Desarrollo del Concepto Clon

Este capítulo está dedicado especialmente a presentar algunas estrategias que se pueden adoptar en la multiplicación clonal. Sin embargo, antes de entrar en el tema sería útil definir algunos conceptos, acerca de los cuales existe confusión, como es el relacionado con la palabra clon[1].

Herbert J. Webber, un fitomejorador del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, introdujo el término 'clon' en 1903, y lo aplicó a las plantas cultivadas que se propagaban vegetativamente. Derivada de una palabra griega (κλῶν) que significa ramita o vástago, la palabra clon había sido sugerida por el botánico Orator F. Cook. Esta palabra proporcionaba una forma clara de decir que "las plantas cultivadas de tales partes vegetativas no son individuos en el sentido común de la palabra, sino que simplemente son partes trasplantadas del mismo individuo; en términos de herencia, tales plantas son el mismo individuo".

En 1912 el genetista George H. Shull recomendó que se ampliase el término para incluir a los animales que aumentan su número o se multiplican por cualquier método asexual; pidió, además, que se aplicase a todos los grupos de individuos genotípicamente idénticos que se originasen de la reproducción asexual de cualquier tipo, incluyendo la apogamia. Consideró necesario limitar el uso de la palabra clon a la designación de organismos genotípicamente idénticos, con el fin de evitar confusiones en el caso de que se presentasen mutaciones somáticas; por definición, concluía, la propagación de una yema vegetativa representaría el origen de un nuevo clon.

Después de considerar problemas tales como el de saber si dos ramitas del mismo árbol, utilizadas como estacas o acodos, tenían la misma constitución, y el de reconocer, en consecuencia, que no había certeza para afirmar que eran miembros del mismo clon, Shull cambió rápidamente su definición por ésta: "clon es un grupo de individuos que pueden ser rastreados mediante reproducciones asexuales (incluyendo la partenogénesis cuando no está acompañada de una segregación genotípica) hasta un solo cigoto ancestral o perpetuamente asexual."

Quienes se preocupaban por la nomenclatura de las plantas cultivadas se descuidaron en reconocer la naturaleza fundamental de los clones hasta cuando el genetista y fitomejorador Arlow B. Stout instó a que se aceptara

1. En esta sección se han omitido las citas de la literatura por razones de espacio. El lector puede consultar a Krikorian (1982).

Digitized by Google

el término clon, conceptuándolo simplemente como "la unidad más pequeña y más individual" en la horticultura. Stout no sólo se daba cuenta de que un clon de cualquier planta cultivada es "ante todo una unidad artificial", sino de que para los taxónomos era importante conocer cómo se producía un clon y cuál era su relación con las especies o las variedades que se presentaban en la naturaleza.

Esta campaña fue ardua y dilatada pero finalmente tuvo éxito, y actualmente el código oficial de la nomenclatura de las plantas cultivadas define la palabra clon como: "un conjunto genéticamente uniforme de individuos (que pueden ser de naturaleza quimérica) originalmente derivados de un solo individuo mediante propagación asexual; por ejemplo, por medio de estacas, divisiones, injertos o apomixis obligada. Los individuos propagados a partir de la mutación perceptible de una yema forman un cultivar diferente de la planta progenitora".

Tal vez sea apropiado señalar que la palabra quimera, aplicada por primera vez a las plantas por el botánico alemán Hans Winkler, se refiere a una planta cuyos tejidos o células corresponden a dos o más ideotipos o al total de los determinantes hereditarios, ya sean cromosómicos o extracromosómicos; los ideotipos diferentes pueden ser causados por mutación somática, segregación o injerto.

Las quimeras son un conjunto heterogéneo dentro del individuo, y a veces se llaman mosaicos. La propagación artificial mediante injertos y gemación es un ejemplo extremo de multiplicación asexual o clonal que es al mismo tiempo quimérica; en este caso, el tronco y el cogollo de un vástago o yema son las unidades de crecimiento clonal que se hacen vivir en el sistema radical de otra planta.

Muchos organismos predominantemente unicelulares existen como clones en su estado natural, y en estos casos la reproducción asexual adquiere mayor importancia; una simple célula es el origen del clon y éste es muy conspicuo como unidad natural de vida, ya que es el origen de toda una raza o especie.

A medida que mejoraron las técnicas para el trabajo con cultivo de células de organismos superiores, especialmente de células animales, los investigadores adoptaron la palabra clon para referirse a una población de células derivadas de una sola, mediante mitosis. Generalmente, ya no estaba implicada la identidad o uniformidad genotípica, porque pronto se reveló que durante el cultivo aséptico las células pueden cambiar en forma dramática en términos de su genotipo, o incluso de su complemento cromosómico.

Digitized by Google

La falta de homogeneidad genotípica absoluta en las poblaciones clonales era un factor que causaba poca preocupación antes de la llegada de las técnicas de cultivo para regenerar plantas superiores completas a partir de células somáticas. En realidad, durante mucho tiempo se ha reconocido que puede haber una variación intraclonal debida a diferentes causas, entre las cuales están las interacciones genotipo-ambiente y un tipo de 'covariación no genética'.

La última derivación celular u origen de una población clonal generada por medios hortícolas o agrícolas tradicionales es de poca importancia, ya que el punto de inicio de la propagación es relativamente grande y crece como una unidad más o menos coordinada. Tiene esa derivación, sin embargo, aplicaciones cruciales en el caso del cultivo de tejidos y de células, sea que las plantas individuales regeneradas en último lugar deriven de una sola célula, de una población de células puras genéticamente idénticas, de una población de células puras genéticamente disímiles, de un grupo genéticamente uniforme de células o de un grupo genéticamente no homogéneo de células (Broertjes et al., 1978).

También tendría consecuencias importantes si se llevasen a cabo procedimientos de ingeniería genética o de ADN recombinante en una población de células puras cultivadas o de sus protoplastos. A menos que los gametos individuales o miembros individuales de un clon sean rastreables hasta las células genéticamente idénticas, la variación en las características heredables —tanto nucleares como citoplasmáticas— de diferentes células produciría un número de subpoblaciones u organismos que, en el sentido estricto, no serían clonales.

Los clones o las poblaciones agregadas que se producen por métodos convencionales no se forman, por lo regular, 'horizontalmente', es decir, durante una generación, sino que lo hacen 'verticalmente' a través del tiempo, generación tras generación; en cambio, las técnicas del cultivo aséptico que incluyen grandes números de propágulos muy pequeños o de células han cambiado dramáticamente el potencial hacia lo 'horizontal'. Todo lo anterior magnifica cualquier falta de fidelidad absoluta en el genotipo o en el fenotipo.

Estrategias para la Propagación Clonal

Existen varias vías generales para realizar la multiplicación clonal; entre ellas están:

Digitized by Google

a. La multiplicación de brotes de yemas terminales, axilares o laterales. El punto de inicio en este caso puede estar en los meristemas, las puntas de los brotes, las yemas, los nudos o los brotes de las yemas en raíces.

b. La organogénesis directa. En este caso la formación del brote adventicio o de la raíz ocurre en el explante de un órgano, o en alguna parte escindida de la planta.

c. La organogénesis indirecta. La formación del brote adventicio o de la raíz ocurre en este caso en el callo; es obvio que el callo se deriva inicialmente de un órgano, tejido u otra parte escindida de la planta.

d. La embriogénesis somática. Los embriones pueden formarse directamente en el explante primario, o indirectamente de las células cultivadas en suspensión o en un medio semisólido.

e. Los órganos de perennidad, formados en cultivos asépticos.

f. El microinjerto.

g. El cultivo de embriones y esporas.

Las Figuras 5.1 y 5.2 ilustran estos puntos, que se discuten más en detalle a continuación.

Cultivos de meristemas, ápices caulinares y yemas axilares

En los años 60, el desarrollo de procedimientos para multiplicar y mantener plantas en cultivos asépticos recibió un impulso dramático; ello se debió al descubrimiento de la capacidad que tienen las puntas de los brotes y los meristemas de la orquídea *Cymbidium* sp., cortados apropiadamente y sembrados en cultivo aséptico, para producir protuberancias que semejan protocormos normales capaces de crecer y desarrollarse en plántulas (American Orchid Society Bulletin, 1960-1968; Moul, 1974; Arditti, 1977).

Desde entonces se han usado los cultivos de puntas de brotes y de meristemas de muchas otras plantas para obtener, mantener y multiplicar los materiales genéticos; de una punta de brote cultivado o de un explante, en algunos casos, se regenera una planta y en otros casos se puede estimular la formación de brotes múltiples (Styer et al., 1983).

En realidad, en cada uno de estos casos se espera a menudo lograr la formación de ramas axilares que puedan separarse y enraizarse; teóricamente los brotes axilares o laterales pueden a su vez producir ramas

Digitized by Google

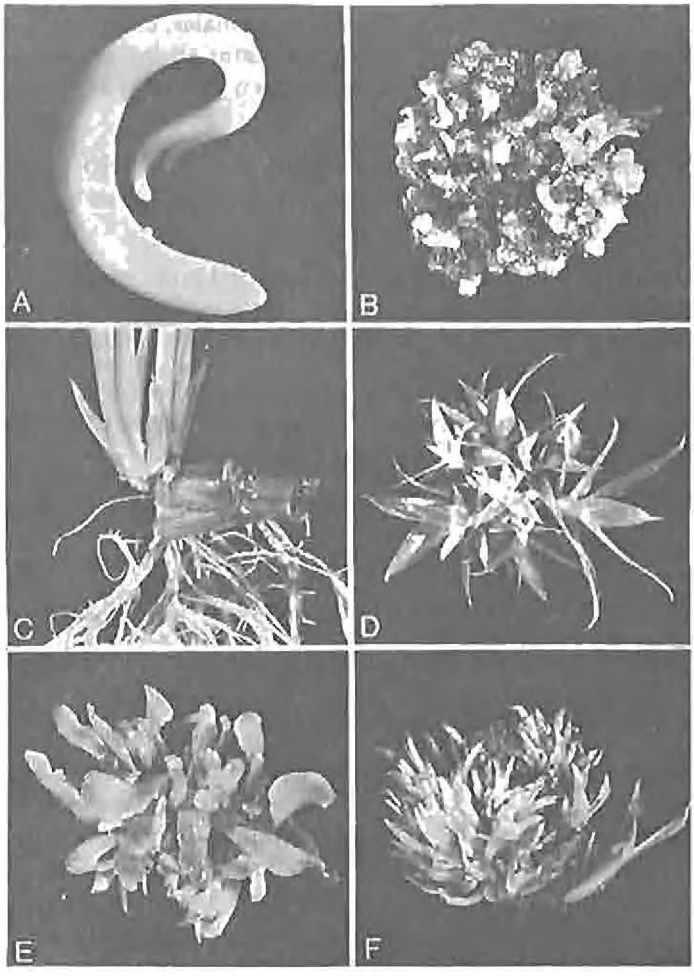


Figura 5.1. Ejemplos de propagación in vitro, usando diferentes estrategias. A) Embrión de *Datura stramonium* escindido de una semilla inmadura en la etapa de corazón y cultivado hasta cuando alcanzó su tamaño normal en el medio de cultivo aséptico (X13.4). B) Masa de protocormos de la orquídea terrestre *Calopogon tuberosus;* esta masa se inició de una semilla germinada asépticamente y estimulada para formar múltiples protocormos (X4.3). C) Multiplicación a partir de brotes explantados de nudos de arroz *(Oryza sativa* IR38); las nuevas macollas derivan de la yema nodal (X4.3). D) Multiplicación en *Aechmea fasciata* mediante la estimulación de yemas axilares (X3). E) Conjunto de brotes del helecho cuerno de venado *(Platicerγum* sp.); éstos, al igual que los de D), requieren ser enraizados (X4). F) Multiplicación de un grupo de brotes iniciados de un meristema vegetativo de banano diploide *Musa* sp. "AA", aquí los brotes derivan de la liberación de yemas de oposición foliar al igual que de la formación de yemas adventicias (X1.3).

Digitized by Google

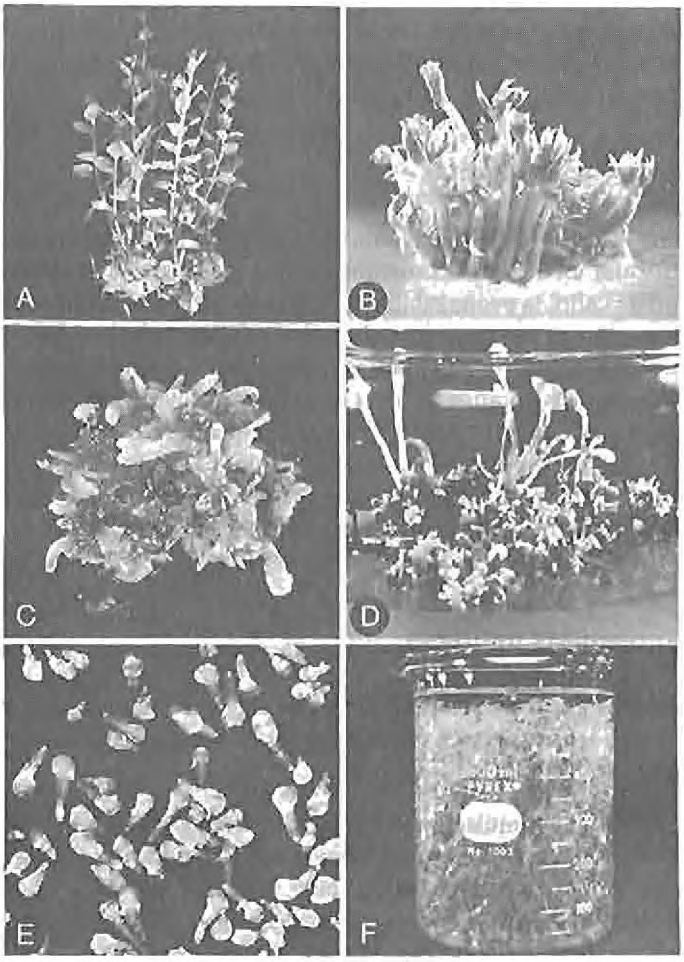


Figura 5.2. Nuevos ejemplos de propagación in vitro empleando diferentes estrategias. A) Grupo de brotes de arándano (*Vaccinium* sp.) obtenidos de un solo brote, con dos hojas totalmente desarrolladas y dos hojas primordiales (X1.7). B) Grupo de brotes del árbol del acebo chino (*Sapium sebiferum*) obtenidos de un explante primario que comprende una sección de tallo y una yema axilar (X2.7). C) Callo derivado de un capullo cerrado de *Tagetes erecta*, la caléndula 'Orange Hawaii', que muestra el desarrollo de brotes adventicios (X5.2). D) Cultivo embriogénico de amapola (*Papaver setigerum*) 'Arya II' que crece en un medio semisólido; observar los diversos niveles de desarrollo de las plántulas (X1.4). E) Estructuras embrionarias de un clon diploide de la azucena amarilla (*Hemerocallis* sp.) 'Autumn Blaze' derivado de un cultivo en suspensión (X5.1). F) Plántulas de azucena amarilla extraídas del cultivo líquido y colocadas en un frasco para la fotografía; estas plántulas derivan de estructuras similares a las que aparecen en E) (X0.6).

Digitized by Google

axilares adicionales a perpetuidad, a medida que se subcultiva cada brote recién formado o cada explante de nudo. Por lo tanto, el método es bueno para obtener una rápida multiplicación clonal, y se ha aplicado a una gran variedad de especies, desde las herbáceas hasta las leñosas.

Organogénesis directa

Durante muchos años se han conocido sistemas mediante los cuales se pueden formar brotes directamente de una parte de la planta, sin la formación de callo; la propagación de la violeta africana *Saintpaulia* sp. a partir de explantes del pecíolo o de la base foliar, o la propagación de ciertas begonias a partir de explantes foliares son ejemplos que se recuerdan fácilmente. Los órganos o partes de plantas que contienen rudimentos de yemas o que tienen un potencial para la producción de meristemas adventicios llevan rápidamente a este enfoque. Las listas de plantas que pueden propagarse por medio de explantes de hojas o de raíces han estado disponibles para quienes trabajan en propagación (Krikorian, 1982; Browse, 1979; Hartmann et al., 1984; Cook, 1984).

Organogénesis indirecta

En términos generales, en los cultivos de callos se inducen proliferaciones más o menos aleatorias, a partir de explantes tomados de varias partes de plantas, para formar brotes y raíces.

Este método de estimulación del desarrollo de órganos a partir de callos se basa en el trabajo, actualmente clásico, de Folke Skoog y sus colegas, especialmente Carlos Miller; este trabajo se realizó en los años 50 utilizando la cepa Wisconsin 38 de un cultivar 'Havana' de tabaco (*Nicotiana tabacum*). Los tejidos fueron expuestos a niveles predeterminados de una o varias clases de sustancias promotoras de la división celular (citocininas) y al AIA o a cualquiera de sus análogos sintéticos, tales como el ANA (Pilet, 1977; Letham et al., 1978; Skoog, 1980; Scott, 1984; MacMillan, 1984).

Nunca se debería dejar de recalcar el ímpetu que el descubrimiento de la primera adenilcitocinina químicamente identificada, la KIN, le dio a la tecnología del cultivo aséptico. Por primera vez los investigadores pudieron añadir al medio de cultivo combinaciones químicas conocidas, las auxinas y las citocininas, que podían estimular la división celular. Además, al manipular los niveles exógenos de KIN y auxina, pudieron fomentar el desarrollo del brote o de la raíz en los cultivos de callos.

Digitized by Google

Actualmente se conoce un gran número de especies en las cuales se puede fomentar la proliferación aleatoria de callos en los explantes, mediante la adición de una o varias citocininas y auxinas al medio básico; en consecuencia, se puede inducir la formación de brotes y raíces ajustando la relación auxinas:citocininas exógenas. Sin embargo, este procedimiento no es de ninguna manera universalmente efectivo; por ejemplo, en sistemas que normalmente no tienen una capacidad para la formación de yemas, las citocininas no inducen la diferenciación de las yemas y el crecimiento de novo.

En resumen, las citocininas no son morfogénicas respecto al brote en el sentido estricto; en contraposición, parecen tener efecto en la expresión de un compromiso determinado por otros factores, cualesquiera que éstos sean, en aquellos sistemas en que se promueve la formación de yemas adventicias.

En algunos casos el problema de la inducción de la morfogénesis es tal que, a pesar de la adición o manipulación de auxinas, citocininas, u otros componentes del medio de cultivo o del medio ambiente externo, los investigadores son incapaces de estimular la división celular o de obtener un verdadero callo. Sin embargo, en plantas de mayor respuesta, en las cuales no hay problemas para inducir y mantener el crecimiento del callo, se puede tratar de manipular la relación citocininas:auxinas, con lo que frecuentemente se inducen brotes o raíces (tal vez raíces con más frecuencia que brotes). Pero incluso en el tabaco, en el cual se desarrollan ambos órganos, en muy raras ocasiones se obtienen plántulas uniformes ya que generalmente no se forman estructuras bipolares o embrionarias.

Para quienes buscan la multiplicación de plantas de una manera estrictamente clonal, tal vez sea favorable que la ruta de la organogénesis indirecta no se comprenda bien, ya que ciertas evidencias sugieren que la formación de callos en estos sistemas constituye a menudo la base para obtener variación genética e inestabilidad. Muchos investigadores recomiendan por ello que se evite este procedimiento en el clonaje aséptico de plantas. Por otra parte, quienes buscan utilizar la organogénesis indirecta por la vía del callo como un medio para fomentar la variación somaclonal (ver Capítulo 22) y producir así un cambio deseado en el genotipo o el fenotipo (Earle y Demarly, 1983), se encuentran a veces restringidos por falta de conocimientos suficientes sobre la estimulación de la morfogénesis a partir de callos presumiblemente no diferenciados.

En algunos sistemas es posible estimular una modalidad de crecimiento que comprenda la ramificación axilar precoz; por ejemplo, puede ocurrir que el extremo cortado de un brote escindido produzca simultáneamente

Digitized by Google

una masa de callo con capacidad organogénica y brotes que se pueden remover y enraizar para multiplicar la planta. Si se trata o no de un sistema estrictamente clonal obtenido por ese medio —como lo sería en el caso de un sistema de ramificación axilar precoz que se promueve, extrae y enraiza— depende del sistema en cuestión.

En los casos en que se trabaja con el callo organogénico, el desarrollo de los brotes que emergen del área proliferada (por ejemplo, de la base de un explante de punta de brote) se puede mantener a una tasa constante removiéndolos mediante la excisión; esto se conoce como un sistema 'abierto'. Simplemente se mantiene un equilibrio que favorezca la formación continua de crecimientos que puedan organizarse en cultivos, con o sin un ajuste en el medio. A medida que se remueven estos brotes (con raíces o sin ellas) de la masa proliferante, y se trasfieren al medio ambiente o a un medio diferente que conduzca a un nuevo o adicional desarrollo radical, crecen nuevas proliferaciones para remplazarlos.

Es obvio que si el sistema no se puede mantener abierto, se presenta un efecto de determinación y se forma un número finito de plantas. Aunque esto puede ser un obstáculo, la adopción de esta ruta de multiplicación sería perfectamente razonable en los casos en que sólo se desea obtener un número relativamente pequeño de plántulas clonales.

Embriogénesis somática

En el período comprendido entre mediados de los años 50 y finales de esa década fue posible obtener, mantener y hacer crecer células aisladas de plantas. A finales de los años 50 y a principios de los 60, un estudio adicional sobre el cultivo de estas células en suspensión en medio líquido mostró que, en algunos casos, tales células podían formar embriones somáticos capaces de desarrollarse en plantas, y que en este sentido se comportaban como embriones cigóticos. Los procedimientos permitieron desviarse de los procesos sexuales normales y produjeron posteriormente una población de plantas con las características de la planta original de la cual derivaba el explante primario.

El nivel de precisión con que el proceso de embriogénesis somática simula la embriogénesis cigótica puede variar considerablemente pero, en general, la simulación es considerable. La gran mayoría de los sistemas que forman embriones somáticos lo hacen mediante la llamada ruta indirecta. En las dicotiledóneas, por ejemplo, las células totipotentes siguen patrones de división que dan origen a proembriones, los cuales a su vez dan origen a

Digitized by Google

las etapas sucesivas de corazón, torpedo y cotiledonar; en las monocotiledóneas, en cambio, el curso de desarrollo progresa según el patrón cigótico normal, con la formación de un solo cotiledón.

La embriogénesis somática puede ocurrir por medio de la llamada ruta directa, pero con menor frecuencia que por la ruta indirecta; en el primer caso, las células del explante primario son la fuente de los embriones somáticos sin que haya una etapa de callo. Este hecho se podría describir mejor como una formación accidental del embrión, ya que evoca situaciones similares que ocurren en el cuerpo intacto de la planta in situ, como es el caso de la formación de un embrión nucelar en los cítricos.

En ciertos casos los embriones somáticos que se forman, ya sea directa o indirectamente, pueden seguir una modalidad de crecimiento que se describe mejor como gemación; en ella, los nuevos embriones somáticos se originan directamente de embriones somáticos preexistentes sin que intervenga una etapa de callo.

En diferentes especies vegetales ha sido posible obtener, a través de los años, el crecimiento exitoso de embriones somáticos hasta plantas enteras, como un procedimiento de laboratorio. Sin embargo, hasta el momento el número de especies así cultivadas ha sido relativamente bajo y sólo recientemente se han empezado a suministrar los medios que permitan competir con los métodos convencionales de propagación vegetativa.

Los procedimientos de embriogénesis somática no sólo son útiles para alcanzar una multiplicación práctica, sino que suministran posibilidades únicas para investigar: a) el estímulo que libera la totipotencialidad —que de otra manera estaría bloqueada— de las células maduras quiescentes según existan en el cuerpo de la planta intacta; y b) los factores que controlan la dirección y el ritmo del desarrollo posterior de la misma (Figuras 5.3 y 5.4).

Un objetivo permanente es aprender a controlar el desarrollo de las células somáticas que crecen aisladas del cuerpo de la planta, para que emulen perfectamente el comportamiento de los cigotos. Si esto fuese factible, no sólo se mejoraría el conocimiento sobre el desarrollo sino que se obtendrían los medios tan buscados para una propagación clonal masal en especies de plantas que generalmente no permiten este tipo de propagación. Ya que por definición los embriones se originan en células únicas, la clave para hacer realidad una verdadera ingeniería genética de plantas está casi por completo en aprender a manejar las células únicas, totipotentes, y los sistemas embriogénicos (Figura 5.5).

Digitized by Google

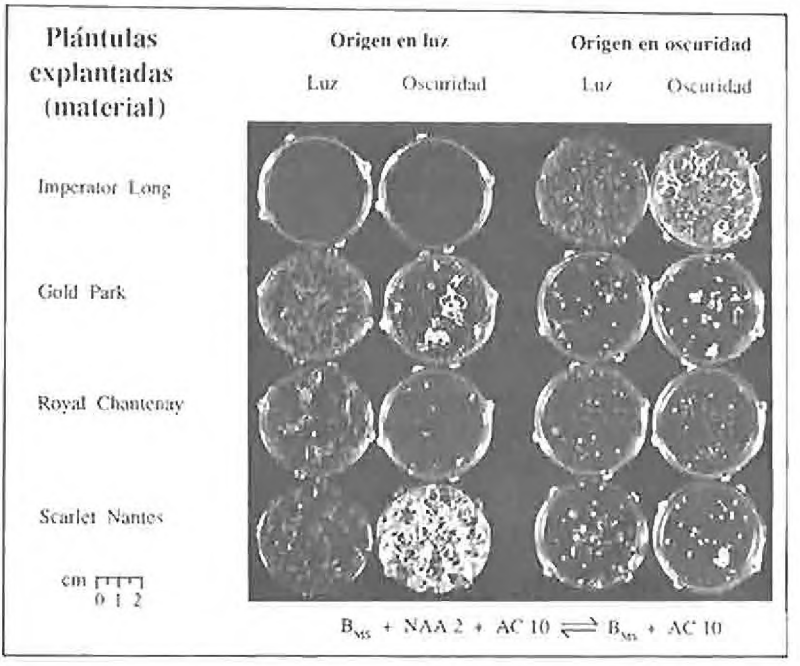


Figura 5.3. Variaciones encontradas en la sensibilidad morfogenética de grupos embrionarios de zanahoria (*Daucus carota*).

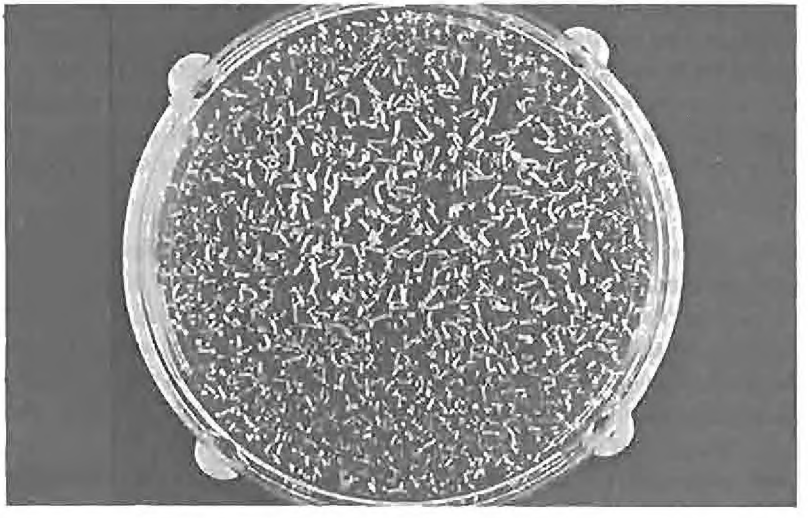


Figura 5.4. Detalle de la placa de la Figura 5.3 correspondiente a la variedad Scarlet Nantes.

Digitized by Google

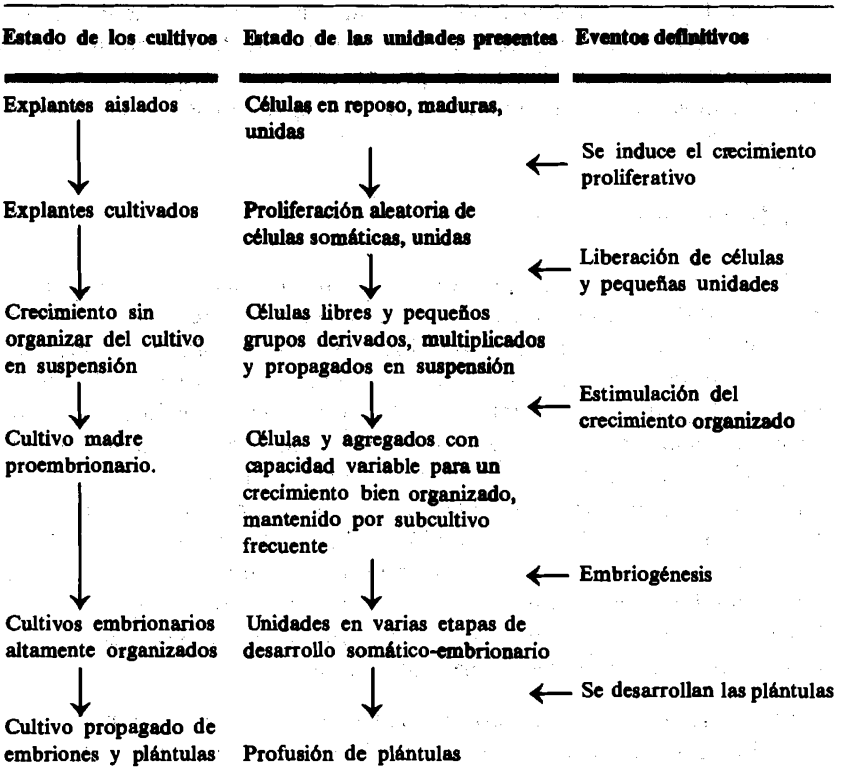


Figura 5.5. Esquema de regeneración de plantas a partir de células cultivadas asépticamente, en que aparecen secuencias del tipo de explante, del estado del cultivo, y del resultado del proceso.

Organos de perennidad formados en cultivos asépticos

Algunas especies producen órganos de perennidad in vitro y cuando esto ocurre, se cuenta con los medios para una multiplicación clonal a otro nivel; si esa característica es controlable, es posible realizar por este medio la siembra directa o el almacenamiento de germoplasma de ciertas plantas. Las papas pueden formar tubérculos en miniatura; los gladíolos pueden formar tallos bulbosos; en ciertos lirios, cebollas, narcisos, jacintos, en *Dioscorea*, etc. se han encontrado bulbillos; y, por supuesto, las orquídeas han producido protocormos.

Digitized by Google

Según los conocimientos del autor, ninguno de estos medios es tan controlable para ser adoptado seriamente como medio de multiplicación clonal, a diferencia del sistema del protocormo en las orquídeas. Aun así, esos órganos pueden suministrar otra estrategia en casos seleccionados (Cuadro 5.1).

Microinjertos

Existen muy pocos ejemplos sobre injertos de ápices de retoños que se hayan podido realizar con éxito, aunque seguramente en un futuro se presentarán más casos; en *Citrus*, los métodos de cultivo de ápices de retoños no han sido promisorios hasta el momento. Ya que la producción in vitro de embriones somáticos de tejido nucelar es análoga a lo que sucede en la naturaleza, se plantea otro problema principalmente porque las plántulas nucelares tienen una fase juvenil muy larga (10-15 años). Sin embargo, los procedimientos que involucra la utilización de injertos han sido muy útiles (ver Capítulos 8 y 9). La Figura 5.3 es un ejemplo de un 'experimento en placa' típico, donde se ensaya el potencial de organización que tienen los proembriones de los cultivares Imperator Long, Gold Pak, Royal Chantenay y Scarlet Nantes de zanahoria, los cuales se mantuvieron bajo condiciones variables de luz u oscuridad.

El experimento se inició con suspensiones celulares de explantes de plántulas cultivadas en un medio líquido (medio basal MS + AC 10% + ANA 2 mg/litro) bajo condiciones de luz y de oscuridad ('origen en luz' y 'origen en oscuridad', en la Figura 5.3). Los proembriones resultantes se colocaron en un medio semisólido (MS + AC 10%) y se dejaron desarrollar ya sea en la oscuridad o ya con luz.

El inóculo inicial está esparcido; en la Figura 5.3 se puede ver que el cultivar Imperator Long virtualmente no mostró proliferación bajo estas condiciones, mientras Scarlet Nantes presentó un fuerte potencial embrionario en la oscuridad, siempre y cuando los glóbulos proembrionarios se hubieran cultivado inicialmente con luz. Aunque estas placas muestran un experimento terminado a los 49 días, Scarlet Nantes desarrolló un gran número de embriones jóvenes después de un período de sólo 19 días en la oscuridad, como se observa en la Figura 5.4.

El hecho anterior recalca que las respuestas no son uniformes, incluso en el caso clásico de cultivos embriogénicos de zanahoria; sin embargo, el conocimiento previo a la selección permite averiguar si un sistema dado responderá o no, y determinar qué se puede utilizar como explante primario en la 'etapa 0'.

Digitized by Google

Cuadro 5.1. Características de la regeneración vegetativa y de la multiplicación y el desarrollo especializado de órganos que pueden servir como indicios para la propagación in vitro.

Característica general	Casos específicos	Observaciones
Brotes con yemas, que enraizan		
Tallos, acodos y macollas que enraizan en los nudos	Brotes rastreros	Brotes plagiótropos o postrados, que se pueden establecer en el extremo o en zonas seleccionadas, y originar una nueva planta.
	Estolones	Tallos de crecimiento horizontal, producidos en nudos basales de la planta progenitora; en los nudos se producen raíces adventicias y pueden desarrollarse terminalmente nuevas plantas o tubérculos.
	Rizomas	Tallos subterráneos con yemas en las axilas de hojas pequeñas (escamas); generalmente son horizontales y con muchos nudos.
	Tubérculos del tallo	Porciones subterráneas y ensanchadas de los tallos, que actúan como órganos de perennidad.
Brotes con base modificada	Bulbos	Bases foliares carnosas o engrosadas o grupos de escamas a un nivel levemente subterráneo y unidas a un tallo aplanado o altamente comprimido; las yemas axilares pueden desarrollarse como bulbos hijos llamados acodos.
	Cormos	Tallos engrosados, con yemas latentes en las axilas foliares a menudo similares a escamas; como en los bulbos, se presentan en la base del brote.

(Continúa)

Digitized by Google

Cuadro 5.1. Continuación.

Característica general	Casos específicos	Observaciones
Macolla radical	Macollas	Brotes que, por medios diversos, se originan en las raíces (pueden ser raíces trepadoras, raíces principales, tubérculos radicales, etc.)
Apomixis	Gametofítica	Se forma un saco embrionario no reducido.
	Partenogénesis o apogamia	Formación del embrión sin fertilización del óvulo u otra célula del gametofito.
	Adventicia (nuclear) y embrionaria	Embriones que se originan directamente del tejido esporofítico en el óvulo.

Digitized by Google

Cultivo de embriones y esporas

Desde 1920 se ha mostrado que a veces se puede estimular el crecimiento de ciertos embriones en cultivos asépticos, crecimiento que de otra forma sería inalcanzable o errático (Raghavan, 1966; 1976).

En algunos casos, los embriones cuyas reservas alimenticias estaban deficientemente desarrolladas no germinaron porque dependían de fuentes externas de nutrimentos. Por ejemplo, las semillas de orquídeas contienen un embrión pequeño que sólo incluye una masa sencilla de algunos cientos de células; para germinar, este embrión depende totalmente del azúcar exógeno, el cual es suministrado en la naturaleza por una relación simbiótica con micorrizas (Arditti, 1982). Otro ejemplo muy conocido de fracasos en la germinación de embriones es el causado por la síntesis de inhibidores en la semilla; en estos casos, a menudo los embriones pueden germinar sólo después de un período apropiado de latencia.

En algunas plantas, como el *Iris* sp., es posible eliminar tanto el requerimiento de latencia como el efecto de los inhibidores de la germinación, presentes en la semilla de algunos híbridos, mediante la excisión de los embriones y su siembra en cultivo aséptico hasta cuando alcanzan un tamaño suficiente para ser trasplantados al suelo.

El cultivo aséptico se ha convertido en un procedimiento ampliamente utilizado y de rutina para el 'rescate' de los embriones que normalmente no crecen ni se convierten en plántulas. En un sentido estricto, el material no se está multiplicando clonalmente, pero sí se está multiplicando el germoplasma que de otra manera se perdería; por lo tanto, tal vez se justifique incluir este sistema en la lista de estrategias para la multiplicación.

Emérita de Guzmán y sus asociados en la Universidad de Filipinas, en Los Baños, obtuvieron un impacto considerable con el cultivo de un mutante de coco llamado 'Makapuno'. Bajo condiciones naturales, el endosperma de las semillas Makapuno se pudre y, por lo tanto, priva al embrión en desarrollo de los nutrimentos necesarios. Al remover los embriones individuales, en cambio, y suministrarles un medio apropiado con nutrimentos, aquéllos se pueden cultivar hasta que adquieran un tamaño suficiente para sembrarlos en el campo (IAEA, 1982).

La división longitudinal de los embriones es otro medio que podría utilizarse para la multiplicación; obviamente, en este caso las mitades de la planta son idénticas o clonales.

En ciertas orquídeas las semillas germinan asépticamente y las plántulas se pueden desarrollar, incluso en ausencia de reguladores exógenos de

Digitized by Google

crecimiento, a partir de masas de protocormos que a su vez se subdividen y se multiplican utilizando las técnicas convencionales de mericlonaje. Así, se pueden derivar poblaciones de un solo embrión y esto constituye, por supuesto, una población clonal.

En casos tales como el de las orquídeas terrestres que son escasas o se encuentran en vías de extinción y en las cuales sólo se puede disponer de semillas, ésta sería una estrategia razonable para la multiplicación clonal, a menos que se puedan adoptar otros medios de obtención no destructiva del explante.

Como una forma de aumentar la tasa de multiplicación de los helechos, durante varios años se han propagado éstos a partir de esporas sembradas asépticamente en un medio de cultivo. Recientemente, el protalo se ha regenerado de las esporas, las cuales se dividen para proporcionar una fuente de tejido gametofítico; este tejido puede desintegrarse mediante procedimientos extremos tales como la acción de corte de un mezclador eléctrico y formará, a su vez, esporofitos. Durante mucho tiempo, los helechos han sido tema favorito para el estudio de la apogamia, es decir, el desarrollo de un esporofito a partir de tejido gametofítico.

Desde finales de los años 50 y principios de la década del 60 se ha explotado la androgénesis, o sea la producción de plántulas a partir de anteras como fuente de células haploides. En el tabaco, por ejemplo, es posible iniciar cultivos de anteras que contienen granos de polen inmaduros en los cuales el núcleo vegetativo —todavía dentro de la pared original del grano— se divide para dar origen al proembrión. Aún en otros casos ha sido posible inducir el crecimiento de los granos de polen aislados para formar embriones somáticos.

Nuevamente, es posible que las plantas producidas mediante estos procedimientos sean disímiles de sus progenitores y que, en consecuencia, no correspondan estrictamente a la multiplicación clonal. Pero existen casos seleccionados en los que se logró realmente una multiplicación clonal del individuo (Nitzsche et al., 1977; Johri, 1982).

Por otra parte se tiene la ginogénesis, que es el proceso por el cual se producen plantas haploides in vitro mediante la inducción de tejidos haploides del gametofito femenino (Yang et al., 1982).

Digitized by Google

Etapas de la Propagación in Vitro

Murashige (1974; 1977a,b) y otros encontraron que era útil destacar la secuencia de eventos asociados con la multiplicación de plantas mediante las técnicas de cultivo aséptico, de la siguiente manera:

Etapa I. Es la etapa de iniciación o de establecimiento, en la cual se establece el cultivo inicial o primario.

Etapa II. Es la etapa de multiplicación de brotes, o multiplicación simplemente.

Etapa III. Corresponde al enraizamiento o etapa de pretrasplante; tiene como objetivo producir una planta autotrófica que pueda sobrevivir en las condiciones del trasplante al suelo.

Frecuentemente, las condiciones específicas del medio o del cultivo aséptico están asociadas con cada una de las etapas mencionadas y, cuando sea posible, conviene organizar una estrategia de multiplicación basada en la interpretación de dichas condiciones. Sin embargo, no se debe llegar a la deducción de que estas etapas son siempre completamente distintas y separables.

Además de las tres etapas mencionadas (propuestas inicialmente por Murashige, 1974) pueden considerarse otras dos como parte integral del procedimiento:

Etapa IV. Trasferencia final a la etapa de medio ambiente.

Etapa 0. Etapa inicial, que comprende la selección de la planta madre y la selección de una modalidad de pretratamiento para volver funcional la estrategia que se adopte.

Propagación Vegetativa Convencional y su Aplicación a la Propagación Clonal

El primero de varios requisitos que tienen que cumplirse cuando se desea lograr una manipulación exitosa en el cultivo aséptico es familiarizarse, tanto como sea posible, con la biología de la planta con la cual se trabaja. Esto significa que los aspectos de la regeneración vegetativa convencional tienen particular importancia cuando se trata de multiplicar clonalmente las plantas mediante cualquiera de las técnicas de cultivo aséptico mencionadas hasta el momento.

Digitized by Google

El desarrollo de modalidades de crecimiento especializado o de órganos para la regeneración es particularmente significativo, ya que si el explante se hace en el momento adecuado y si se le suministra el medio de cultivo correcto, puede dar origen a un sistema in vitro que imita o simula el natural. Esto significa que las habilidades en la propagación vegetativa son de provecho para la persona que trabaja en el cultivo de tejidos (Browse, 1979; Hartmann et al., 1984; Cook, 1984).

Igualmente, es esencial tener una buena comprensión de los reguladores del crecimiento (Abeles, 1973; Pilet, 1977; Plant Growth Regulator Working Group, 1977; Skoog, 1980; Wareing, 1982; Nickell, 1982; 1983) y de las relaciones hormonales (Steward et al., 1971; Thimann, 1977; Letham et al., 1978; Jacobs, 1979; Thimann, 1980; Crozier, 1981; MacMillan, 1984; Scott, 1984).

En el Cuadro 5.1 se presentó una lista de características de la reproducción vegetativa que tienen importancia para la multiplicación in vitro. En teoría, todas las células de las plantas son totipotentes, o sea capaces de dar origen a una planta entera; aunque hasta el momento las puntas del tallo han tenido mayor importancia para la multiplicación clonal en varias especies, también se han utilizado otros explantes como hojas, ovarios, y capullos de flores para obtener plántulas. La capacidad que tienen los distintos explantes cultivados in vitro para regenerar plantas está correlacionada, aunque no invariablemente, con el hecho de que incluso bajo condiciones corrientes —es decir, condiciones de cultivo no aséptico— pueden responder en forma similar.

Desde mucho antes de que las técnicas de cultivo axénico se pusieran en práctica a nivel de laboratorio, los botánicos estimaron que el desarrollo del cuerpo de la planta superior implicaba la supresión de muchos primordios reales o potenciales y el desarrollo de relativamente pocos de ellos. En realidad, los factores que controlan la expresión del potencial han sido y siguen siendo desconocidos. Las células totipotentes, capaces de producir nuevas regiones de crecimiento, tejidos, órganos e incluso nuevas plantas, se han mantenido claramente controladas por las influencias correlativas y las inhibiciones. Algunas veces, éstas pueden liberarse fácilmente, y en otros casos no.

El conocimiento que tenga el investigador sobre el papel de la regulación del crecimiento de las plantas por medio de sustancias químicas será decisivo para su trabajo. Algunas referencias importantes, no citadas específicamente en este texto, corresponden a la serie de multivolúmenes publicados con el nombre de Handbook of Plant Cell Culture (Evans et al., 1983; Sharp et al., 1984; Ammirato et al., 1984) y al Cell Culture and

Digitized by Google

Somatic Cell Genetics of Plants editado por Vasil (1984 y sig.); la obra de un solo volumen de George et al. (1984) es especialmente completa y debería estar disponible para todos las personas que trabajan en estos temas. Otras obras más antiguas, consideradas actualmente clásicas, son también valiosas ya que los principios que están bien establecidos nunca cambian (Gautheret, 1959; White, 1963; Butenko, 1968; Steward, 1969; Wilt et al., 1976).

En realidad, se debería recordar que, en un tema tan amplio como el de la propagación clonal in vitro, es posible tener muchas variaciones y diferentes enfoques. Los investigadores actualizados saben que no hay reglas inquebrantables para el éxito, y que a menudo es necesario ajustar y reajustar la composición del medio de cultivo, e incluso el medio ambiente, para que se pueda inducir el crecimiento en los cultivos y una posterior organización en la forma deseada. Cada una de las etapas tiene sus propios problemas y no hay manera de suministrar directrices precisas para cada una de ellas.

Concepto de micropropagación. Cuando se considera que la mayoría de las plantas que se propagan mediante el cultivo aséptico se originan generalmente en pequeños esquejes, se puede apreciar rápidamente que no hay nada fundamentalmente nuevo acerca de la multiplicación de las plantas por medio del cultivo de tejidos. En realidad, la palabra micropropagación, utilizada por primera vez en 1968 por Hartmann y Kester en su conocido libro sobre propagación de plantas, parece haber ganado una amplia aceptación como término general para designar varias de las técnicas utilizadas en la multiplicación in vitro.

Originalmente, la micropropagación se definió como 'cualquier' procedimiento aséptico que comprenda la manipulación, en las plantas, de órganos, tejidos o células que produzcan poblaciones de plántulas y que permitan el desvío tanto del proceso sexual normal como de la propagación vegetativa no aséptica que se practica convencionalmente.

La micropropagación clonal implica que cada una de las plántulas que se produce pueda crecer y ser fenotípica y genotípicamente idéntica a la planta original de la que se deriva. Hasta el momento, las puntas de tallos y las yemas laterales han sido los explantes más comúnmente utilizados para la Etapa I. Por esta razón, cuando se usa la palabra micropropagación muy raras veces se piensa en el uso de callos, de células libres o de otros sistemas de tejidos más exigentes.

Sin embargo, hay un hecho claro en todo esto: las plantas que pueden multiplicarse o propagarse por medios vegetativos convencionales no

Digitized by Google

siempre responden igualmente bien a los métodos artificiales de propagación vegetativa. Incluso en el caso de las plantas que se propagan con facilidad, ocurre generalmente que cuanto menor sea el segmento utilizado mayor será la dificultad que se encuentra para fomentar la producción de brotes y ralces.

Los progresos en la ciencia han aumentado la comprensión de la función y de la composición de los organismos; igualmente han aumentado las esperanzas acerca de la multiplicación clonal de plantas a partir de pedazos cada vez más pequeños y hasta de células individuales (Krikorian, 1982). Desde la perspectiva de aquellos que buscan la multiplicación clonal, la estrategia comprende el uso de células para la embriogénesis somática; es una estrategia aún experimental y está orientada hacia la investigación, y de ninguna forma está en la etapa de 'desarrollo' de rutina.

Estrategias Adicionales para la Propagación Clonal

Es importante adoptar una estrategia que sea funcional y se ajuste a las necesidades y expectativas del investigador.

La economía no es una consideración de poca importancia en el proceso de decisión. Aunque este capítulo ha hecho hincapié en las técnicas del cultivo aséptico, también llama la atención sobre las posibilidades que tiene el uso de estrategias de micropropagación **sin** el componente del cultivo aséptico.

Un ejemplo de ello está en el método de Pateña et al. (1979) para la propagación rápida de yuca utilizando esquejes de yema. Los esquejes se toman de plantas cultivadas en el campo, se sumergen en un fungicida y en AIB, y se les permite enraizar bajo nebulización; una vez enraizados pueden fortalecerse en un medio ambiente de alta humedad antes de que sean sembrados en el campo. Se ha calculado que de una planta madura con 500 hojas sanas se pueden producir 4 millones de plantas; a medida que la planta recién propagada crece y produce hojas adicionales con yemas, se tiene disponible nuevo material para la propagación.

Igualmente, ciertas coníferas especialmente árboles de los géneros *Pinus*, *Picea*, *Tsuga*, *Pseudotsuga*, *Thuja*, *Juniperus*, *Sequoia* y *Araucaria* pueden manipularse exitosamente con una combinación de estrategias convencionales y de cultivo aséptico. Una de las estrategias comprende el tratamiento repetitivo del árbol vivo con citocinina a niveles muy altos (del orden de 200 mg/litro); esto se hace durante períodos de crecimiento

Digitized by Google

óptimo para inducir yemas o brotes, generalmente de meristemas de yemas axilares latentes localizadas en la base de un conglomerado de agujas o en el ápice de los fascículos. Estos brotes inducidos son juveniles en su morfología y en algunos casos se asemejan sobremanera a plántulas germinadas. Los brotes se extraen y se cultivan nuevamente in vitro para producir yemas adicionales que a la vez se separan y enraizan en el medio de enraizamiento.

Todo esto señala que las estrategias se pueden derivar de un número de enfoques interconectados con hechos biológicos básicos pertinentes al especimen(es) en cuestión. En efecto, los investigadores deberían estar alerta y buscar constantemente la aplicación de los procedimientos innovativos a su sistema, basados en el conocimiento especial que tienen de las plantas en cuestión.

Referencias

Abeles, F. B. 1973. Ethylene in plant biology. Academic Press, Nueva York.

Addicott, F. T. (ed.). 1983. Abscisic acid. Praeger Publishers, Nueva York.

AFOCEL (Association Forêt-Cellulose). 1979. Micropropagation d'arbres forestiers. AFOCEL Etudes et Recherches no. 12.

Alfermann, A. W. y Reinhard, E. (eds.). 1978. Production of natural compounds by cell culture methods: Proceedings of the International Symposium on Plant Cell Culture held at the University of Tubingen, 1977. Memorias. Tubingen, República Federal de Alemania.

American Orchid Society Bulletin (eds.). 1960-1968. Meristem tissue culture: A selection of articles from the AOSB. American Orchid Society, Botanical Museum, Harvard University, Cambridge, Massachusetts, E.U.

Ammirato, P. V.; Evans, D. A.; Sharp, W. R. y Yamada, Y. (eds.). 1984. Handbook of plant cell culture; 3: Crop species. MacMillan Publishing, Nueva York.

Arditti, J. 1977. Clonal propagation of orchids by means of tissue culture: A manual. En: Arditti, J. (ed.). Orchid biology; I: Reviews and perspectives. Cornell University Press, Nueva York. p. 203-293.

———. 1982. Orchid seed germination and seedling culture: A manual. En: Arditti, J. (ed.). Orchid biology; II: Reviews and perspectives. Cornell University Press, Nueva York. p. 242-370.

Digitized by Google

——— y Straus, M. S. 1979. Taro tissue culture manual. South Pacific Commission information document no. 44. South Pacific Commission, Noumea, Nueva Caledonia.

Barz, W.; Reinhard, W. y Zenk, M.H. (eds.). 1977. Plant tissue culture and its bio-technological applications: Proceedings of the First International Congress on Medicinal Plant Research held at the University of Munich, Alemania, 1976. Memorias, sección B. Springer-Verlag, Nueva York.

Bhojwani, S. S. y Razdan, M. K. 1983. Plant tissue culture: Theory and practice. Elsevier Scientific, Amsterdam, Holanda.

Bonga, J. M. y Durzan, D. J. (eds.). 1982. Tissue culture in forestry. Martinus Nijhoff y W. Junk Publishers, La Haya, Holanda.

Broertjes, C. y Van Harten, A. M. 1978. Application of mutation breeding methods in the improvement of vegetatively propagated crops: An interpretive literature review. Elsevier Scientific, Nueva York.

Brown, C. L. y Sommer, H. E. 1975. An atlas of gymnosperms cultured in vitro: 1924-1974. Georgia Forest Research Council, Macon, Georgia, E. U.

Browse, P. M. 1979. Plant propagation: Seeds, roots, bulbs and corms, layering, stem cuttings, leaf cuttings, budding and grafting. Mitchell Beazley Pub. (Simon and Schuster), Nueva York.

Butcher, D. N. e Ingram, D. B. 1976. Plant tissue culture. University Park Press, Baltimore, Maryland, E.U.

Butenko, R. G. 1968. Plant tissue culture and plant morphogenesis. (Traducido del ruso por Israel Program for Scientific Translation). Jerusalén.

Conger, B. V. (ed.). 1981. Cloning agricultural plants via in vitro techniques. CRC Press, Boca Ratón, Florida, E.U.

Constantin, M. J.; Henke, R. R.; Hughes, K. W. y Conger, B. V. (eds.). 1981. Propagation of higher plants through tissue culture: Emerging technologies and strategies. Proceedings of a symposium at the University of Tennessee, 1980. Memorias (publicación especial). Environ. Exp. Bot. 21(3-4):269-452.

Cook, A. D. (ed.). 1984. Propagation for the home gardener. Plants and Gardens 40(1):1-76.

Crozier, A. 1981. Aspects of metabolism and physiology of gibberellins. Advances in Bot. Res. 9:33-149.

Chaleff, R. S. 1981. Genetics of higher plants: Applications of cell culture. Cambridge University Press, Nueva York.

Chaturvedi, H. C. 1979. Tissue culture of economic plants. En: Khoshoo, T. N. y Nair, P. K. K. (eds.). Progress in plant research; 1: National Botanical Research Institute, Nueva Delhi, India. p. 265-288.

Digitized by Google

DeFossard, R. A. 1976. Tissue culture for plant propagators. 2 ed. Department of Botany, University of New England, Armidale, Australia.

Dodds, J. H. (ed.). 1983. Tissue culture of trees. AVI Publishing, Westport, Connecticut, E.U.

——— y Roberts, L. H. 1982. Plant tissue culture. Cambridge University Press, Nueva York. 178 p.

Doré, C. (ed.). 1980. Application de la culture in vitro a l'amélioration des plantes potagères: Réunion EUCARPIA Section Legumes, Versalles, 1980. Station de Génétique et d'Amélioration des Plantes, Institut National de Recherches Agronomiques (INRA), Versalles, Francia.

Dudits, D.; Farkas, G. L. y Maliga, P. 1976. Cell genetics in higher plants: Proceedings of a UNDP/UNESCO/ICRO training course, 1976. Akadémiai Kiadó, Budapest, Hungría.

Durbin, R. D. (ed.). 1979. *Nicotiana*: Procedures for experimental use. Technical bulletin 1586. U. S. Department of Agriculture, Beltsville, Maryland, E.U.

Earle, E. D. y Demarly, Y. (eds.). 1983. Variability in plants regenerated from tissue culture. Praeger Publisher, Nueva York.

Evans, D. A.; Sharp, W. R.; Ammirato, P. V. y Yamada, Y. (eds.). 1983. Handbook of plant cell culture; 1: Techniques and applications. MacMillan Publishing, Nueva York.

Fiechter, A. (ed.). 1980. Advances in biochemical engineering. Springer-Verlag, Nueva York. v. 16, p. 1-143.

Fitter, M. S. y Krikorian, A. D. 1983. Plant protoplasts: Some guidelines for their preparations and manipulation in culture. Calbiochem-Behring, American Hoechst, La Jolla, California, E.U.

Gamborg, O. L. y Wetter, L. R. 1975. Plant tissue culture methods. National Research Council of Canada (NRC), Ottawa, Canadá.

Garner, R. J.; Chaidru, S. A. et al. 1976. The propagation of tropical fruit trees. Horticultural review no. 4. FAO y Commonwealth Agricultural Bureau, Farnham Royal, Inglaterra.

Gautheret, R. J. 1959. La culture des tissus végétaux: Techniques et réalisations. Masson, París. 863 p.

——— (ed.). 1977. La culture de tissus et des cellules des végétaux: Résultats genéraux et réalisations pratiques. Masson, París.

George, E. F. y Sherrington, P. D. 1984. Plant propagation by tissue culture. Exegetics, Eversley, Basingstoke, Inglaterra. (Manual y directorio comercial.)

Digitized by Google

Gleba, Y. Y. y Sytnik, K. M. 1984. Protoplast fusion; 8: Genetic engineering in higher plants. Monographs on theoretical and applied genetics. Springer-Verlag, Nueva York.

Hartmann, H. T. y Kester, D. E. 1984. Plant propagation: Principles and practices. Englewood Cliffs, Nueva Jersey, E.U.

Helgeson, J. P. y Deverall, B. J. (eds.). 1983. Use of tissue culture and protoplasts in plant pathology. Academic Press, Nueva York.

Hewitt, E. J. 1966. Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. 2 ed. Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, Bucks, Inglaterra.

Hughes, K.; Henke, R. y Constantin, M. 1978. Propagation of higher plants through tissue cultures. Technical Information Center, U.S. Department of Energy, Washington, D.C.

Hussey, G. 1978. The application of tissue culture to the vegetative propagation of plants. Science Progress (Oxford) 65:185-208.

———. 1981. Propagation of some members of the *Liliaceae*, *Iridaceae* and *Amaryllidaceae* by tissue culture. En: Brickell, C. D.; Cutler, D. F. y Gregory, M. (eds.). Petaloid monocotyledons. Linnean Society Symposium Series, 8th, Academic Press, Londres. p. 33-42.

IAEA (International Atomic Energy Agency). 1982. Induced mutations in vegetatively propagated plants; 2: Proceedings of the Final Research Coordination Meeting on the Improvement of Vegetatively Propagated Crops and Tree Crops through Induced Mutations, Coimbatore, India, 1980. Viena.

Ingram, D. S. y Helgeson, J. P. 1980. Tissue culture methods for plant pathologists. Blackwell Scientific, Oxford, Inglaterra. v. 1.

——— y ———. 1981. Tissue culture methods for plant pathologists organized by the British Plant Pathologists. John Wiley, Nueva York. v. 2.

Institute of Genetics of the Academia Sinica at Beijing e IRRI (International Rice Research Institute). 1983. Cell and tissue culture techniques for cereal crop improvement. Memorias. Science Press, Beijing, República Popular de China e IRRI, Manila, Filipinas.

IRRI (International Rice Research Institute). 1982. Rice tissue culture planning conference. Los Baños, Filipinas.

Islam, A. S. (ed.). 1981. Proceedings of the International Workshop on Improvement of Tropical Crops through Tissue Culture, Dacca University, 1981. Asiatic Press, Dacca, Bangladesh. 137 p.

Jacobs, W. P. 1979. Plant hormones and plant development. Cambridge University Press, Cambridge, Inglaterra.

Digitized by Google

Johri, B. M. (ed.). 1982. Experimental embryology of vascular plants. Springer-Verlag, Nueva York.

Krikorian, A. D. 1982. Cloning higher plants from aseptically cultured tissues and cells. Biol. Rev. 57:151-218.

Letham, D. S.; Goodwin, P. B. y Higgins, T. J. V. (eds.). 1978. Phytohormones and related compounds: A comprehensive treatise; 2: Phytohormones and the development of higher plants. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Nueva York.

Litz, R. E.; Moore, G. A. y Srinivasan, C. (1985). In vitro systems for propagation and improvement of tropical fruit and nut crops. Horticultural Reviews. (En impresión.)

MacMillan, J. 1984. Hormonal regulation of development; 1: Molecular aspects of plant hormones. En: Encyclopedia of Plant Physiology, new series. Springer-Verlag, Nueva York. v. 9.

Mantell, S. H. y Haque, S. Q. 1979. Disease-free yams: Their production, maintenance and performance. Yam Virus Project bulletin no. 2. Caribbean Agricultural Research and Development Institute (CARDI), University Campus, St. Augustine, Trinidad.

———; ——— y Whitehall, A. P. 1979. A rapid propagation system for yams. Yam Virus Project bulletin no.1. Caribbean Agricultural Research and Development Institute (CARDI), University Campus, St. Augustine, Trinidad.

——— y Smith, H. (eds.). 1983. Plant biotechnology. Cambridge University Press, Cambridge.

Morel, G. M. 1974. Clonal multiplication of orchids. En: Withner, C. L. (ed.). The orchids: Scientific studies. Wiley, Nueva York. p. 169-222.

Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. Ann. Rev. Plant Physiol. 25:135-166.

———. 1977a. Manipulation of organ initiation in plant tissue cultures. Botanical Bulletin of the Academia Sinica 18:1-24.

———. 1977b. Clonal crops through tissue culture. En: Barz, W.; Reinhard, E. y Zenk, M. H. (eds.). Tissue culture and its biotechnological application. Nueva York. p. 392-403.

Nickell, L. G. 1982. Plant growth regulators: Agricultural uses. Springer-Verlag, Nueva York.

——— (ed.). 1983. Plant growth regulating chemicals. CRC Press, Boca Ratón, Florida, E.U.

Nitzsche, W. y Wenzel, G. 1977. Haploids in plant breeding. Fortschritte der Pflanzenzuchtung (Advances in Plant Breeding) Supplement 8:1-101.

Digitized by Google

Pateña, L. F. y Barba, R. C. 1979. Rapid propagation of cassava by leaf-bud cuttings. Phil. Jour. Crop Sci. 4(2-3):53-62.

Pierik, R. L. M. 1979. In vitro culture of higher plants: Bibliography. Kniphorst Scientific Bookshop, Wageningen, Holanda.

Pilet, P. E. (ed.). 1977. Plant growth regulation: Proceedings of the 9th International Conference on Plant Growth Substances, Lausanne, 1976. Springer-Verlag, Nueva York.

Plant Growth Regulator Working Group. 1977. Plant growth regulator handbook. Great Western Sugar, Agricultural Research Center, Longmont, Colorado, E.U.

Potrykus, I.; Harms, C. T.; Hinnen, A.; Hutter, R.; King, P. J. y Shillito, R.D. (eds.). 1983. Protoplasts 1983: Proceedings of the Sixth International Protoplast Symposium, Basel, 1983. Experimentis Supplementum Birkhauser Verlag, Basilea, Suiza. v. 46.

Proceedings of Sino-Australian Plant Tissue Culture Symposium. 1978. Science Press, Pekín, China.

Raghavan, V. 1966. Nutrition, growth and morphogenesis of plant embryos. Biol. Rev. 41:1-58.

———. 1976. Experimental embryogenesis in vascular plants. Academic Press, Londres.

Ramakrishnan, C. V. (ed.). 1965. Tissue culture: Proceedings of the seminar held in Baroda, India, 1965. W. Junk Publishers, La Haya, Holanda.

Rao, A. N. (ed.). 1982. Tissue culture of economically important plants: Proceedings of an international symposium held at the National University of Singapore, 1981. Committee on Science and Technology in Developing Countries (COSTED) y Asian Network for Biological Sciences (ANBS), Singapur, Singapur.

———; Heble, M. R. y Chadha, M. S. (eds.). 1980. Plant tissue culture, genetic manipulation and somatic hybridization of plant cells: Proceedings of a national symposium held at Bhabha Atomic Research Centre, 1980. Bombay, India.

Reinert, J. y Bajaj, Y. P. S. (eds.). 1977. Plant cell, tissue, and organ culture: Applied and fundamental aspects. Springer-Verlag, Nueva York.

——— y Yeoman, M. M. 1982. Plant cell and tissue culture: A laboratory manual. Springer-Verlag, Nueva York. 83 p.

Roca, W. M. 1980. El cultivo de meristemas de yuca: Guía de estudio. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia.

Digitized by Google

———. 1982. El cultivo de meristemas para el saneamiento de clones de yuca: Guía de estudio. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia.

Sala, F.; Parisi, B.; Cella, R. y Ciferri, O. (eds.). Plant cell cultures: Results and perspectives. Proceedings of an international workshop held in Pavia, Italia, 1979. Elsevier, Nueva York.

Scott, T. K. 1984. Hormonal regulation of development; 2: The function of hormones from the level of the cell to the whole plant. En: Encyclopedia of Plant Physiology, new series. Springer-Verlag, Nueva York. v. 10.

Sen, S. K. y Giles, K. (eds.). 1983. Plant cell culture in crop improvement. Plenum Press, Nueva York.

Sharp, W. R.; Larsen, P. O.; Paddock, E. F. y Raghavan, V. (eds.). 1979. Plant cell and tissue culture: Principles and applications. Ohio State University Press, Columbus, E.U.

———; Evans, D. A.; Ammirato, P. V. y Yamada, Y. (eds.). 1984. Handbook of plant cell culture; 2: Crop species. MacMillan Publishing, Nueva York.

———; ———; Flick, E. C. y Sommer, H. E. 1983. Strategies and specifications for management of in vitro plant propagation. En: Meudt, W. J. (ed.). Strategies of plant reproduction: Proceedings of the Sixth Beltsville Symposium in Agricultural Research. Allanhead-Osman Publishers, Londres.

Skoog, F. (ed.). 1980. Plant growth substances 1979: Proceedings of the 10th International Conference on Plant Growth Substances, Madison, Wisconsin, 1979. Springer-Verlag, Nueva York.

Smith, R. 1982. In vitro propagation of *Kalanchoe blossfoeldiana* Poelln. Avery Publishing Group, Wayne, New Jersey.

Staba, E. J. (ed.). 1980. Plant tissue culture as a source of biochemicals. CRC Press, Boca Ratón, Florida, E.U.

Steward, F. C. (ed.). 1969. Plant physiology: A treatise; 5-B: Analysis of growth: The responses of cells and tissues in culture. Academic Press, Nueva York.

——— y Krikorian, A. D. 1971. Plants, chemicals and growth. Academic Press, Nueva York.

Street, H. E. (ed.). 1977. Plant tissue and cell culture. 2 ed. University of California Press, Los Angeles, E.U.

——— y Butcher, D. N. 1964. Excised root culture. Bot. Rev. 30:513-586.

Styer, D. J. y Chin, C. K. 1983. Meristem and shoot tip culture for propagation, pathogen elimination, and germplasm preservation. Horticultural Reviews 5:221-277.

Digitized by Google

Thimann, K. V. 1977. Hormone action in the whole life of plants. The University of Massachusetts Press, Amherst, Mass, E.U.

——— (ed.). 1980. Senescence in plants. CRC Press, Boca Ratón, Florida, E.U.

Thomas, E. y Davey, M. R. 1975. From single cells to plants. Wykeham Publications, Londres. 171 p.

Thorpe, T. A. (ed.). 1978. Frontiers of plant tissue culture: Proceedings of the 4th International Congress of Plant Tissue and Cell Culture held at the University of Calgary, Canadá, 1978. University of Calgary, Calgary, Alberta, Canadá.

——— (ed.). 1981. Plant tissue culture methods and applications in agriculture: Proceedings of a symposium based on the UNESCO training course on plant tissue culture, São Paulo, Brasil, 1978. Academic Press, Nueva York.

Tomes, D. T.; Ellis, B. E.; Harney, R. M.; Kasha, K. J. y Peterson, R. L. (eds.). 1982. Application of plant cell and tissue culture to agriculture and industry. University of Guelph, Guelph, Canadá.

Vasil, I. K. (ed.). 1980. Perspectives in plant cell and tissue culture. Supplement 11A and 11B to International Review of Cytology. Academic Press, Nueva York.

——— (ed.). 1984. Cell culture and somatic cell genetics of plants; 1: Laboratory procedures and applications. Academic Press, Nueva York.

——— (ed.). 1985. Cell culture and somatic cell genetics of plants; 2: Growth, nutrition and preservation. Academic Press, Nueva York.

——— (ed.). 1986. Cell culture and somatic cell genetics; 3: Plant regeneration and genetic variability. Academic Press, Nueva York.

———; Scowcroft, W. R. y Frey, K. J. (eds.). 1982. Plant improvement and somatic cell genetics. Academic Press, Nueva York.

Wareing, P. F. (ed.). 1982. Plant growth substances 1982: Proceedings of the 11th International Conference on Plant Growth Substances, Aberystwyth, Wales, 1982. Academic Press, Nueva York.

Wetherell, D. F. 1982. Introduction to *in vitro* propagation. Avery Publishing Group, Terrace, Wayne, Nueva Jersey, E.U.

Wetter, R. y Constabel, F. (eds.). 1982. Plant tissue culture methods. 2 ed. rev. National Research Council of Canada (NRC), Saskatoon, Canadá. 145 p.

White, P. R. 1963. The cultivation of animal and plant cells. 2 ed. Ronald Press, Nueva York.

——— y Grove, A. R. (ed.). 1965. Proceedings of an international conference on plant tissue culture. McCutchan Publishing, Berkeley, California.

Digitized by Google

Wilt, F. H. y Wessels, N. K. (eds.). 1976. Methods in developmental biology. Thomas Y. Crowell, Nueva York.

Withers, L. A. y Williams, J. T. (eds.). 1982. Crop genetic resources: The conservation of difficult material. IUBS/IBPGR Joint Publication. Nottingham University School of Agriculture, Sutton Bonington, Leicestershire, Inglaterra.

Yang, H. Y. y Zhou, C. 1982. In vitro induction of haploid plants from unpollinated ovaries and ovules. Theor. Appl. Genet. 63:97-104.

Yeoman, M. M. y Truman, D. E. S. 1982. Differentiation in vitro. British Society for Cell Biology Symposium. Cambridge University Press, Cambridge, Inglaterra.

Zimmerman, R. H. (ed.). 1980. Nursery production of fruit plants through tissue culture applications and feasibility: Proceedings of a conference held at Beltsville, E.U. 1980. Department of Agriculture, Science and Education Administration. Beltsville, Maryland, E.U.

Digitized by Google

Capítulo 6

Micropropagación: conceptos, metodología y resultados

V. M. Villalobos A.*
T. A. Thorpe**

Agradecimientos

El presente trabajo fue apoyado en parte por el proyecto PCAFBNA-021310 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México. Los autores agradecen al Dr. Alfredo Carballo Quirós por las sugerencias al texto, y a Laura Valencia Enciso por el trabajo mecanográfico.

* Unidad de Recursos Fitogenéticos, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba, Costa Rica.
** Department of Biology, University of Calgary, Calgary, Alberta, Canadá.

Digitized by Google

Introducción

El concepto original de cultivo de tejidos vegetales se ha extendido modernamente para abarcar tanto el cultivo aséptico de tejidos como el de células y órganos, dentro de un grupo de técnicas que se fundamentan en varios principios. Entre estos principios, los más importantes sin duda son la totipotencialidad celular propuesta por Haberlandt (1902) y la hipótesis del balance hormonal sugerida por Skoog et al. (1957). Aun cuando estos principios fundamentales han sido cuestionados por diferentes autores como Trewavas (1981, 1982) y Firn et al. (1980), parecen encontrar cierto grado de fundamentación en la mayoría de los modelos biológicos empleados en el estudio de la morfogénesis in vitro.

Las técnicas de cultivos asépticos han contribuido no sólo a un mejor entendimiento de los eventos de la diferenciación celular, sino a un mejor aprovechamiento de tales eventos en la explotación más eficiente de las plantas. En este último aspecto vale la pena mencionar los siguientes usos de las técnicas del cultivo in vitro: a) mejoramiento genético; b) obtención de plantas libres de virus y otros patógenos; c) conservación de germoplasma; y (d) micropropagación.

Hasta la fecha, la micropropagación es la técnica que ha trascendido con éxito de los ámbitos experimentales a la aplicación práctica. La presente revisión tiene por objeto el análisis de los avances logrados en la micropropagación de especies explotadas por el hombre.

El Concepto de Micropropagación

Tratando de conciliar principios anteriormente discutidos, se puede decir que cuando un inóculo con potencialidad de diferenciación se incuba en condiciones favorables (balance hormonal apropiado) regenera un nuevo individuo.

Aun cuando se ha hecho énfasis en la importancia del balance hormonal, existen otros factores que han probado jugar un papel importante en la diferenciación; sin embargo, antes de analizar estos otros factores, es pertinente definir el concepto de micropropagación. Si el cultivo de tejidos consiste en cultivar asépticamente diferentes explantes constituidos por fracciones de un tejido u órgano que se extrae de la planta, la micropropagación es prácticamente una multiplicación masiva in vitro.

Digitized by Google

En la actualidad, la micropropagación se practica con éxito en especies hortícolas (Murashige, 1978), ornamentales (Hughes, 1981) y, más recientemente, en especies leñosas (Thorpe, 1983). En algunas especies, esta metodología ha mostrado importantes ventajas en comparación con los sistemas convencionales de propagación; las más importantes son:

- Incremento acelerado del número de plantas derivadas por genotipo.
- Reducción del tiempo de multiplicación.
- Posibilidad de multiplicar grandes cantidades de plantas en una superficie reducida, a bajos costos y en tiempos económicamente costeables.
- Mayor control sobre la sanidad del material que se propaga.
- Facilidad para trasportar el material in vitro de un país a otro, con menos restricciones aduaneras.
- Posibilidad de multiplicar rápidamente una variedad de la cual sólo existan pocos individuos.

Pasos en la Micropropagación

Murashige (1974) ha propuesto tres pasos fundamentales para micropropagar eficientemente una especie: 1) el establecimiento aséptico del cultivo; 2) su multiplicación; y 3) el enraizamiento y la preparación del inóculo para su trasplante al suelo. A continuación se discutirán estos pasos con mayor detalle.

Establecimiento del cultivo aséptico

Una vez seleccionado el mejor explante (según las características que se discutirán más adelante) se requiere desinfectarlo superficialmente; la razón: en el medio de cultivo pueden crecer microorganismos, principalmente bacterias y hongos, que competirán ventajosamente con el explante. Para esta desinfección se han empleado diferentes compuestos, siendo los más comunes las soluciones de hipoclorito de sodio y de calcio, el peróxido de hidrógeno, el nitrato de plata, el cloro comercial, el alcohol a diferentes porcentajes, y otros. La selección y concentración de los desinfectantes y el tiempo de desinfección se determinan, en gran medida, por las características del explante; en la práctica, se establecen experimentalmente por ensayo y error.

Digitized by Google

El explante debe responder eficientemente bajo las condiciones in vitro. Es importante considerar el hecho de que el aislamiento de un tejido u órgano del resto de la planta provoca un estado de estrés que altera su metabolismo celular y, en forma importante, su balance hormonal. Un buen explante es aquel cuyas células sobreviven, en una alta proporción, a la descomposición antes señalada, y que luego responde eficientemente a las condiciones in vitro.

Crecimiento del inóculo

En estado de crecimiento, el explante se multiplica con la formación de callos o sin ella, según las condiciones de cultivo. La fase intermedia de formación de callos se evita cuando se tienen fines de micropropagación debido al hecho, ya ampliamente conocido, de que las plantas provenientes de callos presentan diferentes grados de variación; ésta puede ser de tipo epigenético o corresponder a mutaciones verdaderas (Lankin et al., 1981).

Es importante considerar también que la fase de crecimiento puede deberse a la división de las células, al aumento de su tamaño o a ambas cosas. A este respecto, la diferenciación de novo está asociada con la producción de nuevas células cuya organización está de acuerdo con un 'programa' influido por las condiciones in vitro y la concomitante ganancia en peso seco.

Enraizamiento de los brotes y preparación para su trasplante

El proceso de enraizamiento en los brotes propagados in vitro requiere generalmente del trasplante a un medio de cultivo con menor concentración de sales. El medio de Murashige et al. (1962), por ejemplo, diluido al 50% ha dado resultados positivos en diferentes especies. Asimismo, se requiere cambiar el balance hormonal, esto es, disminuir las citocininas y aumentar las auxinas exógenas. En algunas especies, la eliminación de las citocininas exógenas ha sido suficiente estímulo para la diferenciación del sistema radical (Thorpe, 1980).

En la micropropagación a gran escala de especies ornamentales se ha observado que la diferenciación del sistema radical bajo condiciones in vitro no es económicamente costeable, por lo que en algunas empresas se ha sustituido esta fase del proceso por el enraizamiento de brotes en cámaras de humidificación.

Digitized by Google

Si el sistema radical fue diferenciado in vitro, las plantas no se pueden trasplantar directamente a las condiciones de invernadero sin una paulatina adaptación a las condiciones del suelo. A este período de adaptación se le ha denominado período de endurecimiento.

De acuerdo con los procedimientos seguidos por los autores de este capítulo con especies anuales, leñosas y suculentas, las plantas obtenidas in vitro se deben lavar cuidadosamente para eliminar todos los residuos de agar, que pueden ser una fuente de contaminación. Posteriormente, se trasplantan a recipientes con suelo estéril y se cubren con bolsas de polietileno, que se van perforando gradualmente hasta que queden eliminadas completamente en un período de 15 a 20 días; esto se hace con el objeto de adaptar paulatinamente las plantas a las condiciones del invernadero. Durante esta fase de endurecimiento, las plantas se riegan preferentemente con medio de cultivo diluido al 50% y posteriormente se sustituye esta fórmula de riego por soluciones nutritivas menos complejas.

Factores que Influyen en la Micropropagación

Existen diferentes factores que determinan el éxito en los sistemas de micropropagación. A continuación se mencionan aquéllos más importantes acerca de los cuales se ha acumulado mayor información.

Planta que dona el explante

El estado fisiológico de la planta que da el explante (planta madre) influye significativamente en su capacidad morfogenética. Se ha encontrado, por ejemplo, que los requerimientos nutricionales y hormonales difieren cuando los tejidos cultivados provienen de plantas en diferentes edades fisiológicas (Styer et al., 1983).

Asimismo, se ha observado que la edad fisiológica del explante tiene gran influencia en la morfogénesis. Se sabe que mientras más joven y menos diferenciado esté el tejido que se va a sembrar, mejor será la respuesta in vitro (Villalobos et al., 1982b). A este respecto, los meristemas apicales y axilares han sido empleados con éxito en una amplia gama de especies.

La posición relativa de las yemas es otro factor importante. Se ha observado, por ejemplo, que las yemas axilares de rosa, obtenidas de la parte media del tallo, se desarrollan más rápidamente que aquéllas obtenidas de la base o la porción apical (Bressan et al., 1982). Sin embargo, en el

Digitized by Google

espárrago y la grosella las yemas apicales son las únicas que producen plantas in vitro (Styer et al., 1983).

En el caso de especies propagadas vegetativamente, los brotes jóvenes han sido generalmente la fuente del explante (Villalobos, 1980).

El explante

Como se mencionó anteriormente, el explante es una parte de un tejido o de un órgano que se aísla del resto de la planta con fines de cultivo. La selección del explante puede hacerse teniendo en cuenta el sistema de propagación de la planta.

Si las plantas que se van a micropropagar tienen reproducción por semilla, las partes embrionales o de la plántula son las fuentes más comunes de explantes; las semillas pueden ser desinfectadas superficialmente y germinar en condiciones de asepsia. Este método se usa extensivamente en coníferas y otras especies maderables (Villalobos et al., 1982a). En el caso de especies propagadas vegetativamente, los brotes jóvenes y los ápices meristemáticos han sido generalmente la fuente de los explantes (Villalobos, 1980).

El tamaño del explante no tiene aparentemente mayor influencia. Solamente en el caso de que se pretenda obtener plantas libres de virus, los meristemas (sin primordios foliares) tienen una alta probabilidad de diferenciar plantas libres de estos patógenos; sin embargo, es más difícil regenerar de ellos plantas completas (Villalobos et al., 1982a). Para mayores detalles, consultar el Capítulo 23 de esta publicación.

Factores físicos

Aun cuando muchos factores pueden influir en la micropropagación, los factores físicos juegan un papel determinante; la luz y la temperatura han sido los factores físicos más extensivamente estudiados. La temperatura de incubación para la propagación de la mayoría de las familias fluctúa entre 24 y 28 °C. Se han variado los regímenes de temperatura en el día y la noche, y se ha encontrado que únicamente en un reducido número de especies tal variación es ventajosa (Chee et al., 1982).

Recientes investigaciones han comprobado que la luz es un factor fundamental en la morfogénesis (Villalobos et al., 1984). Al respecto se ha observado, en el caso de *Pinus radiata*, que la luz interacciona con una citocinina durante la diferenciación de los brotes adventicios y que la

Digitized by Google

morfogénesis no ocurre cuando falta uno de esos dos componentes. El papel de la luz en la diferenciación involucra varios componentes como son la intensidad, el fotoperíodo y la calidad; aunque se reconoce la importancia morfogenética de estos componentes, los estudios realizados con el fin de analizarlos son escasos.

Medio de cultivo

De acuerdo con Gamborg et al. (1976) el éxito en el cultivo de tejidos depende de la selección del medio de cultivo, incluyendo su composición química y su forma física. En el Cuadro 6.1 se presentan los medios de cultivo más comúnmente usados en la micropropagación.

Micropropagación de Especies Herbáceas

Los métodos usados para micropropagar especies herbáceas se basan en cualquiera de los siguientes procesos morfogenéticos: a) estímulo de las yemas axilares, b) diferenciación de brotes adventicios, y c) embriogénesis somática.

Estímulo de yemas axilares

En este caso, las condiciones in vitro estimulan el desarrollo de las yemas axilares permitiendo la formación de una planta por cada yema. La eficiencia de este sistema estriba en que el número de plantas obtenidas está determinado por el número de yemas axilares preexistentes en el inóculo; por otro lado, el sistema presenta la ventaja de que los individuos regenerados muestran una gran estabilidad genética.

En Chapingo se ha logrado micropropagar *Opuntia* spp. a partir de una yema (Escobar, 1985), siendo posible obtener plantas enraizadas después de 70 días de cultivo (ver Capítulo 30, Figura 30.1).

Diferenciación de brotes adventicios

La diferenciación de brotes adventicios permite la formación de novo de estructuras unipolares; este sistema permite la regeneración de una mayor cantidad de brotes que el sistema de yemas axilares.

Los brotes adventicios tienen su origen en la formación de tejido meristemático y la posterior diferenciación de ápices, ya sea directamente o a

Digitized by Google

Cuadro 6.1. Diferentes fórmulas de medios de cultivo empleados en micropropagación.

Nutrimentos	Concentración según medio[a]									
	MS		ER		B5		SH		HE	
	mg/litro	mM	mg/litro	mM	mg/litro	mM	mg/litro	mM	mg/litro	mM
NH_4NO_3	1650	20.6	1200	15.0						
KNO_3	1900	18.8	1900	18.8	2500	25	2500	25		
$CaCl_2.2H_2O$	440	3.0	440	3.0	150	1.0	200	2.4	75	0.5
$MgSO_4.7H_2O$	370	1.5	370	1.5	250	1.0	400	1.6	250	1.0
KH_2PO_4	170	1.25	340	2.5						
$(NH_4)_2SO_4$					134	1.0				
$NH_4H_2PO_4$							300	2.6		
$NaNO_3$									600	7.0
$NaH_2PO_4.H_2O$					150	1.1			125	0.9
KCl									750	10.0
KI	0.83	5.0			0.75	4.5	1.0	6.0	0.01	0.06
H_3BO_3	6.2	100	0.63	10	3.0	50	5.0	80	1.0	16.2
$MnSO_4.4H_2O$	22.3	100	2.23	10					0.1	0.5
$MnSO_4.H_2O$					10	60	10	60		
$ZnSO_4.7H_2O$	8.6	30			2.0	7.0	1.0	3.5	1.0	3.5
Versenato de Zn			15	37						
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25	1.0	0.025	0.1	0.25	1.0	0.1	0.4		
$CuSO_4.5H_2O$	0.025	0.1	0.0025	0.01	0.025	0.1	0.2	0.8	0.03	0.12
$CoCl_2.6H_2O$	0.025	0.1	0.0025	0.01	0.025	0.1	0.1	0.4		
$AlCl_3$									0.03	0.22
$NiCl_2.6H_2O$									0.03	0.13
$FeCl_3.6H_2O$									1.0	3.7
Na_2EDTA	37.3	100	37.3	100	37.3	100	20	55		
$FeSO_4.7H_2O$	27.8	100	27.8	100	27.8	100	15	55		
Sacarosa (g)	30		40		20		30			
pH	5.7		5.8		5.5		5.8			

a. MS = Murashige y Skoog, 1962; ER = Erickson, 1965; B5 = Gamborg et al., 1965; SH = Schenk y Hildebrant, 1972; HE = Heller's, 1953.

Digitized by Google

partir de callos originados también del explante; esto último puede traer como consecuencia la variabilidad fenotípica en los clones diferenciados. Otro factor importante en el caso de la regeneración a partir de callos es el fenómeno de habituación; al respecto se sabe que los callos que se mantienen en condiciones indiferenciadas por largos períodos limitan su capacidad morfogenética.

Existen muchas especies que han sido micropropagadas con éxito empleando este sistema; entre ellas se encuentran el clavel (Stone, 1960), la lechuga (Koevary et al., 1978), la papa (Roest y Bokelmann, 1976), el espárrago (Wilmar y Hellendoorn, 1968), el camote (Sehgal, 1978), especies de *Dioscorea* (Granada y Villalobos, 1980) y la zanahoria (Smith y Street, 1974).

Embriogénesis somática

En condiciones in vitro, es factible diferenciar embriones a partir de células tanto del esporofito como del gametofito. Este proceso de diferenciación se observó por vez primera en células suspendidas de *Daucus carota* (Reinert, 1959). Desde ese primer descubrimiento se ha incrementado notablemente el número de especies que han mostrado esta capacidad regenerativa (Evans et al., 1981; Dodds et al., 1982).

Aparentemente, los factores químicos más importantes para la embriogénesis somática son las auxinas exógenas, la fuente y la concentración del nitrógeno, y algunas otras sustancias como la sacarosa. Desde el punto de vista de la propagación, la embriogénesis somática es el sistema más eficiente, si se considera la eficiencia como el número de plantas regeneradas por unidad de tiempo. Empleando este sistema se pueden obtener cantidades virtualmente ilimitadas de plantas, ya que todo hace suponer que por cada célula suspendida en el medio de cultivo se está diferenciando una planta. Debe considerarse, sin embargo, que en un cultivo de células en suspensión la mayoría de los embriones somáticos tienen su origen a partir de callos, implicando, como se indicó con anterioridad, alguna forma de variación epigenética.

Micropropagación de Especies Leñosas

Dentro de las especies leñosas, las más extensivamente estudiadas en los últimos años han sido las forestales y dentro de ellas las coníferas; por esa razón, las informaciones siguientes se referirán a los estudios realizados en

Digitized by Google

árboles maderables. Skirvin (1981) ha hecho una amplia recopilación de investigaciones relacionadas con la micropropagación de frutales perennes, y Hughes (1981) lo ha hecho con algunas ornamentales.

Según datos recientes, la superficie mundial ocupada por los recursos forestales se estima entre 2500 a 2800 millones de hectáreas, lo que equivale a una cuarta parte de la superficie terrestre. No obstante, de continuar el mismo ritmo de explotación de los bosques sin reforestar las zonas taladas, esa superficie se reducirá en 70% en los próximos 50 años (Keays, 1974). Villalobos et al. (1982a) indican que en las próximas décadas la demanda de madera para las industrias de muebles, de la construcción, química y papelera, así como los estragos causados por enfermedades, parásitos e incendios forestales seguirán limitando la existencia de los bosques.

Desafortunadamente, los programas de mejoramiento genético en especies forestales no han tenido repercusiones trascendentales en esta problemática, debido principalmente al largo ciclo de estas especies desde la siembra de la semilla hasta la floración. En las gimnospermas, esta parte del ciclo requiere entre 15 y 20 años, lo que se ve reflejado en la poca continuidad de los proyectos a largo plazo.

La propagación vegetativa ha tenido un papel importante en la multiplicación de árboles 'elite' (Ivanova, 1981); sin embargo, se ha observado que las estacas pierden la capacidad para enraizar a medida que el árbol de origen es más viejo. Por otro lado, es necesario que los árboles usados como patrones sean lo suficientemente maduros para que expresen su potencial genético; asimismo, al emplear ramas maduras para el enraizamiento hay problemas de crecimiento plagiotrópico (Sweet, 1973).

Las técnicas de micropropagación han demostrado ser una importante alternativa para la solución de algunos de los problemas anteriormente referidos. El método de diferenciación de brotes adventicios es más común que la embriogénesis somática, y tiene mayor potencialidad para una propagación masiva que el estímulo de las yemas axilares. Actualmente no existen antecedentes que indiquen el éxito de la embriogénesis somática en especies forestales.

La primera especie leñosa regenerada mediante el cultivo de tejidos fue *Populus tremuloides* (triploide) a partir de callos (Winton, 1968); la primera gimnosperma fue *Pinus palustris* a partir de embriones (Sommer et al., 1975). Con posterioridad a estas investigaciones pioneras, se han publicado diversos trabajos que señalan la regeneración de plantas por sistemas similares. A la fecha existen 57 especies maderables a partir de las cuales se han podido regenerar plantas completas in vitro (Brown et al., 1974; Mott, 1981; Patel et al., 1984).

Digitized by Google

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 directamente del explante, ya que a partir de callos su formación ha sido muy difícil y frecuentemente genera anormalidades. En la diferenciación de brotes adventicios existe una interrelación entre el explante, el medio y las condiciones ambientales de cultivo.

El explante es extremadamente importante; su influencia en el desarrollo in vitro ha sido demostrada (Villalobos et al., 1984). La edad del explante es un factor crítico en las especies maderables (Bonga, 1982); en general, la micropropagación es relativamente fácil empleando tejidos juveniles, y es progresivamente más difícil con tejidos adolescentes y maduros. Sin embargo, aunque se haya delimitado la edad del material, el mejor explante se tiene que determinar experimentalmente; los explantes más comunes en coníferas, por ejemplo, han sido los embriones, partes de plántulas, los cotiledones, y los hipocótilos provenientes de semillas germinadas asépticamente.

Los componentes de los medios de cultivo han sido también objeto de estudios extensivos. Generalmente se agrupan en cinco clases de compuestos: a) macro y microelementos; b) fuentes de carbono, generalmente sacarosa; c) vitaminas; d) nitrógeno reducido, y e) reguladores del crecimiento (Cuadro 6.1). El regulador de crecimiento clave en la formación de brotes es la cinetina; sin embargo, las auxinas en bajas concentraciones han tenido respuesta en algunas especies.

Los factores físicos que se consideran son varios, siendo importantes éstos: a) la forma física del medio; b) la humedad del medio y de su atmósfera gaseosa; c) la luz; y d) la temperatura.

En muchos casos, se requiere el trasplante a un medio con otro balance hormonal y nutricional para la formación de brotes adventicios. En otras ocasiones, el trasplante a otro medio, después de formados los brotes, estimula el alargamiento de los tallos, los cuales se pueden separar y enraizar. En este caso, el trasplante continuo permite generalmente la formación de un gran número de brotes; por ejemplo, en *Pinus radiata* el número de brotes capaces de ser enraizados se ha podido incrementar desde 180 a más de 1300, haciendo el trasplante a intervalos de tres semanas durante 12 a 24 semanas (Aitken et al., 1981).

La inducción del sistema radical en angiospermas ha presentado más problemas. En general, la reducción en la concentración de sales minerales y el uso de auxinas —asociado generalmente con la disminución de la

Digitized by Google

temperatura— han mostrado resultados positivos. No obstante, la tendencia actual es la de enraizar en condiciones no estériles, esto es, estimulando en brotes diferenciados in vitro la formación de raíces en sustratos como la agrolita, la vermiculita y otros; esta medida es simple, más económica y frecuentemente produce mejores raíces.

Los problemas más serios encontrados en la propagación de especies arbóreas in vitro son la variación genética en las respuestas de regeneración y el proceso de maduración; estos dos problemas dificultan considerablemente la ejecución de sistemas prácticos de propagación de fenotipos seleccionados. Entre otros problemas están la formación de órganos y plantas aberrantes, la dificultad para erradicar las infecciones internas, y la secreción de sustancias tóxicas como fenoles y sustancias volátiles.

Consideraciones Finales

En los últimos años, el cultivo de tejidos vegetales ha cobrado mayor interés debido a las expectativas que se tienen en cuanto a la biotecnología. Es de considerar, por ejemplo, la creciente importancia que el cultivo de tejidos está adquiriendo en la agricultura; se tienen predicciones de que las técnicas in vitro serán una importante herramienta de la agricultura del siglo XXI.

Con respecto a la micropropagación, constantemente se incrementa la lista de especies que se pueden multiplicar eficientemente empleando los métodos de aquélla. Sin embargo, tales técnicas no se han podido aplicar con los mismos resultados a las especies leñosas, y esto ha estimulado a muchos investigadores a realizar esfuerzos para elucidar el problema. Sobre la base de las consideraciones anteriores, se estima que aunque el cultivo de tejidos vegetales no resolverá todos los problemas agrícolas de los próximos años, esta técnica, complementada con otras, será de gran importancia para la solución de nuestras crecientes necesidades.

Referencias

Aitken, J.; Horgan, K. y Thorpe, T. A. 1981. Influence of explant selection on the shoot-forming capacity of juvenile tissue of radiata pine. Can. J. For. Res. 11:112-117.

Digitized by Google

Bonga, J. M. 1982. Vegetative propagation in relation to juvenility, maturity and rejuvenation. En: Bonga, J. M. y Durzan, S. N. (eds.). Tissue culture in forestry. Martinus Nijhoff, Holanda. p. 387-412.

Bressan, P. H.; Kim, Y. K.; Hyndman, S. E.; Hasegawa, P. M. y Bressan, R. A. 1982. Factors affecting in vitro propagation of rose. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 107:979-990.

Brown, C. y Sommer, H. 1974. Tissue culture technique for plantlet formation and propagation of difficult-to-root forest trees. Forest Research Progress, University of Georgia, E.U.

Chee, R. y Pool, R. M. 1982. The effects of growth substances and photoperiod on the development of shoot apices of *Vitis* cultures in vitro. Scientia Hort. 16:17-27.

Dodds, J. H. y Roberts, L. W. 1982. Experiments in plant tissue culture. Cambridge University Press, Londres. 178 p.

Erickson, T. 1965. Studies on the growth requeriments and growth measurements of cell cultures of *Haplopappus gracilis*. Physiol. Plant. 18:976-993.

Escobar, A. H. 1985. Organogénesis y propagación in vitro de *Opuntia* spp. Tesis (M.S.). Chapingo, México.

Evans, D. A.; Sharp, W. R. y Flick, C. E. 1981. Growth and behavior of cell cultures: Embryogenesis and organogenesis. En: Thorpe, T. A. (ed.). Plant tissue culture: Methods and applications in agriculture. Academic Press, Nueva York. p. 45-114.

Firn, R. D. y Digby, J. 1980. The establishment of tropic curvatures in plants. Ann. Rev. Plant Physiol. 3:131-148.

Gamborg, O. L.; Murashige, T.; Thorpe, T. A. y Vasil, I. K. 1976. Plant tissue culture media. In vitro 12:473-478.

Granada, C. L. y Villalobos, V. M. 1980. Propagación in vitro de *Dioscorea composita* Hemsl. Nueva Epoca (Chapingo) 21:1-7.

Haberlandt, G. 1902. Culturversuche mit isolierten pflanzenzellen. Sitz-Ber. Mat.-Nat. Kl. Kais. Akad. Wiss. (Wien) 111(1):69-92.

Hughes, K. W. 1981. Ornamental species. En: Conger, B. V. (ed.). Cloning agricultural plants via in vitro techniques. CRC Press, Boca Ratón, Florida, E.U.

Ivanova, Z. 1981. Rapid vegetative propagation of conifers. Scientia Horticulturae 14:347-355.

Keays, M. L. 1974. Full-tree and complete-tree utilization for pulp and paper. For. Prod. J. 24:13-16.

Digitized by Google

Koevary, K.; Rappaport, L. y Morris, L. L. 1978. Tissue culture propagation of head lettuce. Hort. Science 13:39.

Larkin, P. J. y Scowcroft, W. R. 1981. Somaclonal variation, a novel source of variability from cell cultures of plant improvement. Theor. Appl. Genet. 60:1-16.

Leung, A. W. D. 1982. In vitro propagation of gimnosperms. En: Bonga y Durzan. (eds.). Tissue culture in forestry. Martinus Nijhoff, Holanda. p. 72-108.

Mott, R. L. 1981. Trees. En: Conger, B. V. (ed.). Cloning agricultural plants via in vitro techniques. CRC Press, Boca Ratón, Florida, E.U. p. 217-254.

Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue culture. Ann. Rev. Plant. Physiol. 25:135-166.

———. 1978. The impact of plant tissue culture on agriculture. En: Thorpe, T.A. (ed.). Frontiers of plant tissue culture. University of Calgary, Calgary, Canadá. p. 15-26.

——— y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.

Patel, K. R. y Thorpe, T. A. 1984. In vitro differentiation of plantlets from embryonic explants of lodgepole pine (*Pinus contorta* Dougl. ex Loud). Plant Cell, Tissue and Organ Cult. 3(2):131-142.

Reinert, J. 1959. Uber die kontrolle der morphogenese und die induktion von adventivaembryonen an gemebekulturen aus korotten. Planta 53:318-333.

Roest, S. y Bokelbann, G. S. 1976. Vegetative propagation of *Solanum tuberosum* L. Potato Res. 19:173.

Sehgal, C. B. 1978. Regeneration of plants from anther cultures of sweet potato (*Ipomoea batatas* Poir) Z. Pflanzenphysiol. 88:349.

Skirvin, R. M. 1981. Fruit crops. En: Conger, B. V. (ed.). Cloning agricultural plants via in vitro techniques. CRC Press, Boca Ratón, Florida, E.U. p. 51-139.

Skoog, F. y Miller, C. O. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. Symp. Soc. Exp. Biol. 11:118-130.

Smith, S. M. y Street, H. E. 1974. The decline of embryogenic potential as callus and suspension cultures of carrot (*Daucus carota* L.) are serially subcultured. Ann. Bot. 38:223.

Sommer, H. E.; Brown, C. L. y Kormanik, P. P. 1975. Differentiation of plantlets in long-leaf pine (*Pinus palustris* Mill.) tissue cultured in vitro. Bot. Gaz. 136:196-200.

Digitized by Google

Styer, D. J. y Chin, C. K. 1983. Meristem and shoot-tip culture for propagation, pathogen elimination, and germplasm conservation. Horticultural Reviews 5:221-277.

Sweet, G. B. 1973. Effect of maturation on growth and form of vegetative propagules of radiata pine. N. Z. J. For. Sci. 3:191-210.

Thorpe, T. A. 1980. Organogenesis in vitro: Structural, physiological and biochemical aspects. International Review of Cytology, Supplement 11A. Academic Press, Nueva York. p. 71-111.

———. 1983. Biotechnological applications of tissue culture to forest tree improvement. En: Biotechnological Advances. v. 1, p. 263-278.

Trewavas, A. J. 1981. How do plant growth substances work? Plant Cell Environ. 4:203-228.

———. 1982. Growth substances sensitivity: The limiting factor in plant development. Plant Physiol. 55:60-72.

Villalobos A., V. M. 1980. Plantas libres de virus. Ciencia y Desarrollo, CONACYT (México) 33:35-49.

———; Thorpe, T. A. y Yeung, E. C. 1982a. El papel del cultivo de tejidos en especies forestales. Ciencia y Desarrollo, CONACYT (México) 51:43-59.

——— y García V., A. 1982b. Obtención de plantas de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) libres de virus por cultivo in vitro de meristemas y ápices vegetativos. Agrociencia 48:107-118.

———; Leung, D. W. M. y Thorpe, T. A. 1984. Light-cytokinin interaction in shoot formation in cultured cotyledon explants of radiata pine. Physiol. Plant. 61:497-504.

Wilmar, C. y Hellendoorn, M. 1968. Growth and morphogenesis of asparagus cells cultured in vitro. Nature 217:369.

Winton, L. L. 1968. Plantlets from aspen tissue cultures. Science 160:1234-1235.

Digitized by Google

Capítulo 7

Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis

R. E. Litz*
R. L. Jarret*

* Tropical Research and Education Center, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, Homestead, Florida, E. U.

Digitized by Google

Introducción

En 1902, Haberlandt propuso la teoría de que todas las células vegetales tienen capacidad para formar plantas completas, es decir, que tienen totipotencialidad. Sin embargo, esta hipótesis no pudo ser demostrada en aquel tiempo (Krikorian et al., 1969).

White (1939) informó acerca de la inducción de yemas adventicias in vitro a partir de callos de *Nicotiana glauca* x *N. langsdorfii*, y Nobecourt (1939) obtuvo raíces adventicias de un callo de zanahoria (*Daucus carota*). Estos experimentos respaldaron indirectamente la teoría de totipotencialidad celular.

Posteriormente, y en forma simultánea, Reinert (1958) y Steward et al. (1958) informaron acerca de la producción de embriones somáticos (embriones adventicios originados en células somáticas); más tarde se demostró que estos embriones eran originados a partir de células aisladas (Backs-Husemann et al., 1970; Reinert et al., 1971), demostrándose la totipotencialidad de las células vegetales.

La regeneración de plantas directamente de los explantes, o a partir de callos, por medio de la organogénesis o de la embriogénesis somática se ha utilizado como una alternativa en los métodos de propagación; sin embargo, esa aplicación ha sido limitada a causa de la poca estabilidad genética en los cultivos de callos. Hay, en cambio, necesidad de regenerar plantas a partir de células selectas, como también necesidad de establecer métodos genéticos celulares aplicables en el mejoramiento de las plantas y en la recuperación de variantes somaclonales; en consecuencia, existe un considerable interés en definir las vías de regeneración para varias plantas de importancia económica.

La presente revisión se ha enfocado hacia la parte teórica y aplicada de esos dos fenómenos de regeneración. Existen otras revisiones recientes sobre la embriogénesis somática (Tisserat et al., 1979; Ammirato, 1983; Raghavan, 1976; Evans et al., 1981; Vasil, 1982) o sobre la organogénesis (Flick et al., 1983; Thorpe, 1980; 1983; Evans et al., 1981).

Embriogénesis Somática

Como embriones somáticos, asexuales o adventicios se han definido los iniciados a partir de células que no son el producto de la fusión de gametos (Tisserat et al., 1979). Son estructuras bipolares con un eje radical-apical, y

Digitized by Google

no poseen conexión vascular con el tejido materno; las estructuras bipolares deben ser también capaces de crecer y formar plantas normales.

Aspectos teóricos

La embrionía adventicia es un evento morfogenético que ocurre in vivo a partir de las nucelas en algunas especies de ciertos géneros de plantas, por ejemplo, *Citrus* spp., *Mangifera indica*, *Eugenia* spp., *Garcinia mangostana* y *Lansium domesticum*, o a partir de los integumentos del óvulo como ocurre en *Eugenia malacencis*. También se origina de las sinérgidas (Cooper, 1943), del suspensor (Crete, 1938), y de otros tejidos localizados dentro del ovario como el endosperma (Muniyamma, 1977), las antípodas, o el cigoto (Cameron y Garber, 1968). La embrionía adventicia también ocurre en los ápices de las hojas de la orquídea *Malaxis palmosa* (Taylor, 1967).

La totipotencialidad de las células vegetales cultivadas in vitro fue establecida por Reinert (1958) y Steward et al. (1958), quienes describieron la inducción de embriones somáticos a partir de callos derivados del ápice radical de la zanahoria *Daucus carota*. También se ha obtenido la regeneración de plantas in vitro por medio de la embriogénesis somática a partir de células generativas, por ejemplo, en cultivos microspóricos de *Datura innoxia* (Guha et al., 1964) y en *Nicotiana tabacum* (Nitsch, 1969), como también a partir de células de endosperma cultivadas in vitro como en *Santalum album* (Lakshmi Sita et al., 1979).

En ciertos aspectos, los embriones somáticos mantienen una similitud con los embriones cigóticos; sin embargo, tanto in vivo como in vitro pueden ocurrir algunas anormalidades en el desarrollo, por ejemplo, la fasciación y la fusión de los cotiledones.

En los estudios de embriogénesis somática se sigue utilizando la zanahoria como un sistema modelo (Sung et al., 1984) no solamente para estudios sobre control de desarrollo, sino también para determinar los eventos bioquímicos que controlan la morfogénesis.

Inicialmente, Steward et al. (1958) consideraron que para la inducción de la embriogénesis somática era esencial un ingrediente no identificado en el agua de coco (AC); sin embargo, posteriormente se demostró que el AC, aunque era beneficiosa, no era necesaria para inducir embriogénesis (Reinert, 1958). El AC todavía se utiliza frecuentemente en los medios de cultivo, no solamente para estimular la producción de embriones somáticos, sino también para la maduración de los mismos (Thomas et al., 1977; Vasil et al., 1980, 1981a, 1981b).

Digitized by Google

Steward et al. (1958) consideraban también que el aislamiento físico de las células a partir de tejidos de plantas maduras era la causa de que ellas se convirtieran en embriogénicas; sin embargo, las evidencias no apoyan este punto de vista. Las células que dan origen a los proembriones son ricas en almidón y poseen una vacuola pequeña (Halperin, 1970).

Se necesita la presencia de una auxina para la iniciación de un callo embriogénico. Usualmente se emplea el 2,4-D, el cual aparentemente brinda el estímulo o inicia la inducción de la embriogénesis somática en el callo. Sin embargo, la maduración de los embriones y la germinación no ocurren en presencia de 2,4-D (Halperin et al., 1964); en consecuencia, hay que remover la auxina, o usarla en concentraciones más bajas. Tanto la inducción de la embriogénesis somática como el desarrollo de los estados subsiguientes de los embriones dependen de la presencia de nitrógeno reducido (Halperin et al., 1965a; Halperin, 1966; Ammirato et al., 1971).

Steward et al. (1964) creyeron inicialmente que la diferenciación o la formación del callo ocurría en un medio con auxina, y que la formación de embriones y su desarrollo ocurre después de subcultivar el callo en un medio libre de la auxina; actualmente es evidente que la inducción de embriones ocurre en presencia de la auxina (Halperin, 1966). Los cultivos en suspensión mantenidos mediante el subcultivo continuo en medios con auxinas están conformados por embriones globulares.

Hay varias interpretaciones acerca de la naturaleza de la diferenciación que da como resultado la embriogénesis somática. Se cree que dentro de un explante ciertas células están preacondicionadas para los eventos morfogenéticos que llevan a esta embriogénesis (Thorpe, 1980; Tisserat et al., 1979). Por tal razón, la presencia de reguladores exógenos de crecimiento, usualmente el 2,4-D, no solamente inicia el desarrollo de los embriones somáticos, sino que también estimula la multiplicación clonal de las células predeterminadas. Evans et al. (1981), sin embargo, creen que la embriogénesis puede derivarse también de tipos diferenciados de células por medio de la predeterminación; este patrón de desarrollo induce la embriogénesis en determinadas células, y se basa en la suposición de que ciertas células que conducen a la embriogénesis somática han sido reprogramadas in vitro.

Obviamente estas interpretaciones han sido difíciles de demostrar, a causa de los problemas para determinar las células potencialmente embriogénicas dentro del explante y del callo.

Las interpretaciones de los eventos que ocurren tempranamente en las células y que traen consigo la diferenciación de plantas a partir de callos

Digitized by Google

siguen siendo hipotéticas. Steward et al. (1958; 1964) propusieron que la diferenciación dependía del aislamiento físico o fisiológico de las células en cultivo; sin embargo, los estudios ultraestructurales de la embriogénesis somática en callos de zanahoria no respaldan esta interpretación (Street et al., 1974).

Las células cultivadas que forman estructuras poliembriónicas poseen paredes celulares gruesas (Button et al., 1974). Las primeras interpretaciones tempranas del fenómeno regenerativo efectuadas por Skoog et al. (1948 y 1957) sugirieron que la organización era dependiente de las interacciones cuantitativas entre los reguladores de crecimiento y otros factores. De esta manera, dentro de un cultivo puede haber gradientes fisiológicos que determinen la diferenciación.

Street (1976) propuso que las células pequeñas isodiamétricas, con un núcleo prominente y con vacuolas pequeñas que poseen potencialidad para la diferenciación, tienen cierto patrón de expresión genética y se diferenciarán cuando sean expuestas a las señales apropiadas; esto implica un cambio a un nuevo patrón de expresión del gene. Thorpe (1980) ha propuesto tres requerimientos para un desarrollo organizado de novo: la diferenciación celular, la interacción celular y una respuesta a las señales específicas.

Hay por lo menos dos factores que pueden controlar la formación de centros organizados (Street, 1976). Las células en división activa pueden estimular la división en las células adyacentes, y este grupo de células, que se dividen rápidamente, viene a ser como un recipiente de nutrimentos o metabolitos de las células ubicadas junto a él, impidiendo que éstas se dividan.

Factores que afectan la embriogénesis somática

Explante. Virtualmente, todos los tejidos vegetales tienen capacidad para formar callos in vitro; sin embargo, relativamente pocos explantes tienen la habilidad para producir callos embriogénicos. Comúnmente se han usado como explantes partes de plántulas como cotiledones, hipocótilos y embriones; adicionalmente, se han usado ápices caulinares, segmentos de tallos, hojas, raíces e inflorescencias inmaduras. Según Ammirato (1983), estos explantes se han usado con éxito para obtener callos embriogénicos en varias especies de la mayoría de las familias de plantas.

Los embriones inmaduros se usan generalmente en los pastos (Gamborg et al., 1970) y en los cereales (Vasil et al., 1980); sin embargo, también se ha

Digitized by Google

empleado la porción basal de las hojas jóvenes del mijo (Haydu et al., 1981) y del sorgo (Wernicke et al., 1980), así como las inflorescencias jóvenes (Vasil, 1982). En las gramíneas es importante la posición de los embriones cigóticos en el cultivo; el eje embrionario debe estar en contacto con el medio.

Con las plantas leñosas, la selección del explante se hace en forma muy restringida. Se ha inducido embriogénesis somática en nucelas aisladas de *Citrus* sp. (Rangan et al., 1968) y de *Mangifera indica* (Litz, 1984a) y a partir de la nucela de óvulos cultivados de *Citrus* sp. (Button et al., 1977), *Vitis vinifera* (Mullins et al., 1976), *Ribes rubrum* (Zatyko et al., 1975), *Malus domesticum* (Eichholtz et al., 1979), *Mangifera indica* (Litz et al., 1982), especies de *Eugenia* (Litz, 1984b) y *Myrciaria cauliflora* (Litz, 1984c).

Se ha estimulado el desarrollo de callos embriogénicos a partir de varios tipos de explantes obtenidos de palmas; entre ellos están los embriones cigóticos (Rabechault et al., 1970), las hojas jóvenes (Pannetier et al., 1982), las inflorescencias (Branton et al., 1983), los ápices radicales (Smith et al., 1970) y los ápices de los retoños de palma datilera (Reynolds et al., 1979).

También se ha informado que la embriogénesis somática ocurre en el endosperma de *Croton bonplandeanum* (Bhojwani, 1966) y de *Santalum album* (Lakshmi Sita et al., 1980), dando como resultado plantas triploides. También como resultado de la embriogénesis somática se han recuperado plantas haploides de varias especies como *Datura innoxia* (Guha et al., 1964) y *Nicotiana tabacum* (Nitsch, 1969), a partir de anteras cultivadas in vitro.

La respuesta embriogénica del callo depende del genotipo de la planta. Algunos cultivares se pueden regenerar fácilmente en un medio específico, mientras que otros cultivares no responden en el mismo medio (Litz, 1984a). El estado de desarrollo de la planta madre afecta la respuesta morfológica del explante; Banks (1979) observó que los explantes obtenidos a partir de plantas maduras de *Hedera helix* formaban callos embriogénicos, mientras que ello no ocurría con explantes de plantas jóvenes.

Medio de cultivo. Generalmente se ha usado el medio desarrollado por Murashige et al. (1962) o la modificación de esta formulación (Evans et al., 1981); la concentración alta de sales de este medio parece ser muy benéfica para el crecimiento de embriones somáticos (Ammirato, 1983).

Wetherell (1984) ha demostrado que es posible aumentar el potencial embriogénico de los callos de zanahoria exponiéndolos a niveles altos de

Digitized by Google

sacarosa o de manitol; la sacarosa se usa en concentraciones de 2% a 3% y hasta 12%. El nitrógeno, suministrado como nitrato o como ion amonio, es esencial (Halperin et al., 1965a; Reinert, 1967); el nitrógeno orgánico provisto por la glutamina y la alanina (Wetherell et al., 1976; Kato et al., 1966), por la caseína hidrolizada (Ammirato et al., 1971) o por el AC (Steward et al., 1959) es también beneficioso y puede remplazar el nitrógeno inorgánico en el medio. El hierro es también esencial para la embriogénesis somática (Havranek et al., 1979) ya que en ausencia de ese elemento, los embriones somáticos globulares no son capaces de desarrollarse hasta la madurez.

Los niveles altos de sacarosa parecen tener un efecto comparable al producido por el ácido abscísico. Las concentraciones altas de esta sustancia estimulan la formación de los callos embriogénicos (Lu et al., 1982) y reducen la frecuencia de anormalidades de desarrollo tales como la formación de embriones secundarios, la fasciación y la formación de policotiledones; también inhiben la germinación precoz (Ammirato et al., 1971).

El carbón activado se ha usado para superar problemas específicos de oxidación, los cuales se asocian con el cultivo de tejidos de palmas (Reynolds et al., 1979). La adición de esta sustancia a los cultivos embriogénicos promueve su desarrollo cuando éste ha sido inhibido, ya que al parecer absorbe del medio los compuestos fenólicos (Fridborg et al., 1978), las auxinas y citocininas (Weatherhead et al., 1978) que inhiben el desarrollo del embrión somático. Además, permite la germinación y la maduración de los embriones (Litz et al., 1980; Fridborg et al., 1975).

En estudios recientes se ha demostrado que el uso de poliaminas tales como la espermina, la putrescina y la espermidina está relacionado con el control de la embriogénesis somática en *Daucus carota* (Fienberg et al., 1985). Las poliaminas, incorporadas al medio de callos embriogénicos de zanahoria, inhiben el desarrollo de los embriones somáticos; los subcultivos, en cambio, en un medio libre de poliaminas pero que contenga arginina, permiten el desarrollo normal del embrión (Bradley et al., 1984).

Reguladores del crecimiento. De acuerdo con Evans et al. (1981) la mayoría de los sistemas embriogénicos requieren, para la inducción de los embriones, de una concentración alta de auxina (generalmente 2,4-D) en el medio. Para las gramíneas, el 2,4-D es la única auxina que se usa. En *Daucus carota* han sido efectivas varias auxinas, por ejemplo ANA (Ammirato et al., 1971), AIA (Sussex et al., 1968) y 2,4-D (Halperin et al., 1965b). Otras auxinas sintéticas tales como el picloram, el 2,4,5-T, el ácido 2-benzothiazol acético, y el ácido paraclorofenoxiacético han demostrado ser bastante efectivas.

Digitized by Google

La concentración usual de 2,4-D está dentro del rango de 0.5-27.6 µM (Evans et al., 1981), aunque se deben usar concentraciones más altas, por ejemplo 450 µM de 2,4-D, en caso de que el carbón activado se incorpore al medio (Reynolds et al., 1979).

El papel de las citocininas en el medio primario o inductor del embrión es menos claro, aunque normalmente este medio incluye una de ellas. Evans et al. (1981) muestran que las citocininas se usan en el medio primario para el 65.4% de las especies explotadas por el hombre y para 21.4% de las especies no cultivadas; el uso de estas sustancias en el medio de subcultivo es menos frecuente (en 34.6% de las especies explotadas por el hombre y en 14.1% en las especies no cultivadas). Fujimura et al. (1980) han sugerido que las citocininas pueden ser esenciales para la maduración y la germinación de los embriones somáticos.

El ácido giberélico (AG) también se ha incorporado al medio con el fin de ayudar a la maduración normal y a la germinación de los embriones somáticos de *Panicum maximum* (Lu et al., 1981), *Santalum album* (Lakshmi Sita et al., 1979) y *Citrus sinensis* (Kochba et al., 1974).

Se han usado inhibidores del crecimiento tales como el ácido abscísico (ABA), el cual reprime la embriogénesis somática y reduce la frecuencia de anormalidades de desarrollo como son la formación secundaria de embriones a partir de embriones somáticos y la germinación precoz (Ammirato, 1973; 1974); las concentraciones de ABA más usadas fluctúan entre 0.1 y 1.0 µM. Las antiauxinas han sido efectivas de la misma forma que el ABA (Fujimura et al., 1979).

Condiciones del medio ambiente. En contraste con la cantidad de información que se ha divulgado sobre la optimización de los medios de cultivo y del uso de sustancias de crecimiento, poca atención se ha dedicado a los parámetros físicos que influyen en el crecimiento y el desarrollo in vitro.

Una alta intensidad lumínica ha sido esencial para obtener embriogénesis somática en *Nicotiana tabacum* (Haccius et al., 1965), aunque en *Daucus carota* (Ammirato et al., 1971) y en *Carum* sp. (Ammirato, 1974) fue necesaria la oscuridad para el desarrollo y la maduración normal de los embriones. Pretratamientos con frío se han usado rutinariamente para estimular la embriogénesis somática a partir de anteras cultivadas (Nitsch, 1974).

Los medios de cultivo semisólidos se han empleado para el crecimiento de callos y para estimular la embriogénesis somática; Ammirato (1983)

Digitized by Google

demostró que cuando se utilizan medios líquidos, el tipo de recipiente usado para el cultivo tiene un efecto muy grande sobre la embriogénesis. Es preferible agitar suavemente el medio porque así se obtienen menos anormalidades en el desarrollo que cuando se agita vigorosamente. La adición de ABA previene el desarrollo anormal, sin importar el tipo de recipiente o el grado de agitación.

Otros factores. Es difícil obtener una sincronización en los cultivos en suspensión. Para obtener una suspensión homogénea, los cultivos se pasan usualmente por una serie de filtros. También es posible alcanzar un cierto grado de sincronización por medio de una exposición previa de los cultivos al ABA o a las poliaminas. Tal como lo indicó Ammirato (1983), es difícil demostrar el control sobre la maduración y la germinación; estos estados son altamente plásticos (adaptables) dependiendo del genotipo y de las condiciones de cultivo.

Después de un período prolongado de cultivo, el potencial embriogénico del callo declina; Halperin (1966) y Smith et al. (1974) asociaron este hecho con una acumulación de cambios genéticos que ocurrían en las células en cultivo. Algunas veces es posible restaurar el potencial embriogénico de los cultivos incrementando la concentración de sacarosa (Jones, 1974), o alterando las proporciones de nitrógeno y de auxina (Reinert, 1973).

Fuera del grupo de las angiospermas se han dado muy pocos ejemplos de embriogénesis somática, aunque es posible la regeneración de plantas de *Pinus palustris* (Sommer et al., 1975) y de *Zamia integrifolia* (Norstog et al., 1967). Las especies de plantas leñosas, en general, han sido difíciles de regenerar in vitro; se exceptúan aquellas especies que pueden producir callos embriogénicos a partir de la nucela.

Procedimiento para inducir la embriogénesis somática en zanahoria

Comúnmente se describen dos modelos de los sistemas típicos para inducir embriogénesis somática in vitro. El primer sistema, que se desarrolló a partir de las nucelas de *Citrus*, es un ejemplo de embriogénesis somática de células preembriónicas; en el Capítulo 8 se describe un sistema similar para el mango.

Otro sistema modelo es el de la zanahoria (*Daucus carota*), que se ha usado para estudiar la inducción, el desarrollo y la bioquímica de los embriones somáticos. El siguiente es el procedimiento que comúnmente se

Digitized by Google

emplea para establecer callos embriogénicos y para estudiar el desarrollo embrionario:

1) Esterilice superficialmente los pecíolos (1.0 cm de largo) o los ápices radicales (0.5 cm de diámetro) de zanahoria (*Daucus carota*). Para ello, sumerja estos tejidos en una solución al 10% de NaOCl (utilice productos de uso doméstico al 10%); esta solución debe contener 2 gotas de Tween-20 por cada 100 ml de solución. Diez minutos después, enjuague tres veces con agua destilada estéril.

2) Cultive los explantes en cajas Petri en el medio sólido de Murashige et al. (1962), suplementado con 1 a 2 mg/litro de 2,4-D y 30 mg/litro de sacarosa. La formación de callos ocurre a los pocos días.

3) Inicie los cultivos en suspensión después de 4 a 5 semanas, cuando haya suficientes callos. Inocule aproximadamente 30 g de callo en un Erlenmeyer de 250 ml que contenga 50 ml de medio líquido suplementado con 1 a 2 mg/litro de 2,4-D. Todas estas operaciones se deben efectuar bajo condiciones estériles, en una cámara de aislamiento.

4) Incube los cultivos en un agitador giratorio (150 rpm), a 25 °C, con un fotoperíodo de 16 h (1000 lux).

5) Para estimular el desarrollo embrionario, colecte los cultivos en suspensión filtrando a través de un filtro 'Millipore' estéril. Subcultive a intervalos regulares, usualmente cada 2 ó 3 semanas. Subcultive las células en suspensión en un medio líquido sin 2,4-D.

6) Después de 2 a 3 semanas, transfiera las suspensiones a un medio sólido para permitir el desarrollo y la germinación de los embriones somáticos.

7) Transfiera las plántulas resultantes a una mezcla de perlita y arena (1:1) o a una mezcla 'Jiffy' y colóquelas bajo rocío intermitente durante 10 días, hasta cuando estén en condiciones de ser cultivadas en invernadero.

Organogénesis

En contraste con la embriogénesis somática, la organogénesis comprende el desarrollo de yemas o de meristemas radicales a partir de los explantes directamente o a partir de los callos.

Digitized by Google

Aspectos teóricos

Después de las primeras observaciones sobre formación de raíces adventicias (White, 1939) y de raíces principales (Nobecourt, 1939) en cultivos de tejidos, Skoog (1944) demostró el efecto estimulante de las auxinas en la formación de raíces y su efecto inhibidor en la formación de yemas. El estímulo en la formación de raíces adventicias se puede cambiar usando concentraciones altas de sacarosa o de fosfatos inorgánicos en el medio.

Skoog et al. (1948) demostraron que el sulfato de adenina promueve el desarrollo de yemas, lo cual indicó la posibilidad de obtener un cierto control en la formación de órganos in vitro. Más tarde se demostró que la organogénesis dependía de la concentración y de la proporción de estos constituyentes en el medio (Skoog et al., 1951).

El hallazgo del factor que promovía la división celular en preparaciones degradadas de ADN, identificado como cinetina (Miller et al., 1955), condujo al estudio realizado por Skoog et al. (1957), en el que se demostró la importancia de las proporciones de auxina:citocinina en la determinación de la respuesta morfogenética in vitro. Una proporción alta de auxina comparada con la de citocinina favorecía la formación de raíces, mientras una proporción baja favorecía la formación de yemas. Por otra parte, la adición al medio de ciertos compuestos tales como la caseína hidrolizada (CH) modificaba la actividad reguladora de las proporciones de auxina:citocinina. Esto sugirió que el balance de ciertos factores afectaría el proceso de diferenciación y se consideraba como la base para el desarrollo de un medio definido de organogénesis in vitro.

Varias partes de una planta pueden responder diferentemente a idénticas condiciones de cultivo, y tales diferencias reflejan el estado fisiológico de la fuente del explante (Tran Thanh Van, 1980). El estado fisiológico determinará además los factores exógenos que se deben añadir al medio de cultivo, o que deben sustraerse de él, para poder inducir la respuesta morfogenética requerida. Los factores endógenos podrán variar cuantitativamente de acuerdo con las condiciones ambientales, el genotipo, el tipo de célula, y otros aspectos.

A causa de esta complejidad de las interacciones entre un gran número de variables que pueden afectar la respuesta de un explante, las influencias del medio ambiente y los efectos del tejido no se pueden examinar individualmente.

Digitized by Google

Para que la organogénesis ocurra a partir de un callo, se deben producir cambios que conduzcan a la organización celular. Thorpe (1980) ha propuesto que este proceso involucra diferenciación celular, interacción celular y reacción a señales específicas.

El término organogénesis de novo en el cultivo de tejidos se refiere a la diferenciación dentro del explante (Thorpe, 1980). Por ejemplo, a partir del floema externo de segmentos de tallo de tabaco cultivado in vitro se desarrollan meristemas primarios (Sterling, 1951), mientras que del protoxilema de raíces de explantes de *Convolvulus* spp. se desarrollan raíces y primordios de yemas (Bonnett y Torrey, 1966).

La capacidad morfogenética de algunos tejidos puede pasar desapercibida debido a la asociación de éstos con tejidos diferenciados que están dentro de un sistema organizado (Chlyah, 1974a). En contraste, la organogénesis a partir de callos subcultivados no ocurre generalmente en asociación con las estructuras preexistentes.

Nakano et al. (1974) distinguieron morfológicamente, entre varios tipos específicos de callos de arroz, el que era capaz de producir organogénesis. Se ha informado que divisiones al azar de las células pueden dar como resultado la formación de hileras radiales del tejido; las regiones de mayor división celular forman 'meristemoides' que hacen que el callo tenga una apariencia nodular (Thorpe, 1980).

En la epidermis de explantes de *Torenia* sp. las regiones de rápida división celular se inician a partir de algunas células que, eventualmente, estimulan la división de las células circundantes (Chlyah, 1974b); las células que se encuentran hacia adentro de estos grupos se dividen rápidamente, mientras que las de la periferia se dividen lentamente.

Estas zonas de división celular resultan de la capacidad misma de células activamente divisorias, las cuales a su vez estimulan la división en las células adyacentes; éstas toman nutrimentos y metabolitos a partir de las células periféricas, limitando la potencialidad divisoria de estas últimas (Street, 1976).

Una función primaria de la mitosis en la organogénesis es la formación de un número crítico de células en división activa; éstas son capaces de responder a las señales de desarrollo (Thorpe, 1983).

Los meristemoides o regiones localizadas de células en división activa (Torrey, 1966) se componen de células pequeñas, isodiamétricas, con un citoplasma denso, vacuolas pequeñas y núcleos prominentes; usualmente contienen varios orgánulos (Asbell, 1977) y grandes cantidades de almidón

Digitized by Google

(Thorpe, 1983), del cual requieren en cantidad considerable durante su diferenciación (Thorpe et al., 1970).

La mayoría de estos meristemoides se asemejan a meristemas verdaderos y poseen conexiones vasculares con el callo o el tejido circundante. Bajo condiciones apropiadas de cultivo pueden formar yemas o raíces primarias (Bonnett et al., 1966); esta plasticidad está de acuerdo con las primeras observaciones de Skoog et al. (1957).

Las proporciones internas de los reguladores de crecimiento y los efectos del tejido dentro de un callo pueden afectar profundamente el desarrollo (Ross et al., 1973). Así, concentraciones de 0.05-46 µM de citocininas, KIN o BAP por ejemplo, han sido efectivas en el 75% de las especies de plantas que han formado vástagos a partir de callos (Evans et al., 1981), mientras que las auxinas, por ejemplo AIA y ANA, han sido más efectivas en concentraciones de 0.06 a 27 µM. Los meristemoides periféricos del cultivo de *Petunia inflata* dan lugar a la formación de raíces y vástagos (Handro et al., 1973); en los callos de arroz y de escarola, en cambio, se forman vástagos de la superficie de los meristemoides, mientras que de la subsuperficie se forman raíces.

Factores que afectan la organogénesis

Murashige (1974) y Narayanaswamy (1977) han descrito ciertos factores que deben ser considerados para la manipulación exitosa de la organogénesis. Se incluyen factores relacionados con el explante (su edad fisiológica y ontogénica, su tamaño, el tejido u órgano del que es extraído) así como con el estado fisiológico de la planta madre y con la época del año en que se realiza el cultivo.

Cualquiera de estos factores, o su combinación, puede afectar profundamente la respuesta morfogenética, y es necesario realizar una evaluación sistemática de tales efectos con el fin de establecer un sistema característico de experimentación.

Explante. Virtualmente todas las partes de la planta se han utilizado como explantes para la iniciación de callo (Flick et al., 1983; Murashige, 1974; Evans et al., 1981); no obstante, los tejidos juveniles poseen un alto grado de actividad meristemática y tienden a tener más plasticidad in vitro.

Los explantes que se han utilizado exitosamente incluyen ramas en floración (Tran Thanh Van et al., 1978), pedúnculos florales (Pelletier et al., 1969), embriones inmaduros (Bajaj et al., 1981), meristemas (Bush et al., 1976), epicótilos (Malmberg, 1979), yemas florales (Konar et al., 1966),

Digitized by Google

partes de rizomas (Loewenger, 1969), cariópsides (Conger et al., 1978), mesocótilos (Rangan, 1976), raquis (Dudits et al., 1975), bulbos (Fridborg, 1971), hojas de coníferas (Jansson et al., 1980), óvulos (Hussey, 1975), tubérculos (Jarret et al., 1980) y raíces (Norton y Ball, 1954).

La variación en la respuesta de ciertos explantes pertenecientes a la misma especie vegetal puede ser considerable (Flick et al., 1983; Murashige, 1974). Más aún, puede haber variación en los requerimientos de los reguladores de crecimiento para la organogénesis según el tipo de tejido usado como explante (Litz et al., 1983). El conocimiento de la morfología de las especies usadas es de mucho provecho para identificar los explantes potencialmente morfogenéticos.

El tamaño de un explante puede determinar la respuesta in vitro (Okazawa et al., 1967; Gukasyan et al., 1977). Los explantes grandes son más difíciles de esterilizar que los pequeños, pero generalmente los primeros poseen un potencial regenerador considerablemente mayor; la viabilidad y la capacidad regenerativa de explantes muy pequeños tiende a ser baja. Sin embargo, se han usado exitosamente delgadas capas de células como sistemas experimentales, con el fin de estudiar los efectos de factores exógenos y endógenos sobre la morfogénesis cuando no hay influencia de tejidos circundantes (Tran Thanh Van, 1980). Los explantes pequeños tienden, además, a ser dañados más fácilmente.

El potencial organogenético de un explante es inversamente proporcional a su edad fisiológica (Alleweldt et al., 1962). A partir de secciones de tallo cercanas a los ápices caulinares se puede producir mayor cantidad de meristemoides que a partir de la porción baja del tallo. En su trabajo con discos de hojas de *Echeverria elegans*, Raju et al. (1970) demostraron que los tejidos inmaduros, los parcialmente maduros y los maduros producían raíces, raíces o yemas y yemas respectivamente. Pierik et al. (1974) indujeron únicamente la formación de callos a partir de tejidos inmaduros de *Anthurium* sp. Se han hecho observaciones similares usando tejidos de frutos de fresa (Asahira et al., 1977), escamas de bulbos de *Lilium* (Hackett, 1969), secciones de pecíolos de *Lunaria annua* (Pierik, 1972) y segmentos del tallo de rododendro (Pierik et al., 1975).

El estado de la planta madre y la estación durante la cual el explante es extraído también pueden afectar notablemente el potencial organogenético (Murashige, 1974). Los efectos limitantes de la estación y la calidad de este fenómeno no han sido bien estudiados.

Medio de cultivo. Los medios usados más frecuentemente para promover la organogénesis son los de Murashige et al. (1962), White (1963),

Digitized by Google

Gamborg et al. (1968), Linsmaier et al. (1965), Schenk et al. (1972) y Heller (1953). En una revisión reciente, Flick et al. (1983) hicieron énfasis en que el medio Murashige et al. (1962) se usa muy a menudo en estudios que se relacionan con la organogénesis para cualquier tipo de planta; sin embargo, se ha preferido el medio de Campbell y Durzan (1975) para estudios con gimnospermas.

La sacarosa es generalmente la fuente carbonada que se usa en los estudios de organogénesis, aunque en algunas circunstancias se ha sustituido por glucosa o fructuosa. La concentración de sacarosa puede alterar la pigmentación del callo (Narayanaswamy, 1977) --también lo hace la proporción auxina:citocinina-- favoreciendo la formación de yemas (Zwagerman et al., 1979); puede asimismo la sacarosa estimular la formación de callos (Takayama et al., 1979) y cambiar la textura de los mismos.

Puesto que la concentración de carbohidratos también afecta el potencial osmótico del medio, la sacarosa ha sido sustituida por sorbitol en el medio para callos de plantas de la familia Rosaceae (Coffin et al., 1976). Brown et al. (1979) concluyeron que aproximadamente una tercera parte de la sacarosa en el medio mantiene el potencial osmótico requerido para la formación de callos en tabaco; el manitol puede sustituir a la sacarosa sin causar pérdidas en la capacidad de formación de las yemas (Brown et al., 1979).

En los medios de cultivo de tejidos se han incluido varias vitaminas, aunque generalmente se acepta que únicamente la tiamina es esencial para el crecimiento continuo (Murashige, 1974). El inositol, que también está presente en el AC (Pollard et al., 1961), puede ser un componente esencial para el crecimiento y la diferenciación de los callos (Wolter et al., 1966; Kaul et al., 1975). Como medida de precaución se han usado mezclas complejas de vitaminas, las cuales pueden ser benéficas para el cultivo de explantes muy pequeños o para cultivar células en bajas densidades (Gamborg et al., 1981). En estas circunstancias, la adición de ácido para-aminobenzoico, ácido fólico, cloruro de colina, riboflavina o ácido ascórbico puede estimular el crecimiento.

El nitrógeno orgánico, en forma de CH o de glutamina, es algunas veces benéfico para la iniciación y crecimiento de los callos; la glutamina ha sido sustituida por la CH (Gamborg et al., 1981). Entre los aminoácidos, únicamente son activos los de las formas L; la presencia de las formas D puede contrarrestar los efectos benéficos de las primeras si los aminoácidos se usan como mezcla racémica (Murashige, 1974). Tanto la tirosina como la fenilalanina estimulan la organogénesis en callos de tabaco (Skoog et al., 1957).

Digitized by Google

Otros tipos de compuestos que pueden afectar la organogénesis incluyen los fenoles sustituidos y los alcaloides. Lee et al. (1965) informaron que los fenoles monohidróxidos sustituidos en las posiciones 2 ó 4 estimulan la formación de yemas. Los ácidos fenólicos como el p-cumárico, el ferúlico y el vainíllico estimulan la formación de raíces en explantes de alcachofa de Jerusalén (Rucker et al., 1969). Peters et al. (1974) estimularon el enraizamiento en *Nicotiana rustica* al incluir nicotina en el medio de cultivo. Estas sustancias pueden reaccionar con los niveles endógenos de los reguladores de crecimiento, alterando las proporciones de auxina y de citocinina. El carbón activado ha sido efectivo para remover del medio los compuestos fenólicos inhibidores (Fridborg et al., 1978).

Reguladores del crecimiento. El papel de los reguladores de crecimiento en la organogénesis se ha estudiado intensamente. Usualmente se induce la formación de callos a partir de explantes en medios que contengan auxina(s) o una proporción alta de auxina:citocinina.

El medio para que la proliferación de callos sea rápida puede requerir una composición ligeramente diferente de la que se usa para la inducción de los mismos. La diferenciación de yemas se logra subcultivando los callos en un medio que tenga alta relación citocinina:auxina; en cambio, para la diferenciación de raíces se requieren medios con una relación citocinina:auxina baja. En medios con citocinina, algunas veces ocurre la organogénesis directamente del explante (Flick et al., 1983). El uso de una auxina o citocinina ha sido efectivo para estimular la formación de yemas en explantes de Douglas Fir (Cheng, 1975); la formación de yemas puede también ser estimulada en presencia de la auxina solamente (Sastri, 1963). Las antiauxinas se han usado para inducir organogénesis. Estas respuestas in vitro suelen ser variables, debido, probablemente, a los distintos niveles endógenos de fitohormonas en el momento de la organogénesis.

Las giberelinas también pueden tener un papel importante en la organogénesis (Murashige, 1964; Thorpe et al., 1973): aunque generalmente inhiben la diferenciación, algunas veces estimulan la formación de yemas (Jarret et al., 1981). El efecto inhibitorio de las giberelinas en la diferenciación se puede anular parcialmente adicionando ácido abscísico al medio (Thorpe et al., 1973); las antigiberelinas como el CCC (cloruro de clorocolina) se consideran inefectivas. En presencia de los precursores del AIA (triptófano desaminado oxidativamente), el AG puede inducir la formación de raíces adventicias a partir de discos de hojas cultivados in vitro, probablemente debido al estímulo biosintético del AIA (Coleman et al., 1977; Thorpe, 1980).

Digitized by Google

Se han incluido en el medio componentes orgánicos como AC, extractos de malta y levadura, CH, pulpa y jugo de frutas, y productos extraídos de animales; sin embargo, con la excepción del AC y la CH, la mayoría de estos componentes se pueden remplazar por nutrimentos definidos.

Otros factores. La organogénesis puede estar afectada por una gran variedad de factores como luz, temperatura, consistencia del medio, y pH. La luz es un factor crítico para la iniciación de yemas en el cultivo de callos de tabaco (Murashige et al., 1968); su efecto se puede deber a que incrementa la acumulación de almidón en los tejidos cultivados, la cual es necesaria para la formación de primordios de vástagos (Thorpe et al., 1970). Kato (1978) ha demostrado que la formación de yemas a partir de callos de *Heloniopsis orientalis* se regula por medio de las concentraciones de los reguladores del crecimiento y también por medio de la actividad fotosintética.

El fotoperíodo también puede afectar los niveles internos de los reguladores del crecimiento (Heide et al., 1967). Usualmente, un fotoperíodo de 12 a 16 horas con 1000 a 3000 lux es suficiente para inducir la organogénesis; por otra parte, un cambio en la intensidad lumínica puede causar organogénesis (Hasegawa et al., 1973), y pueden ocurrir cambios morfogenéticos específicos debidos a la longitud de onda de la iluminación. Una mezcla de los colores rojo y azul afecta la formación de vástagos en *Heloniopsis orientalis*, aunque la luz verde no afecta esta respuesta (Kato, 1978).

Los cultivos de tejidos se mantienen generalmente a 25 °C (Thorpe, 1980); sin embargo, las temperaturas que estén dentro de 18 y 28 °C son también efectivas. Las fluctuaciones entre las temperaturas del día y de la noche pueden estimular la organogénesis; por ejemplo, Gautheret (1969) halló que alternando temperaturas diurnas y nocturnas de 20 y 15 °C respectivamente, se conseguía una formación óptima de raíces de explantes de tubérculos de *Helianthus tuberosus*. Los tratamientos previos con temperaturas bajas también son efectivos; por ejemplo, Fonnesbech (1974) demostró que, cuando se trataban segmentos de pecíolos de *Begonia* x *Cheimantha* con temperaturas frías, éstos formaban más yemas adventicias que cuando no se hacía ese tratamiento.

La interacción de los reguladores de crecimiento con la temperatura puede influenciar la respuesta in vitro (Cheng et al., 1977); así, explantes de lechuga que están a 17 °C producen yemas únicamente si el medio contiene cinetina, pero si están a 28 °C pueden producir yemas también en ausencia de esta hormona.

Digitized by Google

La mayoría de los estudios sobre organogénesis se han hecho en medios semisólidos que contienen de 0.3% a 1.0% de agar. La forma física del medio tiene una profunda influencia en las respuestas morfogenéticas; White (1939) demostró que en un medio semisólido los callos de *Nicotiana* no se diferenciaban, pero que formaban raíces y vástagos en un medio líquido. Se cree que las concentraciones altas de agar crean un medio ambiente con mucho estrés para las plantas, lo cual reduce la formación de meristemoides (Brown et al., 1979), pero puede estimular la producción de yemas foliares y florales (Mangara et al., 1967).

Entre otros factores que afectan la organogénesis están el pH del medio, la polaridad del explante, la humedad relativa y la fase gaseosa del medio de cultivo.

Procedimiento para inducir organogénesis en tabaco

La organogénesis se ha estudiado extensamente en especies de la familia Solanaceae, particularmente del género *Nicotiana*; regularmente se utiliza *Nicotiana tabacum* como especie modelo. El procedimiento se puede realizar en una cámara estéril, así:

1) Cultive en un invernadero plantas de *Nicotiana tabacum* L. variedad Wisconsin 38. Antes de que ocurra la floración, corte la planta y descarte todas las hojas, las yemas axilares y los 10 cm apicales del tallo.

2) Coloque trozos del tallo en alcohol al 70%, durante 10 segundos. Transfiéralos luego a una solución de blanqueador comercial al 10% (v/v); esta solución debe contener 2 gotas de Tween-20 por cada 100 ml de solución. Después de 10 minutos, enjuague 2 ó 3 veces con agua destilada estéril.

3) En una caja Petri estéril que contenga papel filtro húmedo, coloque las porciones de tallo. Corte y descarte 5 mm de la porción terminal de cada pedazo de tallo; divida luego el tallo en porciones de 1.0 cm.

4) Remueva la superficie externa de los trozos de tallo, usando forceps esterilizados y un bisturí. Corte diagonalmente tres o cuatro secciones en cada porción de tallo y coloque cada parte con el cambium hacia arriba, en un medio de cultivo.

5) Para la inducción de callos utilice tubos de ensayo con el medio de Murashige y Skoog (1962) suplementado con: 0.3 mg/litro de 2,4-D, 0.1 mg/litro de KIN, 8 g/litro de agar, 30 g/litro de sacarosa y 1 g/litro

Digitized by Google

de CH. Ajuste el pH del medio a 5.7 antes de someter éste a la esterilización en el autoclave, a 1.1 kg/cm^2 de presión y 121 °C de temperatura, durante 15 minutos.

6) Incube los cultivos en la oscuridad, a 27 °C. El callo se observa a los 7 días, y puede ser subcultivado después de 4 semanas.

7) La organogénesis se puede inducir subcultivando el callo en un medio que contenga 3.0 mg/litro de 2iP y 0.3 mg/litro de AIA; si los cultivos se han mantenido en la oscuridad o con baja luminosidad, los meristemas se forman después de 4 a 6 semanas. Para estimular la organogénesis han sido efectivas también otras citocininas y auxinas, en varias concentraciones.

8) La formación de raíces se puede inducir haciendo el subcultivo en un medio que contenga 3.0 mg/litro de AIA y 0.1 mg/litro de KIN.

Referencias

Alleveldt, G. y Radler, F. 1962. Interrelationship between photoperiodic behavior of grapes and growth of plant tissue cultures. Plant Physiol. 37:376-379.

Ammirato, P. V. 1973. Some effects of abscisic acid on the development of embryos from caraway cells in suspension culture. Amer. J. Bot. 60 (supl.): 22-23.

———. 1974. The effects of abscisic acid on the development of somatic embryos from cells of caraway (*Carum carvi* L.). Bot. Gaz. 135:328-337.

———. 1983. Embryogenesis. En: Evans, D. A.; Sharp, W. R.; Ammirato, P. V. y Yamada, Y. (eds.). Handbook of plant cell culture. MacMillan Publishing, Nueva York. v. 1, p. 82-123.

——— y Steward, F. C. 1971. Some effects of the environment on the development of embryos from cultured free cells. Bot. Gaz. 132:149-158.

Asahira, T. y Kano, Y. 1977. Shoot formation from cultured tissue of strawberry fruits. J. Jpn. Soc. Hort. Sci. 46:317.

Asbell, C. W. 1977. Ultrastructural modifications during shoot formation in vitro. In vitro 13:180.

Backs-Husemann, D. y Reinert, J. 1970. Embryobildung durch isoilierte einzelzellen aus gewebekulturen von *Daucus carota*. Protoplasma 70:49-60.

Bajaj, Y. P. S.; Kumar, P.; Labana, K. S. y Singh, M. M. 1981. Regeneration of plants from seedling explants and callus cultures of *Arachis hypogaea*. Ind. J. Exp. Biol. 19:1026-1029.

Digitized by Google

Banks, M. S. 1979. Plant regeneration from callus of two growth phases of English ivy, *Hedera helix* L. Z. Pflanzenphysiol. 92:349-353.

Bhojwani, S. S. 1966. Morphogenetic behavior of mature endosperm of *Croton bonplandianum* Baill. in culture. Phytomorphology 16:349-353.

Bonnett, H. T. y Torrey, J. G. 1966. Comparative anatomy of endogenous bud and lateral root formation in *Convolvulus arvensis* roots cultured in vitro. Amer. J. Bot. 53:496-508.

Bradley, P. M.; El-Fiki, F. y Giles, K. L. 1984. Polyamines and arginine affect somatic embryogenesis of *Daucus carota*. Plant Sci. Lett. 34:397-401.

Branton, R. L. y Blake, J. 1983. Development of organized structures in callus derived from explants of *Cocos nucifera* L. Ann. Bot. 52:673-678.

Brown, D. C. W.; Leung, D. W. M. y Thorpe, T. A. 1979. Osmotic requirement for shoot formation in tobacco callus. Physiol. Plant. 46:36-41.

Bush, S. R.; Earle, E. D. y Langhans, R. W. 1976. Plantlets from petal segments, petal epidermis, and shoot tips of the periclinal chimera, *Chrysanthemum morifolium* 'Indianapolis'. Amer. J. Bot. 63:729-737.

Button, J.; Kochba, J. y Bornman, C. H. 1974. Fine structure of, and embryoid development from, embryogenic ovular callus of 'Shamouti' orange (*Citrus sinensis* Osb.). J. Exp. Bot. 25:446-457.

——— y ———. 1977. Tissue culture in the citrus industry. En: Reinert, J. y Bajaj, Y. P. S. (eds.). Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture. Springer-Verlag, Berlín. p. 70-92.

Cameron, J. W. y Garber, M. J. 1968. Identical-twin hybrids of *Citrus* x *Poncirus* from strictly sexual seed partners. Amer. J. Bot. 55:199-205.

Campbell, R. A. y Durzan, D. J. 1975. Induction of multiple buds and needles in tissue cultures of *Picea glauca*. Can. J. Bot. 53:1652-1657.

Cheng, T. Y. 1975. Adventitious bud formation in culture of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* Mirb. Franco). Plant Sci. Lett. 5:97-102.

——— y Voqui, T. H. 1977. Regeneration of Douglas-fir plantlets through tissue culture. Science 198:306-307.

Chlyah, H. 1974a. Etude histologique de la neoformation de meristemes caulinaires et radiculaires a partir de segments d'entre-noeuds de *Torenia fournieri* cultivés in vitro. Can. J. Bot. 52:473-476.

———. 1974b. Inter-tissue correlations in organ fragments: Organogenetic capacity of tissues excised from stem segments of *Torenia fournieri* Lind. cultured separately in vitro. Plant Physiol. 54:341-348.

Digitized by Google

Coffin, R.; Taper, C. D. y Chong, C. 1976. Sorbitol and sucrose as carbon sources for callus culture of some species of the *Rosaceae*. Can. J. Bot. 54:547-551.

Coleman, W. K. y Greyson, R. I. 1977. Promotion of root initiation by gibberellic acid in leaf discs of tomato (*Lycopersicon esculentum*) cultured in vitro. New Phytol. 78:47-54.

Conger, B. V. y Carabia, J. V. 1978. Callus induction and plantlet regeneration in orchardgrass. Crop Sci. 18:157-159.

Cooper, D. C. 1943. Haploid-diploid twin embryos in *Lilium* and *Nicotiana*. Amer. J. Bot. 31:408-413.

Crete, P. 1938. La polyembryonie chez la *Lobelia syphilitica* L. Bul. Soc. Bot. Fr. 85:580-583.

Dudits, D.; Nemet, G. y Haydu, Z. 1975. Study of callus growth and organ formation in wheat (*Triticum aestivum*) tissue cultures. Can. J. Bot. 53:957-963.

Eichholtz, D.; Robitaille, H. A. y Hasegawa, P. M. 1979. Adventive embryology in apple. HortScience 14:699-700.

Evans, D. A.; Sharp, W. R. y Flick, C. E. 1981. Growth and behavior of cell cultures: Embryogenesis and organogenesis. En: Thorpe, T. A. (ed.). Tissue culture: Methods and applications in agriculture. Academic Press, Nueva York. p. 45-113.

Fienberg, A. A.; Choi, J. H.; Lubich, W. P. y Sung, Z. R. (1985). Developmental regulation of polyamine metabolism in growth and differentiation of carrot culture. Planta (entregado para publicación).

Flick, C. E.; Evans, D. A. y Sharp, W. R. 1983. Organogenesis. En: Evans, D. A.; Sharp, W. R.; Ammirato, P. V. y Yamada, Y. (eds.). Handbook of plant cell culture. MacMillan Publishing, Nueva York. v. 1, p. 13-81.

Fonnesbech, M. 1974. Temperature effects on shoot and root development from *Begonia* x *Cheimantha* petiole segments grown in vitro. Physiol. Plant. 32:282-286.

Fridborg, G. 1971. Growth and organogenesis in tissue cultures of *Allium cepa* var. *proliferum*. Physiol. Plant. 25:436-440.

——— y Eriksson, T. 1975. Effects of activated charcoal on growth and morphogenesis in cell cultures. Physiol. Plant. 34:306-308.

———; Pedersen, M.; Landstron, L. E. y Eriksson, T. 1978. The effect of activated charcoal on tissue cultures: Adsorption of metabolites inhibiting morphogenesis. Physiol. Plant. 43:104-106.

Digitized by Google

Fujimura, T. y Komamine, A. 1979. Involvement of endogenous auxin in somatic embryogenesis in a carrot cell suspension culture. Z. Pflanzenphysiol. 95:13-19.

——— y ———. 1980. Mode of action of 2,4-D and zeatin on somatic embryogenesis in a carrot cell suspension culture. Z. Pflanzenphysiol. 99:1-8.

Gamborg, O. L.; Constabel, F. y Miller, R. A. 1970. Embryogenesis and production of albino plants from cell cultures of *Bromus inermis*. Planta 95:355-358.

———; Miller, R. A. y Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50:151-158.

——— y Shyluk, J. P. 1981. Nutrition, media and characteristics of plant cell and tissue cultures. En: Thorpe, T. A. (ed.). Tissue culture: Methods and applications in agriculture. Academic Press, Nueva York. p. 21-44.

Gautheret, R. J. 1969. Investigations on the root formation in the tissues of *Helianthus tuberosus* cultures in vitro. Am. J. Bot. 56:702-717.

Guha, S. y Maheshwari, S. C. 1964. In vitro production of embryos from anthers of *Datura*. Nature 204:497.

Gukasyan, I. A.; Butenko, R. G.; Petoyan, S. A. y Sevostyanova. 1977. Morphogenesis of isolated apices of remontant carnation on an artificial medium. Sov. Plant Physiol. 24:130-133.

Haccius, B. 1973. Les premiers stages des embryons végétaux zygotiques et somatiques sont-ils differents oun non? Societé Botanique de France, Memoires Coll. Morphologie. p. 201-206.

——— y Lakshmanan, K. K. 1965. Adventiv-embryonen aus Nicotiana-kallus, der bei hohen lichtintensitaten kultiviert wurde. Planta 65:102-104.

Hackett, W. P. 1969. Control of bulblet formation on bulb scales of *Lilium longifolium*. HortScience 4:69-70.

Halperin, W. 1966. Alternative morphogenetic events in cell suspensions. Amer. J. Bot. 53:443-453.

———. 1967. Populations density effects on embryogenesis in carrot cell cultures. Exptl. Cell Res. 48:170-173.

———. 1970. Embryos from somatic plant cells. En: Padykula, H. A. (ed.). Control mechanisms in the expression of cellular phenotypes. Academic Press, Nueva York. p. 169-191.

——— y Wetherell, D. F. 1964. Adventive embryony in tissue cultures of the wild carrot, *Daucus carota*. Amer. J. Bot. 51:274-283.

Digitized by Google

——— y ———. 1965a. Ammonium requirement for embryogenesis in vitro. Nature 205:519-520.

——— y ———. 1965b. Ontogeny of adventive embryos of wild carrot. Science 147:756-758.

Handro, W.; Rao, P. S. y Harada, H. 1973. A histological study of the development of buds, roots, and embryos in organ cultures of *Petunia inflata* R. Fries. Ann. Bot. 37:817-821.

Hasegawa, P. M.; Murashige, T. y Takotori, F. H. 1973. Propagation of asparagus through shoot apex culture; 2: Light and temperature requirements, transplantability of plants and cytological characteristics. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 98:143-148.

Havranek, P. y Vagera, J. 1979. Regulation of in vitro androgenesis in tobacco through iron-free media. Biol. Plant. 21:412-417.

Haydu, Z. y Vasil, I. K. 1981. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf tissue and anthers of *Pennisetum purpureum* Schum. Theor. Appl. Genet. 59:269-274.

Heide, O. M. y Skoog, F. 1967. Cytokinin activity in *Begonia* and *Bryophyllum*. Physiol. Plant. 20:771-780.

Heller, R. 1953. Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés in vitro. Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Veg. (París) 14:1-223.

Hussey, G. 1975. Totipotency in tissue explants and callus of some members of the *Liliaceae*, *Iridaceae*, and *Amaryllidaceae*. J. Exp. Bot. 26:253-262.

Jansson, E. y Bornman, C. H. 1980. In vitro phyllomorphic regeneration of shoot buds and shoots in *Picea abies*. Physiol. Plant. 49:105-111.

Jarret, R. L.; Hasegawa, P. M. y Erickson, H. T. 1980. Factors affecting shoot initiation in tuber discs of potato (*Solanum tuberosum*). Physiol. Plant. 49:177-184.

———; ——— y Bressan, R. A. 1981. Gibberellic acid regulation of adventitious shoot formation from tuber discs of potato. In vitro 17:825-830.

Jones, L. H. 1974. Long-term survival of embryoids of carrot (*Daucus carota* L.). Plant Sci. Lett. 2:221-224.

Kato, H. y Takeguchi, M. 1966. Embryogenesis from the epidermal cells of carrot hypocotyl. Sci. Papers College Gen. Educ. Univ. Tokyo 16:245-254.

Kato, Y. 1978. The involvement of photosynthesis in inducing bud formation on excised leaf segments of *Helonipsis orientalis* (*Liliaceae*). Plant Cell Physiol. 19:791-799.

Digitized by Google

Kaul, K. y Sabharwal, P. S. 1975. Morphogenetic studies on **Haworthia**: Effects of inositol on growth and differentiation. Amer. J. Bot. 62:655-659.

Kochba, J.; Button, J.; Spiegel-Roy, P.; Bornman, C. H. y Kochba, M. 1974. Stimulation of rooting *Citrus* embryoids by gibberellic acid and adenine sulfate. Ann. Bot. 38:795-802.

Konar, R. N. y Konar, A. 1966. Plantlet and flower formation in callus culture from *Phlox drummondi* Hook. Phytomorphology 16:379-382.

Krikorian, A. D. y Berquam, D. L. 1969. Plant cell and tissue cultures: The role of Haberlandt. Bot. Rev. 35:59-88.

Lakshmi Sita, G.; Raghava Ram, N. V. y Vaidyanathan, C. S. 1979. Differentiation of embryoids and plantlets from shoot callus of sandalwood. Plant Sci. Lett. 15:265-270.

———; ——— y ———. 1980. Triploid plants from endosperm cultures of sandalwood by experimental embryogenesis. Plant Sci. Lett. 20:63-69.

Lee, T. T. y Skoog, F. 1965. Effects of substituted phenols on bud formation and growth of tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 18:386-402.

Linsmaier, E. M. y Skoog, F. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 18:100-127.

Litz, R. E. 1984a. In vitro somatic embryogenesis from nucellar callus of monoembryonic mango. HortScience 19:715-717.

———. 1984b. In vitro responses of adventitious embryos of two polyembryonic *Eugenia* species. HortScience 19:720-722.

———. 1984c. In vitro somatic embryogenesis from callus of jaboticaba, *Myrciaria cauliflora*. HortScience 19:62-64.

——— y Conover, R. A. 1980. Somatic embryogenesis in cell cultures of *Carica stipulata*. HortScience 15:733-734.

———; Knight, R. K. y Gazit, S. 1982. Somatic embryos from cultured ovules of polyembryonic *Mangifera indica* L. Plant Cell Rep. 1:264-266.

———; O'Hair, S. K. y Conover, R. A. 1983. In vitro growth of *Carica papaya* L. cotyledons. Scientia Hortc. 19:287-293.

Loewenger, J. R. 1969. Cyclamen callus cultures. Can. J. Bot. 47:2065-2067.

Lu, C. y Vasil, I. K. 1981. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf tissues of *Panicum maximum* Jacq. Theor. Appl. Genet. 59:275-280.

———; ——— y Ozias-Akins, P. 1982. Somatic embryogenesis in *Zea mays* L. Theor. Appl. Genet. 62:109-112.

Digitized by Google

Malmberg, R. L. 1979. Regeneration of whole plants from callus culture of diverse genetic lines of *Pisum sativum* L. Planta 146:243-244.

Margara, J. y Bouniols, A. 1967. Comparison in vitro de l'influence du milieu liquide ou gélose, sur l'initiation florale chez *Cichorium intybus* L. C. R. Acad. Sci. Ser. D. 264:1166-1168.

Miller, C. O.; Skoog, F.; von Saltza, M. H. y Strong, F. M. 1955. Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. J. Am. Chem. Soc. 77:1392.

Mullins, M. G. y Srinivasan, C. S. 1976. Somatic embryos and plantlets from an ancient clone of the grapevine (cv. Cabernet-Sauvignon) by apomixis in vitro. J. Exptl. Bot. 27:1022-1030.

Muniyamma, A. 1977. Triploid embryos from endosperm in vivo. Ann. Bot. 41:1077-1079.

Murashige, T. 1964. Analysis of the inhibition of organ formation in tobacco tissue culture by gibberellin. Physiol. Plant. 17:636-643.

———. 1974. Plant propagation through tissue cultures. Ann. Rev. Plant Physiol. 25:135-165.

——— y Nakano, R. 1968. The light requirement for shoot initiation in tobacco callus cultures. Amer. J. Bot. 55(supl.):710.

——— y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.

Nakano, H. y Maeda, E. 1974. Morphology of the process of shoot formation in rice callus cultures. Proc. Crop. Sci. Soc. Japan 43:151-160.

Narayanaswamy, S. 1977. Regeneration of plants from tissue culture. En: Reinert, J. y Bajaj, Y. P. S. (eds.). Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture. Springer-Verlag, Berlín. p. 179-248.

Nitsch, C. 1974. Pollen culture: A new technique for mass production of haploid and homozygous plants. En: Kasha, K. J. (ed.). Haploids in higher plants. Guelph Press, Guelph, Canadá. p. 123-135.

Nitsch, J. P. 1969. Experimental androgenesis in *Nicotiana*. Phytomorphology 19:389-404.

Nobencourt, P. 1939. Sur les radicelles naissant des cultures de tissus vegetaux. C. R. S. Soc. Biol. 130:1271.

Norstog, K. y Rhamstine, E. 1967. Isolation and culture of haploid and diploid cycad tissues. Phytomorphology 17:374-38.

Norton, J. P. y Ball, W. G. 1954. Callus and shoot formation from tomato roots in vitro. Science 119:220-221.

Digitized by Google

Okazawa, Y.; Katsura, N. y Tagawa, T. 1967. Effects of auxin and kinetin on the development and differentiation of potato tissue cultured in vitro. Physiol. Plant. 20:862-869.

Pelletier, G. y Delise, B. 1969. Sur la faculté de régénération des plantes entières par culture in vitro du pédoncule floral de *Petunia pendula*. Ann. Amelior. Plantes 19:353-355.

Pannetier, C. y Buffard-Morel, J. 1982. Production of somatic embryos from leaf tissues of coconut, *Cocos nucifera* L. En: Fujiwara, A. (ed.). Plant tissue culture 1982. Japan Assoc. Plant Tissue Culture, Tokio. p. 755-756.

Peters, J. E.; Wu, P. H. L.; Sharp, W. R. y Paddock, E. F. 1974. Rooting and the metabolism of nicotine in tobacco callus cultures. Physiol. Plant. 31:97-100.

Pierik, R. L. M. 1972. Adventitious root formation in isolated petiole fragments of *Lunaria annua* L. Z. Pflanzenphysiol. 60:343-351.

——— y Steegmans, H. H. M. 1975. Analysis of adventitious root formation in isolated stem explants of *Rhododendron*. Scientia Hortic. 3:1-20.

———; ——— y Van Der Meys, J. A. J. 1974. Plantlet formation in callus tissue of *Anthurium andreanum* Lind. Scientia Hortic. 2:193.

Pollard, J. K.; Shantz, E. M. y Steward, F. C. 1961. Hexitols in coconut milk: Their role in nurture of dividing cells. Plant Physiol. 36:492-501.

Rabechault, H.; Ahee, J. y Guenin, G. 1970. Colonies cellularies et formes embryoides obtenues in vitro a partir de cultures d'embryons de Palmier a l'huile (*Elaeis guianensis* Jacq. var. Dura Becc.). C. R. Acad. Sci. Paris 270:3067-3070.

Raghavan, V. 1976. Experimental embryogenesis in vascular plants. Academic Press, Nueva York.

Raju, M. V. S. y Mann, H. E. 1970. Regenerative studies on the detached leaves of *Echeveria elegans*: Anatomy and regeneration of leaves in sterile culture. Can. J. Bot. 48:1887-1891.

Rangan, T. S. 1976. Growth and plantlet regeneration in tissue cultures of some Indian millets: *Paspalum scrobiculatum* L., *Eleusine coracana* Gaertn. and *Pennisetum typhoideum* Pers. Z. Pflanzenphysiol. 78:208-216.

———; Murashige, T. y Bitters, W. P. 1968. In vitro initiation of nucellar embryos in monoembryonic Citrus. HortScience 3:226-227.

Reinert, J. 1958. Untersuchungen über die morphogenese und gewebekulturen. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 71:15.

———. 1967. Some aspects of embryogenesis in somatic cells of *Daucus carota*. Phytomorphology 17:510-516.

Digitized by Google

———. 1973. Aspects of organization-organogenesis and embryogenesis. En: Street, H. E. (ed.). Plant cell and tissue culture. Blackwell Sci. Pub., Oxford, Inglaterra. p. 338-355.

———; Backs-Husemann, D. y Zerban, H. 1971. Determination of embryo and root formation in tissue cultures from *Daucus carota*. Coll. Natl. C. N. R. S. (París):261-268.

Reynolds, J. F. y Murashige, T. 1979. Asexual embryogenesis in callus cultures of palms. In vitro 5:383-387.

Ross, M. K. y Thorpe, T. A. 1973. Physiological gradients and shoot initiation in tobacco callus cultures. Plant Cell Physiol. 14:473-480.

Rucker, W. y Paupardin, C. 1969. Action de quelques acides-phenols sur la rhizogénése des tissus de tubercules de topinambour (variété violet de Rennes) cultivés in vitro. C. R. Acad. Sci. Ser. D. 268:1279-1281.

Sastri, R. L. N. 1963. Morphogenesis in plant tissue cultures. En: Plant tissue and organ culture: A symposium. International Society of Plant Morphologists, Delhi, India. p. 105-107.

Schenk, R. U. y Hildebrandt, A. C. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Can. J. Bot. 50:199-204.

Skoog, F. 1944. Growth and organ formation in tobacco tissue cultures. Amer. J. Bot. 31:19-24.

——— y Miller, C. O. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. Symp. Soc. Exp. Biol. 11:118-130.

——— y Tsui, C. 1948. Chemical control of growth and bud formation in tobacco stem segments and callus cultured in vitro. Amer. J. Bot. 35:782-787.

——— y ———. 1951. Growth substances and the formation of buds in plant tissue. En: Skoog, F. (ed.). Plant growth substances. University of Wisconsin Press, Madison, E.U. p. 263-285.

Smith, S. M. y Street, H. E. 1974. The decline of embryogenic potential as callus and suspension cultures of carrot (*Daucus carota* L.) are serially subcultured. Ann. Bot. 38:223-241.

Smith, W. K. y Jones, L. H. 1970. Plant propagation through cell cultures. Chem. Ind. 44:1399.

Sommer, H. E.; Brown, C. L. y Kormanik, P. P. 1975. Differentiation of plantlets in long-leaf pine (*Pinus palustris* Mill.) tissue cultured in vitro. Bot. Gaz. 136:196-200.

Sterling, C. 1951. Origin of buds in tobacco stem segments cultured in vitro. Amer. J. Bot. 38:761-767.

Digitized by Google

Steward, F. C.; Mapes, M. O. y Mears, K. 1958. Growth and organized development of cultured cells; 2: Organization in cultures grown from freely suspended cells. Amer. J. Bot. 45:705-708.

———; ———; Kent, A. E. y Holsten, R. D. 1964. Growth and development of cultured plant cells. Science 143:20-22.

——— y Shantz, E. M. 1959. The chemical induction of growth in plant tissue cultures. En: Wain, R. L. y Wightman, F. (eds.). The chemistry and mode of action of plant growth substances. Academic Press, Nueva York. p. 165-187.

Street, H. E. 1976. Cell cultures: A tool in plant biology. En: Dudits, D.; Farkas, G. L. y Malia P. (eds.). Cell genetics in higher plants. Pub. House Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Hungría. p. 7-38.

——— y Withers, L. A. 1974. The anatomy of embryogenesis in culture. En: Street, H. E. (ed.). Tissue culture and plant science. Academic Press, Londres. p. 71-100.

Sung, Z. R.; Fienberg, A.; Chorneau, R.; Borkind, C.; Furner, I.; Smith, J.; Terzi, M.; LoShiavo, F.; Giuliano, G.; Pitto, L. y Nuti-Ronchi, V. 1984. Developmental biology of embryogenesis from carrot culture. Plant Mol. Biol. Rep. 2:3-14.

Sussex, I. M. y Frei, K. A. 1968. Embryoid development in long-term tissue cultures of carrot. Phytomorphology 18:339-349.

Takayama, S. y Misawa, M. 1979. Differentiation in *Lilium* bulbscales grown in vitro: Effects of various cultural conditions. Physiol. Plant. 46:184-190.

Taylor, R. L. 1967. The foliar embryos of *Malaxis paludosa*. Can. J. Bot. 45:1553-1556.

Thomas, E.; King, P. J. y Potrykus, I. 1977. Shoot and embryo-like structures from cultured tissues of *Sorghum bicolor*. Naturwissenschaften 64:587.

Thorpe, T. A. 1980. Organogenesis in vitro: Structural, physiological and biochemical aspects. En: Vasil, I. K. (ed.). Perspectives in plant cell and tissue culture. Academic Press, Nueva York. p. 71-111.

———. 1983. Morphogenesis and regeneration in tissue culture. En: Owens, L. D. (ed.). Genetic engineering: Applications to agriculture. Rowman and Allanhead, Totowa, Nueva Jersey, E.U. p. 285-303.

——— y Meier, D. D. 1973. Effects of gibberellic acid and abscisic acid on shoot formation in tobacco callus cultures. Physiol. Plant. 29:121-124.

——— y Murashige, T. 1970. Some histochemical changes underlying shoot initiation in tobacco callus cultures. Can. J. Bot. 48:277-285.

Tisserat, B.; Esan, E. B. y Murashige, T. 1979. Somatic embryogenesis in angiosperms. Hort. Rev. 1:1-78.

Digitized by Google

Torrey, J. G. 1966. The initiation of organized development in plants. Adv. Morphog. 5:39-91.

Tran Thanh Van, K. 1980. Control of morphogenesis by inherent and exogenously applied factors in thin cell layers. En: Vasil, I. K. (ed.). Perspectives in plant cell and tissue culture. Academic Press, Nueva York. p. 175-194.

——— y Trinh, H. 1978. Morphogenesis in thin cell layers: Concept, methodology and results. En: Thorpe, T. A. (ed.). Frontiers of plant tissue culture. University of Calgary Press, Calgary, Canadá. p. 37-48.

Vasil, I. K. 1982. Plant cell culture and somatic cell genetics of cereals and grasses. En: Vasil, I. K.; Scowcroft, W. R. y Frey, K. J. (eds.). Plant improvement and somatic cells genetics. Academic Press, New York. p. 179-203.

Vasil, V. y Vasil, I. K. 1980. Isolation and culture of cereal protoplasts; 2: Embryogenesis and plantlet formation from protoplasts of *Pennisetum americanum*. Theor. Appl. Genet. 56:97-100.

——— y ———. 1981a. Somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension cultures of pearl millet (*Pennisetum americanum*). Ann. Bot. 669:678.

——— y ———. 1981b. Somatic embryogenesis and plant regeneration from tissue cultures of *Pennisetum americanum* and *P. americanum* x *P. purpureum* hybrid. Amer. J. Bot. 68:864-872.

Weatherhead, M. A.; Burdon, J. y Henshaw, G. G. 1978. Some effects of activated charcoal as an additive to plant tissue culture media. Z. Pflanzenphysiol. 89:141-147.

Wernicke, W. y Brettell, R. 1980. Somatic embryogenesis from *Sorghum bicolor* leaves. Nature 287:138-139.

Wetherell, D. F. 1984. Enhanced adventive embryogenesis resulting from plasmolysis of cultured wild carrot cells. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 3:221-227.

——— y Dougall, D. K. 1976. Sources of nitrogen supporting growth and embryogenesis in cultured wild carrot tissue. Physiol. Plant. 37:97-103.

White, P. R. 1939. Controlled differentiation in a plant tissue culture. Bull. Torrey Bot. Club 66:507-513.

———. 1963. The cultivation of animal and plant cells. Ronald Press, Nueva York. 228 p.

Wolter, K. E. y Skoog, F. 1966. Nutritional requirements of *Fraxinus* callus cultures. Amer. J. Bot. 53:263-269.

Zatyko, J. M.; Simon, I. Y. y Szabo, C. S. 1975. Induction of polyembryony in cultivated ovules of red currant. Plant Sci. Lett. 4:822-825.

Digitized by Google

Capítulo 8

Suspensiones celulares: descripción, manipulación y aplicaciones

L. Szabados*
L. A. Mroginski**
W. M. Roca***

* Unidad de Investigación en Biotecnología (UIB), Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. Dirección actual: Biological Research Center, Institute of Plant Physiology, Szeged, Hungría.
** Facultad de Ciencias Agrarias, Instituto de Botánica del Nordeste, Corrientes, Argentina.
*** Unidad de Investigación en Biotecnología (UIB), Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia.

Digitized by Google

Introducción

En las últimas décadas se han desarrollado diferentes sistemas para los cultivos de protoplastos, células, tejidos y órganos vegetales; uno de ellos es el cultivo en suspensión (suspensiones celulares), el cual constituye una forma para mantener y propagar células vegetales.

Descripción y Manipulación de las Suspensiones Celulares

Las suspensiones celulares consisten en células libres y agregados celulares distribuidos en un medio en movimiento. Estas suspensiones pueden ser permanentes mediante el suministro continuo de nutrimentos.

Medios de cultivo

Para el cultivo de suspensiones celulares de una gran variedad de plantas se ha utilizado el medio MS desarrollado por Murashige y Skoog (1962) para el cultivo de tejidos de tabaco, como también el medio B-5 de Gamborg et al. (1968). También se han utilizado otros medios, pero su composición no difiere mucho de los citados.

A menudo, los medios óptimos para la inducción y crecimiento de callos a partir de explantes primarios no son los mismos que para el establecimiento de suspensiones celulares; el nivel óptimo de auxinas y citocininas, p.ej., puede ser diferente (Torrey et al., 1961). En ocasiones las células en suspensión necesitan de suplementos orgánicos, aminoácidos, CH, extracto de levadura, y AC; la auxina más utilizada es 2,4-D. Mayor información sobre los medios de cultivos se consulta en el Capítulo 3 de esta publicación.

Iniciación de las suspensiones

Las suspensiones celulares se inician generalmente mediante la incubación de trozos de callos friables en medios líquidos que están en movimiento continuo.

Comúnmente se emplean frascos Erlenmeyer, en los cuales se deposita el medio líquido con los trozos de callo dispersos en él, hasta llenar aproximadamente 1/5 de la capacidad de los frascos; éstos se ponen luego a

Digitized by Google

incubar en un agitador giratorio (ver Capítulo 1) a 80-150 rpm, bajo luz continua y a 25 °C de temperatura. Mediante subcultivos semanales, las suspensiones celulares quedan establecidas después de varios días.

Durante los primeros subcultivos es recomendable usar una tasa de dilución baja (por ej., 1:1 a 1:4) utilizando cuatro partes de medio fresco por cada parte de suspensión celular. Posteriormente se puede utilizar una tasa de dilución más alta, según el objetivo para el cual se haya establecido la suspensión.

El mejor inóculo para la iniciación de suspensiones celulares es sin duda un callo friable, con un alto ritmo de división celular. Sin embargo, a veces es necesario utilizar otros tipos de callos, y en esos casos hay que realizar frecuentemente operaciones para romper los agregados grandes. Se puede apelar a medios mecánicos, como el uso de frascos con deflectores o el filtrado (King, 1984); la adición de pectinasas y celulasas al medio de cultivo también puede reducir el tamaño de los agregados celulares (King et al., 1973).

La selección de células aptas para crecer en suspensiones celulares se puede efectuar, en un medio sólido, mediante el plaqueo de una suspensión recién comenzada, para continuar únicamente con la suspensión de colonias celulares friables y de rápido crecimiento (Wilson et al., 1975).

En su iniciación, las suspensiones celulares constan de grandes agregados y de células libres, alargadas y enormes, que no se dividen; pero después de repetir los subcultivos es factible obtener una suspensión celular finamente dispersa con alto ritmo de crecimiento. Estas suspensiones poseen pequeños agregados de células pequeñas, isodiamétricas, con paredes finas y citoplasma denso.

Sistemas de cultivo

Para mantener las suspensiones celulares se pueden usar diferentes sistemas de cultivo, los cuales se pueden clasificar básicamente en tres tipos: cerrados, continuos cerrados, y continuos abiertos (Figura 8.1).

Cultivos cerrados. En este sistema, las células producidas se quedan en el medio, y de esta manera se produce un aumento en la densidad celular (Figura 8.1, A); al alcanzar la suspensión la denominada fase estacionaria, se toman fracciones de ella para subcultivarlas en un medio fresco y reiniciar de esta manera el ciclo de crecimiento. Este es el sistema más empleado en los laboratorios de investigaciones de tipo agrícola que utilizan técnicas de cultivo de células.

Digitized by Google

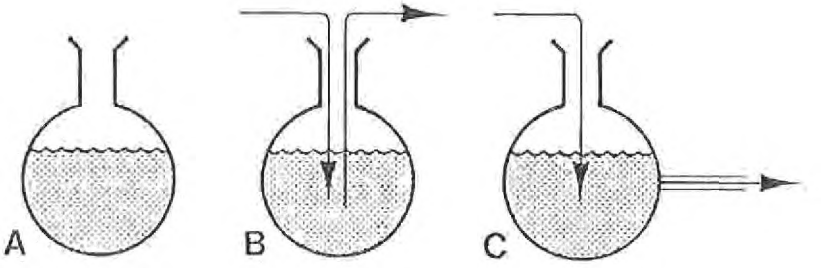


Figura 8.1 Representación esquemática de los sistemas de cultivo de suspensiones celulares vegetales. A = cultivo cerrado (no entra ni sale medio nuevo); B = continuo cerrado (entra medio nuevo y sale medio gastado pero sin células); C = continuo abierto (entra medio nuevo y sale medio gastado con algunas células)

Cultivos continuos cerrados. En este sistema se suministra a la solución medio fresco en forma continua, y simultáneamente se retira sólo el medio 'usado'; las células, separadas mecánicamente, se acumulan en el sistema (Figura 8.1, B).

Cultivos continuos abiertos. Al igual que en el sistema anterior, hay un suministro de medio fresco, pero el medio 'usado' sale junto con las células (Figura 8.1, C).

En este capítulo se tratará sólo el primer sistema. Para la manipulación de los dos últimos, como también para obtener detalles de los aparatos que se utilizan en ellos, consultar a Street (1977), Kurz (1982), Drew (1980), y Wilson et al., (1971), entre otros.

Métodos para medir el crecimiento

Hay numerosos métodos para determinar el crecimiento de las suspensiones celulares (Street, 1977). Los más utilizados son:

Número de células. Este es un parámetro de crecimiento de mucha utilidad, y para usarlo como método de medición es necesario disgregar los grupos celulares en células individuales o en agregados de no más de 10 células.

La separación de los agregados se puede hacer mediante el tratamiento con soluciones acuosas de CrO_3 al 8-12%, a 70 °C durante 2-15 min según el material vegetal; se usan cuatro volúmenes de la solución previamente

Digitized by Google

filtrada por cada volumen de cultivo (King, 1984). Para realizar el conteo de las células conviene hacerlo en un microscopio de uso rutinario, ya que el CrO_3 es corrosivo.

Los agregados celulares también se separan mediante un tratamiento con pectinasa (0.1%, durante 16 h a 25 °C).

Volumen celular. Para aplicar este método se toma un volumen conocido de la suspensión y se centrifuga durante 3 min a 200g para provocar la sedimentación de las células; luego se determina el volumen de éstas y se expresa en ml de células por ml de cultivo.

Peso fresco. Sobre un papel filtro previamente pesado se colocan las células lavadas con agua destilada y se pesan. Este método no es recomendable para cantidades pequeñas de células.

Peso seco. Se determina de manera similar a como se determina el peso fresco, pero antes de pesar las células se secan a 60 °C, durante 12 h como mínimo (preferiblemente al vacío).

Turbidez. Este método (Sung et al., 1976b) se puede aplicar a suspensiones que crecen en frascos provistos de brazo lateral; la turbidez se puede medir con un fotocolorímetro (con filtro azul, a 400-465 nm).

Indice mitótico (IM). Se recolectan las células y se fijan con una solución 1:3 de ácido acético glacial y etanol absoluto, usando 2 ml del fijador por cada 5 ml de suspensión; después de un período de 30 min a 3 horas de fijación se depositan las células sobre un portaobjetos y se colorean con carbolfucsina; después de colocar y presionar el cubreobjetos, se observa en un microscopio para determinar y registrar el número de núcleos que haya en mitosis.

Se deben analizar por lo menos 1000 células, para aplicar la siguiente ecuación:

$$IM = \frac{\text{células en mitosis}}{\text{total de células}} \times 100 \qquad (1)$$

Desarrollo de las Suspensiones Celulares

En los cultivos cerrados, el 'crecimiento' de las suspensiones celulares comprende varias fases representadas en la Figura 8.2.

Digitized by Google

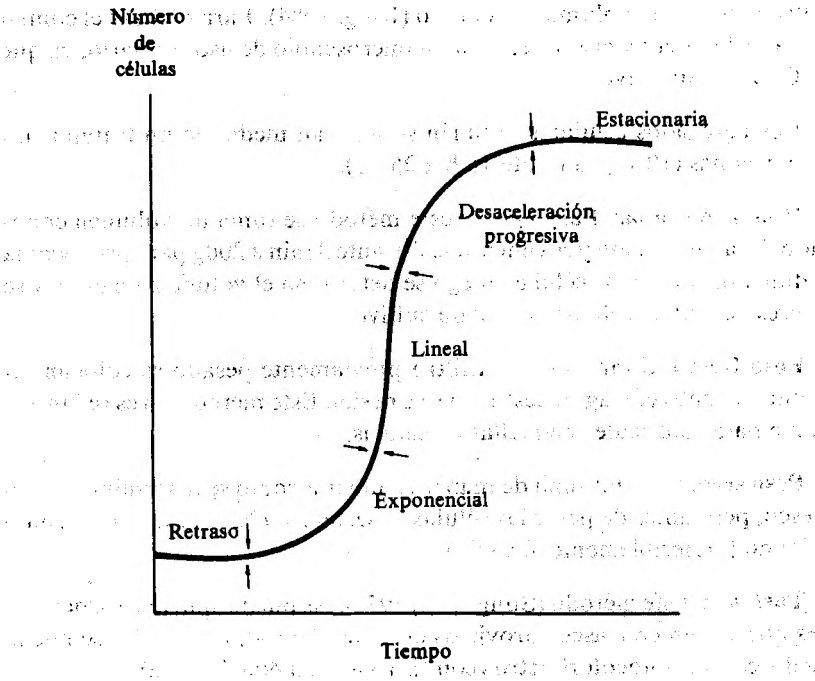


Figura 8.2. Curva de crecimiento típica, en la cual se relaciona el número de células en las diferentes fases (de retraso, exponencial, lineal, de desaceleración y estacionaria) con el tiempo de incubación, en un cultivo cerrado.

La fase de retraso se observa cuando en un medio fresco se subcultivan suspensiones celulares que están en la fase estacionaria; los cultivos crecen lentamente durante 1 a 3 días. La fase de retraso no se presenta, o es muy corta, si se subcultivan suspensiones que están en el período de crecimiento (Street, 1977; Nover et al., 1982; Meadows, 1982-1983; Gould et al., 1975); también se acorta con la adición al medio de cultivo de ciertos extractos orgánicos como la CH (Larkin, 1982).

En la fase exponencial (o fase logarítmica), la tasa específica de crecimiento (μ), o sea, el aumento de la biomasa por unidad de concentración de la misma, es constante y medible. Matemáticamente (Street, 1977) se expresaría mediante la ecuación:

$$\mu = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{t_d} = \frac{d(\log_e X)}{t_d} = \frac{\log_e 2}{t_d} \qquad (2)$$

Digitized by Google

en donde:

μ = tasa específica de crecimiento de la suspensión;
X = número de células por unidad de volumen, en el tiempo t;
t_d = tiempo de duplicación de la densidad celular.

Cuando la tasa de crecimiento es igual a 1, el t_d es igual (King, 1980) al promedio del tiempo del ciclo celular (TCC). Sin embargo, la gran variación en el tiempo de los ciclos celulares y la presencia de células que no se dividen (células Q), causan diferencias de diversa magnitud entre t_d y TCC. Las células Q se han observado en numerosas suspensiones celulares (Chu et al., 1976; Vasil et al., 1982; Rembur, 1973).

Cuando la cantidad de células Q es pequeña y $t_d > TCC$, la población celular crece realmente en forma exponencial. En estos cultivos la fase exponencial de crecimiento dura de 2 a 4 veces el tiempo de la generación celular. Cuando la fracción de células Q es alta y $TCC > t_d$, la fase exponencial es más larga y el modelo de crecimiento tiende a ser lineal.

El uso de bajas densidades celulares en la iniciación del cultivo, o el empleo de elevadas concentraciones de nutrimentos en el medio, pueden prolongar la fase exponencial.

En la fase lineal, la tasa específica de crecimiento declina uniformemente con el tiempo. Esta declinación aumenta en la fase de desaceleración progresiva, para alcanzar finalmente la fase estacionaria, en la cual no hay aumento neto en la síntesis de biomasa o en el número de células.

Características generales de las células en suspensión

Para caracterizar el crecimiento de las suspensiones celulares, pueden ser útiles los siguientes parámetros: número de células, actividad mitótica, peso (fresco y seco), turbidez, y volumen.

El número de células comienza a aumentar al final de la fase de retraso, mientras que la frecuencia de la división celular, expresada por el índice mitótico (IM), es baja durante esta fase. Aunque la fase de retraso puede no existir cuando se subcultivan células en crecimiento activo, el IM decae durante varias horas, para luego aumentar rápidamente; la actividad mitótica alcanza su máximo nivel pasados de 1 a 3 días de subcultivo.

Al final de la fase lineal, el IM comienza a declinar hasta ser prácticamente nulo en la fase estacionaria (Eriksson, 1966; Evans et al., 1982; Gould et al., 1974; King, 1980; Meadows, 1982-1983; Nover et al., 1982).

Digitized by Google

La suspensión celular de remolacha azucarera (Figura 8.3) cultivada apropiadamente tiene una fase de retraso corta (Figura 8.4); la máxima actividad mitótica (IM $\simeq$ 8%) se presentó al tercer día de cultivo y fue igual a cero al cabo de 9 a 10 días (Szabados et al., 1985). Gould et al. (1975) encontraron altos niveles de división celular sincronizada en la fase exponencial de suspensiones celulares de *Acer pseudoplatanus*, cuando el inóculo provenía de la fase estacionaria; esta sincronización fue persistente en términos de replicación de ADN y de división celular.

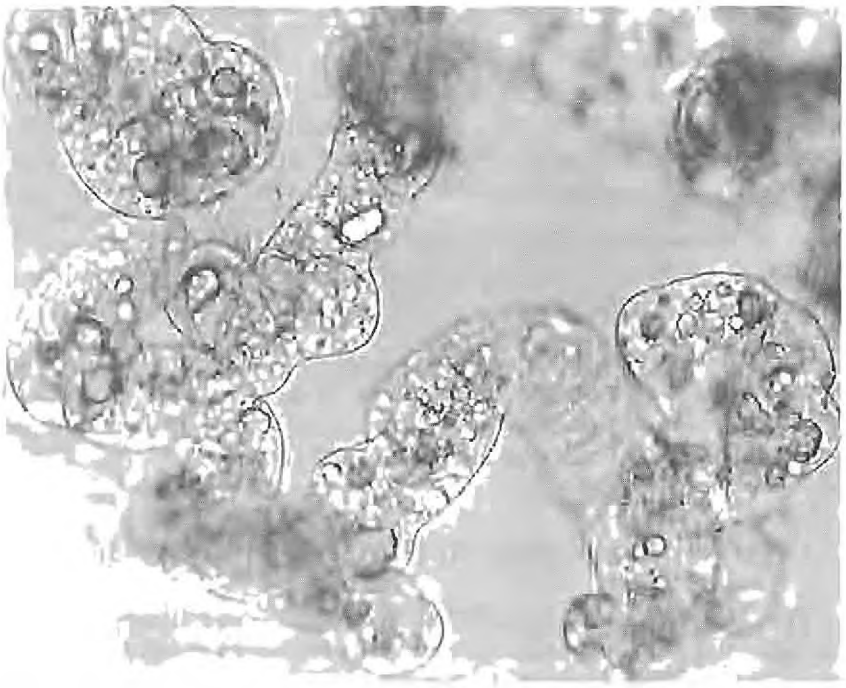


Figura 8.3 Suspensión celular de remolacha azucarera.

El crecimiento, en términos de peso fresco y seco y de volumen celular, es similar al crecimiento medido con el número de células pero no completamente paralelo a éste, ya que el incremento de los dos primeros parámetros tiende a retrasarse con respecto al número de células. En la primera parte de la fase exponencial de los cultivos, tales parámetros muestran un

Digitized by Google

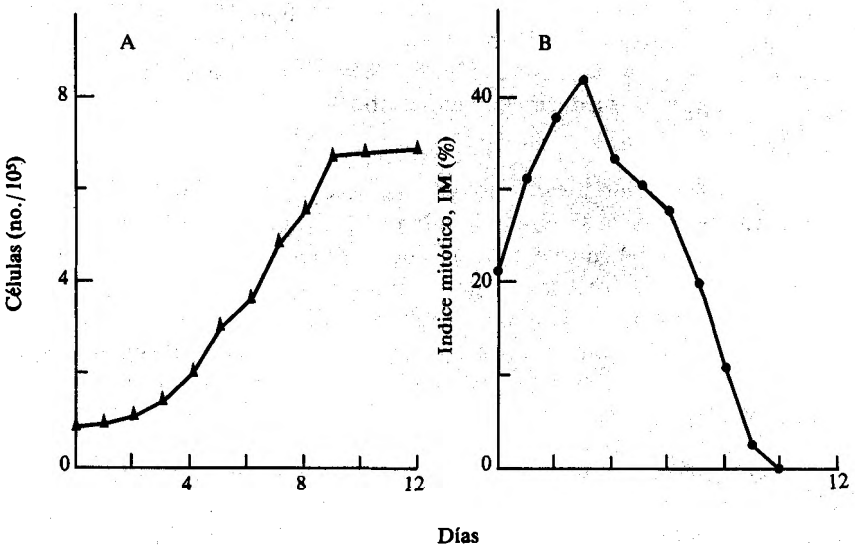


Figura 8.4. Crecimiento de suspensiones celulares de remolacha azucarera, en términos de número de células (A) e índice mitótico, IM (B).

incremento menor que el del número de células, pero en períodos posteriores ellos se pueden incrementar, incluso en la fase estacionaria, en la cual el número de células no cambia (Nover et al., 1982; Owens et al., 1979).

Esa diferencia se debe a los cambios en el tamaño de las células. El peso y el volumen de las células individuales decrece en la primera fase de los cultivos pero aumenta cuando las células están en una fase de poca actividad mitótica o estacionaria, debido a la vacuolización y a la síntesis de sustancias. En la fase estacionaria hay células pequeñas y grandes; el tamaño y la morfología de estas células se puede uniformar acortando el ciclo de cultivo.

Se ha encontrado que el volumen ocupado por el citoplasma en la célula está correlacionado con la cantidad de proteínas, pero no hay correlación exacta con el tamaño de la célula. En suspensiones celulares de frijol, el citoplasma varía desde el 25% al momento de la trasferencia hasta el 45% cuando comienza la fase de división celular rápida, para luego caer al 10% en la fase estacionaria. El crecimiento del volumen citoplasmático como un todo parece ser constante durante el ciclo de cultivo, a pesar de los cambios en la división celular, en el tamaño de las células, en su vacuolización, y en los aumentos en el peso fresco y seco (Owens et al., 1979).

Digitized by Google

Durante el cultivo ocurren ciertos cambios bioquímicos en las células. El subcultivo causa cambios complejos en los modelos de actividad génica, y estimula la síntesis de proteínas y de ARN; la formación de polisomas aumenta la traducción de un pequeño grupo de mARN (Bevan et al., 1981; Verma et al., 1974).

Una de las características de los cultivos, luego del subcultivo, es su alta actividad metabólica. El contenido de proteínas de las células decrece en las últimas fases del cultivo, y la viabilidad de las células también declina durante fases estacionarias largas, aunque hay suspensiones celulares capaces de mantenerse vivas sin grandes cambios en su viabilidad (Reider et al., 1982). Los cambios en el peso seco, en la acumulación de proteínas, y en la viabilidad dependen de las condiciones que limitan el crecimiento (Stafford et al., 1983).

La acumulación de metabolitos secundarios es un hecho muy frecuente, especialmente cuando los cultivos se hallan en la fase estacionaria y cuando muestran cierta diferenciación estructural (Lindsey et al., 1983a).

El contenido de ADN celular muestra cambios característicos durante el ciclo de cultivo. Las células en la fase estacionaria tienen generalmente núcleos en G_1; al subcultivarlos comienza la replicación del ADN (al final de la fase de retraso) y el contenido de éste aumenta. Durante el período de crecimiento, el contenido de ADN es el promedio del de las células en G_1, S, G_2 y M. Al entrar en la fase estacionaria,el contenido de ADN declina hasta alcanzar los valores de las células G_1 (Bayliss et al., 1974).

Inestabilidad cromosómica

Varios trabajos indican que las suspensiones celulares pueden contener células con considerables anomalías cromosómicas (Bayliss, 1980); las principales son la poliploidía y la aneuploidía. Bayliss et al. (1974) encontraron que los cambios estructurales y la pérdida de cromosomas ocurren al azar. Un extenso análisis del cariotipo de las células de apio cultivadas en suspensión reveló diferentes alteraciones estructurales en los cromosomas; se observó una alta tasa de aneuploidía, además de traslocaciones y desapariciones ('deletions') en los cromosomas (Murata et al., 1983).

Por el contrario, Evans et al. (1982) establecieron suspensiones celulares con números cromosómicos estables a partir de cuatro genotipos de *Nicotiana*. Para ello emplearon hojas o vástagos jóvenes como explantes, 2,4-D como auxina, e intervalos de cultivo cortos. En el Capítulo 5 se puede encontrar más información respecto a este tema.

Digitized by Google

Plaqueo de suspensiones celulares en medios semisólidos

En muchas ocasiones —por ejemplo, para obtener plantas— es necesario plaquear las suspensiones en medios que contengan agar. Lo mismo sucede cuando se desea obtener clones de una célula única; para este caso hay que asegurar, en primer lugar, la presencia de células aisladas, libres de agregados celulares.

La digestión enzimática con pectinasas o macerozimas (p. ej., 4% de macerozima a 30 °C durante 5 a 7 h) provoca la liberación de células a partir de los agregados (Gresshoff, 1980). La separación también se puede conseguir mediante la filtración a través de tamices de nylon de aberturas entre 26 y 270 µm, según el propósito (Fujimura et al., 1984). También hay indicios de que es posible incrementar la eficiencia del plaqueo de las suspensiones celulares mediante la irradiación con rayos X (Werry et al., 1981).

Morris et al. (1981) describieron un método simple para producir suspensiones celulares compuestas casi exclusivamente de células aisladas; el método consiste en aplicar alginato de calcio para inmovilizar trozos de callos (de 4 a 5 mm de diámetro); las células inmovilizadas continúan dividiéndose, y forman una suspensión celular fina que se puede filtrar y cultivar subsiguientemente en un medio fresco, o usarse para el 'plaqueo'.

Para el plaqueo, las suspensiones celulares se mezclan con un medio de cultivo que contenga 0.6% de agar a 35 °C, e inmediatamente se distribuyen en cajas Petri estériles; las células y agregados (unidades plaqueadas) se pueden contar con la ayuda de un microscopio invertido (con un aumento de 40). Las placas se incuban en la oscuridad, a 25 °C durante 20 a 30 días; después de este período se determina el número de colonias por caja y se compara con el número de unidades plaqueadas. La eficiencia del plaqueo (EP) se determina con la siguiente fórmula:

$$EP = \frac{\text{número de colonias/placa}}{\text{número de unidades plaqueadas}} \times 100 \qquad (3)$$

Para obtener una alta eficiencia en el plaqueo son importantes las siguientes precauciones:

- Usar medios acondicionados o sintéticos que sean adecuados para el crecimiento de las células cultivadas a bajas densidades.
- Utilizar células en una fase de división activa (fase exponencial).

Digitized by Google

- No exponer las células que se plaquean a temperaturas superiores a 35 °C.
- Incubar las placas en condiciones de oscuridad o con muy baja intensidad lumínica (Street, 1977).

Crioconservación de suspensiones celulares

Mantener las suspensiones celulares es una tarea tediosa y que consume tiempo; además, siempre existe el peligro de que se contaminen con microorganismos y que las células sufran cambios genéticos con los prolongados subcultivos. Una posibilidad interesante para obviar estos inconvenientes es la crioconservación de las suspensiones celulares a la temperatura del nitrógeno líquido (-196 °C). Existen numerosos trabajos de crioconservación que incluyen el tema de las suspensiones celulares (Kartha, 1982; Kartha et al., 1982; Withers, 1980); también se encuentra información sobre el tema en el Capítulo 32 de esta obra.

Probablemente, el método más apropiado para la crioconservación es el del congelamiento lento; se procede así:

1) Concentrar la suspensión celular de 4 a 5 veces y dejarla en hielo durante 3 minutos.
2) Agregar gradualmente a la suspensión celular un volumen igual de una solución crioprotectora. Los crioprotectores pueden contener una o varias sustancias. Productos como el dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración final de 5% a 10%, glicerol, prolina o glucosa (1 a 2 M), sacarosa y manitol, se han utilizado individualmente o en combinación para la crioconservación de suspensiones celulares (Kartha et al., 1982; Hauptmann et al., 1982; Kartha, 1982; Withers, 1980; Maddox et al., 1982-1983; Withers et al., 1979).
3) Repartir la suspensión celular con el crioprotector en ampollas de polietileno de 2 ml y congelar en una unidad apropiada. La velocidad de congelamiento generalmente es de 1-2 °C/min hasta -40 ó -70 °C.
4) Trasferir las suspensiones a nitrógeno líquido (-196 °C) para almacenarlas.

Antes de usar la suspensión celular, se debe descongelar agitando la ampolla en agua a 37 °C. Las células se lavan varias veces con centrifugación. Finalmente, la suspensión celular se somete a las pruebas de viabilidad y se subcultiva. La viabilidad se puede estimar mediante la coloración con diacetato de flouresceína o por plaqueo en medios semisólidos (ver Capítulo 32).

Digitized by Google

La tasa de sobrevivencia es variable, y los factores más importantes que se deben optimizar son:

a) el tipo de las células y su estado fisiológico antes del congelamiento; generalmente las células en la fase de retraso o en la fase exponencial brindan los mejores resultados;

b) el tipo de crioprotector;

c) la velocidad de congelamiento;

d) la temperatura final de congelamiento;

e) la temperatura de almacenamiento; generalmente se prefiere la del nitrógeno líquido;

f) el proceso de descongelamiento.

Los resultados exitosos en la crioconservación de diferentes suspensiones celulares (Hauptmann et al., 1980; Kartha et al., 1982; Maddox et al., 1982-1983; Withers, 1980; Withers et al., 1975) sugieren que este método podría ser aplicado en forma más general.

Sincronización de las suspensiones celulares

La sincronización de los sistemas de suspensiones celulares es necesaria para adquirir mejores conocimientos acerca de los mecanismos bioquímicos y fisiológicos de las células, como también para regular su ciclo externo.

En los sistemas asincrónicos, las mediciones de los distintos parámetros de la actividad metabólica darán únicamente valores promedio, ya que tales parámetros serán diferentes en todas las células según el momento del ciclo en que se encuentren. En el sistema ideal de cultivo sincronizado, en cambio, la mayoría de las células se encuentran en la misma fase del ciclo celular, y en consecuencia, el comportamiento de cualquier célula individual reflejará el comportamiento de la totalidad de la población.

En las suspensiones celulares vegetales, es posible obtener únicamente una sincronización parcial mediante diversos procedimientos que primero detienen el ciclo celular en un punto específico y luego permiten su continuación. La detención del ciclo celular se puede lograr por medio de una variedad de compuestos químicos o por la privación de algún elemento o compuesto esencial.

Digitized by Google

Uso de productos químicos. Los inhibidores que frecuentemente se usan para detener el ciclo celular son drogas específicas que bloquean la síntesis del ADN y detienen dicho ciclo en el límite entre las fases G_1 y S, o en la fase S.

Eriksson (1966), trabajando con células de *Haplopappus*, utilizó 5AU (5-aminouracil), FUdR (fluorodesoxiuridina) y HU (hidroxiurea); después de 12 a 16 h de tratamiento con las drogas, encontró picos de mitosis dos a cuatro veces mayores que en el testigo. Los mejores resultados se obtuvieron cuando las células se trataron con HU (3 mM) durante 12 a 24 h. A las 12 horas del tratamiento las suspensiones celulares tenían un IM (índice mitótico) de 35%.

Los compuestos 5AU y FUdR inhiben la síntesis de ADN (Cheon et al., 1960; Grobner et al., 1982; Prensky et al., 1965; Scheuermann et al., 1973) y aunque hay diferencias entre sus efectos, ambas sustancias se pueden utilizar exitosamente en la sincronización de suspensiones celulares (Chu et al., 1976; Eriksson, 1966; Malberg et al., 1980; Scheurmann et al., 1973).

En el caso de la HU, la inhibición de la síntesis del ADN se relaciona con el bloqueo de la conversión de ribonucleótidos a desoxiribonucleótidos, mediante la inhibición de la enzima ribonucleótido-reductasa (Timson, 1975).

La colchicina se reconoce como una sustancia que inhibe la formación de microtúbulos, y frecuentemente se usa para la acumulación de células en metafase (Evans et al., 1957).

La colchicina se ha usado con la HU en la sincronización de suspensiones celulares de trigo, perejil y amapola (Hadlaczky et al., 1983; Szabados et al., 1981). En los tratamientos con HU, los picos mitóticos en suspensiones de trigo y perejil aparecen a las 12 ó 13 h después de la remoción de la droga, con índices mitóticos entre 15 y 20%. La adición de colchicina después del tratamiento con HU permite obtener índices mitóticos del orden del 25% en trigo (Figuras 8.5 y 8.6) y de 50-80% en perejil (Szabados et al., 1981). En las células de amapola, el tratamiento con HU y colchicina no provocó un aumento significativo en el índice mitótico, pero la colchicina sola produjo altos valores de IM (Hadlaczky et al., 1983).

Utilizando un tratamiento combinado con FUdR y colchicina, Malmbert et al. (1980) obtuvieron índices mitóticos de 15% en suspensiones celulares de tabaco, y de 25% en tomate.

Digitized by Google

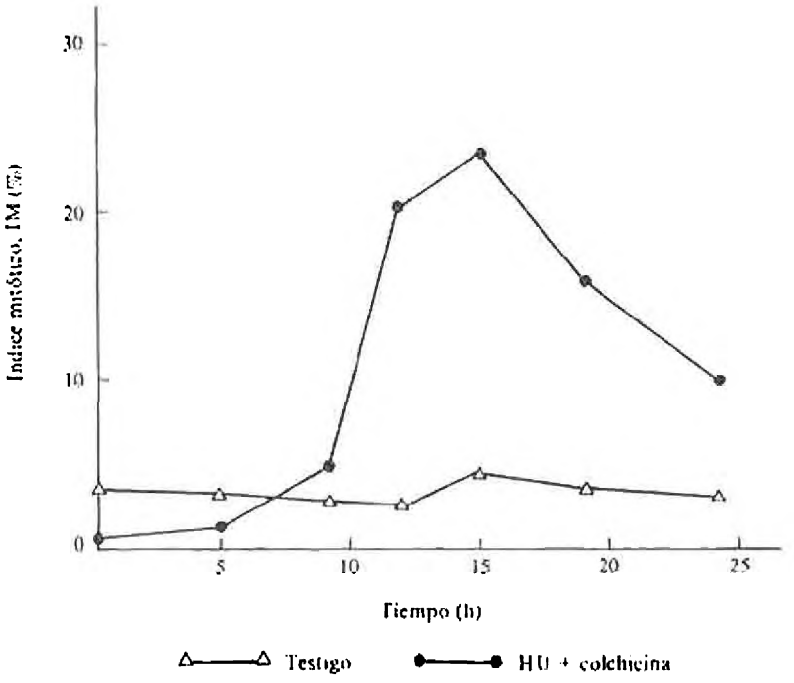


Figura 8.5 Indices mitóticos obtenidos en suspensiones celulares de trigo tratadas con hidroxiurea (5 mM) más colchicina (0.05%), y en suspensiones sin tratamiento (testigo)

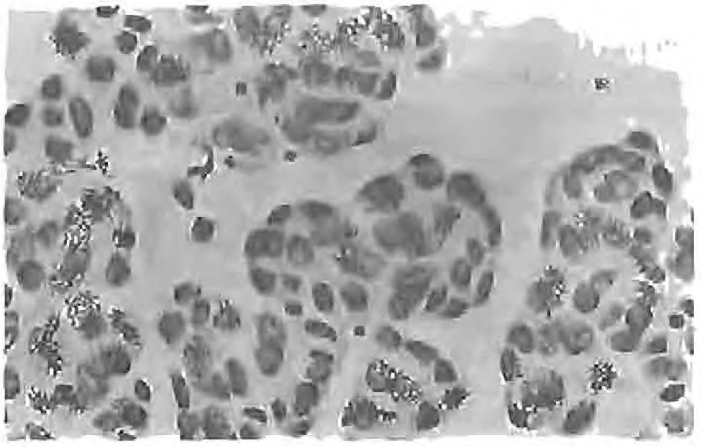


Figura 8.6. Sincronización mitótica en células de trigo después del tratamiento con hidroxiurea más colchicina. Se observa de 25% a 30% de las células en mitosis.

Digitized by Google

También existen inhibidores no específicos que inducen la sincronización celular. Constabel et al. (1977) usaron pulsos de etileno para aumentar la sincronización de la división celular en soya; se ha sugerido que el etileno no afecta directamente la mitosis pero que puede actuar influenciando el ciclo celular antes de esta fase, en los períodos G_2 o S (Constabel et al., 1977; Rost, 1982).

Mediante tratamientos con pulsos de nitrógeno gaseoso también se puede aumentar la sincronización de la mitosis, con IM superiores a 25% (Constabel et al., 1974). Los métodos basados en tratamientos gaseosos hacen posible la sincronización, durante largos períodos, de grandes poblaciones celulares en los sistemas de cultivo continuos.

La elevación de la temperatura (37-40 °C) causa una rápida disminución en el IM, pero si los cultivos se vuelven a incubar a temperaturas más bajas, se encuentran valores de IM superiores a 15%, como en las suspensiones celulares de tomate (Scharf et al., 1982).

Privación de nutrimentos. La sincronización celular se puede inducir también mediante métodos de privación de nutrimentos esenciales para el crecimiento. Las células 'hambreadas' generalmente se detienen en la fase G_1 (Gould et al., 1975; 1981; Kurz, 1982); si posteriormente se adicionan los nutrimentos al medio de cultivo, se obtiene generalmente una sincronización de las divisiones mitóticas.

Gould et al. (1975) y King et al. (1974) obtuvieron suspensiones celulares de *Acer pseudoplatanus* sincronizadas después de la privación de nitratos. Komamine et al. (1978) describieron divisiones sincronizadas en suspensiones celulares de *Vinca rosea* luego de la privación de fósforo.

Los cultivos que requieren reguladores de crecimiento se pueden sincronizar mediante la privación de los mismos. Nishi et al. (1977) informaron que es posible sincronizar suspensiones celulares de zanahoria por medio de la privación de 2,4-D; la posterior adición de esta hormona induce un incremento en el número de células y en el contenido de ADN. Jounneau (1971) informó que las suspensiones celulares de tabaco se pueden sincronizar parcialmente por la privación y posterior adición de citocininas, pero no por la privación de auxinas.

La aplicabilidad general de la privación de los reguladores de crecimiento para la sincronización celular ha sido cuestionada por Everett et al. (1981) quienes, usando suspensiones celulares de soya, observaron únicamente oscilaciones en los valores de IM luego de la privación de BAP.

En la mayoría de las suspensiones celulares sincronizadas, el alto grado inicial de sincronización decae rápidamente (Chu et al., 1976; Eriksson,

Digitized by Google

1966; Hadlaczky et al., 1983; King, 1980; Nishi et al., 1977; Szabados et al., 1981); esto puede deberse a la variabilidad de la fase G_1 y a la existencia de una fase poco conocida en el ciclo celular (Smith et al., 1973).

Una excepción al hecho anterior es el caso de suspensiones celulares de *Acer pseudoplatanus* las cuales, después de ser privadas de iones nitrato durante la fase estacionaria, muestran un alto grado de sincronización durante 4 a 5 generaciones celulares; se ha sugerido la presencia de algunos factores acondicionantes como responsables de este fenómeno (Gould et al., 1975; King et al., 1974). También se pueden inducir cultivos sincronizados mediante tratamientos con repetidos pulsos de nitrógeno gaseoso o etileno (Constabel et al., 1974; 1977).

Aplicaciones de las Suspensiones Celulares

En la investigación con vegetales, las suspensiones celulares constituyen una técnica muy valiosa, particularmente en: a) estudios sobre el ciclo celular; b) estudios fisiológicos y bioquímicos; c) formación de metabolitos secundarios y aislamientos de mutantes; y d) embriogénesis somática.

Estudios sobre el ciclo celular

El desarrollo y la regulación del ciclo celular se han estudiado intensivamente en diferentes organismos y células (Hochhauser et al., 1981).

En las plantas superiores, las investigaciones se han llevado a cabo tradicionalmente en meristemas de raíces (Giménez-Martín et al., 1977; Van't Hof et al., 1972); sin embargo, la organización de los meristemas y la traslocación de sustancias dificultan ese tipo de estudios, mientras que las suspensiones celulares constituyen un material más conveniente para el examen de muchas características del ciclo celular de tales plantas. En este caso, los problemas que presenta el crecimiento no balanceado de las suspensiones celulares, en el sistema de cultivo cerrado, se pueden obviar mediante la utilización de sistemas continuos abiertos (Street, 1977).

En una suspensión en crecimiento activo, el ciclo celular es más largo que en las células de meristemas de raíces, pero es más corto que el de las células de callos que crecen en medios semisólidos (Eriksson, 1966; Gould et al., 1974; Chu et al., 1976; González-Fernández et al., 1966). Existen diferentes métodos para determinar el ciclo celular y la distribución de las diferentes fases.

Digitized by Google

Indices de actividad celular. En una suspensión celular asincrónica,las células se encuentran en diferentes fases; la cantidad de células que hay en una determinada fase en un momento dado es proporcional al tiempo que esa fase dura con respecto al ciclo total.

El principio anterior se aplica para determinar diferentes índices en una población de células. El índice mitótico muestra la duración relativa de la mitosis, y el índice de marcación con ^{3}H-timidina (^{3}HTdR) muestra la duración de la replicación del ADN en la fase S (Gould et al., 1974, 1975; Chu et al., 1976). Si la población de células es homógenea (células con el mismo número de cromosomas), es posible distinguir las fases G_1 y G_2, y calcular su duración relativa, empleando una coloración cuantitativa con Feulgen del ADN y de los núcleos individuales. Combinando la coloración con Feulgen y la marcación con ^{3}HTdR se pueden medir las fases G_1, G_2 y S en la misma preparación y se pueden determinar diferentes etapas de la fase S (Gould et al., 1974; Mak, 1965; Navarrette et al., 1978).

Mediante la utilización de esta técnica, Gould et al. (1975) encontraron que en diferentes líneas asincrónicas de *Acer pseudoplatanus* el tiempo de duplicación celular es de 22 a 63 horas, y que las fases tenían las siguientes duraciones:

$S = 7.0 \pm 0.2$ h
$G_2 = 8.7 \pm 0.6$ h
Mitosis $= 2.9 \pm 0.3$ h

G_1 varió entre 4 y 40 h, de acuerdo con el tiempo de duplicación celular.

En una suspensión celular no sincrónica, el análisis cinético se puede llevar a cabo mediante la marcación de una fracción de la población celular, y el ulterior seguimiento de las células marcadas.

Marcación con ^{3}HTdR (^{3}H-timidina). Luego de un breve pulso de ^{3}HTdR y de determinar la proporción de las figuras mitóticas marcadas, se pueden determinar las fases G_2, M y S, como también la duración del ciclo celular (Chu et al., 1976; Gould et al., 1974).

El ciclo total también se puede medir mediante la marcación continua; las células se exponen a ^{3}HTdR por períodos prolongados y, a partir de la acumulación de mitosis marcadas, se calcula la duración del ciclo. Gould et al. (1974) encontraron que este procedimiento permite medir la duración del ciclo celular en suspensiones celulares de *Acer pseudoplatanus*, siendo más eficiente que el método de marcación mediante pulsos.

Digitized by Google

Marcación con cafeína. La cafeína inhibe la citocinesis y produce células binucleadas (Giménez-Martín et al., 1965). La cinética de la aparición de bi-metafases en poblaciones celulares tratadas con cafeína se puede usar para determinar la duración del ciclo celular (Eriksson, 1966; Giménez-Martín et al., 1965; González-Fernández et al., 1966).

Teoría del punto principal de control. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con el ciclo celular de diferentes suspensiones celulares, es posible aplicar a estos sistemas el modelo propuesto por Smith et al. (1973), modelo que divide el período intermitótico en dos partes o etapas.

La etapa B se encuentra bajo control y consta de las fases S, G_2, M y una porción de G_1; una vez iniciada esta etapa, una secuencia regular de eventos lleva la célula a la división. Después de la mitosis, la célula entra en la etapa A, que no está programada. Los datos que muestran la naturaleza variable de la fase G_1 y la duración relativamente constante de S, G_2 y M apoyan este modelo (Gould et al., 1974; 1975).

Los experimentos que utilizan la limitación o la privación de nutrimentos ayudan a la determinación de las fases del ciclo celular sensibles a ella. Así, la privación de nitratos en suspensiones de *Acer pseudoplatanus* hace que las células se concentren casi exclusivamente en la fase G_1, mientras que la privación de sacarosa y fosfato conduce a una concentración en G_1 (80%) y en G_2 (20%). Las células son más sensibles a la privación de sacarosa que de nitrato o fosfato (Gould et al., 1975; 1981); Komamine et al. (1978) encontraron que la privación de fósforo hace que las células de *Vinca rosea* se acumulen preferiblemente en G_2.

Las observaciones anteriores sobre las suspensiones celulares apoyan la hipótesis de Van't Hof et al. (1972) acerca del punto principal de control (PPC). Estos investigadores describieron en los meristemas de puntas de raíz dos PPC, uno en G_1 y otro en G_2, sugiriendo que estos puntos determinan la detención o 'puesta en marcha' del ciclo celular. Además de ser sensibles a la privación de carbohidratos, estos puntos de control son sensibles a las radiaciones ionizantes, a la anaerobiosis, a la inhibición de la síntesis de proteínas, y al desacoplamiento de la fosforilación oxidativa (Van't Hof et al., 1972).

Se ha sugerido que el estado de fosforilación de los ribosomas puede tener un papel central en el mecanismo de control de la actividad del ciclo celular. La fosforilación de ciertas proteínas ribosómicas es baja o nula en las células 'en descanso', pero es alta antes del aumento de la síntesis de proteínas y de la 'reentrada' de las células en el ciclo celular activo (Scharf et al., 1982).

Digitized by Google

En suspensiones celulares con muy baja densidad, como también en el plaqueo en medios semisólidos y en cultivos de protoplastos, se ha probado la existencia de factores que promueven la división celular (Street et al., 1977; Szabados et al., 1980; 1981).

Fitohormonas en la regulación del ciclo celular. Las fitohormonas son necesarias para la inducción de divisiones celulares y para mantener una adecuada actividad metabólica de las células. Las suspensiones celulares generalmente requieren del suministro exógeno de auxinas para su crecimiento; los reguladores más usados son 2,4-D, ANA y AIA.

La absorción y el metabolismo de 2,4-D y AIA en suspensiones celulares se ha estudiado detalladamente. En algunos casos, la división celular está controlada por una fuente intracelular de auxinas (que incluye AIA) y por auxinas sintéticas exógenas como el 2,4-D (Nishi et al., 1977; Leguay et al., 1975, 1977; Moloney et al., 1983). Nishi et al. (1977) sugirieron que en las suspensiones que requieren auxinas exógenas, éstas se necesitan para la transición entre las fases G_1 y S. En contraste con estos resultados, se ha propuesto que las auxinas no regulan la división celular en las suspensiones, debido a su interacción con puntos específicos de control del ciclo nuclear (Everett et al., 1981; Jouanneau, 1971).

Las citocininas (p. ej., KIN o BAP) se requieren ocasionalmente para promover divisiones en células cultivadas en suspensión. Se ha sugerido que las citocininas regulan la síntesis de proteínas en la fase G_0 o en la transición de las fases G_2 y M (Everett et al., 1978; Fosket, 1977); sin embargo, Wang et al. (1981) encontraron rápidas oscilaciones en los índices mitóticos después de la adición de tales sustancias a suspensiones celulares privadas de ellas, y supusieron que esto era causado por pequeñas subpoblaciones de la suspensión celular, bloqueadas previamente en numerosos puntos del ciclo celular. En general, no ha sido posible probar claramente la acción de las citocininas en algún punto principal de control de la regulación del ciclo celular (Van't Hof et al., 1972; Wang et al., 1981; Jouanneau, 1971).

Estudios fisiológicos y bioquímicos

Las suspensiones celulares, cultivadas en medios sintéticos completamente definidos y bajo condiciones ambientales controladas, representan un interesante sistema para las investigaciones fisiológicas y bioquímicas. Otras ventajas son su bajo grado de diferenciación celular y la falta de las estructuras altamente organizadas que se presentan en los tejidos y órganos.

Digitized by Google

Absorción de nutrimentos. Las plantas son organismos autótrofos, con un sistema radical altamente especializado para la absorción de nutrimentos; las suspensiones celulares, en cambio, son generalmente sistemas heterótrofos, donde el crecimiento y el metabolismo dependen de la disponibilidad de nutrimentos y reguladores en el medio de cultivo. Puesto que la disponibilidad de nutrimentos en el cultivo puede modificar la fisiología de las células, es importante conocer los mecanismos que regulan la absorción de los mismos. De otro lado, los intercambios de nutrimentos entre los compartimentos de la célula son alterados durante el ciclo de cultivo (Thom et al., 1981).

Las suspensiones celulares se han empleado extensivamente durante la última década para estudiar el trasporte de moléculas orgánicas e inorgánicas. Especialmente se ha estudiado el trasporte de iones (Halbrock, 1974; Thom et al., 1981; Furner et al., 1982), azúcares (de Klerk-Kiebert et al., 1983; Komor et al., 1981; Maretzky et al., 1972), y aminoácidos (Harrington et al., 1981a, 1981b; Berry et al., 1981; McDaniel et al., 1982). Maretzky et al. (1978) han revisado el trasporte en células cultivadas y han discutido las ventajas del uso de suspensiones celulares en los estudios de absorción.

Eventos metabólicos en las suspensiones celulares. Las suspensiones celulares son excelentes sistemas experimentales para estudiar el metabolismo de las plantas in vitro. Por ello se han utilizado en diversas investigaciones de eventos metabólicos asociados con el crecimiento y la división celular (Nash et al., 1972).

Zeleneva et al (1980) estudiaron las readaptaciones de los patrones enzimáticos en callos y en suspensiones celulares de maíz. En la mayoría de los casos, durante el establecimiento y el crecimiento de los callos los patrones enzimáticos fueron similares a los de la planta intacta, mientras que los de las suspensiones celulares diferían marcadamente. El medio líquido introduce un gran cambio ambiental, el cual se traduce muchas veces en una modificación de la actividad enzimática y de los patrones cuantitativos de la expresión de los genes.

En numerosos experimentos se han utilizado suspensiones celulares para estudios relacionados con las fosfatasas (Zink et al., 1982), las nucleasas (Schaefer et al., 1981) y las enzimas involucradas en la oxidación de carbohidratos (Stafford et al., 1983; Zeleneva et al., 1980). También se han usado para estudios relacionados con la asimilación de nitratos (Stafford et al., 1983; Jones et al., 1976), la reducción de sulfatos (Urlaub et al., 1982) y el metabolismo de los lípidos (Gaver et al., 1983), los aminoácidos (Fletcher et al., 1971; Moloney et al., 1982) y las sustancias reguladoras del

Digitized by Google

crecimiento (Moloney et al., 1982, 1983); igualmente se han utilizado para trabajos con las poliaminas (Smith et al., 1978), los nucleótidos (Slabas et al., 1980) y la respiración (Horn et al., 1982).

Se han efectuado estudios relacionados con la replicación del ADN y con la expresión de los genes en sistemas que hacen uso de bacterias o virus, debido a la flexibilidad genética y fisiológica de estos sistemas y a la estructura simple de su material genético. Muchos de estos estudios en eucariontes se han llevado a cabo con levaduras; sin embargo, las suspensiones celulares de plantas superiores son potencialmente adecuadas para este tipo de experimentación, dado que pueden crecer a diferentes temperaturas y en medios simples bien definidos, y pueden ser fácilmente trasferidas de una condición a otra (King, 1980; Street, 1977; Chu et al., 1976).

En los últimos años ha aumentado la utilización de las suspensiones celulares en los estudios sobre la replicación de ADN (Slabas et al., 1980; Cress et al., 1978), la síntesis de ARN (Jackson et al., 1982) y la síntesis de proteínas (Bevan et al., 1981). Scharf et al. (1982) informaron que en suspensiones celulares de tomate, los tratamientos de calor inducen alteraciones en la expresión de los genes y en la fosforilación de las proteínas.

Diversos autores han hecho énfasis en la importancia de los sistemas sincronizados para los estudios relacionados con el crecimiento y diferenciación en células y tejidos de plantas. Así, Komamine et al. (1978) examinaron, en el ciclo celular de células sincronizadas de *Vinca rosea* cultivadas en suspensión, los cambios que se presentaban en el ritmo de respiración, la síntesis de ADN, ARN y proteínas, y la actividad de las enzimas del metabolismo de las pentosas-fosfato y de las purinas. Por otra parte, King et al. (1974) estudiaron la síntesis de ADN, la respiración y la actividad de diferentes enzimas de células de *Acer pseudoplatanus* sincronizadas y cultivadas en suspensión. Cress et al. (1978) utilizaron suspensiones celulares en la fase exponencial y suspensiones sincronizadas con FUdR para estudiar el mecanismo de replicación del ADN en soya.

Formación de metabolitos secundarios

Si bien la mayoría de las plantas superiores sintetizan diferentes metabolitos secundarios, sus células cultivadas en suspensión suelen comportarse de manera diferente y frecuentemente no producen estos metabolitos secundarios; esto podría deberse a cambios en la expresión de los genes (Bohm, 1982). Sin embargo, debido al interés económico en explotar las técnicas del cultivo de tejidos para la producción y bioconservación de

Digitized by Google

sustancias (véase Capítulo 9), en los últimos años se han realizado numerosas investigaciones que se traducen en un aumento sustancial de la capacidad biosintética de las suspensiones celulares.

Los resultados experimentales muestran que la máxima acumulación de productos secundarios ocurre cuando el ritmo de crecimiento de los cultivos celulares decrece y cuando éstos exhiben alguna diferenciación estructural (Yeoman et al., 1982; Hagimori et al., 1982a; Franke et al., 1982).

Lindsey et al. (1983a) investigaron detalladamente las relaciones entre el contenido de alcaloides, el ritmo de crecimiento y el grado de diferenciación de suspensiones celulares de varias especies de solanáceas. Sus estudios mostraron que la máxima acumulación de compuestos secundarios tenía lugar en la fase estacionaria de los cultivos, en la que éstos mostraban agregación y eran de color verde; por el contrario, los cultivos en la fase exponencial del crecimiento, con poca agregación celular, eran los más improductivos. El verdeamiento de los cultivos se ha asociado muchas veces con una producción de alcaloides, pero no es aquél un requerimiento absoluto.

Hagimori et al. (1982a, 1983) obtuvieron resultados similares; usando suspensiones celulares de *Digitalis purpurea* encontraron que la máxima acumulación de digitoxina se producía en los cultivos iluminados, verdes, con principios de regeneración de vástagos. Asimismo, Franke et al. (1982) informaron acerca de la diferenciación de células especializadas en la acumulación de alcaloides, que se hallaban en los agregados celulares más grandes de suspensiones celulares de *Macleaya*.

El ritmo de crecimiento de los cultivos parece ser un importante factor en la formación de productos secundarios. El metabolismo primario está asociado con el crecimiento rápido, mientras que el secundario está ligado con el crecimiento lento y con cierta organización de los cultivos (Lindsey et al., 1983a; Davies, 1972).

Hasta la mitad de la década del 70 había relativamente pocos estudios sobre la capacidad biosintética de las suspensiones celulares; posteriormente, se han obtenido varias líneas altamente productoras de metabolitos secundarios, por medio de la repetida selección y clonación celular a partir de tales suspensiones. La producción de 10% a 15% de alcaloides en varias líneas indica la enorme capacidad biosintética de los cultivos in vitro de células vegetales (Bohm, 1980; Constabel et al., 1982; Kutney et al., 1980; Ogino et al., 1978; Watanabe et al., 1983).

Digitized by Google

En determinadas circunstancias, la producción de metabolitos secundarios, particularmente de uso farmacéutico, que se observa en células cultivadas in vitro es una alternativa promisoria para la producción de los mismos en las plantas (véase Capítulo 9). Generalmente, el espectro de los metabolitos secundarios producidos por las suspensiones celulares es comparable con el producido por las plantas, aunque frecuentemente la proporción cuantitativa es diferente; es decir, en algunos casos las suspensiones celulares producen cantidades relativamente mayores de un compuesto y menores de otro.

Ocasionalmente se puede detectar, en las suspensiones celulares, la síntesis de compuestos desconocidos en la planta; sin embargo, lo que ocurre con mayor frecuencia en esas suspensiones es la pérdida de la capacidad para sintetizar algún compuesto que se halla presente en la planta (Bohm, 1980; Constabel et al., 1982). La variedad de las suspensiones celulares puede modificar el espectro de los metabolitos secundarios producidos; la variación no necesariamente es de naturaleza genética.

Los factores que afectan el ritmo de crecimiento y la organización de las células cultivadas influyen también en el contenido de metabolitos secundarios, y un medio de cultivo adecuado para el crecimiento no siempre es adecuado para la producción de determinados compuestos. Entre otros factores se deben tener en cuenta la composición (mineral y orgánica) de los medios de cultivo y el pH (Zenk et al., 1977; Hagimori et al., 1982b; Bohm, 1980; Knobloch et al., 1981).

Un ejemplo de lo anterior es el caso del 2,4-D, cuyo contenido en el medio afecta la friabilidad de los agregados celulares; un aumento de 2,4-D lleva a una caída en la producción de alcaloides de diferentes suspensiones celulares, mientras que niveles relativamente bajos han tenido generalmente un efecto contrario (Tabata et al., 1976; Roustan et al., 1982; Hagimori et al., 1982a; Lindsey et al., 1983a). La adición de diferentes precursores al medio de cultivo y la utilización de inhibidores metabólicos pueden modificar la formación de productos secundarios (Bohm, 1980).

Factores ambientales como la luz, los niveles de oxígeno, y el dióxido de carbono también afectan la producción de metabolitos secundarios en las suspensiones celulares; la luz tiene mucha importancia en la síntesis de determinados compuestos (Bohm, 1980, Lindsey et al., 1983a).

Por lo general, las suspensiones celulares que crecen en los bioreactores son más productivas. Los bioreactores se basan en los principios del sistema de cultivo continuo y abierto; en ellos las suspensiones se pueden controlar con relativa facilidad y las condiciones ambientales se pueden

Digitized by Google

manipular. Como la biosíntesis de metabolitos secundarios ocurre principalmente durante la fase estacionaria, los bioreactores deben ser adecuados para contener grandes cantidades de suspensiones celulares en esta fase.

En los últimos años, la inmobilización de células vegetales ha recibido mucha atención, ya sea para la producción o para la biotrasformación de productos vegetales. En este sistema las células se inmobilizan por medio de materias inertes y se cultivan en un medio líquido; el método de 'atrapar' las células, por ejemplo en alginatos, se usa ampliamente (Morris et al., 1981; 1983). En los cultivos de células 'atrapadas', la producción de metabolitos secundarios puede aumentar con respecto al cultivo de las clásicas suspensiones celulares (Lindsey et al., 1983b y 1983c; Brodelius et al., 1979).

Aislamiento de mutantes

Las suspensiones celulares constituyen sistemas adecuados para el aislamiento y la selección de mutantes. Con métodos similares a los utilizados en microbiología se puede tratar, manipular, plaquear y seleccionar un gran número de células.

Una gran diferencia entre la suspensión celular y el cultivo de bacterias radica en el hecho de que la suspensión presenta agregación celular, mientras que en los cultivos de bacterias cada célula está libre en el medio. La presencia de los agregados en las suspensiones celulares modifica la distribución de los mutantes esperados, pero no descarta la posibilidad de aplicar los criterios de la genética microbiana en los experimentos de aislamiento de mutantes (Murphy, 1982).

Los cultivos de células en suspensión, por sí solos, generan variabilidad genética (Meins, 1983; véase también el Capítulo 13); sin embargo, es posible inducir una variabilidad adicional exponiendo las células, generalmente en la fase de retraso o en la exponencial, a agentes mutagénicos. Los agentes mutagénicos pueden ser de naturaleza física como la luz UV, los rayos γ y los rayos X, o de naturaleza química como el sulfonato de etilmetano (EMS) o el N-etil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NG). Después del tratamiento, las células se cultivan en medios frescos para permitir su recuperación, y luego se plaquean en medios selectivos.

La selección se puede llevar a cabo con inhibición metabólica usando análogos de aminoácidos, herbicidas, toxinas de agentes fitopatógenos, o alta concentración de sales. Las colonias que crecen bajo la presión selectiva se pueden separar y caracterizar.

Digitized by Google

La utilidad de las suspensiones celulares para el aislamiento de mutantes se ha demostrado en varios experimentos exitosos que brindaron mutantes estables. Sung (1976a) aisló líneas celulares mutantes de zanahoria resistentes al 5-fluorouracil y a la cicloheximida, inhibidora ésta de la síntesis de proteínas. Reish et al. (1981) aislaron líneas de alfalfa resistentes a la etionina luego de un tratamiento con EMS.

Varias de las líneas resistentes a los análogos de aminoácidos contienen mayores cantidades de metionina y cisteína. Shimamoto et al. (1981) seleccionaron, luego de tratamientos mutagénicos, líneas celulares de maíz resistentes a la aminopterina. Erdei et al. (1982) han aislado diferentes tipos de mutantes; por ejemplo, aislaron una línea celular estable de trigo resistente al DMSO que tiene alterada la composición lipídica de la membrana celular.

Murphy et al. (1981), trabajando con suspensiones celulares de *Rosa damascena*, aislaron líneas resistentes a los cloratos; en algunas de estas líneas, la actividad de la nitratoreductasa es nula, por lo que no pueden crecer en medios que contengan únicamente nitratos. De suspensiones celulares formadas por células predominantemente haploides se pueden aislar mutantes auxotróficos. Aunque la mayoría de estos mutantes se ha producido con propósitos genéticos o bioquímicos, algunas de sus características importantes se han expresado también a nivel de la suspensión celular, como en el caso de la tolerancia a sales (Warren et al., 1982). Asimismo, Ojima et al. (1983) aislaron líneas celulares tolerantes al aluminio y al manganeso. Por otra parte, las líneas resistentes a los análogos de los aminoácidos producen mayores cantidades del correspondiente aminoácido natural que las líneas celulares normales (Reish et al., 1981).

Las tolerancias a metales pesados, toxinas de fitopatógenos, herbicidas, o condiciones extremas del pH del suelo constituyen temas que se pueden estudiar mediante la utilización de suspensiones celulares (Chaleff, 1983). En la Figura 8.7 se observa, como ejemplo, el efecto del extracto de *Colletotrichum gloeosporioides* sobre el cultivo de células en suspensión de *Stylosanthes guianensis*.

Embriogénesis somática

Las suspensiones celulares constituyen sistemas de gran utilidad para el estudio de los procesos de diferenciación y desarrollo de los embriones resultantes de la embriogénesis somática (véanse Capítulos 5, 7, y 13).

Digitized by Google

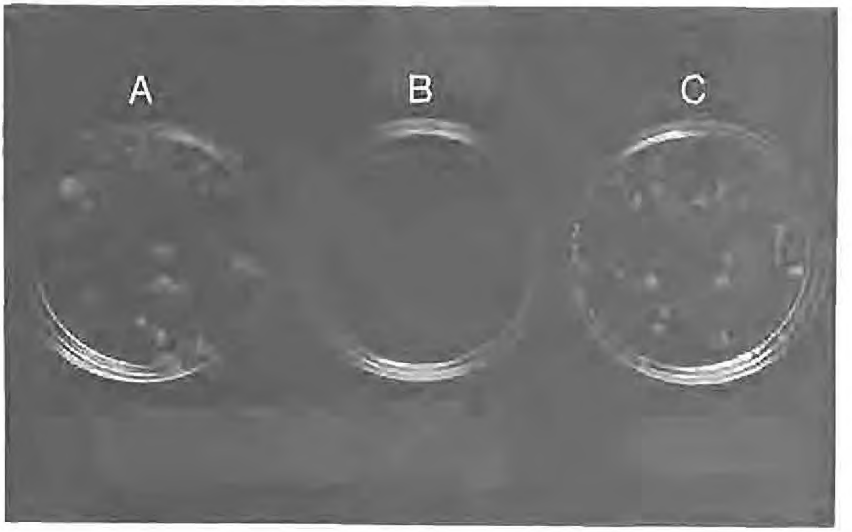


Figura 8.7 Plaqueo de suspensiones celulares de *Stylosanthes guianensis* en MS + ANA (0.5 mg·l) + BAP (0.5 mg) A) testigo; B) con extracto de *Colletotrichum gloeosporioides*; C) en el medio de Czapek (medio de crecimiento del hongo).

El crecimiento de las suspensiones celulares de zanahoria (*Daucus carota* L.) no es organizado cuando se usan medios que contienen 2,4-D; pero cuando las soluciones se cultivan en el mismo medio desprovisto de la auxina, hay desarrollo de embriones (McWilliam et al., 1974). El potencial embriogenénico varía de cultivo a cultivo y declina con la edad de las suspensiones.

Se han descrito algunos sistemas, especialmente de zanahoria, en que la diferenciación de embriones se lleva a cabo de manera altamente sincronizada (más del 80%) a partir de pequeños agregados celulares. Estos sistemas son muy útiles para la realización de estudios bioquímicos relacionados con la embriogénesis somática (Jones, 1974; Fujimura et al., 1981). Se ha publicado acerca de la síntesis de proteínas, de ADN y de ARN (Verma et al., 1978; Fujimura et al., 1980, 1981) y sobre los efectos tanto de diferentes reguladores del crecimiento (Jones, 1974; Sung et al., 1979) como del carbón activado (Drew, 1979).

El establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas ha sido difícil en especies de gramíneas (King et al., 1978). Sin embargo se han establecido cultivos de este tipo en algunas especies como *Pennisetum*

Digitized by Google

americanum (Vasil et al., 1980, 1982), *Panicum maximum* (Lu et al., 1981), caña de azúcar (Ho et al., 1983; Larkin, 1982) y maíz (Lu, 1982; Vasil, 1983; Vasil et al., 1984).

También se han descrito suspensiones embriogénicas para otras especies de plantas, entre ellas *Carica* spp. (Litz et al., 1983), tréboles (Gresshoff, 1980) y *Dioscorea* spp. (Ammirato, 1984).

Referencias

Ammirato, P. V. 1984. Induction, maintenance, and manipulation of development in embryogenic cell suspension cultures. En: Vasil, I. K. (ed.). Cell culture and somatic cell genetics of plants. Academic Press, Orlando, E.U. v. 1, p. 139-151.

Bayliss, M. W. 1980. Chromosomal variation in plant tissues in culture. En: Vasil, I. K. (ed.). Perspectives in plant cell and tissue culture. Int. Rev. Cytol. Supl. 11A:113-144.

——— y Gourld, A. R. 1974. Studies on the growth in culture of plant cells. 18: Nuclear citology of *Acer pseudoplatanus* suspension cultures. J. Exp. Bot. 25:772-983.

Berry, S. L.; Harrington, H. M.; Bernstein, R. L. y Henke, R. R. 1981. Amino acid transport into cultured tobacco cells; 3: Arginine transport. Planta 153: 511-518.

Bevan, M. y Northcote, D. H. 1981. Subculture-induced protein synthesis in tissue cultures of *Glycine max* and *Phaseolus vulgaris*. Planta 152:24-31.

Bohm, H. 1980. The formation of secondary metabolites in plant tissue and cell cultures. Int. Rev. Cytol. Suppl. 11B:183-208.

———. 1982. The inability of plant cell cultures to produce secondary substances. En: Plant tissue culture: Proceedings of the 5th International Congress of Plant Tissue & Cell Culture. p. 325-328.

Brodelius P.; Deus, B.; Mosbach, K. y Zenk, M. H. 1979. Immobilized plant cells for the production and transformation of natural products. FEBS Lett. 103:93-97.

Chaleff, R. S. 1983. Isolation of agronomically useful mutants from plant cell cultures. Science 219:676-682.

Cheong, L.; Rich, A. M. y Eidinoff, M. L. 1960. Mechanism of growth inhibition of H. Ep.l. cells by 5-fluorodeoxycitidine and 5-fluorodeoxyuridine. Cancer Res. 20:1602-1607.

Digitized by Google

Chu, Y. y Lark, K. G. 1976. Cell cicle parameters of soybean (*Glycine max*) cells growing in suspension culture: Suitability of the system for genetic studies. Planta 132:259-268.

Constabel, F.; Kurz, W. G. W.; Chatson, B. y Gamborg, O. L. 1974. Induction of partial synchrony in soybean cell cultures. Exp. Cell Res. 85:105-110.

———; ———; ——— y Kirkpatric, J. W. 1977. Partial synchrony in soybean cell suspension cultures induced by ethylene. Exp. Cell. Res. 105:263-268.

———; ——— y Kutney, J. P. 1982. Variation in cell cultures of periwinkle, *Catharanthus roseus*. En: Plant tissue culture: Proceedings of the 5th International Congress of Plant Tissue & Cell Culture. p. 301-304.

Cress, D. E.; Jackson, P. J.; Kadouri, A.; Chu, Y. E. y Lark, K. G. 1978. DNA replication in soybean protoplasts and suspension cultured cells: Comparison of exponential and fluorodeoxyuridine synchronized cultures. Planta 143:241-253.

Davies, M. E. 1972. Polyphenol synthesis in cell suspension cultures of Paul's Scarlet rose. Planta 104:50-65.

Drew, R. L. K. 1979. Effect of activated charcoal on embryogenesis and regeneration of plantlets from suspension cultures of carrot (*Daucus carota* L.). Ann. Bot. 44:387-389.

———. 1980. A cheap, simple apparatus for growing large batches of plant tissue in submerged liquid culture. Plant Sci. Lett. 17:227-236.

Dudits, D.; Lázár, G. y Bajszár, G. 1979. Reversible inhibition of somatic embryo differentiation by bromodeoxyuridine in cultured cells of *Daucus carota* L. Cell Differentiation 8:135-144.

Erdei, L.; Vigh, L. y Dudits, D. 1982. Isolation of wheat cell line with alterated membrane properties. Plant Physiol. 69:572-574.

Eriksson, T. 1966. Partial synchronization of cell divisions in suspension cultures of *Haplopappus gracilis*. Physiol. Plant. 19:900-910.

Evans, D. A. y Gamborg, O. L. 1982. Chromosome stability of cell suspension culture of *Nicotiana* spp. Plant Cell Reports 1:104-107.

Evans, H. J.; Neary, G. J. y Tonkinson, S. M. 1957. The use of colchicine as an indicator of mitotic rate in broad bean root meristems. J. Genetics 55:487-502.

Everett, N. P.; Wang, T. L.; Gould, A. R. y Street, H. E. 1981. Studies on the control of the cell cycle in culture plant cells; 2: Effects of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). Protoplasma 106:15-22.

Digitized by Google

———; ——— y Street, H. E. 1978. Hormone regulation of cell growth and development in vitro. En: Thorpe, T. A. Frontiers of plant tissue culture. International Association for Plant Tissue Culture, Calgary, Canadá. p. 307-316.

Fletcher, J. S. y Beevers, H. 1971. Influence of cycloheximide on the synthesis and utilization of amino acids in suspension cultures. Plant Physiol. 48:261-264.

Fosket, D. E. 1977. Regulations of the plant cell cycle by cytokinin. En: Rost, T. L. y Gifford, E. M. (eds.). Mechanism and control of cell division. Dowden, Nueva York. p. 66-91.

Franke, J.; Bohm, H. 1982. Accumulation and secretion of alkaloids by *Macleaya microcarpa* cell cultures; 2: Experiments in liquid medium. Biochem. Physiol. Pflanzen. 177:501-507.

Fujimura, T.; Komamine, A. y Matsumoto, H. 1980. Aspects of DNA, RNA and protein synthesis during somatic embryogenesis in a carrot cell suspension culture. Physiol. Plant. 49:255-260.

———; ——— y ———. 1981. Changes in chromosomal proteins during early stages of synchronized embryogenesis in a carrot cell suspension culture. Z. Pflanzenphysiol. 102:293-298.

——— y ———. 1984. Fractionation of cultured cells. En: Vasil, I. K. (ed). Cell culture and somatic cell genetics of plants. v. 1, p. 159-166.

Furner, I. J. y Sung, Z. R. 1982. Regulation of sulfate uptake in carrot cells: Properties of a hypercontrolled variant. Proc. Natl. Acad. Sci. (E.U.) 79:1149-1153.

Gamborg, O. L.; Miller, R. A. y Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research. 50:151-158.

Gaver, M.; Sansonetti, A. y Mazliak, P. 1983. Lipid composition of tobacco cells cultivated at various temperatures. Phytochemistry 22:855-859.

Giménez-Martín, G.; González-Fernández, A. y López-Sáenz, J. F. 1965. A new method of labelling cells. J. Cell Biol. 26:305-309.

———; de la Torre, C. y López-Sáenz, J. F. 1977. Cell division in higher plants. En: Rost, T. L. y Gifford, E. M. (eds.). Mechanism and control of cell division. Dowden, Hutchinson and Ross, Stroudsburg, Pensylvania, E.U. p. 261-307.

González-Fernández, A.; López-Sáenz, J. F. y Giménez-Martín, G. 1966. Duration of division cycle in binucleate and mononucleate cell . Expl. Cell. Res. 43:255-267.

Gould, A. R.; Bayliss, M. W. y Street, H. E. 1974. Studies on the growth in culture of plant cells; 17: Analysis of the cell cycle of asynchronously dividing *Acer pseudoplatanus* L. cells in suspension culture. J. Exp. Bot. 25:468-478.

Digitized by Google

———; Everett, N. P.; Wang, T. L. y Street, H. E. 1981. Studies on the control of the cell cycle in cultured plant cells; 1: Effects of nutrient limitation and nutrient starvation. Protoplasma 106:1-13.

——— y Street, H. E. 1975. Kinetic aspects of synchrony in suspension cultures of *Acer pseudoplatanus* L. J. Cell Sci. 17:337-348.

Gresshoff, P. M. 1980. In vitro culture of white clover: Callus, suspension, protoplast culture, and plant regeneration. Bot. Gaz. 141:157-164.

Grobner, P. y Loidl, P. 1982. Action of 5-flourodeoxyuridine on synchronous nuclear division and thymidylate synthetase activity of *Physarum polycephalum*. FEBS Letters 140:41-44.

Hadlaczky, Gy; Bisztray, Gy; Praznovszky, T. y Dudits, D. 1983. Mass isolation of plant chromosomes and nuclei. Planta 157:278-285.

Hagimori, M.; Matsumoto, T. y Obi, Y. 1982a. Studies on the production of *Digitalis cardenolides* by plant tissue culture; 2: Effect of light and plant growth substances on digitoxin formation by undifferentiated cells and shoot forming cultures of *Digitalis purpurea* L. grown in liquid media. Plant Physiol. 69:653-656.

———; ——— y ———. 1982b. Studies on the production *Digitalis cardenolides* by plant tissue culture; 3: Effects of nutrients on digitoxin formation by shoot-forming cultures of *Digitalis purpurea* L. grown in liquid media. Plant and Cell Physiol. 23:1205-1211.

———; ——— y ———. 1983. Effects of mineral salts, initial pH and precursors on digitoxin formation by shoot-forming cultures of *Digitalis purpurea* L. grown in liquid media. Agric. Biol. Chem. 47:565-571.

Halbrock, K. 1974. Correlation between nitrate uptake, growth and changes in metabolic activities of cultured plant cells. En: Street, H. E. (ed.). Tissue culture and plant science. Academic Press, Londres. p. 363-378.

Harrington, H, M. y Henke, R. R. 1981a. Amino acid transport into cultured tobacco cells; 1: Lysine transport. Plant Physiol. 67:373-378.

———; Berry, S. L. y Jenke, R. R. 1981b. Amino acid transport into cultured tobacco cells; 2: Effect of calcium. Plant Physiol. 67:379-384.

Hauptmann, R. M. y Witholm, J. M. 1982. Cryostorage of cloned amino acid resistant carrot and tobacco suspension cultures. Plant Physiol. 70:30-34.

Ho, W. y Vasil, I. K. 1983. Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.): Growth and plant regeneration from embryogenic cell suspension cultures. Ann. Bot. 51:719-726.

Hochhauser, S. J.; Stein, J. L. y Stein, G. S. 1981. Gene expression and cell cycle regulation. Internat. Review of Cytology 71:95-243.

Digitized by Google

Horn, M. E. y Mertz, D. 1982. Cyanid resistant respiration in suspension cultured cells of *Nicotiana glutinosa* L. Plant Physiol. 69:1439-1443.

Jackson, P. J. y Lack, K. G. 1982. Ribosomal RNA synthesis in soybean suspension cultures growing in different media. Plant Physiol. 69:234-239.

Jones, L. H. 1974. Factors influencing embryogenesis in carrot cultures (*Daucus carota* L.). Ann. Bot. 38:177-188.

Jones, R. W.; Abbot, A. J.; Hewitt, E. J.; James, D. M. y Best, G. R. 1976. Nitrate reductase activity and growth in Paul's Scarlet rose suspension cultures in relation to nitrogen source and molybdenum. Planta 133:27-34.

Jouanneau, J. P. 1971. Controlle par les cytokinines de la synchronization des mitoses dans les cellules de tabac. Exp. Cell. Res. 67:329-337.

Kartha, K. K. 1982. Cryopreservation of plant meristems and cells. En: Wetter, L. R. y Constabel, F. (eds.). Plant tissue culture methods. National Research Council of Canada. p. 25-33.

———; Leung, N. L.; Gaudet-La Prairie, P. y Constabel, F. 1982. Cryopreservation of periwinkle (*Catharanthus roseus*) cells cultured in vitro. Plant Cell Reports 1:135-138.

King, P. J. 1980. Cell proliferation and growth in suspension cultures. Int. Rev. Cytol. Suppl. 11A:25-53.

———. 1984. Induction and maintenance of cell suspension cultures. En: Vasil, I. K. (ed.). Cell culture and somatic cell genetics of plants. Academic Press, Orlando, E.U. v. 1, p. 130-138.

———; Cox, B. J.; Flower, M. W. y Street, H. E. 1974. Metabolic events in synchronized cell cultures of *Acer pseudoplatanus* L. Planta 117:109-122.

———; Mansfield, K. J. y Street, H. E. 1973. Control of growth and cell division in plant cell suspension cultures. Can. J. Bot. 51:1807-1823.

———; Potrykus, I. y Thomas, E. 1979. In vitro genetics of cereals: Problems and perspectives. Physiol. Veg. 16:381-399.

Klerk-Kiebert de, Y. M.; Kneppers, T. J. A.; Matthijs, H. C. P. y Verleur, J. D. 1983. Sugar uptake in soybean (*Glycine max*) cells in suspension culture. Physiol. Plant. 57:217-221.

Knobloch, K. H.; Beutnagel, G. y Berlin, J. 1981. Influence of accumulated phosphate on culture growth and formation of cinnamoyl putrescines in medium induced cell suspension cultures of *Nicotiana tabacum*. Planta 153:582-585.

Komamine, A.; Morigaki, T. M. y Fujimura, T. 1982. Metabolism in synchronous growth and differentiation in plant tissue and cell cultures. En: Thorpe, T. A. (ed.). Frontiers of plant tissue culture 1978. Calgary, Canadá. p. 159-168.

Digitized by Google

Komor, E.; Thom, M. y Maretzky, A. 1981. The mechanism of sugar uptake by sugarcane suspension cells. Planta 153:181-192.

Kurz, W. G. W. 1982. A bioreactor system for the continuous culture of plant cells. En: Wetter, L. R. y Constabel, F. (eds.). Plant tissue culture methods. P. R. L. National Research Council, Saskatoon, Canadá. p. 117-121.

Kutney, J. P.; Choi, L. S. L.; Kólodziejczyk, P.; Sleigh, S. K.; Stuart, K. L.; Worth, B. R.; Kurz, W. G. W.; Chatson, K. B. y Constabel, F. 1980. Alkaloid production in *Catharanthus roseus* cell cultures; 3: Catharanthine and other alkaloids from the 200 GW cell line. Heterocycles 14:765-768.

Larkin, P. J. 1982. Sugarcane tissue and protoplast culture. Plant Cell Tissue and Organ Culture 1:149-164.

Leguay, J.-J. y Guern, J. 1975. Quantitative effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on growth of suspension-cultured *Acer pseudoplatanus* cells. Plant Physiol. 56:356-359.

——— y ———. 1977. Quantitative effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on growth of suspension-cultured *Acer pseudoplatanus* cells; 2: Influence of 2,4-D metabolism and intracellular pH on the control of cell division by intracellular 2,4-D concentration. Plant Physiol. 60:265-270.

Lindsey, K. y Yeoman, M. M. 1983a. The relationship between growth rate, differentiation and alkaloid accumulation in cell cultures. J. Exp. Bot. 34:1055-1065.

——— y ———. 1983b. Novel experimental systems for studying the production secondary metabolites by plant tissue cultures. En: Mantel, S. H. y Smith, H. (eds.). Plant biotechnology. Cambridge University Press, Cambridge. p. 39-66.

———; ———; Black, G. M. y Mavituna, F. 1983c. A novel method for the immobilization and culture of plant cells. FEBS Letters 155:143-149.

Litz, R. E. y Conover, R. A. 1983. High frecuency somatic embryogenesis from *Carica* suspension cultures. Ann. Bot. 51:683-686.

Lu, C. y Vasil, I. K. 1981. Somatic embryogenesis and plant regeneration from freely suspended cells and cell groups of *Panicum maximum* in vitro. Ann. Bot. 47:543-548.

——— y ———. 1982. Somatic embryogenesis in *Zea mays* L. Theor. Appl. Genet. 62:109-112.

Maddox, A. D.; Gonsalves, F. y Shields, R. 1982/83. Succesful preservation suspension cultures of three *Nicotiana* species at the temperature of liquid nitrogen. Plant Sci. Lett. 28:157-162.

Mak, S. 1965. Mammalian cell cycle analysis using microspectrophotometry combined with autoradiography. Exp. Cell Res. 39:286-308.

Digitized by Google

Malmberg, R. L. y Griesbach, R. J. 1980. The isolation of mitotic and meiotic chromosomes from plant protoplasts. Plant Sci. Lett. 17:141-147.

Maretzky, A. y Thom, M. 1972. The existence of two membrane transport systems for glucose in suspension of sugar cane cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 47:44-50.

——— y ———. 1978. Transports of organic and inorganic substances by plant cells in culture. En: Thorpe, T. A. (ed.). Frontiers of plant tissue culture. International Association for Plant Tissue Culture, Calgary, Canadá. p. 463-473.

McDaniel, C. N.; Holterman, R. K.; Bone, R. F. y Wozniak, P. M. 1982. Amino acid transport in suspension cultured plant cells; 3: Common carrier system for the uptake of L-arginine, L-aspartic acid, L-histidine, L-leucine and L-phenylalanine. Plant Physiol. 69:246-249.

McWilliam, A. A.; Smith, S. M. y Street, H. E. 1974. The origin and development of embryoids in suspension cultures of carrot. Ann. Bot. 38:243-250; 463-473.

Meadows, M. G. 1982/83. Characterization of cells and protoplasts of the B73 maize cell line. Plant Science Letters 28:337-348.

Meins, F. Jr. 1983. Heritable variation in plant cell culture. Ann. Rev. Plant Physiol. 34:327-346.

Moloney, M. M. y Elliot, M. C. 1982. Tryptophan and indole-3-acetic acid accumulation in *Acer* cell cultures and its relationship with cell autolysis. Planta 156:326-331.

———; Hall, J. F.; Robinson, G. M. y Elliot, M. C. 1983. Auxin requeriments of sycamore cells in suspension culture. Plant Phys. 71:927-931.

Morris, P. y Fowler, M. W. 1981. A new method for the production of fine plant cell suspension cultures. Plant Cell Tissue & Organ Culture 1:15-24.

———; Smart, N. J. y Fowler, M. W. 1983. Afluidised bed vessel for the culture of immobilized plant cells for the continuous production of fine cell suspension. Plant Cell Tissue & Organ Culture 2:207-216.

Murashige, T. y Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.

Murata, M. y Orton, T. J. 1983. Chromosome structural changes in cultured celery cells. In vitro 19:83-89.

Murphy, T. M. 1982. Analysis of distribution of mutants in clones and plant cell aggregates. Theor. Appl. Genet. 61:367-372.

——— e Imbrie, C. W. 1981. Iduction and characterization of chlorate-resistant strains of *Rosa damascena* cultured cells. Plant Physiol. 67:910-916.

Digitized by Google

Nash, D. T. y Davies, M. E. 1972. Some aspects of growth and metabolism of Paul's Scarlet rose cell suspensions. J. Exp. Bot. 23:75-91.

Navarrette, M. H.; de la Torre, C. y Schwartzman, J. B. 1978. Compartmentalizing the S period. Cell Biology Internal. Reports 2:607-613.

Nishi, A.; Kato, K.; Takahashi, M. y Yoshida, R. 1977. Partial synchronization of carrot cell culture by auxin deprivation. Physiol. Plant. 39:9-12.

Nover, L.; Kranz, E. y Scharf, K. D. 1982. Growth cycle of suspension cultures of *Lycopersicum esculentum* and *L. peruvianum*. Biochem. Physiol. Pflanzen 177:483-499.

Ogino, T.; Hiraoka, N. y Tabata, M. 1978. Selection of high nicotine producing cell lines of tobacco callus by single-cell cloning. Phytochemistry 17: 1907-1910.

Ojima, K. y Ohira, K. 1983. Characterization of aluminium and manganese tolerant cell lines selected from carrot cell cultures. Plant and Cell Physiol. 24:789-797.

Owens, T. y Poole, R. J. 1979. Regulation of cytoplasmic and vacuolar volumes by plant cells in suspension culture. Plant Physiol. 64:900-904.

Prensky, W. y Smith, H. H. 1965. The mechanism of 5-aminouracil-induced synchrony of cell division in *Vicia faba* root meristems. J. Cell. Biol. 24:401-414.

Reider, M. L.; Smith, B. A. y Fletcher, J. S. 1982. Protein content and subculturing properties of senescing plant suspension cultures. In vitro 18:1004-1008.

Reish, B.; Duke, S. H. y Bingham, E. T. 1981. Selection and characterizarion of ethionine-resistant alfalfa (*Medicago sativa*) cell lines. Theor. Appl. Genet. 59:89-94.

Rembur, J. 1973. Cycle cellulaire et teneurs en ADN de cellules en suspension de l'*Acer pseudoplatanus* en phase exponentielle de croissance: Hétérogénéité de la culture. Can. J. Bot. 52:1535-1543.

Rost, T. 1982. Regulation of cell division in pea root tips after wounding: A posible role for ethylene. Protoplasma 111:1-9.

Roustan, J. P.; Ambid, C. y Fallot, J. 1982. Influence de l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique sur l'accumulation de certains alcaloides indoliques dans les cellules quiescentes de *Catharanthus roseus* cultivées *in vitro*. Physiol. Vég. 20:523-532.

Schaefer, A.; Ohyama, K. y Gamborg, P. L. 1981. Detection by agarose gel electrophoresis of nucleases associated with cells and protoplasts from plant suspension cultures using *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. Agric. Biol. Chem. 45:1441-1445.

Digitized by Google

Scharf, K. D. y Nover, L. 1982. Heat-shock-induced alteration of ribosomal protein phosphorylation in plant cell cultures. Cell 30:427-437.

Scheuermann, W. y Klaffke-Lobsien, G. 1973. On the influence of 5-aminouracil on the cell cycle of root tip meristems. Exp. Cell Res. 76:428-436.

Shimamoto, K. y Nelson, O. E. 1981. Isolation and characterization of aminopterin-resistant cell lines in maize. Planta 153:436-442.

Slabas, A. R.; MacDonald, G. y Lloyd, C. W. 1980. Thymidine metabolism and the measurement of the rate of DNA synthesis in carrot suspension cultures. Plant Physiol. 65:1194-1198.

Smith, J. A. y Martin, L. 1973. The cell cycle. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 70:1263-1267.

Smith, T. A.; Best, G. R.; Abbot, A. J. y Clements, E. D. 1978. Polyamines in Paul's Scarlet rose suspension cultures. Planta 144:63-68.

Stafford, A. y Fowler, M. W. 1983. Effect of carbon and nitrogen growth limitations upon nutrient uptake and metabolism in batch cultures of *Catharanthus roseus* L. Plant Cell Tissue & Organ Culture 2:239-251.

Street, H. E. 1977. Cell (suspension) culture-techniques. En: Street, H. E. (ed.). Plant tissue and cell culture. University of California Press, Los Angeles, E.U. p. 61-102.

Sung, Z. R. 1976a. Mutagenesis of cultured plant cells. Genetics 84:51-57.

———. 1976b. Turbidimetric measurement of plant cell culture growth. Plant Physiol. 57:460-462.

———; Smith, R. y Horowitz, J. 1979. Quantitative studies of embryogenesis in normal and 5-methyltryptophan-resistant cell lines of wild carrot; the effects of growth regulators. Planta 147:236-240.

Szabados, L. y Gaggero, C. 1985. Callus formation from protoplasts of a sugarbeet cell suspension culture. Plant Cell Reports 4(4):195-198.

———; Hadlaczky, Gy. y Dudits, D. 1981. Uptake of isolated plant chromosomes by plant protoplasts. Planta 151:141-145.

Tabata, M. y Hiraoka, N. 1976. Variation of alkaloid production in *Nicotiana rustica* callus cultures. Physiologia Plantarum 38:19-23.

Thom, M.; Maretzky, A.; Komor, E. y Sakai, W. S. 1981. Nutrient uptake and accumulation by sugarcane cell cultures in relation to the growth cycle. Plant Cell Tissue & Organ Culture 1:3-14.

Timson, J. 1975. Hydroxyurea. Mutation Res. 32:115-132.

Digitized by Google

Torrey, J. G. y Reinert, J. 1961. Suspension cultures of higher plant cells in synthetic media. Plant Physiol. 36:483-491.

Urlaub, H. y Jankowski, G. 1982. Sulfate reduction in *Catharanthus roseus* L. Identification and subcellular localization of a particulate adenosine 5'-phosphosulfate-reducing activity in cells from cell suspension cultures. Planta 155:154-161.

Van't Hof, J. y Kovacs, C. J. 1972. Mitotic cycle regulation in the meristem of cultured roots: The principal control point hypothesis. Adv. Exp. Med. Biol. 18:15-30.

Vasil, I. K. 1983. Regeneration of plants from single cells of cereals and grasses. En: Lurquin, P. F. y Kleinhofs, A. (eds.). Genetic engineering in eukaryotes. Plenum Publishing Corporation. p. 233-252.

Vasil, V. y Vasil, I. K. 1980. Isolation and culture of cereal protoplasts; 2: Embryogenesis and plantlet formation from protoplasts of *Pennisetum americanum*. Theor. Appl. Genet. 56:97-99.

——— y ———. 1982. Characterization of an embryogenic cell suspension culture derived from cultured inflorescens of *Pennisetum americanum* (Pearl millet, *Gramineae*). Amer. J. Bot. 69:1441-1449.

——— y ———. 1984. Isolation and maintenance of embryogenic cell suspension cultures of *Gramineae*. En: Vasil, I. K. (ed.). Cell culture and somatic cell genetic of plants. Academic Press, Orlando, E.U. v. 1, p. 152-158.

Verma, D. C. y Dougall, D. K. 1978. DNA, RNA and protein content of tissue during growth and embryogenesis in wild-carrot suspension cultures. In vitro 14:183-191.

Verma, D. P. S. y Marcus, A. 1974. Activation of protein synthesis upon dilution of an *Arachis* cell culture from the stationary phase. Plant Physiol. 53:83-87.

Wang, T. L.; Everett, N. P.; Gould, A. R. y Street, H. E. 1981. Studies on the control of the cell cycle in cultured plant cells; 3: The effects of cytokinin. Protoplasma 106:23-35.

Warren, R. S. y Gould, A. R. 1982. Salt tolerance expressed as a cellular trait in suspension cultures developed from the halophytic grass *Distichlis specata*. Z. Pflanzephysiol. 107:347-356.

Watanabe, K. y Yamada, Y. 1983. Selection of variants with high levels of biotin from cultured green *Lavandula vera* cells irradiated with gamma rays. Plant and Cell Physiol. 23:1453-1456.

Werry, P. A. Th. J. y Stoffelsen, K. M. 1981. Radiation stimulated increase of plating efficiency of free plant cells. Theor. Appl. Genet. 59:391-393.

Digitized by Google

Wilson, S. B.; King, P. J. y Street, H. E. 1971. Studies on the growth in culture of plant cells; 7: A verastile system for the large scale bath or continuous culture of plant cell suspensions. J. Exp. Bot. 24:1172-1185.

Wilson, H. M. y Street, H. E. 1975. The growth anatomy and morphogenetic potential of callus and cell suspension cultures of *Hevea brassiliensis*. Ann. Bot. 39:671-682.

Withers, L. A. 1980. Preservation of germplasm. En: Vasil, I. K. (ed.). International Review of Cytology. Academic Press. Suppl. 11B:101-136.

——— y King P. J. 1979. Proline, a novel cryoprotectant for the freeze preservation of cultured cells of *Zea mays* L. Plant Physiol. 64:675-678.

Yeoman, M. M.; Lindsay, K.; Miedzybrodzka, M. B. y McLauchland, W. R. 1982. Accumulation of secondary products as a facet of differentiation in plant cell and tissue culture. En: Yeoman, M. M. y Truman, D. E. S. (eds.). Differentiation in vitro. British Society for Cell Biology Symposium. Cambridge University Press. v. 4, p. 65-82.

Zeleneva, I. V. y Khavkin, E. E. 1980. Rearrangements of enzyme patterns in maize callus and suspension cultures: Is it relevant to the changes in the growing cells of the intact plant? Planta 148:108-115.

Zenk, M. H.; El-Shagi, H.; Arens, H.; Stockigt, J.; Weiler, E. W. y Deus, B. 1977. Formation of indole alkaloids serpentine and ajmalicine in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. En: Barz, W.; Reinhard, E. y Zenk, M. H. (eds.). Plant tissue culture and its biotechnological application. Springer-Verlag, Berlín. p. 27-43.

Zink, M. W. y Veliky, I. A. 1982. Separation and some properties of two acid phosphatases from suspension cultures of *Ipomoea* sp. Plant Cell Tissue & Organ Culture 1:265-273.

Digitized by Google

Capítulo 9

Biosíntesis y bioconversión de metabolitos secundarios por células cultivadas in vitro

M. L. Robert*
J. Reyes**
V. M. Loyola***

Agradecimientos

Los autores agradecen a la señora Genny Gil por la mecanografía del manuscrito del presente capítulo. Reconocen además que las investigaciones efectuadas por ellos, y mencionadas aquí, han sido posibles gracias al apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México PCCBCNA-020845.

* Departamento de Genética y Fisiología, Centro de Investigación Científica de Yucatán, México.
** Departamento de Química Orgánica, Centro de Investigación Científica de Yucatán, México.
*** Centro de Investigación Científica de Yucatán, México.

Digitized by Google

Introducción

Los cultivos de células y tejidos vegetales in vitro constituyen actualmente una alternativa para producir sustancias de uso farmacéutico, agrícola o industrial, cuya producción comercial por los métodos convencionales —síntesis química o extracción de las plantas que los sintetizan— resulta difícil o económicamente poco viable.

Estos cultivos in vitro constituyen asimismo una promesa para aumentar el rendimiento de los principios activos presentes en las plantas, así como para controlar más adecuadamente su producción.

Los conocimientos que se adquieran acerca de los metabolitos secundarios y de su biosíntesis son necesarios, no sólo por el conocimiento en sí, sino para aprovechar mejor los componentes sintetizados por las plantas, especialmente las nativas. Conocer la regulación de una vía metabólica en particular dará mayores posibilidades de producir el compuesto deseado en mayor cantidad. En este caso, la bioquímica, el cultivo de células vegetales y la genética tendrán un papel muy importante.

La Fitoquímica y los Metabolitos Secundarios

La industria farmacéutica tuvo su origen en los pequeños laboratorios que se encontraban en la parte posterior de las boticas (las actuales farmacias) donde se preparaban las mezclas de 'yerbas' que serían usadas en algún té o infusión, o donde se extraían principios activos de las plantas cuando esto era posible. Surgieron así medicamentos tan importantes como el derivado de la *Cinchona ledgeriana*, conocido entre los indígenas de la Nueva España como la "yerba para las fiebres" y en Europa como los "polvos de la condesa". El principio activo, ahora usado y conocido como quinina, se sigue extrayendo de la misma *C. ledgeriana* y de *C. officinalis*.

Otra planta muy importante estudiada en la 'botica' fue la portadora del principio alcalino del opio, el cual es capaz de disminuir o quitar el dolor más fuerte. Se trata de un analgésico que hasta nuestros días no tiene igual, pero cuyos efectos secundarios son tan agudos que han limitado fuertemente su uso. Sin embargo, se sigue estudiando la morfina para obtener compuestos que puedan usarse como analgésico, sin producir adicción (opiáceos sintéticos).

Hasta principios del siglo XX, todos o casi todos los medicamentos usados provenían de las plantas. Vino después la época en que la síntesis

Digitized by Google

orgánica sustituyó a las plantas como fuente de los principios activos y se produjeron los llamados medicamentos de patente; aún no se lograba la síntesis de la quinina, la morfina y muchos otros compuestos, pero la fitoquímica pasó a ser una disciplina secundaria pues ya las plantas no constituían la única fuente de fármacos. Sólo muchos años después del aislamiento de la morfina y de la identificación de su estructura, Gates y Tschudi (1952; 1956) lograron su síntesis total, pero sin que ésta tuviera posibilidades comerciales. En 1944, Woodward logró la síntesis de la quinina, pero el método quedó también como una curiosidad de laboratorio.

Entre tanto, la fitoquímica siguió produciendo compuestos útiles; se aislaron los glucósidos de *Digitalis purpurea*, de los cuales se obtuvo el mejor cardiotónico que se conoce. En 1926, Cloetta logró el aislamiento de la digitoxina, y Windaus y Freese lograron su purificación en 1925; siguieron después la digitoxigenina (Cloetta, 1926; Stoll y Kreis, 1934) y la digitonina (Tschesche y Hagedorn, 1936; Marker et al., 1942).

La síntesis de los compuestos anteriores es un reto para los químicos, pues la lactona de cinco miembros conjugados, unida al carbono 17 con giro libre, y el grupo hidroxilo en posición beta del carbono 14 no facilitan esta síntesis. Por esta razón, todavía se sigue usando un extracto de *Digitalis*, a pesar de que otros medicamentos con estructuras químicas diferentes a los glucósidos mencionados son también útiles para mantener el ritmo cardíaco.

En 1940, Marker y colaboradores aislaron la diosgenina de *Dioscorea compositae*; se trata de una sapogenina esteroidal, la cual se convirtió en la base de la industria para la producción de las hormonas que se usan en el control de la natalidad o bien para sintetizar compuestos de la importancia de la cortisona; ésta se emplea en el tratamiento de la artritis. Pese al enorme desarrollo de la industria, no se ha logrado la síntesis comercial de estos compuestos; primero se debe extraer una genina, por ejemplo diosgenina, o alguna similar como la hecogenina (hasta hoy sin posibilidad comercial) para efectuar una degradación. Así se obtiene, del núcleo básico de estos compuestos, la 16-dihidro-pregnenolona, la cual se puede modificar químicamente para obtener los productos deseados, como corticoides y hormonas.

Otros compuestos de gran interés farmacológico y comercial son los alcaloides de *Catharantus roseus*, planta conocida en México como juanita, chula, vicaria, maravilla, etc., según la región. Se trata de la fuente natural de un gran número de compuestos, entre los cuales sobresalen la vincoleucoblastina y la vincristina por su actividad antitumoral (Noble et

Digitized by Google

al., 1958); una vez más, la síntesis química ha fallado en sustituir una planta que produce rendimientos muy bajos.

Extracción de principios activos de plantas: algunas limitaciones

En los ejemplos anteriores se observa que existen muchas dificultades para sintetizar principios activos, no sólo de uso farmacéutico, sino también de otro tipo como las piretrinas (insecticidas), y esto ha hecho que se vuelva la atención hacia las plantas como fuentes de productos naturales. Sin embargo, las plantas también presentan problemas para la obtención de los compuestos.

La quinina, que se extrae de la corteza de *Cinchona officinalis* y de *C. ledgeriana*, es un ejemplo al respecto; hay que esperar aproximadamente 21 años para que la planta llegue a la edad adecuada y se pueda explotar, y se hace necesaria una reforestación bien organizada para no perder la producción.

También hay ejemplos de sobreexplotación de recursos silvestres no domésticos, que trae como consecuencia una reducción en el rendimiento o la extinción de la especie. Tal es el caso de *Dioscorea compositae*, especie que no se ha cultivado sino que se ha explotado como planta silvestre; como resultado, el contenido de diosgenina de las plantas ha disminuido actualmente de 8% a 3% ó 3.5% y, además, el recurso es ahora escaso.

Catharantus roseus presenta problemas diferentes para el aislamiento de la vincristina y la vincoleucoblastina; estos compuestos se encuentran en cantidades pequeñas en la planta, lo que ha creado la necesidad de buscar variedades con mayores porcentajes de tales alcaloides; sin embargo, aun después de una búsqueda exhaustiva como la que realizaron Zenk et al. (1977), quienes analizaron 184 muestras provenientes de diferentes sitios geográficos, no se ha encontrado una planta con mayor rendimiento.

Otro caso es el de *Papaver somniferum*; pese a que el cultivo puede hallarse en muchos lugares del mundo, presenta dificultades especiales porque requiere un control muy estricto por parte de las autoridades, debido al tráfico ilegal de morfina. De esta planta se obtiene también la codeína, un derivado de la morfina, que es un antitusivo muy eficaz, además de analgésico.

El empleo del cultivo in vitro de células y tejidos vegetales ofrece actualmente una alternativa de solución a los problemas expuestos, con la

Digitized by Google

posibilidad de un mayor rendimiento en los principios activos de cada planta.

Conceptos básicos sobre los metabolitos secundarios

Se definen como metabolitos o productos secundarios aquellos compuestos que no tienen una función reconocida en el mantenimiento de los procesos fisiológicos fundamentales de los organismos que los sintetizan. Aunque estos compuestos se encuentran ampliamente distribuidos entre los microorganismos, los que se encuentran en las plantas superiores son los que han despertado mayor interés desde el punto de vista de su posible función biológica y su aplicación.

Puesto que las plantas no se desplazan de un lugar a otro, han desarrollado gran cantidad de estrategias para sobrevivir en su condición sedentaria, y en este sentido los metabolitos secundarios desempeñan las siguientes funciones importantes: protegerlas contra los depredadores, permitirles competir ventajosamente por el hábitat con otras plantas, atraer polinizadores y simbiontes y, tal vez, brindarles protección contra los diferentes tipos de estreses a los que se ven sometidas a lo largo de su vida (Loyola-Vargas, 1985).

Por otro lado, Bell (1981) sugiere que algunos metabolitos secundarios serían el producto final de un proceso biosintético aberrante y otros serían productos de excreción; propone además que tales productos se han mantenido a lo largo de la evolución debido a que los genes que codifican su síntesis se encuentran ligados a un gen esencial para la sobrevivencia de la planta.

Sin embargo, existen evidencias de que los metabolitos secundarios se encuentran bajo una estricta regulación metabólica (Reyes et al., 1985; Loyola-Vargas et al., 1984) y que su síntesis está regulada también por factores como la luz (Endress et al., 1984; Hagimori et al., 1982), los reguladores del crecimiento (Hagimori et al., 1982; Elliot, 1983) y la temperatura (Lipskii et al., 1982). Esto sugiere que los metabolitos pueden tener una función importante para la sobrevivencia de las plantas, y que la falta de información sobre las vías de su síntesis es lo que ha provocado la especulación.

En la actualidad se dispone de un esquema general sobre la biosíntesis de los metabolitos secundarios (Figura 9.1), pero se desconocen en gran medida los pasos intermedios y las estrategias que siguen las células para regularla. Se sabe, por ejemplo, que un estrés nutricional puede modificar la calidad y la cantidad de los alcaloides en *C. roseus* (Loyola-Vargas et al., 1984; Reyes et al., 1985) pero no se sabe cómo lo hace.

Digitized by Google

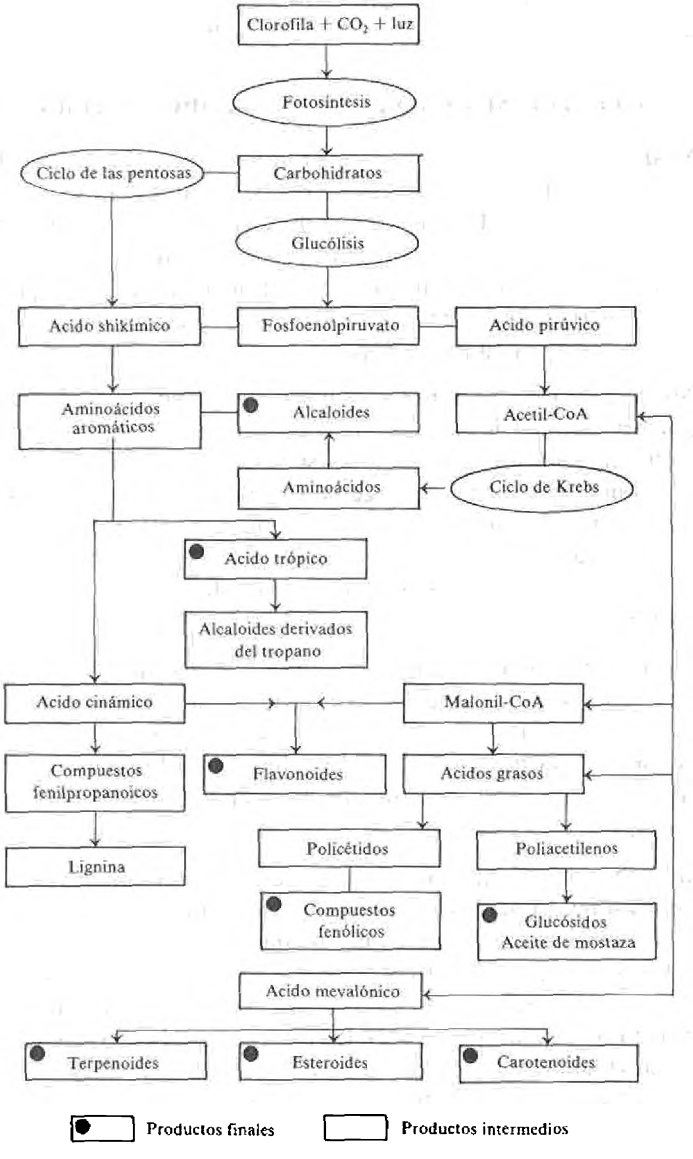


Figura 9.1. **Principales vías del metabolismo secundario en las células vegetales.** FUENTE: Loyola-Vargas, 1984.

Digitized by Google

Técnicas para la Producción de Metabolitos Secundarios

Para que el cultivo de células vegetales in vitro tenga aplicación en la producción industrial de metabolitos secundarios, se requiere que éstos se puedan obtener en grandes cantidades; no ocurre así en la mayoría de los cultivos celulares que producen esos compuestos en niveles inferiores a los obtenidos en las plantas de las cuales se derivan tales cultivos. No obstante, este panorama cambia rápidamente y, como se verá en los ejemplos que se presentan más adelante, la producción de algunos metabolitos específicos ha aumentado notablemente mediante diferentes métodos que se empezaron a utilizar recientemente. Las tres alternativas principales son:

- Seleccionar variantes genéticas sobreproductoras.
- Optimizar el medio de cultivo para la producción de biomasa y para la biosíntesis.
- Producir biomasa en gran escala.

Modificación genética y selección de líneas sobreproductoras

A diferencia de lo que ocurre con la biología de los microorganismos en cuanto a sus aplicaciones biotecnológicas, las células vegetales no han recibido todavía un beneficio de los métodos de modificación genética disponibles actualmente.

El desconocimiento de los factores que regulan el metabolismo secundario, e inclusive de las reacciones y enzimas involucradas en él, ha dificultado el desarrollo de métodos de selección para obtener líneas sobreproductoras de metabolitos específicos —inducidas por tratamientos mutagénicos— o simplemente para obtener productos de la variación somaclonal presente en las células vegetales.

Se pueden aplicar eventualmente en este caso las técnicas para trasferir genes, descritas en el Capítulo 33. Por ejemplo, existen enzimas que desvían los metabolitos primarios hacia las vías metabólicas secundarias y son, por lo tanto, factores importantes en la acumulación de los productos de tales vías; estas enzimas constituyen blancos específicos de los productores en la manipulación de la expresión de los genes. Recientemente, Berlin (1984) comunicó los resultados preliminares de experimentos sobre

Digitized by Google

modificación genética tendientes a aumentar el rendimiento de quinalizidina en cultivos de *Lupinus* sp.; este objetivo podría lograrse introduciendo genes para la expresión (constitutiva) de una lisina-decarboxilasa bacteriana.

Probablemente, una de las más grandes aplicaciones de la fusión somática es la obtención de líneas celulares sobreproductoras de metabolitos secundarios. La falta de rediferenciación no es un impedimento si tales líneas se van a cultivar en fermentadores, y lo único que se requiere son métodos de selección adecuados. Los resultados obtenidos con algunos híbridos somáticos de *Nicotiana tabacum* x *N. rustica*, que producen cuatro veces más alcaloides que *N. rustica* y 10 veces más que *N. tabacum* (Douglas et al., 1981), son muy sugestivos acerca del potencial que tiene la fusión somática en esta área de la biotecnología. Sería también factible pensar en líneas sobreproductoras normales pero con más rápido crecimiento u otras cualidades deseables.

A menudo, los cultivos in vitro que se seleccionan porque producen niveles de metabolitos suficientemente elevados y despiertan, por ello, el interés comercial, son inestables y no se pueden conservar sin una selección repetida; esto se debería a que las células sobreproductoras tendrían una velocidad de crecimiento menor que las demás, lo que conduce a su eliminación por dilución al hacer los subcultivos. La selección y clonación de las células sobreproductoras pueden dar como resultado líneas celulares sobreproductoras estables. Sin embargo, se tropieza con dos grandes dificultades: tener que seleccionar estas líneas entre una población de millones de células, y clonarlas cultivándolas a baja densidad; esto ha sido siempre difícil, si no imposible en algunas especies.

Chaprin et al. (1984) sugirieron una solución para el primer problema; midieron, por microespectrofotometría, la concentración intracelular de ácido rosmarínico en células de *Coleus blumei* cultivadas en suspensión, cuya absorbancia a 330 nm se debe exclusivamente a este ácido. No se ha demostrado, sin embargo, que cultivos derivados de células seleccionadas por este método sean sobreproductoras o estables.

Un método más eficiente de selección es el descrito por Brown et al. (1984), quienes separaron por fluorocitometría protaplastos de *Catharantus roseus* con alto contenido de alcaloides, valiéndose de la fluorescencia azul causada por el contenido de serpentina. Este método permite separar, cada segundo, 1000 células con una viabilidad elevada; de 30% a 50% de estas células generan plantas (Galbraith et al., 1984), lo que representa la ventaja de no requerir el cultivo de células aisladas.

Digitized by Google

Otras técnicas, como la separación por punto isoeléctrico, la cual se ha aplicado recientemente en la selección de productos de fusión de protoplastos, serían también de gran utilidad en la separación de células que acumulan algún compuesto (Griffin et al., 1985).

El preacondicionamiento al medio de cultivo es una alternativa que puede tener una aplicación generalizada en el plaqueo a baja densidad; consiste en cultivar las células a altas densidades sobre un papel filtro colocado encima del medio de cultivo sólido, removiendo posteriormente el papel y las células. Se ha logrado con este método una eficiencia de recuperación del 70%, plaqueando células de *C. roseus a* baja densidad.[1]

Aunque la mayoría de los cultivos celulares producen metabolitos en cantidades más pequeñas que las producidas por la planta completa, los cultivos de tejidos organizados (órganos) producen a menudo cantidades mucho mayores de esos metabolitos. Estos cultivos no han recibido mucha atención por la dificultad que se presenta para mantenerlos; sin embargo, empleando líneas tumorales derivadas de cepas mutantes de *Agrobacterium tumefaciens* y de *A. rhizogenes*, las cuales forman tumores organogénicos fácilmente cultivables, se podrían obtener buenos rendimientos de ciertas sustancias.

Investigaciones realizadas por Florez et al. (1985) indican que las raíces que se forman en cultivos de *Nicotiana tabacum, Hyoscyamus muticus* y *H. niger*, transformados con *A. rhizogenes*, crecen a velocidades semejantes a las de los cultivos en suspensión, y producen niveles de alcaloides semejantes a los de la planta madre en el medio de White carente de hormonas. Los niveles de alcaloides se pueden incrementar optimizando el medio de cultivo.

Optimización de los medios de cultivo

Una de las principales dificultades del uso de células vegetales cultivadas in vitro para producir metabolitos a nivel industrial es la lentitud de crecimiento de aquéllas; esto aumenta significativamente el tiempo que se requiere para la producción de biomasa.

En los sistemas microbianos, el crecimiento y la síntesis de productos secundarios son procesos mutuamente excluyentes; algo similar parece suceder en los sistemas vegetales, en los que la acumulación de metabolitos ocurre durante la fase estacionaria.

---

1. Cresswell, P. Información publicada en Agricell Report, 1984.

Digitized by Google

Ejemplos de tal situación son la producción de antraquinonas por cultivos de *Gallium mollugo* (Wilson et al., 1978) y la de alcaloides por *C. roseus* (Zenk et al., 1977). Más aún, se ha informado acerca de condiciones nutricionales o físicas que restringen el crecimiento y producen un aumento en el nivel de metabolitos (Knobloch et al., 1980; Curtois et al., 1980). Lindsey et al. (1983a y 1983b) han sugerido, inclusive, que en los cultivos de solanáceas es indispensable un cierto grado de rediferenciación para la producción de alcaloides de tropano.

Lo anterior sugiere la necesidad de definir la relación (o compromiso) entre la velocidad de producción de biomasa y la acumulación de productos, o la de separar ambas fases aunque esto represente mayor número de pasos en el proceso. La división del cultivo en dos fases, una de mantenimiento (crecimiento rápido) y otra de producción, empleando diferentes medios de cultivo (Zenk et al., 1977), parece ser una estrategia importante para lograr una mayor producción de metabolitos específicos; así lo demuestra el incremento del 400% en la producción de shikonina alcanzado por cultivos de *Lythosperum erythroryzon* (Yamada et al., 1983).

Pese a lo anterior, Stafford et al. (1985) consideran que la separación entre el crecimiento y la acumulación se debe a la variedad de condiciones experimentales empleadas con células que se encuentran en un mismo estado fisiológico y que, por lo tanto, no corresponde a una característica propia de las células. Cuando ellos analizaron la producción de alcaloides en relación con el crecimiento del cultivo en células de *C. roseus* provenientes de diferentes fases de crecimiento, pero cultivadas en condiciones idénticas, encontraron que en todas las etapas de cultivo la acumulación de serpentina era proporcional a la acumulación de biomasa.

Las técnicas básicas para la inducción y el mantenimiento de callos y células en suspensión (descritas en otros capítulos de este libro) han sufrido modificaciones específicas dirigidas a resolver los problemas que ocasiona la producción de biomasa y el incremento de la productividad. Prácticamente todos los factores físicos y químicos que constituyen el medio de cultivo afectan, de una u otra forma, la velocidad del crecimiento o la acumulación de metabolitos— o ambas variables.

El análisis de todos esos efectos está fuera del objetivo del presente capítulo y, por lo tanto, sólo se darán algunos ejemplos para ilustrar la importancia de la influencia de tales factores.

Factores nutricionales y pH. Lógicamente, la cantidad de nutrimentos en el medio de cultivo tiene influencia directa sobre la velocidad del

Digitized by Google

crecimiento. En general, las concentraciones elevadas de macronutrimentos como nitratos, potasio, amonio y fosfatos permiten un crecimiento acelerado, mientras que su eliminación lo limita, estimulando al mismo tiempo la acumulación de metabolitos.

El efecto anterior se ha observado en la producción de alcaloides por *C. roseus* (MacCarthy et al., 1980a) y de nicotina en cultivos de tabaco (Mantell et al., 1983), entre otros. Sin embargo, la calidad de los nutrimentos presentes ejerce también influencia en la producción de metabolitos específicos; así, se observa que en cultivos de *C. roseus* diversos medios pueden sostener adecuadamente el crecimiento, pero sólo en MS ocurre la mayor acumulación de alcaloides (Zenk et al., 1977). Se observa también que la sustitución de nitrógeno inorgánico por nitrógeno orgánico, como peptonas o extracto de levaduras, incrementa grandemente la producción de alcaloides (Dougall, 1980).

Los bajos niveles intracelulares de fosfatos producen, en los microorganismos, una baja carga energética que resulta en la activación de las enzimas del metabolismo secundario (Drew et al., 1977). En las células vegetales, tales niveles son característicos de cultivos seniles; por tanto, no es sorprendente que el agotamiento de los fosfatos influya dramáticamente en la biosíntesis de metabolitos secundarios.

La fuente de carbono, principalmente sacarosa y glucosa, es también fundamental para mantener el crecimiento celular; sin embargo, en algunas ocasiones su adición incrementa la acumulación de metabolitos (Davies, 1972). Este efecto se debe probablemente a factores osmóticos.

La mayoría de los cultivos celulares se desarrollan a un pH inicial óptimo, entre 5 y 6, el cual cambia durante el curso del cultivo. Estos cambios pueden afectar gravemente la acumulación de metabolitos, como lo demuestra la conversión de triptofano a una variedad de metabolitos indólicos. A un pH constante de 6.3, la cantidad de triptofol producido dobla la del cultivo con pH variable, y si el pH decae a 4.8, la síntesis se inhibe totalmente (Veliky, 1977).

Factores físicos. Las mismas características de la radiación que afectan el desarrollo de las plantas in vivo afectan el de las células cultivadas in vitro: tanto la longitud de onda, como la intensidad y el fotoperíodo, pueden estimular o inhibir la biosíntesis de algún metabolito. Para revisar las investigaciones hechas sobre estos efectos, el lector consultará Seiber et al. (1980).

La aireación, ya sea por flujo controlado de gases o por agitación mecánica, es indispensable para el incremento de la biomasa y afecta

Digitized by Google

también la acumulación de metabolitos. Este aspecto será discutido más adelante cuando se trate sobre el empleo de los fermentadores.

Existen pocos datos sobre el efecto de la temperatura en la síntesis de metabolitos secundarios, pero este efecto no se debe descuidar, como lo muestra el caso de los callos de *Peganum* sp. La temperatura óptima para el crecimiento de estos callos es de 30 °C, pero la producción óptima de alcaloides ocurre a 25 °C con un rápido decaimiento a temperaturas superiores (Nettleship et al., 1974); por otra parte, el contenido de ácidos grasos de las células cultivadas in vitro aumenta notablemente a temperaturas subóptimas para el crecimiento (MacCarthy et al., 1980b). Estos datos son congruentes con el hecho de que la acumulación de metabolitos ocurre principalmente en fases de lento o nulo crecimiento.

Reguladores. Los reguladores del crecimiento inducen generalmente la formación de metabolitos secundarios in vitro e in vivo. La cantidad y calidad de las auxinas presentes al principio del desarrollo del cultivo y durante él tiene un marcado efecto sobre el metabolismo primario y secundario.

Es necesario verificar la calidad y las proporciones de los reguladores, no sólo por su efecto sobre el crecimiento, sino también sobre la biosíntesis. La KIN no ejerce ningún efecto sobre el crecimiento de los callos de *Datura tatula*; no obstante, a elevadas concentraciones, inhibe la biosíntesis de alcaloides (Tabata et al., 1971). Detalles sobre la amplia literatura acerca del tema se pueden consultar en Mantell et al. (1983).

Otro grupo de compuestos que regulan el metabolismo celular y que pueden tener un efecto importante sobre la producción de metabolitos secundarios es el de las poliaminas. Muhitch et al. (1985) informaron que, cuando se añade sacarosa y espermidina a cultivos celulares de la rosa Escarlata de Paul en fase estacionaria, se previene el envejecimiento y se incrementa la cantidad y la variedad de los fenoles acumulados en las células. Este tratamiento podría alargar la vida de los cultivos maduros en la fase de producción.

Otros factores. La adición de carbón activado induce la síntesis de ciertos compuestos, como la benzoquinona, en cultivos de *Lithospermum erythrorhyzon* (Fukui et al., 1984).

La infección por microorganismos patógenos induce la producción de una gran variedad de metabolitos secundarios in vitro; de la misma forma, la adición de extractos microbianos induce la síntesis de alcaloides, flavonoides, cumarinas, etc., en las células cultivadas in vitro. Por ejemplo,

Digitized by Google

Heinstein (1985) añadió muestras de *Verticillium dahliaI* o *Fusarium moniliforme*, esterilizadas en el autoclave, a cultivos de *Gosypium arboreum*, *Papaver somniferum* y *Cephalotaxus harringtonia*, y obtuvo rendimientos que eran, respectivamente, 19, 92 y 106 veces superiores a los testigos.

El cultivo en gran escala

Para la producción industrial de cualquier compuesto se requieren grandes volúmenes de mezclas de reacción, o de medios de cultivo, en fermentadores que permitan obtener toneladas del producto. El cultivo de células vegetales en gran escala presenta varias dificultades, las cuales se deben resolver antes de que esta técnica tenga mayor aplicabilidad comercial. Los principales problemas son: a) el lento crecimiento de la biomasa; b) una tendencia a la agregación celular; c) la acumulación intracelular de los productos; y d) poca resistencia a la agitación mecánica.

Ya se ha discutido aquí la rápida producción de biomasa y la acumulación de metabolitos mediante la optimización de los medios de cultivo; los otros problemas se están afrontando por medio de las siguientes técnicas:

a) Inmovilización de células en matrices inertes.
b) Permeabilización.
c) Diseño de biorreactores especiales.

Inmovilización de las células. Se trata de una de las técnicas biotecnológicas más importantes para la bioconversión de sustancias por microorganismos. El desarrollo de esta técnica se inició en 1966, cuando Mosbach et al. (1966) atraparon células del liquen *Umbicaria pustulata* en un gel de poliacrilamida; desde entonces se ha empleado una gama de sustratos que comprende DEAE sephadex, dextrano, carboximetil-celulosa, lana metálica, ECTEOLA celulasa, colágeno y, más recientemente, geles de alginato, agarosa y carragenina (Lindsey et al., 1983a). La utilización de la técnica de inmovilización de células es posterior a 1966 y fue motivada por el interés de emplear estas células como reactores biológicos (Brodelius et al., 1979).

En Lindsey et al. (1983a) se encuentra un análisis más completo de las ventajas de la inmovilización de las células, aunque las razones que justifican esta práctica se pueden resumir así:

a. Las células en suspensión se encuentran en un ambiente muy diferente al natural y sufren severos cambios en su metabolismo. Este hecho ha

Digitized by Google

sido demostrado por Zeleneva et al. (1980), quienes encontraron que los patrones de actividad de una variedad de enzimas eran similares en callos en desarrollo y en el tejido de la raíz del cual se originaron tales callos, pero eran muy diferentes en las células en suspensión derivadas de los mismos callos.

b. Las células inmovilizadas tienden a crecer más lentamente y a diferenciarse, condiciones que conducen a una acumulación de metabolitos secundarios, como se mencionó anteriormente.

c. La inmovilización de las células permite cambiar con facilidad la composición química del medio de cultivo y colectar los productos secretados sin tener que manipular físicamente las células; la manipulación, que es frecuente en los cultivos en suspensión, maltrata generalmente las células.

Se ha estudiado, empleando varios métodos, la viabilidad de las células inmovilizadas en esferas de alginato, agarosa o carragenina, y se ha encontrado que este proceso no afecta las condiciones metabólicas de las células. El análisis espectroscópico del metabolismo del 2iP y del pH celular por resonancia magnética nuclear no reveló ninguna diferencia entre células de *C. roseus* cultivadas en suspensión o inmovilizadas en agarosa o alginato.

El estudio de la viabilidad por medio de mediciones de la respiración, por incorporación de diacetato de fluoresceína, y por la actividad de la enzima 5-beta hidroxilasa (que es dependiente de la viabilidad celular) muestra que los protoplastos de *Daucus carota* y de *C. roseus* inmovilizados en carragenina, agarosa o alginato poseen, después de catorce días, una viabilidad superior a la de los que se cultivan libres bajo las mismas condiciones (Linsefors et al., 1985).

Otro método es el presentado por Lindsey et al. (1984), quienes inmovilizaron células de *Capsicum frutescens* permitiendo que invadieran pasivamente los poros de la espuma reticulada de poliuretano. Las células inmovilizadas de esta manera no muestran reducción en su actividad respiratoria ni en la actividad de las esterasas, y producen niveles de capsaicina mil veces superiores a los producidos por las células en suspensión. El método es menos tóxico y más barato que la inmovilización en esferas de alginato, y los autores lo consideran básico para el desarrollo de la inmovilización celular a escala industrial.

Permeabilización. Al contrario de las células animales, la mayoría de las células vegetales no secretan sustancias al medio de cultivo sino que

Digitized by Google

tienden a almacenarlas en vacuolas; esto es un gran inconveniente cuando lo que se desea es una producción continua y barata de tales sustancias, pues implica la necesidad de aplicar procesos de extracción y purificación, y de regenerar continuamente la biomasa. Lo ideal sería que las células secretaran sus productos al medio de cultivo, de donde éstos se recuperarían sin necesidad de destruir la biomasa.

La permeabilización celular se puede inducir por medio de tratamientos químicos, los cuales se deben definir antes de que el método pueda ser aplicado extensivamente.

Se ha empleado sulfóxido de dimetilo (DMSO) al 10% durante 30 min para inducir, en células inmovilizadas de *C. roseus*, la liberación de ajmalicina; después del tratamiento se puede usar la misma biomasa para producir más ajmalicina y repetir el proceso varias veces. Sin embargo, este método no es aplicable a todos los tipos de células y de procesos; en *Cinchona ledgeriana* la liberación de alcaloides intracelulares requiere concentraciones de DMSO superiores al 20%, los cuales causan daños a las células (Parr et al., 1984).

No todos los metabolitos son almacenados intracelularmente, y existen algunos informes de liberación espontánea. Cultivos en suspensión de *Thalictum minus* secretan mayor cantidad de berberina (10% del peso seco) que la producida por las raíces de la planta madre (0.01% del peso seco); las concentraciones son tan altas que el alcaloide se cristaliza como nitrato o cloruro, dependiendo de la composición del medio (Nakagawa et al., 1984).

Biorreactores. Por su diferente tamaño y características estructurales, las células vegetales no se pueden cultivar a gran escala en el mismo tipo de reactores biológicos que se emplean para el cultivo de microorganismos. Esto ha obligado al diseño de contenedores y sistemas de agitación y aireación especiales.

Se ha empleado un gran número de fermentadores con diferentes características, y con capacidades que fluctúan entre 2 y 20,000 litros (Martin, 1980; Fowler, 1983); estos fermentadores presentan ventajas y desventajas que dependen del tipo de cultivo. Aquí se citan algunas de las características que se deben considerar.

Las células vegetales son de 10 a 100 veces más grandes que las células microbianas (20 a 150 µ de diámetro) por lo que tienden a sedimentarse con rapidez. Esto produce zonas de maduración y de necrosis que afectan la población celular que se mantiene en suspensión, dando como resultado cultivos multifásicos.

Digitized by Google

Un problema adicional es el aumento en la viscosidad de los cultivos, los cuales, por esa razón, deben estar bien agitados. Sin embargo, la agitación no se puede hacer por sistemas que produzcan gran turbulencia, debido a la presencia de vacuolas (más marcada en las últimas fases de crecimiento) y a la baja resistencia que las paredes celulares de las células vegetales ofrecen a la agitación; la ruptura del tonoplasma en particular ocasiona la liberación de sustancias tóxicas que afectan tanto el crecimiento como la producción de las células. Por todo esto, la agitación debe ser lo más suave posible y con poca turbulencia.

El lento crecimiento, con tiempos de generación que fluctúen entre 25 y 100 horas, conduce a períodos de incubación de días o semanas durante los cuales los fermentadores deben ser inaccesibles a microorganismos del exterior, ya que con el crecimiento de éstos no podrían competir las células vegetales.

En este caso, tal vez la mejor solución disponible está en los fermentadores agitados por corriente de aire. Usados por primera vez por Wagber et al. (1977), fueron mejorados por Fowler (1983), quien empleó un sistema cerrado de circulación del medio de cultivo, impulsado por aire. Este sistema tiene la ventaja de dañar poco las células y de no poseer uniones de piezas que faciliten la contaminación.

Se está investigando acerca de otros sistemas promisorios de agitación. El rendimiento más elevado, hasta la fecha, de un cultivo de células vegetales es el de Ulbrech et al. (1985), quienes obtuvieron 5 g (21% de peso seco) de ácido rosmarínico por litro de cultivo de *Coleus blumei* en un reactor agitado por un agitador en espiral.

Estrategia general. Como se aprecia, ha habido considerables avances en la producción de metabolitos secundarios a partir de cultivos de tejidos vegetales; en general, esto se ha logrado mediante la manipulación del medio de crecimiento y la aplicación de métodos de producción en gran escala. Esta es una estrategia que consume mucho tiempo, sobre todo porque las condiciones óptimas son características de cada especie y se deben determinar en cada caso; sin embargo, tal estrategia ha permitido obtener cultivos que producen algún compuesto específico en cantidades mayores que las producidas por la planta original (Constabel et al., 1982; Staba, 1982).

Deus et al. (1982) y Heinstein (1985) han propuesto una estrategia que ofrece las mejores posibilidades de obtener líneas celulares con alto rendimiento; es la siguiente:

Digitized by Google

1. Selección de plantas con alto rendimiento para el metabolito deseado.
2. Establecimiento de una(s) línea(s) celular(es) a partir de la planta seleccionada.
3. Desarrollo de un medio óptimo de crecimiento (no considera la producción de metabolitos secundarios).
4. Desarrollo de condiciones para inducir la síntesis de los productos secundarios.
5. Selección clonal de las líneas celulares de alto rendimiento.
6. Desarrollo de un medio óptimo para la producción de los metabolitos secundarios.

Esta estrategia ha permitido a Deus et al. (1982) obtener líneas celulares de *Catharanthus roseus* cuyo rendimiento de ajmalicina es del orden de 369 mg/litro, así como una elevada frecuencia de colonias (23%) con más de 1% (peso fresco) de serpentina.

Micropropagación

Aunque en este trabajo se ha discutido únicamente el empleo de células cultivadas in vitro, no se debe olvidar otra forma en que el cultivo de tejidos vegetales puede contribuir a la obtención de metabolitos importantes: la selección y la micropropagación en gran escala de plantas sobreproductoras, que son la fuente natural de ciertos compuestos. Esta alternativa es particularmente importante para los países del tercer mundo que, como se discute más adelante, se verán seriamente afectados por el desarrollo biotecnológico a nivel mundial.

Cultivo in Vitro para Producir Metabolitos Secundarios

Algunos de los compuestos químicos de importancia económica cuya producción por células cultivadas in vitro se está investigando se presentan en el Cuadro 9.1. Los beneficios esperados de la industrialización de estos cultivos se pueden resumir así:

- Producción, en escala industrial, de algunas sustancias naturales.

Digitized by Google

- Producción de sustancias difíciles de obtener por extracción o por síntesis química.
- Reducción de los costos de producción de estas sustancias, a largo plazo.
- Eliminación de la dependencia en materia de importación.
- Producción continua y controlada de sustancias, independientemente de los factores del medio ambiente.
- Precios estables.
- Posibilidad de realizar la producción cerca de las fábricas de procesamiento final y de los mercados.

Cuadro 9.1. Productos naturales obtenidos de plantas y sus usos industriales.

Producto	Especie vegetal	Uso industrial
Codeína	*Papaver sommiferum*	Analgésico
Diosgenina	*Dioscorea deltoidea*	Anticonceptivo
Quinina	*Chinchona ledgeriana*	Antimalárico Amargorizante
Digoxina	*Digitalis lanata*	Cardiotónico
Escopolamina	*Datura stramonium*	Antihipertensivo
Vincristina	*Catharanthus roseus*	Antileucémico
Piretreína	*Chrysanhemum cinerariaefolium;* *Pyrethrum* sp.	Insecticida
Taumatina	*Thaumatococcus daniellí*	Edulcorante
Jasmina	*Jasminum* sp.	Perfume
Shikonina	*Lithospermum erythrorhyzon*	Colorante
Teobromina	*Theobroma cacao*	Saborizante
Reserpina	*Ranwolfia serpentina*	Antihipertensivo
Vainillina	*Vainilla planifolia*	Saborizante
Menta	*Mentha piperita, M. viridis*	Saborizante
Capsaicina	*Capsicum frutescens*	Saborizante
Esteriosida	*Stevia rebaudiana*	Edulcorante

La biosíntesis de la shikonina y la biotrasformación de precursores, que se describen enseguida, son ejemplos que indican la posibilidad de lograr, en un futuro no muy lejano, grandes producciones de un gran número de sustancias de importancia industrial, médica y agronómica mediante esta técnica, y bajo condiciones económicamente factibles.

Digitized by Google

Biosíntesis de shikonina

La shikonina es un pigmento que se extrae de las raíces de *Lithospermum erythrorhyzon*, una planta perenne nativa de Japón, China y el sureste asiático, donde crece en forma silvestre. Esta planta está sufriendo una rápida disminución en su población, y además su rendimiento en shikonina depende de la distribución geográfica y del clima, lo que hace muy variable la disponibilidad de este pigmento. Aunque éste se puede sintetizar químicamente, el proceso es económicamente impracticable, ya que requiere doce pasos y tiene un rendimiento final de sólo 0.7%.

La biosíntesis de shikonina por medio de cultivos celulares de *L. erythrorhyzon* es el mejor ejemplo que se puede dar sobre la aplicabilidad de la tecnología para la producción de metabolitos secundarios. Por un lado, las dificultades para la obtención y la síntesis química del pigmento caracterizan el tipo de problemas que el cultivo in vitro puede resolver, y por otro, la metodología empleada ejemplifica el uso de las técnicas descritas aquí. La shikonina ya entró en la etapa de producción en gran escala: la produce la compañía petroquímica Mitsui del Japón y constituye el primer producto industrial de esta tecnología.

La estrategia para la producción de shikonina por células cultivadas in vitro (Yamada et al., 1983) consistió primero en el desarrollo de un sistema de cultivo en dos fases, una de rápido crecimiento celular y otra de producción del pigmento; las dos fases dieron como resultado un incremento cuatro veces mayor que el obtenido en el sistema de una sola fase. Luego se hizo la optimización de las condiciones del medio de cultivo de cada fase, lo que aumentó 13 veces la productividad. Posteriormente, se hizo la selección de las líneas celulares derivadas de protoplastos, cuyas elevadas velocidades de crecimiento y producción de shikonina incrementaron aún más la productividad.

La optimización de la oxigenación de los cultivos (a nivel de planta piloto) para alcanzar una densidad celular elevada constituyó el último paso en un proceso de optimización que produce cantidades de shikonina 800 veces superiores a las obtenidas de la planta natural. Según investigadores de Mitsui, la cantidad de pigmento producido en un fermentador de 750 litros en 14 días equivale a la que podría extraerse de las plantas en una superficie de aproximadamente 18 ha.

La shikonina producida in vitro se está vendiendo actualmente a US$4000 por kilogramo.

Digitized by Google

Biotrasformación de precursores

La biotrasformación de precursores mediante cultivo de tejidos vegetales permite la síntesis de compuestos de interés económico, como también elucidar las vías de la biosíntesis; en este último sentido se ha trabajado más arduamente. El potencial de esta técnica para producir moléculas marcadas específicamente en alguna posición clave, o productos estereoquímicamente puros, permite suponer que habrá un incremento muy marcado en el estudio de los productos secundarios.

La biotrasformación se lleva a cabo empleando varias de las metodologías descritas; por ejemplo, Furuya et al. (1984), usando alginato de calcio, inmovilizaron células de *P. somniferum* capaces de trasformar codeinona (-) en codeína (-), con una eficiencia del 70.4% en suspensiones agitadas; en un biorreactor la eficiencia fue del 42%.

Se han utilizado cultivos en suspensión de *Cannabis sativa* L. para trasformar el cannabidiol en cannabielsoína y en un compuesto aún no identificado; ésto constituye otra posible aplicación de la biotrasformación, o sea, la producción de metabolitos hasta ahora desconocidos (Loh et al., 1983).

La 1-O-(1-^{14}C)hexadecil-2-acetil-glicero-3-fosfolina es un factor de activación de las plaquetas, que se emplea en la investigación biomédica y que es extremadamente difícil de sintetizar químicamente. Aunque las plantas no producen esta clase de compuestos, las células cultivadas in vitro se pueden usar como biorreactores para trasformar sus precursores; Weber et al. (1985) emplearon cultivos celulares de *Brassica napus* para convertir los 1-O-alquil-sn-gliceroles en sus correspondientes 1-O-alquil-2-acil-sn-glicero-3-fosfocolinas, con una eficiencia del 70 al 78%; la hidrólisis alcalina y la acetilación posteriores producen el derivado final. Adicionalmente, tales cultivos producen los compuestos esteroquímicamente uniformes a partir de muestras racémicas, reducen en cuatro pasos la síntesis total y permiten marcar con ^{14}C las cadenas alquilo que antes solamente habían podido ser marcadas con ^{3}H.

Un último ejemplo de biotrasformación es el trabajo de Alferman et al. (1984), quienes han desarrollado una metodología para la biotrasformación de β -metil digitoxina en β -metil digoxina por medio de células de *Digitalis lanata* inmovilizadas en alginato. En una reactor de 200 lt, estas células llevan a cabo la conversión, por más de 170 días, a una velocidad constante; en un lapso de 13 días se pueden extraer 430 mg de β -metil digoxina por litro de cultivo, lo cual representa el 70% del sustrato añadido y la base para producir 800,000 tabletas cardiovasculares.

Digitized by Google

Producción de Metabolitos Secundarios en los Países en Desarrollo

Como se ha visto, son muy grandes los beneficios potenciales de la síntesis de productos químicos por células cultivadas en reactores biológicos. No se debe subestimar el atractivo que sobre los métodos convencionales de producción agrícola y farmacéutica tiene la nueva tecnología para las empresas de los países industrializados, particularmente en lo que se refiere a la obtención de la materia prima de los países en desarrollo. La mayoría de las sustancias cuya producción in vitro se está considerando actualmente provienen de plantas nativas de los países en vías de desarrollo.

La industrializacion del cultivo de tejidos vegetales podría representar dos tipos de situaciones para el tercer mundo: a) el desplazamiento de algunas de sus exportaciones de productos naturales, lo que parece ser una consecuencia inevitable de la revolución biotecnológica en general; y b) un aumento de su dependencia de los países industrializados (Kenney et al., 1983).

Al considerar el impacto socioeconómico de la biotecnología no se puede hablar de hechos, ya que la situación actual no tiene precedente comparable. Sin embargo, dada la importancia y el alcance de este campo, parece conveniente intentar hacer algunas predicciones basadas en la experiencia adquirida y en el análisis de las tendencias actuales.

Las instituciones nacionales deberían disponer de toda la información posible al respecto, para anticipar a tiempo y de manera adecuada la dirección de los cambios rápidos provocados por la biotecnología. La acción rápida es necesaria para evitar el crecimiento de la brecha tecnológica con los países industrializados, por dos causas principales: a) las grandes inversiones de capital que demanda la investigación básica para desarrollar un producto biotecnológico hasta llevarlo al mercado; b) la alta especialización de los conocimientos científicos y tecnológicos que se requieren para desarrollar esos procesos, y que implicaría dificultades para adquirir recursos humanos adecuadamente capacitados.

La privatización de la biotecnología tendría los siguientes efectos:

1. Se restringirá el acceso a la información en este campo.
2. Habría competencia para los mercados de los nuevos productos, y los países sin suficientes recursos se sentirían afectados.

Digitized by Google

3. Posiblemente estos países tendrían que adquirir sustancias que anteriormente provenían de cultivos nativos.

En resumen, todo lo anterior parece indicar que los países menos desarrollados no sólo perderían algunos de sus mercados tradicionales, sino que también tendrían dificultades para establecer su propia industria biotecnológica. Sin embargo, es necesario insistir en que en este momento el futuro no está determinado.

Es necesario planear a corto y largo plazo la tecnología del cultivo de tejidos vegetales y de la biotecnología en general. Es esencial que cada país en vías de desarrollo tenga una idea clara acerca de los últimos adelantos de la biotecnología a nivel mundial, y con este propósito debería disponer de una lista de todas las especies sobre las cuales se está investigando, y conocer los objetivos de estas investigaciones.

Por otra parte, las instituciones nacionales no deben ignorar la vulnerabilidad de los sectores campesinos y de los pequeños productores ante los posibles efectos negativos de la biotecnología. Es importante que se creen a tiempo alternativas para evitar dichos efectos negativos.

La estrategia más importante para los países en vías de desarrollo sería desarrollar su propia infraestructura, y los conocimientos necesarios, para la utilización del cultivo de tejidos vegetales. Esto les permitirá hacer una investigación básica acorde con sus necesidades. Para un análisis más profundo sobre este tema ver Eastmond (1985).

Consideraciones Finales

Los autores del presente capítulo no consideran apropiados los análisis y las evaluaciones tecnológicas que se han hecho sobre el estudio del metabolismo secundario de las células vegetales. Es ésta una disciplina biológica que, aunque se encuentra aún en una fase temprana de su desarrollo, posee un enorme potencial para generar conocimientos que pueden aplicarse al desarrollo de tecnologías económicamente factibles (Goldstein et al., 1980; Fowler, 1983).

Tomando como ejemplo la biología molecular, se observa que ella se desarrolló felizmente desde los años cuarentas hasta 1972 sin que nadie sospechara cómo iba a ayudar a la comprensión de problemas médicos como el cáncer, ni mucho menos cuál sería su potencial económico en la ingeniería genética. A pesar de lo anterior, nadie puso en duda la conveniencia de llevar a cabo investigaciones en ese campo, ni nadie tomó en

Digitized by Google

cuenta los costos de la misma. Se trataba de una investigación por el conocimiento mismo, mientras que la investigación biotecnológica actual es, en muchos casos, una investigación por el desarrollo comercial tecnológico.

Referencias

Alfermann, A. W.; Bergmann, W.; Figur, C.; Helimbold, U.; Schwantag, D.; Schuller, I. y Reinhard, E. 1984. Biotransformation of β -methyldigitoxin to β -methyldigoxin by cell cultures of *Digitalis lanata*. En: Mantell, S. H. y Smith, H. (eds.). Plant biotechnology. Crambridge University Press, Londres. p. 67-74.

Bell, E. A. 1981. The physiological role(s) of secondary (natural) products. En: Conn, E. E. (ed.). The biochemistry of plants; 7: Secondary plant products. Academic Press, Nueva York. p. 1-19.

Berling, J. 1984. Plant cultures, a future source of natural products. Endeavor 8:5-8.

Brodelius, P.; Deus, B.; Mosbach, K. y Zenk, M. H. 1979. Immobilized plant cells for the production and transformation of natural products. FEBS Letters 103:93-97.

Brown, S.; Renaudin, J. P.; Prevot, C. y Guern, J. 1984. Flow cytometry and sorting of plant protoplasts: Technical problems and physiological results from a study of pH and alcaloids in *Catharantus roseus*. Physiol. Veg. 22:541-554.

Chaprin, N. y Ellis, B. E. 1984. Microespectrophotometric evaluation of rosmatinic acid accumulation in single cultured plant cells. Can J. Bot. 62:2278-2282.

Cloetta, M. 1980. Chemistry and pharmacology of digitoxin and its cleave products. Arch. Exptl. Path. Pharm. 88:113-157.

———. 1926. Preparation and chemical composition of the active substances of *Digitalis* leaves, their pharmacological and therapeutic properties. Arch. Exptl. Path. Pharm. 112:261-342.

Constabel, F.; Kurz, W. G. W. y Kutney, J. P. 1982. Variation in cell cultures of perwinkle, *Catharantus roseus*. En: Fujiwara, A. (ed.). Plant tissue and cell culture: Proceedings of the 5th International Congress, Tokio. p. 301-304.

Courtois, D. y Guern, J. 1980. Temperature response of *Catharantus roseus* cells cultivated in liquid medium. Plant Science Lett. 17:473-482.

Davies, M. E. 1972. Polyphenol synthesis in cell suspension cultures of Paul's Scarlet rose. Planta 104:50-65.

Digitized by Google

Deus, B. y Zenk, M. H. 1982. Exploitation of plant cells for the production of natural compounds. Biotech. Bioengin. 24:1965-1974.

Dougall, D. K. 1980. Nutrition and metabolism. En: Staba, E. J. (ed.). Plant tissue culture as a source of biochemicals. CRC Press, Boca Ratón, Florida, E.U. p. 21-58.

Douglas, G. C.; Wetter, L. R.; Nakamura, C.; Keller, W. A. y Setterfield, G. 1981. Somatic hybridization between *Nicotiana rustica* and *N. tabacum*; 3: Biochemical morphological and cytological analysis of somatic hybrids. Can. J. Bot. 59:228-237.

Drew, J. W. y Demain, A. L. 1977. Effect of primary metabolites on secondary metabolism. Ann. Rev. Microbiol. 31:346-356.

Eastmond, A. 1985. Probables efectos socieconómicos de la industrialización del cultivo de tejidos vegetales sobre los países en vías de desarrollo. En: Robert, M. L. (ed.). El cultivo de tejidos vegetales en México. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México.

Elliot, D. C. 1983. Accumulation of cytokinin induced betacyanin in specific cells of *Amaranthus tricolor* seedlings. J. Exp. Bot. 34:67-73.

Endress, R.; Jager, A. y Kreis, R. W. 1984. Cathecholamine biosynthesis dependent on the dark in betacyanin *Portulaca* callus. J. Plant Physiol. 115:291-295.

Flores, H. y Filner, P. 1985. Hairy roots of Solanaceae as a source of alkaloids. Plant Physiol. 77:125.

Fowler, M. W. 1983. Commercial applications and economic aspects of mass plant cells culture. En: Mantell, S. H. y Smith, H. (eds.). Plant biotechnology. Cambridge University Press, Cambridge, Inglaterra.

Fujita, Y.; Tabata, M.; Nishi, A. y Yamada, Y. 1982. New medium and production of secondary compounds with two-staged culture method. En: Fujiwara, A. (ed.). Plant tissue and cell culture. Proceedings of the 5th International Congress, Tokio. p. 399-400.

Fukui, H.; Yoshikawa, N. y Tabata, M. 1984. Induction of benzoquinone formation by active carbon in *Lithospermum erythrorhyzon* cell suspension cultures. Phytochemistry 23:301-305.

Furuya, Y.; Yoshikawa, T. y Taira, M. 1984. Biotransformation of codeinone to codeine by immobilized cells of *Papaver somniferum*. Phytochemistry 23:999-1001.

Galbraith, D. W. et al. 1984. Flow sorting and culture of protoplasts: Conditions for high frequency recovery, growth and morphologenesis from sorted protoplast of suspension cultures of *Nicotiana*. Plant Cell Reports 3:151.

Digitized by Google

Gates, M. y Tschudi, G. 1952. The synthesis of morphine. J. Am. Chem. Soc. 74:1109-1110.

———. 1956. The synthesis of morphine. J. Am. Chem. Soc. 78:1381-1393.

Goldstein, W. E.; Lasaure, L. C. y Ingle, M. B. 1980. Product cost analysis. En: Staba, E. J. (ed.). Plant tissue culture as a source of biochemicals. CRC Press, Boca Ratón, Florida, E.U.

Gorman, M.; Neuss, N. y Svoboda, G. H. 1959. *Vinca* alkaloids: Structural features of leurosine and vincaleublastine, representatives of a new type of indole indoline alkaloids. J. Am. Chem. Soc. 81:4745-4746.

Griffin, L. R.; Cutler, A. J.; Shargool, P. D. y Fowke, L. C. 1985. Isoelectric focusing of plant cell protoplasts. Plant Physiol. 77:765-769.

Hagimori, M.; Takashi, M. y Obi, R. Y. 1982. Studies on the production of *Digitalis* cardenolides by plant tissue culture; 2: Effect of light and plant growth substances on digitoxin formation by indifferentiated cells and shoot-forming cultures of *Digitalis pupurea* L. grown in liquid media. Plant Physiol. 69:653-656.

Heinstein, P. F. 1985. Future approaches to the formation of secondary natural products in plant cells suspension cultures. J. Nat. Prod. 48:1-9.

Kenney, M. J.; Kloppenburg Jr. J., R.; Buttel, E. H. y Cowan, J. T. 1983. Genetic engineering and agriculture: Socieconomic aspects of biotechnology in development and developing countries. En: Biotech 83: Proceedings of the International Conference on the Commercial Applications and Implications of Biotechnology. On-line Conferences, Middelessex, Inglaterra.

———; Buttel, F. H. y Kloppenburg Jr., J. 1984. Advance technology alert system; 1: Tissue culture technology for development. Centre for Science and Technology for Development, United Nations, Nueva York.

Knobloch, J. H. y Berlin, J. 1980. Influence of medium composition on the formation of secondary compounds in cell suspension cultures of *Catharantus roseus* (L.) G Don. Z. Naturforsch. 35:551-556.

Lindsey, K. y Yeoman, M. M. 1983a. Novel experimental systems for studying the production of secondary metabolites by plant tissue cultures. En: Mantell, S. H. y Smith, H. (eds.). Plant biotechnology. Cambridge University Press, Cambridge, Inglaterra. p. 39-66.

——— y ———. 1983b. The relationship between growth rate, differentiation and alkaloid accumulation in cell cultures. J. Exp. Bot. 34:1055-1065.

——— y ———. 1984. The viability and biosynthetic activity of cells of *Capsicum frutescens* Mill cv. *annuum* immobilized in reticulate polyurethane. J. Exp. Bot. 35:1684-1696.

Digitized by Google

Linsefors, L. y Brodelius, P. 1985. Immobilization of plant protoplasts: Viability studies. Plant Cell Reports 4:23-27.

Lipskii, A. Kh. y Chernyak, N. D. 1983. Effect of temperature on a cell culture of *Dioscorea deltoidea* wall during submerged cultivation. Sov. Plant. Physiol. 30:329-337.

Loh, W. H. T.; Hartsel, S. C. y Robertson, L. W. 1983. Tissue culture of *Cannabis sativa* L. and in vitro biotransformation of phenolics. Z. Pflanzenphysiol. 111:395-400.

Loyola-Vargas, V. M. 1984. Obtención de productos secundarios de interés farmacológico en cultivo de tejidos; 1: Consideraciones generales y proposición de un modelo. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas 14:26-36.

———. 1985. Efecto del stress en la síntesis de productos secundatios. En: Loyola-Vargas, V. M. (ed.). Cuadernos de posgrado. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

———; Gómez, I.; López, M. E.; Reyes, J.; Fierro, M y Robert, M. L. 1984. Nitrogen metabolism and alkaloid content in *Catharanthus roseus*. Plant Physiol. 75:144s.

MacCarthy, J. J.; Ratcliffe, D. y Street, H. E. 1980a. The effect of nutrient medium composition on the growth cycle of *Catharantus roseus* G. Don cells grown in bath culture. J. Exp. Bot. 31:1315-1325.

——— y Stumpf, P. K. 1980b. Effect of different temperatures on fatty acid synthesis and polyunsaturation in cell suspension cultures. Planta 147:389-395.

Mantell, S. H. y Smith, H. 1983. Cultural factors that influence secondary metabolite accumulations in plant cell and tissue culture. En: Mantell, S. H. y Smith, H. (eds.). Plant biotechnology. Cambridge University Press, Cambridge, Inglaterra.

Marker, R. E. y Krueger, J. 1940. Sapogenins; 41: The preparation of trillin and its conversion to progesterone. J. Am. Chem. Soc. 62:3349-3350.

———; Tsukamoto, T. y Turner, D. L. 1940. Diogenin. J. Am. Chem. Soc. 62:2525-2532.

———; Turner, D. L. y Ulshafer, P. R. 1942. Sapogenins; 63: The position of the hydroxyl groups in digitogenin. J. Am. Chem. Soc. 64:1843-1847.

Martin, S. M. 1980. Mass culture systems for plant cell suspensions. En: Staba, J. E. (ed.). Plant tissue culture as a source of biochemicals. CRC Press, Boca Ratón, Florida, E. U.

Mosbach, K. y Mosbach, R. 1966. Entrapment of enzyme and microorganisms in synthetic crosslinked polymers and their application in column techniques. Acta Chemica Scandinavica 20:2807-2810.

Digitized by Google

Muhitch, M. J. y Fletcher, J. S. 1985. Influence of culture age and spermidine treatment on the accumulation of phenolic compounds in suspension cultures. In vitro 21(3):53A.

Nakagawa, K.; Konagai, A.; Fukui, H. y Tabata, M. 1984. Release and crystallization of berberine in the liquid medium of *Thalictium minus* cells suspension cultures. Plant Cell Reports 3:254-257.

Nettleship, L. y Slaytor, M. 1984. Adaptation of *Paganum harmala* callus to alkaloids production. J. Exp. Bot. 25:1114-1123.

Noble, R. L.; Beer, C. T. y Cutts, J. H. 1958. Role of chance observations in chemotherapy: *Vinca rosea.* Ann. New York Acad. Sci. 76:882-894.

Parr, A. J.; Robins, R. J. y Rhodes, M. J. C. 1984. Permeabilization of *Cinchona ledgeriana* cells by dimethylsulphoxide: Effects of alkaloid release and long term membrane integrity. Plant Cell. Rep. 3(6):262-265.

Reyes, J.; Oropeza, C.; Robert, M. L.; Ríos, P.; Alpízar, L.; Robles, M. L. y Loyola-Vargas, V. M. 1985. Alkaloids in *Catharantus roseus* cultures. Plant Cell Reports 3:262-265.

Seibert, M. y Kadkade, P. G. 1980. Environmental factors; A: Light. En: Staba, E. J. (ed). Plant tissue culture as a resource of biochemicals. CRC Press, Boca Ratón, Florida, E.U. p. 123-141.

Staba, E. J. 1982. Production of useful compounds from plant tissue cultures. En: Fujiwara, A. (ed.). Plant cell culture: Proceedings of the 5th International Congress, Tokio, p. 25-30.

Stafford, A.; Smith, L. y Fowler, M. W. 1985. Regulation of product synthesis in cell cultures of *Catharantus roseus* (L.) G Don. Plant Cell Tissue & Organ Culture 4:83-94.

Stoll, A. y Kreis, W. 1934. Acetyldigitoxin, acetylgitoxin and acetyldigoxin. Helv. Chim. Acta 17:592-613.

Tabata, M.; Yamamoto, H. y Hiraoka, N. 1971. Alkaloid production in the tissue cultures of some solanaceous plants. En: Les cultures de tissu de plantes. Centre National pour la Recherche Scientifique (CNRS), París.

Tschesche, R. 1985. Neutral saponins; conversion of digitogenin, gitogenin and tigogenin into identical derivatives. Ber. 68B:1090-1094.

——— y Hagedorn, A. 1936. Saponins of the cyclopentanehydrophenantrene group; 4: Constitution of gitogenin and digitogenin. Ber. 69B:797-805.

Ulbrech, B. y Wiesner, W. 1985. High yield rosemarinic acid production from plant cell culture in a stirred bioreactor system. In vitro 21(3):60A.

Veliky, I. A. 1977. Effect of pH on triptophol formation by cultures of *Ipomoea* sp. plant cells. Lloydia 40:482.

Digitized by Google

Wagner, F. y Vogelman, H. 1977. Cultivation of plant tissue cultures in bioreactors and formation of secondary metabolites. En: Barz, W.; Reinhard, E. y Zenk, M. H. (eds.). Plant tissue culture and its biotechnological applications. Springer-Verlag, Berlín.

Weber, N. y Mangold, H. K. 1985. Semisynthesis preparation of 1-O-(1-^{14}C)hexadecyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocoline (platelet activating factor) using plant cell cultures. J. Lipid Res. 26:495-500.

Wilson, G. y Marron, P. 1978. Growth and entharaquinose biosynthesis by *Gallium mollugo* (L.) cells in bath and chemostat culture. J. Exp. Bot. 29:837-851.

Windaus, A. y Freese, C. 1925. Digitoxin. Ber. 58B:2503-2510.

Woodward, R. B. y Doerin, W. E. 1944. The total synthesis of quinine. J. Am. Chem. Soc. 66:849.

———. 1945. The total synthesis of quinine. J. Am. Chem. Soc., 67:860-874.

Yamada, Y. y Fuhita, Y. 1983. Production of useful compounds in culture. En: Evans, D. A.; Sharp, W. R.; Ammirato, P. V. y Yamada, Y. (eds.). Handbook of plant cell culture; I: Techniques for propagation and breeding. MacMillan Publishing, Nueva York.

Zeleneva, I. y Khavrin, E. E. 1980. Rearrangement of enzyme patterns in maize callus and suspension cultures: Is it relevant to the changes in the growing cells on the intact plant? Planta 148:108-115.

Zenk, M. H.; El-Shagi, H.; Arens, H.; Stockigt, J.; Weiler, E. W. y Deus, B. 1977. Formation of the indole alkaloids serpentine and ajmalicine in cell suspension culture of *Catharantus roseus*. En: Barz, W.; Reinhard, E. y Zenk, M. H. (eds.). Plant tissue culture and its biotechnological applications. Springer-Verlag, Berlín. p. 27-43.

Digitized by Google

Capítulo 10

Protoplastos: aislamiento, cultivo y regeneración de plantas

L. Szabados*

* Unidad de Investigación en Biotecnología (UIB), Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. Dirección actual: Biological Research Center, Institute of Plant Physiology, Szeged, Hungría.

Digitized by Google

Introducción

El término protoplastos se refiere a componentes vivos de las células vegetales que están rodeados sólo por la membrana plasmática; en realidad, constituyen células desnudas de una planta. Muchos protoplastos pueden resintetizar la pared celular, dividirse, formar colonias e incluso regenerar plantas. La capacidad para producir un organismo altamente diferenciado, a partir de una sola célula somática, es una característica única de los protoplastos de las plantas superiores.

Debido a la ausencia de la pared celular, los protoplastos son adecuados para diversas y diferentes manipulaciones genéticas que no serían posibles con plantas o células intactas (véase Capítulo 34). Los protoplastos sirven además como herramientas experimentales únicas para muchas investigaciones fisiológicas, biofísicas y bioquímicas.

El primer aislamiento de protoplastos vivos fue el descrito por Klercker (1892), quien tuvo éxito al aislar protoplastos de cebolla usando métodos mecánicos. El primer aislamiento por métodos enzimáticos se hizo en células de levadura, utilizando jugo gástrico del caracol *Helix pomatia* (Giaja, 1919); aunque en ese momento no se conocía el mecanismo de degradación enzimática de la pared celular, las observaciones de este trabajo fueron muy importantes ya que el método permitió aislar altas cantidades de protoplastos.

Cocking (1960) fue quien utilizó por primera vez degradantes de pared celular para aislar protoplastos de plantas superiores; usando una preparación de celulasa cruda del hongo *Myrothecium varrucaria*, este investigador aisló protoplastos de raíces de tomate.

Aislamiento de Protoplastos

Aunque existe un método mecánico para aislar protoplastos, el método enzimático es actualmente la forma más importante y efectiva para ese propósito.

El método mecánico tiene, ante todo, un interés histórico, ya que su rendimiento es bajo, su procedimiento tedioso y su aplicabilidad limitada (Vasil et al., 1980). Dicho método consiste en aplicar un choque osmótico para producir plasmólisis en las células, las cuales se rompen luego mediante un corte; luego se pueden liberar los protoplastos de las células rotas mediante el restablecimiento de su nivel osmótico.

Digitized by Google

El método enzimático para el aislamiento de los protoplastos consiste en incubar las células en una mezcla de enzimas que degradan la pared celular. Los principales factores que se deben considerar para el éxito de este método son:

a. el tipo de enzimas que se usarán;
b. la composición del medio en que ellas actuarán; y
c. el material de origen de los protoplastos.

Enzimas para el aislamiento de protoplastos

Para el aislamiento de protoplastos por el método enzimático es necesario usar mezclas de enzimas, en lugar de usarlas individualmente. Se utilizan enzimas de las siguientes clases generales: celulasas, hemicelulasas y pectinasas (Ruesink, 1980), las cuales se obtienen generalmente de preparaciones comerciales (Cuadro 10.1); éstas no son puras sino que contienen otras enzimas como proteasas, nucleasas y lipasas.

Cuadro 10.1. Enzimas que se utilizan para el aislamiento de protoplastos.

Enzimas	Producto comercial
Celulasas	
Celulasa Onozuka R 10	Kinki Yakult Biochemicals Co. Ltd., Nishiromiya, Japón.
Driselasa	Kyowa Hakko Kogya Co., Tokio, Japón.
Celulisina	Calbiochem, San Diego, CA, U.S.A.
Meicelasa	Meiji Seika Kaisha Ltd., Tokio, Japón.
Pectinasas	
Pectinasa	Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.
Macerozima R 10	Kinki Yakult Biochemicals Co., Ltd.
Macerasa	Calbiochem, San Diego, CA, U.S.A.
Pectoliasa Y 23	Seishiu Pharmaceutical Co. Ltd., Tokio, Japón.
Hemicelulasas	
Rhozima HP 150	Rohm & Haas, Filadelfia, PN, U.S.A.
Hemicelulasa	Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.

Digitized by Google

Para utilizar las preparaciones enzimáticas comerciales en algunos tejidos, se aconseja eliminar de ellas las sales que contienen; esto se puede hacer filtrándolas con una columna de Biogel o de Sephadex G25 ó G50, como se indica en el Procedimiento I más adelante (Dos Santos et al., 1980; Slabas, 1980; Shekhawat et al., 1983).

El medio de incubación

El material de incubación que se utiliza para el aislamiento de protoplastos consta de los siguientes elementos: enzimas disueltas en una solución que contenga algunas sales (como $CaCl_2$, KH_2PO_4, $MgCl_2$), un medio de cultivo, un amortiguador (solución tampón), y un estabilizador o regulador osmótico. El calcio (1 a 10 mM) es un ingrediente esencial y el ion fosfato (0.5 a 2.0 mM) es benéfico para conservar la viabilidad de los protoplastos.

A menudo la solución contiene como amortiguadores (buffer) fosfato o MES [ácido 2(N-morfolino)-etanosulfónico] a una concentración de 3 mM. Los estabilizadores osmóticos más comunes son el manitol, el sorbitol, la glucosa y la sacarosa; generalmente, el potencial osmótico se ajusta de tal manera que las células sean levemente plasmolizadas durante la digestión de la pared. La osmolaridad óptima varía de 0.3 a 0.7 M. Un pH ácido en el rango de 5.0-6.0 es el óptimo.

Fuentes para la obtención de protoplastos

En teoría, es posible aislar protoplastos de cualquier tipo de planta, órgano o tejido, pero las fuentes que se usan corrientemente son mesófilo foliar y tejidos cultivados in vitro como células en suspensión, callos, y ápices de plántulas generadas in vitro (Ruesink, 1980; Vasil et al., 1980a).

El mesófilo es una fuente adecuada de protoplastos. Se utilizan, en general, hojas completamente abiertas de plantas jóvenes, o brotes nuevos; a menudo se prefieren las hojas de brotes de cultivos in vitro a las hojas de plantas cultivadas en invernadero.

Los protoplastos también se aislan de suspensiones celulares; en cambio, los callos cultivados en agar resultan con frecuencia inadecuados para ese propósito.

El mesófilo como fuente de protoplastos. El estado fisiológico del tejido foliar influye sustancialmente en el rendimiento y viabilidad de los protoplastos. Para liberar protoplastos de buena calidad, las plantas se deben

Digitized by Google

cultivar en condiciones controladas (invernadero, cámara de crecimiento), donde se puedan optimizar la luz, la temperatura, la fertilidad del suelo y la humedad. Usualmente se utilizan una luz de 10,000 a 30,000 lux y un fotoperíodo de 18 ó 16 h. Es esencial contar con un buen suministro de agua y con fertilización regular, como se indica en el Procedimiento II, más adelante.

Algunas veces los protoplastos aislados resultan más estables si las plantas se conservan previamente en la oscuridad durante algunos días. En ciertos casos, para mejorar la viabiliad de los protoplastos aislados, es aconsejable el pretratamiento del tejido foliar en un medio con hormonas de crecimiento, en diferentes condiciones de luz y temperatura (Kao et al., 1980; Shepard et al., 1977; Shahin et al., 1980).

Las suspensiones celulares como fuente de protoplastos. Debido a que las suspensiones son heterogéneas y a menudo están compuestas de agregados de diferentes tamaños y de células libres, no todas las células están en condiciones óptimas para la liberación de protoplastos; la liberación en este caso depende también de las condiciones de crecimiento de las células cultivadas.

Los protoplastos se deberían aislar de agregados de células de tipo meristémico; en estas células en activa división, el rendimiento puede elevarse a casi el 100% mediante la manipulación del período de subcultivo y de la tasa de dilución (ver Procedimiento III, más adelante).

Antes del aislamiento de los protoplastos, la suspensión celular debería subcultivarse con una frecuencia de 1 a 4 días (Potrykus et al., 1979b).

Procedimientos para aislar los protoplastos

Procedimiento I: purificación de las enzimas. La viabilidad de los protoplastos aislados se puede mejorar purificando las enzimas de sales y de otras impurezas. Se procede así:

1) Disuelva 5 g de la preparación enzimática en 20 ml de un amortiguador de fosfato 1 mM (pH 6.0).

2) Después de una hora, centrifugue la solución a 12,000*g* durante 10 minutos, para remover las impurezas insolubles.

3) Lleve la fracción sobrenadante a una columna de Sephadex G 50 (4 x 20 cm) y recoja fracciones de elución de 20 x 10 ml.

4) A los 280 minutos mida el contenido de proteínas de cada fracción. Reúna las fracciones que contienen proteína y almacénelas a 4 °C.

Digitized by Google

Procedimiento II: aislamiento de protoplastos del mesófilo. Todas las operaciones se deben efectuar asépticamente en una cámara de flujo laminar de aire estéril. Se procede así:

1) Esterilice superficialmente las hojas, sumergiéndolas en etanol al 70% durante 30 segundos, y trasfiéralas luego a una solución al 2% de NaOCl (con una gota de Tween-80 por cada 20 ml) durante 20 minutos. Lave las hojas tres veces con agua destilada estéril y luego con una solución de manitol o sorbitol, con la osmolaridad y el pH ajustados a los de la solución enzimática que se utilizará después.

   El empleo de hojas de brotes cultivados in vitro tiene la gran ventaja de que los tejidos ya son axénicos y, por lo tanto, se puede omitir el procedimiento de esterilización. Utilice hojas jóvenes pero expandidas, de cultivos de cuatro a seis semanas de edad.

2) Remueva la epidermis inferior desprendiéndola con pinzas finas de relojero; si la epidermis es difícil de remover —por ejemplo, en las hojas de los cereales— corte estas hojas en bandas delgadas (2 mm, aproximadamente). Algunas veces los protoplastos resultan más estables si el tejido se deja durante 1 a 2 horas en el regulador osmótico para buscar equilibrio en él antes de iniciar el tratamiento enzimático.

3) Trasfiera las secciones de hoja a una caja Petri de 15 x 100 mm, que contenga 10 ml de una solución de mezcla enzimática E_2 o E_3 y de medio A_2 para el cultivo de protoplastos (Cuadros 10.2 y 10.3), en una proporción 1:1. La mezcla E_2 se ha utilizado exitosamente para el aislamiento de protoplastos del mesófilo de hojas de diferentes especies como tabaco, remolacha azucarera, zanahoria y perejil, mientras la mezcla E_3 se encontró superior para el aislamiento de protoplastos de hojas de yuca y de *Stylosanthes* spp.

Cuadro 10.2. Soluciones (de 100 ml) para el aislamiento de protoplastos.

Compuestos	Cantidades según tipo de solución (mg)	
	A_1	A_2
$CaCl_2$ (mg)	100	100
NaH_2PO_4 (mg)	10	10
Sorbitol (mg)	6400	
Manitol (mg)	6400	7300
Tampón (bófer MES, mg)	60	60
pH	5.8	5.8

Digitized by Google

Cuadro 10.3. Mezclas enzimáticas (de 100 ml) para el aislamiento de protoplastos.[a]

Enzimas	Cantidades (g) según tipo de mezcla[b]		
	E_1	E_2	E_3
Onozuka R 10	2	3	3
Driselasa	0.5		
Hemicelulasa	0.5	1	1
Pectinasa	1	1	
Pectoliasa Y 23			0.3

a. Esterilizar con filtro y almacenar a 0-4 °C.
b. Usar la solución A_1 (Cuadro 10.2) para la mezcla E_1, y la solución A_2 para las mezclas E_2 y E_3.

4) Incube las partes foliares en la mezcla de enzimas durante 4 a 12 horas en la oscuridad, a 22-25 °C; hágalo con agitación lenta, esto es, a 50 rpm en un agitador giratorio, o agitando suavemente cada hora. Observe la liberaciób de los protoplastos en un microscopio invertido.

5) Lave los protoplastos así:

5.1) Con una pipeta Pasteur, remueva de la caja Petri la suspensión de protoplastos y pásela por un tamiz de nylon para extraer el tejido no digerido.

5.2) Trasfiera la suspensión tamizada a un tubo de ensayo cónico y centrifugue a 100g durante 3 minutos.

5.3) Remueva el sobrenadante y vuelva a suspender los protoplastos en 9 ml de la solución A_4 (Cuadro 10.4). Añada lentamente 1 ml de la solución A_3, colocándola en capas sobre la suspensión de protoplastos en la solución A_4. Centrifugue a 100g durante 5 minutos.

5.4) Remueva los protoplastos de la interfase de las soluciones A_3/ A_4 con una pipeta Pasteur, suspéndalos de nuevo en 10 ml de medio, y centrifugue a 100g durante 3 minutos. Con la centrifugación, los protoplastos se sedimentan si el osmótico es manitol (solución A_3), sorbitol, glucosa o diferentes sales, y flotan si el osmótico es sacarosa, en cuyo caso los desechos se sedimentan. La flotación, en el procedimiento de lavado da como resultado una población pura de protoplastos de mesófilo viables e intactos.

Digitized by Google

Cuadro 10.4. Soluciones (de 100 ml) para el lavado de protoplatos.

Compuesto	Cantidades (mg) según el tipo de solución		
	A_3	A_4	A_5
$CaCl_2$ (mg)	50	50	50
KH_2PO_4 (mg)	10	10	10
Sacarosa (mg)	—	13,680	—
Manitol (mg)	7280	—	7280
Percoll® (%)	—	—	30
pH	5.6	5.6	5.6

5.5) Remueva el sobrenadante, vuelva a suspender los protoplastos en el medio de cultivo, y cultive según se describe más adelante.

Procedimiento III: aislamiento de protoplastos de suspensiones celulares. Las suspensiones celulares para el aislamiento de protoplastos deberán estar en la fase de división activa, con 2 ó 3 días de edad. Se procede así:

1) Trabajando con 5 ml de suspensión, separe las células por sedimentación y recójalas en tubos de ensayo cónicos de 15 ml; lave una vez con el medio de cultivo líquido.

2) Ajuste la suspensión a 2 ó 3 ml y añada un volumen igual de la mezcla de enzimas E_1 (Cuadros 10.2 y 10.3); trasfiera la solución a una caja Petri de 100 x 15 mm. La solución de enzimas E_1 se ha utilizado con éxito en el aislamiento de protoplastos de suspensiones celulares establecidas de trigo, zanahoria, perejil, remolacha y soya. A menudo se obtiene de las células hasta un 100% de protoplastos y no quedan restos importantes.

3) Incube las células a 22-25 °C durante 12 a 16 horas, con agitación lenta (50 rpm en un agitador giratorio).

4) Lave los protoplatos según el procedimiento que se describe para los protoplatos del mesófilo.

Procedimiento IV: aislamiento de protoplastos de puntas de brotes. Las puntas se obtienen de brotes estériles de rápido crecimiento obtenidos por cultivo de tejidos. Se procede así:

1) Corte puntas de 1 a 2 mm (meristemas con primordio foliar) dividiéndolas en varios pedazos, y colóquelas en una solución A_2 (Cuadro 10.2) en una caja Petri estéril.

Digitized by Google

2) Trasfiera las secciones a una mezcla 1:1 de la solución enzimática E_3 y de un medio de cultivo de protoplastos (Cuadros 10.2 y 10.3). Selle la caja Petri con Parafilm.

3) Incube las secciones toda la noche (12 a 16 horas) en la mezcla enzimática a 22-25 °C con agitación lenta (10 rpm).

4) Lave los protoplastos así:

   4.1) Con una pipeta Pasteur, pase los protoplastos en suspensión por un tamiz de acero inoxidable de malla de 60-70 µm o por un filtro de nylon.

   4.2) Trasfiera la solución de protoplastos a un tubo de ensayo cónico (15 ml) y centrifugue a 100g durante 5 minutos.

   4.3) Remueva el sobrenadante y vuelva a suspender los protoplastos en 9 ml de la solución A_5 (Cuadro 10.4). Coloque cuidadosamente una capa de 1 ml de solución A_3 sobre la solución A_5, y centrifugue a 100g durante 10 minutos. Debido a que muchos protoplastos de origen meristémico son pequeños y tienen citoplasma denso, a menudo se sedimentan cuando el regulador osmótico es sacarosa. Por consiguiente, para la flotación de estos protoplastos no es útil una solución A_4; en una solución A_5, que contine manitol 0.4 M como regulador osmótico y 30% de Percoll, todos estos protoplastos flotarán y formarán una banda definida en la interfase de las soluciones A_3/A_5.

   4.4) Con una pipeta Pasteur recoja los protoplastos de la interfase de las soluciones A_3/A_5, vuelva a suspenderlos en 10 ml de medio, y centrifugue a 100g durante 5 minutos.

   4.5) Remueva el sobrenadante, vuelva a suspender los protoplastos en el medio de cultivo, y cultive según se describe más adelante.

Características de los protoplastos aislados

Las poblaciones de protoplastos recién aislados reflejan las propiedades morfológicas y fisiológicas de las células de las cuales se derivan, y representan por tanto un material útil para los experimentos bioquímicos y fisiológicos (Galun, 1981).

Así, los protoplastos de mesófilo (Figura 10.1, A) contienen cloroplastos verdes y en la luz muestran actividad fotosintética (Gutiérrez et al., 1974). Los protoplastos de las suspensiones celulares (Figura 10.1, B), por

Digitized by Google

su parte, contienen a menudo granos de almidón; su tamaño y su actividad metabólica se asemejan a las del ciclo de crecimiento de la suspensión (Tewes et al., 1984). Los protoplastos aislados de las capas de aleurona de las semillas de avena secretan amilasa y RNAsa en presencia del ácido giberélico (Hooley, 1982). Los protoplastos de los nódulos de raíces de las leguminosas pueden reducir el acetileno, bajo ciertas circunstancias (Broughton et al., 1976).

Dado que los tejidos de la planta constan generalmente de diferentes tipos de células, las poblaciones de protoplastos aislados conservan la heterogeneidad del tejido original (Magnien et al., 1982); estas poblaciones mixtas de protoplastos se pueden reagrupar, por centrifugación, en gradientes iso-osmóticos de densidad (Harms et al., 1978; Fitzsimons et al., 1983; Nomura et al., 1982), o clasificarse por flujo y citometría (Harkins et al., 1984).

Otra característica de los protoplastos libres, adicional a la de su similitud con las células intactas, son los cambios claramente caracterizados en su metabolismo por efecto del estrés osmótico, de la remoción de la pared celular, de la ruptura de los plasmodesmos y del ambiente nuevo a que éstos están sometidos. El choque osmótico ocasiona cambios en el patrón del ARN y de la síntesis de proteínas, los cuales conducen a la aparición de las características 'proteínas de choque osmótico' (Fleck et al., 1982). En los protoplastos aislados se han detectado nuevas actividades enzimáticas como las de las nucleasas (Schaefer et al., 1981).

En comparación con lo que ocurre en los tejidos intactos, es relativamente más fácil aislar y purificar orgánulos celulares en los protoplastos mediante un proceso que incluye métodos graduales para que éstos conserven su integridad estructural y funcional. Así, los protoplastos del mesófilo constituyen una fuente adecuada para el aislamiento de cloroplastos (Horvath et al., 1978; Nishimura et al., 1976). También se pueden aislar vacuolas de diferentes células vacuolizadas; por ejemplo, de protoplastos originados en el tejido de almacenamiento de la remolacha roja (Smith et al., 1980). Se ha aislado la membrana plasmática de diferentes fuentes como de los protoplastos radicales (Lin, 1981) o de los protoplastos foliares (Perlin et al., 1980).

Los protoplastos de suspensiones celulares se pueden utilizar para el aislamiento de núcleos celulares (Ohyama et al., 1977; Tallman et al., 1980). También se han aislado cromosomas mitóticos de los protoplastos de suspensiones celulares sincronizadas (Hadlaczky et al., 1983; Malmberg et al., 1980; Szabados et al., 1981), y se pueden aislar cromosomas meióticos de protoplastos originados a partir de microesporocitos (Griesbach et al., 1982; Malmberg et al., 1980).

Digitized by Google

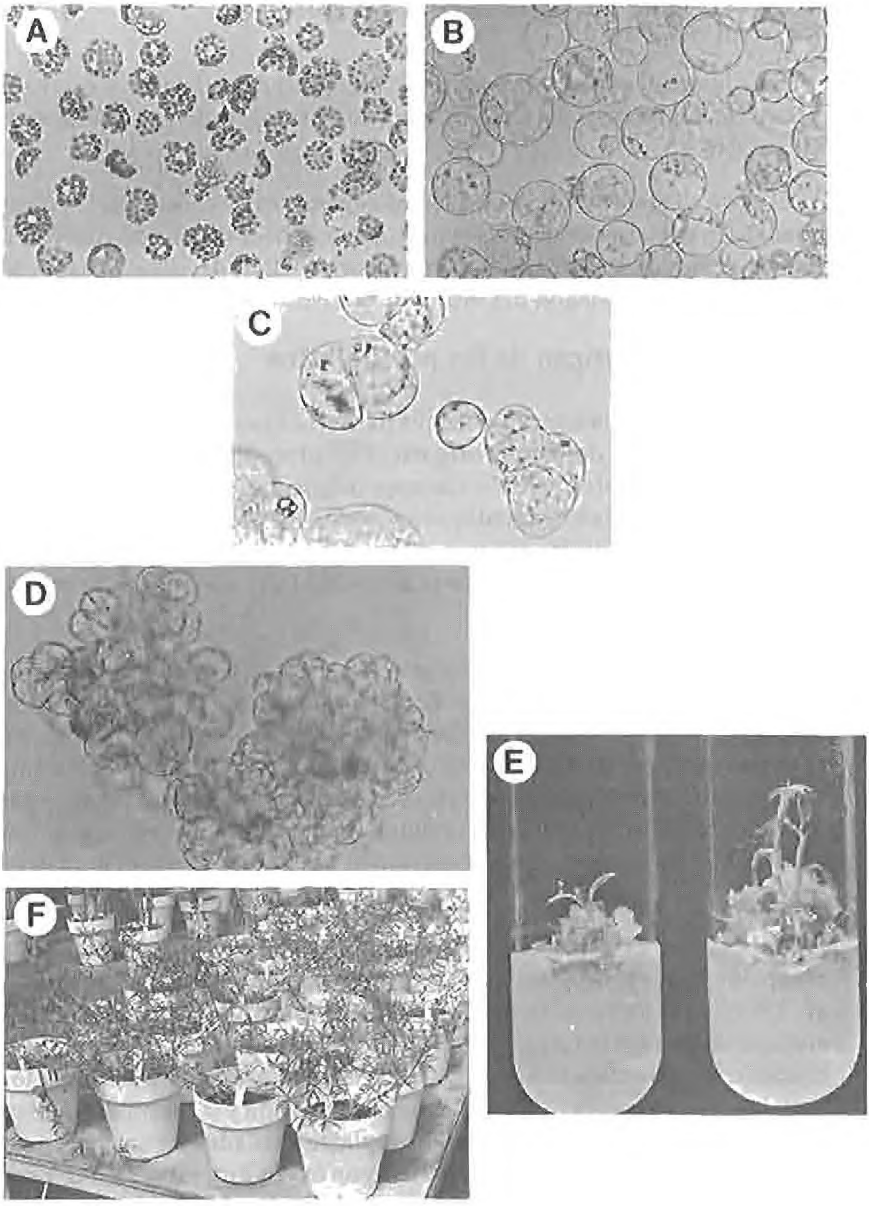


Figura 10.1. Aislamiento y desarrollo de protoplastos. Protoplastos recién aislados, ya sea de mesófilo (A) o de suspensión celular (B); primera división celular (C) y primeras colonias (D); finalmente, transferencia a un medio (E) para lograr la regeneración final de la planta (F).

Digitized by Google

Cultivo de Protoplastos Aislados

Una de las principales aplicaciones de la técnica de aislamiento de protoplastos es el cultivo de los mismos hasta obtener la regeneración de plantas (Figura 10.2).

El éxito en el cultivo de protoplastos depende de factores como a) tipo y edad del material de origen de los protoplastos; b) el sistema de cultivo y la densidad de los protoplastos contenidos en él; y de manera especial, c) adecuada composición del medio de cultivo.

Material de origen de los protoplastos

Se ha recalcado la importancia que para el cultivo de protoplastos tiene el carácter juvenil del tejido original. Los protoplastos de las regiones apicales de las plantas y de los vástagos originados por cultivo de tejidos generalmente brindan resultados superiores a los del mesófilo (Binding et al., 1981); en las células jóvenes es posible manejar más fácilmente la inducción y el mantenimiento de la actividad mitótica que en las células altamente especializadas.

Se ha encontrado que cuando se cultivan protoplastos derivados de suspensiones, el éxito del cultivo depende claramente de la calidad de la suspensión celular que se ha utilizado. Los protoplastos de suspensiones celulares que están en crecimiento logarítmico comienzan a dividirse muy rápidamente, mientras que los derivados de suspensiones más viejas —por ejemplo, en la fase de expansión celular— regeneran la pared celular y se dividen con menor frecuencia (Potrykus et al., 1979b; Tewes et al., 1984).

Por otra parte, también se ha encontrado que los protoplastos de las gramíneas son extremadamente recalcitrantes al cultivo; con la única excepción de los protoplastos provenientes de tallos de maíz (Potrykus et al., 1977), no se han podido cultivar exitosamente protoplastos de cereales aislados de plantas enteras. Los resultados negativos de numerosos experimentos han llevado a la conclusión de que las células diferenciadas de los cereales deben haber perdido el potencial de división y la totipotencialidad (Potrykus, 1980); en cambio, los protoplastos aislados de suspensiones celulares embriogénicas se han cultivado con éxito (Potrykus, 1979b; Vasil et al., 1980b; Lu et al., 1981; Jones et al., 1982; Vasil, 1983; Deka et al., 1976).

Digitized by Google

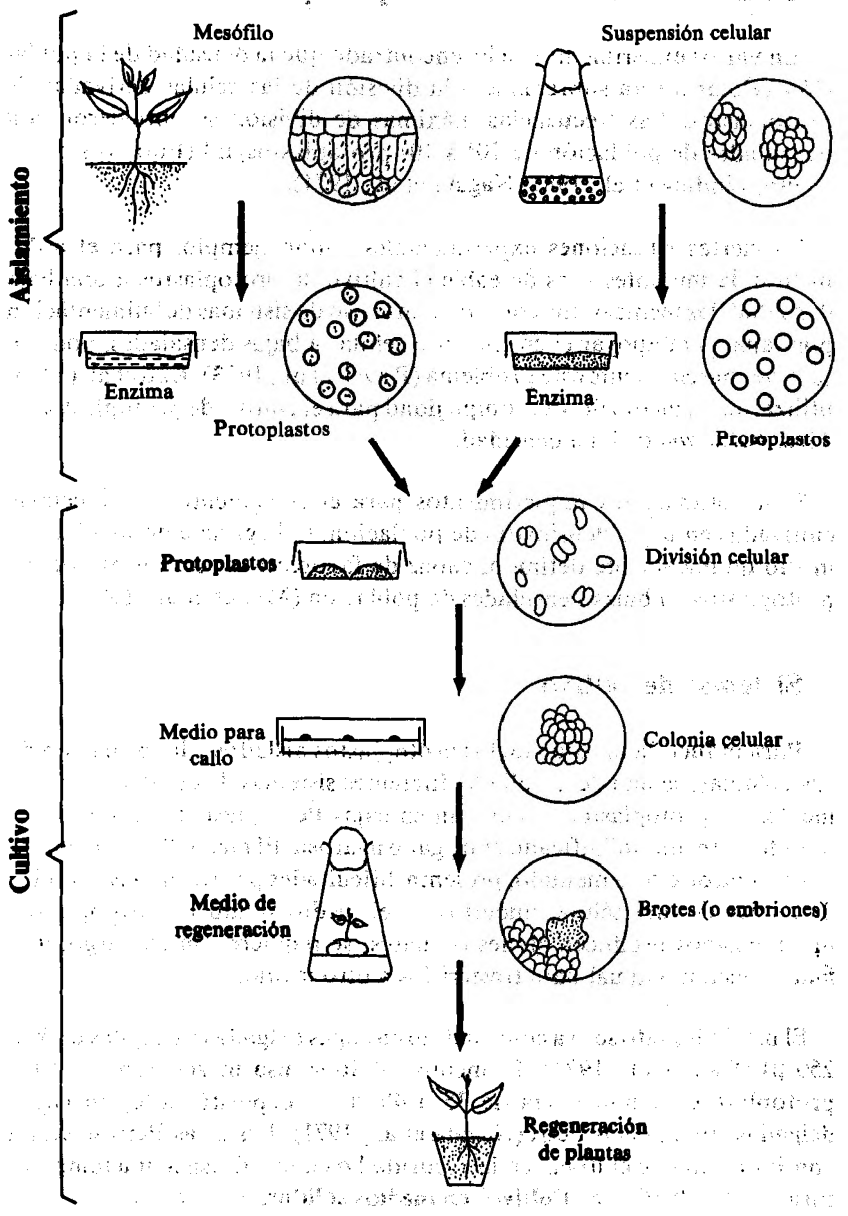


Figura 10.2. Proceso para el aislamiento de protoplastos de dos fuentes (mesófilo y suspensión celular) y para el cultivo de los mismos, hasta la regeneración de las plantas.

Digitized by Google

Densidad de población de los protoplastos

En varios experimentos se ha encontrado que la densidad de la población celular afecta sobremanera la división de las células derivadas de protoplastos. Las frecuencias máximas de división se obtuvieron con densidades de población de 10^4 a 10^5 protoplastos/ml (Potrykus et al., 1979b; Binding et al., 1981; Nagata et al., 1971).

En ciertas situaciones experimentales —por ejemplo, para el aislamiento de mutantes— es deseable el cultivo de protoplastos a una baja densidad; las técnicas que comprenden el uso de sistemas de 'alimentación por capa' para apoyar el crecimiento celular a bajas densidades, podrían resolver parcialmente este problema (Raveh et al., 1973). Kao et al. (1975) utilizaron un medio de alta complejidad para el cultivo de protoplastos de *Vicia hajastana* de baja densidad.

Si se estudian los requerimientos para el crecimiento de las células cultivadas en bajas densidades de población, se llegaría a desarrollar un medio químicamente definido, capaz de favorecer el crecimiento de los protoplastos en bajas densidades de población (Muller et al., 1983).

Sistemas de cultivo

Para inducir la división de los protoplastos aislados y la formación de sus colonias, se han desarrollado diferentes sistemas de cultivo. Generalmente, los protoplastos se cultivan en cajas Petri plásticas en un medio líquido, o en uno solidificado con agar o agarosa. El medio líquido tiene la desventaja de que, a menudo, presenta dificultades para aislar las colonias derivadas de una célula, mientras en el medio sólido los protoplastos inmovilizados producen clones celulares; se requiere, sin embargo, una manipulación manual para trasferirlos a otro medio.

El medio líquido se usa colocándolo en capas delgadas o en gotas de 50 a 250 µl (Kao et al., 1971). El medio sólido se usa mezclando en él los protoplastos cuando tenga de 35 a 40 °C, y depositándolo, en capas delgadas, en las cajas Petri (Nagata et al., 1971). Las cajas Petri se sellan con Parafilm y se cultivan en la oscuridad o en luz difusa a una temperatura de 24 a 28 °C (ver **Cultivos en medios sólidos**, más adelante).

Para obtener una alta frecuencia de división celular y lograr un crecimiento rápido de las células y colonias derivadas de los protoplastos, es necesaria la adición gradual de medio fresco con niveles reducidos de

Digitized by Google

estabilizadores osmóticos, o bien la trasferencia de las colonias en crecimiento a medios frescos (Binding et al., 1981; Jia, 1982; Kohlenbach et al., 1982; Shepard, 1982; Shekhawat et al., 1983).

En los sistemas de cultivo mencionados se han desarrollado varias combinaciones y modificaciones. Frecuentemente, los protoplastos se cultivan en un medio líquido, y las células en división o las microcolonias derivadas se cultivan en un medio sólido. Adams et al. (1983) utilizaron un medio solidificado de agarosa para el cultivo de protoplastos; cuando las colonias se habían desarrollado, el medio se volvió a derretir a 40 °C y las colonias se trasfirieron por medio de una pipeta.

Potrykus et al. (1979a) desarrollaron la técnica de las 'gotas múltiples en serie' (MDA, siglas en inglés de 'multiple drop array') para el ensayo rápido de numerosas combinaciones de componentes del medio de cultivo. Este sistema utiliza, como unidad experimental, el cultivo de gotas colgantes de 40 µl, las cuales se disponen en las cajas Petri según la combinación de gradientes de los factores. Las gotas colgantes permiten la observación de los protoplastos con el microscopio normal.

Para el cultivo individual de protoplastos se han desarrollado varios sistemas de cultivo. Kao (1977) y Gleba et al. (1973) utilizaron platos de 'Cuprak' con pequeños alvéolos donde era posible cultivar protoplastos individuales con solamente 0.25 µl de medio de cultivo. Koop et al. (1983) cultivaron protoplastos individuales en microgotas de medio de 10 a 25 µl; éstas se colocaban en una cámara de cultivo fabricada con un cubreobjetos y un marco de nitrato de celulosa, y sellada con una capa delgada de aceite universal.

Composición de los medios de cultivo

Los medios adecuados para el cultivo de protoplastos siguen generalmente el modelo de los utilizados para el cultivo de células in vitro; a menudo se han desarrollado diferentes modificaciones de los medios de Murashige et al. (1962) o de Gamborg et al. (1968).

Además de las similitudes con las células in vitro, en cuanto a sus requerimientos nutricionales, los protoplastos tienen ciertos requerimientos que se han analizado en varios experimentos (Kao et al., 1973; Jones et al., 1984; Tewes et al., 1984). Sin embargo, no existe un medio estándar para el cultivo de protoplastos aislados, a pesar de las extensivas investigaciones realizadas. Frecuentemente, los protoplastos originados de diferentes genotipos de la misma especie tienen diferentes requerimientos, los

Digitized by Google

cuales se deben satisfacer mediante el ajuste empírico de los procedimientos de cultivo (Shepard, 1982; Vardi et al., 1982).

Entre los medios de cultivo que se han utilizado con éxito en diferentes sistemas de protoplastos están: el medio '8p.' de Kao et al. (1975), el medio de Kao (Cuadro 10.5), el medio 'To' de Caboche (1980), el medio de Nagata et al. (1971).

Sales inorgánicas. Puesto que los protoplastos aislados tienen una eficiente captación de nutrimentos, la mayoría de los medios contienen bajos niveles de sustancias inorgánicas; la concentración del ion Ca++ puede ser mayor, ya que es crítico para la estabilización de los protoplastos (Kao et al., 1973).

Estabilizadores osmóticos. Todos los medios de cultivo de protoplastos contienen estabilizadores osmóticos, conocidos simplemente como osmóticos. Hay en los protoplastos diferentes niveles óptimos en relación con la presión osmótica y con el tipo de osmótico empleado; si se cultivan en medios no óptimos osmóticamente, es posible que haya un estrés celular y, como resultado, una baja eficiencia del cultivo (Takeuchi et al., 1982; Vardi et al., 1982; Smith et al., 1984).

Como osmóticos se utilizan generalmente azúcares como el sorbitol, el manitol, la glucosa y la sacarosa, en una concentración de 0.3-0.7 M. De ellos, la glucosa posee características superiores, ya que los protoplastos pueden metabolizarla gradualmente y de esta manera la presión osmótica disminuye paulatinamente (Binding et al., 1981; Kao et al., 1973).

Reguladores del crecimiento. La mayoría de los protoplastos requieren necesariamente las auxinas, y muchos también las citocininas, para la división celular; sin embargo, el tipo de las hormonas de crecimiento y su concentración en el medio se debería optimizar de manera cuidadosa, ya que las auxinas pueden ocasionar la vacuolización y ruptura de los protoplatos (Harms et al., 1979; Jia, 1982; Jones et al., 1982; Negrutiu, 1981; Takeuchi et al., 1982).

Ciertos protoplastos, como los de remolacha y los de *Lolium multiflorum*, derivados de suspensiones celulares se dividen también en un medio carente de hormonas (Szabados et al., 1985; Jones et al., 1982). Es interesante señalar además que las hormonas tienen un efecto inhibitorio en la división de los protoplastos de *Citrus* (Vardi et al., 1982).

Otros componentes. La mayoría de los medios para el cultivo de protoplastos están enriquecidos con algunos extractos naturales (AC, extracto de levadura, CH, aminoácidos, vitaminas, ácidos orgánicos, azúcares, etc.).

Digitized by Google

Cuadro 10.5. Medio de Kao para el cultivo de protoplastos.[a]

Componente	Cantidad (mg)	Componente	Cantidad (mg)
Sales minerales			
NH_4NO_3	600	KI	0.75
KNO_3	1,900	H_3BO_3	3.00
$CaCl_2.2H_2O$	600	$MnSO_4.H_2O$	10.00
$MgSO_4.7H_2O$	300	$ZnSO_4.7H_2O$	2.00
KH_2PO_4	170	$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
KCl	300	$CuSO_4.5H_2O$	0.025
Secuestrene 330-Fe	28	$CoCl_2.6H_2O$	0.025
Azúcares			
Glucosa	68,400	Manosa	125
Sacarosa	125	Ramnosa	125
Fructosa	125	Celobiosa	125
Ribosa	125	Sorbitol	125
Xilosa	125	Manitol	125
Acidos orgánicos[b]			
Piruvato de sodio	5	Acido málico	10
Acido cítrico	10	Acido fumárico	10
Vitaminas			
Inositol	100	Acido fólico	0.2
Tiamina-HCl	10	Riboflavina	0.1
Acido ascórbico	1	Acido p-aminobenzoico	0.01
Nicotinamida	1	Vitamina B_{12}	0.01
Piridoxina-HCl	1	Vitamina A	0.005
Pantotenato de calcio	0.5	Vitamina D_3	0.005
Cloruro de colina	0.5	Biotina	0.005
Hormonas			
2,4-D	0.2	Zeatina (ZEA)	0.5
Acido naftalenacético (ANA)	1		
Misceláneos			
Acido casamino, libre de vitaminas	125		
Agua de coco[c]	10[d]		
Agua destilada	1000[d]		

a. Se ajusta su pH a 5.7 con NaOH y se esteriliza con filtro.
b. Ajustados a un pH de 5.5 con NH_4OH
c. Agua de coco obtenida de frutos maduros, calentada a 60 °C durante 30 min, y filtrada.
d. Cantidades en mililitros.

Los medios de cultivo pueden ser líquidos o sólidos. A menudo se ha encontrado que la eficiencia del cultivo se reduce en un medio solidificado con agar, en comparación con un medio líquido o solidificado con agarosa

Digitized by Google

(Binding, 1974; Lorz et al., 1983); sin embargo, algunos tipos de protoplastos presentan una mayor tasa de división cuando se cultivan en un medio sólido (Takeuchi et al., 1982).

Procedimientos para el cultivo de protoplastos

Para el cultivo de los protoplastos, al igual que para su aislamiento, todas las operaciones se deben hacer asépticamente, sea que se trabaje con medios líquidos o con medios sólidos.

Cultivo en medios líquidos. Proceda así:

1) Suspenda en el medio de cultivo líquido los protoplastos aislados, hasta una densidad de 10^4 a 10^5 protoplastos/ml. La densidad óptima de la población debe determinarse experimentalmente para cada tipo de protoplastos.

2) Con una pipeta Pasteur vierta, en cajas Petri de 60 x 15 mm, 1 ml de suspensión en forma de gotas (5 gotas de 0.2 ml por caja). Los protoplastos también se pueden cultivar en una capa delgada de medio de cultivo (2 ml de suspensión por caja Petri de 60 x 15 mm).

3) Selle las cajas con Parafilm e incube en la oscuridad o en luz difusa, a 25-26 °C, en recipientes plásticos que contengan papel filtro húmedo.

4) Después de 1 a 2 semanas de cultivo, añada cada 7 días medio fresco a los cultivos, hasta cuando las colonias en desarrollo sean trasferidas a un medio diferente.

Para el cultivo de protoplastos de soya, tabaco, yuca, *Stylosanthes*, y otras especies se han utilizado varios medios de cultivo.

Cuando se haya logrado una división celular sostenida en los cultivos de protoplastos, las colonias desarrolladas se pueden trasferir a un medio que favorezca la regeneración de plantas.

Cultivos en medios sólidos. El medio sólido se usa para el cultivo de protoplastos aislados cuando se desea obtener de ellos clones celulares individuales (Nagata et al., 1971). El medio sólido contiene los mismos ingredientes que el medio líquido, pero está complementado con 0.6% de agar ó 0.4% de agarosa; la agarosa se considera superior para solidificar el medio de cultivo de los protoplastos.

Para el cultivo de protoplastos en un medio sólido se procede así:

Digitized by Google

1) Suspenda en un medio líquido los protoplastos purificados; mezcle esta suspensión con un volumen igual de un medio de agar derretido. Este medio debe contener 1.2% de agar o 0.8% de agarosa y conservarse a 40 °C hasta su utilización.

2) Vierta la mezcla en cajas Petri (60 x 15 mm ó 100 x 15 mm), formando una capa delgada que contenga de 3 a 10 ml del medio.

3) Selle las cajas Petri con Parafilm e incube según el procedimiento descrito anteriormente.

Desarrollo del cultivo de protoplastos

Los protoplastos aislados de suspensiones celulares regeneran más rápidamente las paredes celulares, y se dividen antes que aquellos cloroplastos aislados de tejidos diferenciados como el mesófilo; ello se debe a que, en estos tejidos, los protoplastos tienen que pasar primero por un proceso de 'desdiferenciación', mientras que en las suspensiones celulares los protoplastos están 'desdiferenciados' y tienen un metabolismo activo que conduce a divisiones precoces.

Regeneración de la pared celular. Cuando los protoplastos recién aislados se cultivan en un medio adecuado, regeneran rápidamente la pared celular. Klein et al. (1981) observaron que algunos minutos después de trasferir protoplastos de soya al medio de cultivo, aparecían sobre la superficie de éstos algunas fibrillas de celulosa y de otros polímeros; esto significa que los protoplastos empiezan a sintetizar la pared celular inmediatamente después de la digestión enzimática.

La pared celular primaria se forma a partir de las microfibrillas, después de 8 a 24 horas de cultivo; esto se puede observar en un microscopio de luz ultravioleta mediante coloración con 'Calcoflour White' (Galbraith et al., 1982; Nagata et al., 1971), o con un microscopio electrónico (Burgess et al., 1974; Klein et al., 1981). La pared celular primaria está compuesta de microfibrillas de celulosa dispuestas en forma poco compacta, que posteriormente se organizan para formar una pared celular típica (Fowke et al., 1974).

El depósito de la pared celular está controlado probablemente por el sistema de microtúbulos. En los protoplastos aislados, tales microtúbulos no se pueden observar en grupos ordenados, pero éstos se establecen al sintetizarse la nueva pared celular (Lloyd et al., 1980). Los inhibidores de la síntesis de la pared celular (p.ej., el 2,6-diclorobenzonitrilo, la cumarina)

Digitized by Google

no inhiben la condensación cromosómica, pero su presencia impide la síntesis de nueva pared y, por lo tanto, la división normal; así se producen protoplastos binucleados o poliploides (Galbraith et al., 1982).

División celular. Además de sintetizar la pared celular, los protoplastos adecuadamente cultivados aumentan de tamaño, forman filamentos citoplasmáticos, y presentan mayor actividad metabólica. La síntesis de ADN se inicia paralelamente a la síntesis de la pared celular pero no depende de ésta (Galbraith et al., 1982).

Las primeras divisiones se inician después de 1 a 7 días de cultivo, según el tipo de protoplastos (Figura 10.1, C). Si después de la primera mitosis las divisiones siguen ocurriendo en forma sostenida, en 1 a 3 semanas se forman pequeñas colonias (Figura 10.1, D).

Las divisiones mitóticas de los protoplastos cultivados están controladas por los reguladores del crecimiento; las auxinas y las citocininas controlan los cambios en la expresión del gen, la síntesis de ácidos nucleicos y de proteínas, la elongación celular, y la división misma (Cooke et al., 1981; Hasezawa et al., 1983; Meyer et al., 1981).

Evaluación de la eficiencia del cultivo

Existen varias formas de estimar la eficiencia del cultivo basadas principalmente en cálculos de la viabilidad de los protoplastos aislados y de su supervivencia, de la regeneración de células, de la frecuencia de la división celular, y de las colonias obtenidas en relación con los protoplastos sembrados.

Para evaluar la viabilidad de los protoplastos aislados, se utilizan generalmente sustancias como los reactivos de fluorescencia, por ejemplo el diacetato de fluoresceína (FDA) y el isocianato de fluoresceína. El mecanismo de coloración se basa en la segmentación de la molécula de FDA por las esterasas endógenas, con la liberación posterior de fluoresceína, la cual presenta fluorescencia con la luz ultravioleta.

Un indicador confiable de las células muertas o no viables es la fenosafranina (Widholm, 1972; Bornman et al., 1982). Para calcular la viabilidad relativa y la supervivencia de los protoplastos de las plantas se han utilizado otras técnicas tales como la corriente citoplasmática y la plasmólisis. La tasa de supervivencia (TS) se calcula así:

$$TS = \frac{\text{Protoplastos que sobreviven (no.)}}{\text{Total de protoplastos (no.)}} \times 100 \qquad (1)$$

Digitized by Google

La regeneración de la pared celular es una condición para que los cultivos de protoplastos prosperen; esta pared se puede visualizar fácilmente con 'Calcofluor White' en un microscopio de luz ultravioleta (Nagata et al., 1970). El coeficiente de células regeneradas (CCR) se calcula así:

$$CCR = \frac{\text{Protoplastos con pared celular (no.)}}{\text{Total de protoplastos (no.)}} \times 100 \qquad (2)$$

La frecuencia de la división, otra forma de evaluar la eficiencia del cultivo, se verifica de 7 a 10 días de iniciado éste, comparando el número de protoplastos en división con el número de protoplastos cultivados o de protoplastos que sobreviven. La frecuencia absoluta de división (FAD) es:

$$FAD = \frac{\text{Células en división (no.)}}{\text{Total de protoplastos cultivados (no.)}} \times 100 \qquad (3)$$

La frecuencia relativa de división (FRD) es:

$$FRD = \frac{\text{Células en división (no.)}}{\text{Células que sobreviven (no.)}} \times 100 \qquad (4)$$

Los índices anteriores expresan la efectividad del período incial; puesto que éste es un período sumamente crítico en el cultivo, tales valores también caracterizan adecuadamente la eficiencia del cultivo (EC); éste se relaciona con el número de colonias regeneradas, en función de los protoplastos cultivados, así:

$$EC = \frac{\text{Colonias regeneradas (no./caja)}}{\text{Protoplastos sembrados (no./caja)}} \times 100 \qquad (5)$$

El índice EC expresa la capacidad de los protoplastos para dividirse sostenidamente y para formar colonias.

Regeneración de las Plantas

Una vez logrado un ritmo sostenido de división celular, las colonias desarrolladas se pueden trasferir a un medio que conduzca a la generación de plantas (Figuras 10.1, E y 10.1, F). Esto se logró por primera vez en tabaco (Takebe et al., 1971).

Digitized by Google

En muchas especies, la iniciación de los brotes requiere del uso de citocininas, y la regeneración de la planta se efectúa con la diferenciación separada de la raíz y del brote (Bokelman et al., 1983; Bourgin et al., 1979; Binding et al., 1981). En el Cuadro 10.6 se presentan los resultados obtenidos con el cultivo de protoplastos de varias especies vegetales.

Cuadro 10.6. Resultados obtenidos con el cultivo de protoplastos de varias especies vegetales, aislados de diferentes fuentes.

Fuente de los protoplastos	Especies ensayadas	Resultados[a]	Referencias
Mesófilo	*Brassica napus*	C/E	Kohlenbach et al., 1982
	Brassica napus	Pl	Kartha et al., 1974
	Cichorium intybus	Pl	Crepy et al., 1982
	Fagus silvatica	D	Ahuja, 1984
	Glycine max	C	Gamborg et al., 1983
	Lycopersicon peruvianum	C	Adams et al., 1983
	Lycopersicon peruvianum	Pl	Zapata et al., 1981
	Manihot esculenta	C/Pl	Shahin et al., 1980
	Medicago spp.	C/E	Johnson et al., 1982
	Nicotiana spp.	Pl	Bourgin et al., 1979
	Nicotiana tabacum	C	Nagata et al., 1970
	Nicotiana debneyi	Pl	Scowcroft et al., 1980
	Petunia inflata	Pl	Power et al., 1976
	P. violacea, P. axillaris	Pl	Power et al., 1976
	Solanum tuberosum	Pl	Shepard, 1982
	Solanum tuberosum	C	Adams et al., 1983
	Stylosanthes guianensis	Pl	Szabados y Roca, 1986
Suspensiones celulares	*Beta vulgaris*	C	Szabados et al., 1985
	Bromus inermis	C	Michayluk et al., 1975
	Daucus carota	Pl	Grambow, 1972
	Digitalis lanata	C	Dietrich et al., 1982
	Elalis quinensis	C	Boss et al., 1984
	Glycine spp.	C/C	Gamborg et al., 1983
	Glycine max	C	Michayluk et al., 1975
	Lolium multiflorum	C	Jones et al., 1982
	Lycorpersicon spp.	Pl	Koblitz et al., 1982
	Panicum miliaceum	E/Pl	Heyser, 1984
	Parthenocissus tricuspidata (agalla de la corona)	C	Scowcroft et al., 1975
	Pennisetum americanum	E/Pl	Vasil et al., 1980b
	Saccharum spp.	C	Larkin, 1982
	Vicia hajastana	C	Michayluk et al., 1975
	Zea mays	C	Potrykus et al., 1979b
Puntas de brotes	*Manihot esculenta*	C	Szabados (no publicado)
	Solanum dulcamara (haploide)	Pl	Binding et al., 1984

(Continúa)

Digitized by Google

Cuadro 10.6. Continuación.

Fuente de los protoplastos	Especies ensayadas	Resultados[a]	Referencias
Células guardianas (estomas)	*Allium cepa*	P	Schnabl et al., 1978
	Commelina communis	P	Fitzsimons et al., 1983
	Vicia faba	C	Schnabl et al., 1978
Aleuronas de semillas	*Avena fatua*	C	Hooley, 1982
Embriones somáticos	*Brassica napus* (haploide)	Pl	Kohlenbach et al., 1982
	Daucus carota	E	Nomura et al., 1983
	Daucus carota	P	Nomura et al., 1982
	Manihot esculenta	C	Szabados (no publicado)
Cotiledones	*Pinus pinaster*	C	David et al., 1984
	Pinus coulteri	C	Patel et al., 1984
Raíces	*Glycine max*	C	Xu, 1982
	Lycopersicon esculentum	P	Cocking, 1960
Hipocótilo	*Brassica* sp.	Pl	Glimelius, 1984
Callo embriogénico	*Citrus* sp.	Pl	Vardi et al., 1982
	Coffea arabica	C	Sondahl et al., 1980

a. P = Protoplastos aislados; D = división celular; C = callo; V = vástago; E = embrión; Pl = regeneración de plantas.

Si se utilizan protoplastos de cultivos celulares formadores de embriones, las células recién formadas pueden producir los embriones directamente y regenerar las plantas mediante la embriogénesis somática (Kohlenbach et al., 1982; Shekhawat et al., 1983; Zapata et al., 1981).

Para la utilización de la tecnología de protoplastos en las manipulaciones genéticas, la alta frecuencia en la regeneración de plantas es un prerrequisito (Thomas et al., 1979). Se han descrito sistemas de regeneración protoplastos-planta en varias especies, aunque generalmente la eficiencia es baja; sólo en algunas especies de los géneros *Daucus*, *Nicotiana*, *Petunia*, *Datura*, *Brassica* y *Solanum* se ha desarrollado una frecuencia de regeneración de plantas alta y reproducible en otros trabajos.

La mayoría de las especies de importancia económica fracasan en la regeneración de plantas a partir de protoplastos o presentan una regeneración apenas ocasional, que a veces está restringida a ciertos genotipos o células (Vasil, 1983; Vasil et al., 1980a; Gamborg et al., 1981). La papa es la única especie importante que se ha podido obtener por cultivo de protoplastos, y en ella la eficiencia de regeneración ha alcanzado tal nivel, que

Digitized by Google

actualmente es posible aplicar esa tecnología a los programas de fitomejoramiento de la especie (Bokelman et al., 1983; Shepard, 1982; Shepard et al., 1980; Wenzel et al., 1979).

Referencias

Adams, T. L. y Townsend, J. A. 1983. A new procedure for increasing efficiency of protoplast plating and clone selection. Plant Cell Reports 2:165-168.

Ahuja, M. R. 1984. Isolation and culture of mesophyll protoplasts from mature beech trees. Silva Genetica 33:37-39.

Bass, A. y Hughes, W. 1984. Conditions for isolation and regeneration of viable protoplasts of oil palm (*Eleaeis guineensis*). Plant Cell Reports 3:169-171.

Binding, H. 1974. Regeneration von haploiden und diploiden pflanzen aus protoplasten von *Petunia hybrida* L. Z. Pflanzenphysiol. 74:327-356.

———; Nehls, R.; Kock, R.; Finger, J. y Mordhorst, G. 1981. Comparative studies on protoplast regeneration in herbaceus species of the *Dicotyledoneae* class. Z. Pflanzenphysiol. 101:119-130.

———; Jain, S. M.; Finger, J.; Mordhorst, G.; Nehls, R. y Gressel, J. 1982. Somatic hybridization of an atrazine resistant biotype of *Solanum nigrum* with *Solanum tuberosum*; 1: Clonal variation in morphology and in atrazine sensitivity. Theor. Appl. Genet. 63:273-277.

——— y Moralhorst, G. 1984. Haploid *Solanum dulcamara* L. shoot culture and plant regeneration from isolated protoplasts. Plant Sci. Lett. 35:77-79.

Bokelman, G. S. y Roest, S. 1983. Plant regeneration from protoplasts of potato (*Solanum tuberosum*. cv. Bintje). Z. Pflanzenphysiol. 109:259-265.

Bornman, J. F.; Bornman, C. H. y Bjorn, L. O. 1982. Effects of ultraviolet radiation on viability of isolated *Beta vulgaris* and *Hordeum vulgare* protoplasts. Z. Pflanzephysiol. 105:297-306.

Bourgin, J. P. 1978. Valine-resistant plants from in vitro selected tobacco cells. Molec. Gen. Genet. 161:225-230.

———; Chupeau, Y. y Missonier, C. 1979. Plant regeneration from mesophyll protoplast of several *Nicotiana* species. Physiol. Plant. 45:288-292.

Broughton, W. J.; Wooi, K. C. y Hoh, C. H. 1976. Acetylene reduction by legume root nodule protoplasts. Nature 262(5565):208-209.

Burgess, J. y Fleming, E. N. 1974. Ultrastructural observations of cell wall regeneration around isolated tobacco protoplasts. J. Cell. Sci. 14:439-449.

Digitized by Google

Caboche, M. 1980. Nutritional requeriments of protoplasts-derived haploid tobacco cells grown at low cell densities in liquid medium. Planta 149:7-18.

Cocking, E. C. 1960. A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. Nature 187:927-929.

Cooke, R. y Meyer, Y. 1981. Hormonal control of tobacco protoplasts nucleic acid metabolism during *in vitro* culture. Planta 152:1-7.

Crepy, L.; Chupeau, M. C. y Chupeau, Y. 1982. The isolation and culture of leaf protoplast of *Cichorium intybus* and their regeneration into plants. Z. Pflanzenphysiol. 107:123-131.

David, H.; Jarlet, E. y David, A. 1984. Effects of nitrogen source, calcium concentration and osmotic stress on protoplasts and protoplast-derived cell cultures of *Pinus pinaster* cotyledons. Physiol. Plant. 61:477-482.

Deka, P. C. y Sen, S. K. 1976. Differentiation in calli originated from isolated protoplasts of rice (*Oryza sativa* L.) through plating technique. Mol. Gen. Genet. 149:239-243.

Dietrich, B.; Newman, D. y Lucknes, M. 1982. Clonation of protoplast-derived cells of *Digitalis lanata* suspension cultures. Biochem. Physiol. 177:176-183.

dos Santos, A. V. P.; Outka, D. E.; Cocking, E. C. y Davey, M. R. 1980. Organogenesis and somatic embryogenesis in tissues derived from leaf protoplasts and leaf explants of *Medicago sativa*. Z. Pflanzenphysiol. 99:261-270.

Fitzsimons, P. J. y Weyers, J. D. B. 1983. Separation and purification of protoplast types from *Cammelia communis* L. leaf epidermis. J. Exp. Bot. 34:49-60.

Fleck, J.; Durr, A.; Fritsch, C.; Venut, T. y Histh, L. 1982. Osmotic-shock 'stress proteins' in protoplasts of *Nicotiana sylvestris*. Plant Sci. Lett. 26:159-165.

Fowke, L. C.; Bech-Hansen, C. W. y Gamborg, O. L. 1974. Electron microscopy observation of cell regeneration from cultured protoplasts of *Amni visnaga*. Protoplasma 79:235-248.

Galbraith, D. W. y Shields, B. A. 1982. The effects of inhibitors of cellwall synthesis on tobacco protoplast development. Physiol. Plant 55:25-30.

Galun, E. 1981. Plant protoplasts as physiological tools. Ann. Rev. Plant Physiol. 32:237-266.

———. 1982. Somatic cell fusion for inducing cytoplasmic exchange: A new biological system for cytoplasmic genetics in higher plants. En: Vasil, I. K., Scowcroft, W. R. y Frey, K. J. (eds.). Plant improvement and somatic cell genetics. Academic Press. p. 205-219.

Gamborg, O. L.; Miller, R. A. y Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50:151-158.

Digitized by Google

——— y Bottino, P. J. 1981. Protoplasts in genetic modifications of plants. Advance in Biochemical Engineering 19:239-263.

———; Davis, B. P. y Stalhut, R. W. 1983. Cell division and differentiation in protoplasts from cell cultures of *Glycine* species and leaf tissue of soybean. Plant Cell Reports 2:213-215.

Giaja, J. 1919. Emploi des ferments dans les études de physiologie cellulaire: Le globule de levure depouillé de sa membrane. C. R. Sc. Biol. Fil. Paris 82:719.

Gleba, Y. Y.; Mamot, V. P.; Cherep, N. N. y Skarzynskaya, M. V. 1982. Intergeneric hybrid cell lines of *Atropa belladona* x *Nicotiana chinensis* obtained by cloning individual protoplast fusion products. Theor. Appl. Genet. 62:75-79.

Glimelius, K. 1984. High growth rate and regeneration capacity of hypocotyl protoplasts in some *Brassicacae*. Physiol. Plant. 61:38-44.

Grambow, H. J.; Kao, K. N.; Miller, R. A. y Gamborg, O. L. 1972. Cell division and plant development from protoplasts of carrot cell suspension cultures. Planta 103:348-355.

Griesbach, R. J.; Malmberg, R. L. y Carlson, P. S. 1982a. An improved technique for the isolation of higher plant chromosomes. Plant Sci. Lett. 24:55-60.

———; ——— y ———. 1982b. Uptake of isolated lily chromosome by tobacco protoplasts. J. Heredity 73:151-152.

Gutiérrez, M.; Kanai, R.; Huber, S. C.; Ku, S. B. y Edwards, G. E. 1974. Photosynthesis in mesophyll protoplasts of bundle sheath cells of various types of C-4 plants. Z. Pflanzenphysiol. 72:305-319.

Hadlaczky, Gy; Bisztray, Gy; Praznovszky, T. y Dudits, D. 1983. Mass isolation of plant chromosomes and nuclei. Planta 157:278-285.

Harkins, K. R. y Galbraith, D. W. 1984. Flow sorting culture of plant protoplasts. Physiol. Plant. 60:43-52.

Harms, C. T. y Potrykus, I. 1978. Fractionation of plant protoplasts types by iso-osmotic density gradient centrifugation. Theor. Appl. Genet. 53:57-63.

———; Lorz, H. y Potrykus, I. 1979. Multiple-drop-array (MDA) technique for the large-scale testing of culture media variation in hanging microdrop cultures of single cell systems; 2: Response in *Nicotiana tabacum* protoplast cultures. Plant Sci. Lett. 14:237-244.

Hasezawa, S. y Syono, K. 1983. Hormonal control of elongation of tobacco cells derived from protoplasts. Plant Cell Physiol. 24:127-132.

Heyser, J. W. 1984. Callus and shoot regeneration from protoplasts of praso millet (*Panicum miliaceum* L.), Z. Pflanzenphysiol 113:293-299.

Digitized by Google

Hooley, R. 1982. Protoplasts isolated from aleurone layers of wild oat (*Avena fatua* L.) exhibit the classic response to gibberellic acid. Planta 154:29-40.

Horvath, G.; Droppa, M.; Mustárdy, L. A. y Faludi-Dániel, A. 1978. Functional characteristics of intact chloroplasts isolated from mesophyll protoplasts and bundle sheath cells of maize. Planta 141:239-244.

Jia, S. R. 1982. Factors affecting the division frequency of pea mesophyll protoplasts. Can. J. Bot. 60:2192-2196.

Johnson, L. B.; Stuteville, D. L.; Higgins, R. K. y Douglas, H. L. 1982. Pectolyase Y-23 for isolating mesophyll protoplasts from several *Medicago* species. Plant Sci. Lett. 26:133-137.

Jones, M. G. K. y Dale, P. J. 1982. Reproducible regeneration of callus from suspension culture protoplasts of the grass *Lolium multiflorum*. Z. Pflanzenphysiol. 105:267-274.

Kado, C. I. y Keinhofs, A. 1980. Genetic modification of plant cells through uptake of foreign DNA. Int. Rev. Cytol. Suppl. 11B.

Kao, K. N. 1977. Chromosomal behaviour in somatic hybrids of soybean *Nicotiana glauca*. Mol. Gen. Genet. 150:225-230.

———. 1982. Plant protoplast fusion and isolation of heterokaryocites. En: Wetter, L. R. y Constabel, F. (eds.). Plant tissue culture methods. National Research Council of Canada, Saskatoon, Canadá. p. 49-56.

———; Gamborg, O. L.; Miller, R. A. y Keller, W. A. 1971. Cell divisions in cells regenerated from protoplasts of soybean and *Haplopappus gracilis*. Nature New Biology 232:124.

———; ———; Michayluk, M. R.; Keller, W. A. y Miller, R. A. 1973. The effect of sugars and inorganic salts on cell regeneration and sustained cell division in plant protoplasts. En: Protoplasts et fusion de cellules somatiques végétales. CNRS, París. p. 207-213.

——— y Michayluk, M. R. 1975. Nutritional requeriments for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at very low population density in liquid media. Planta 126:105-110.

——— y ———. 1980. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of alfalfa. Z. Pflanzenphysiol. 96:135-141.

Kartha, K. K.; Michayluk, M. R.; Kao, K. N.; Gamborg, O. L. y Constabel, F. 1974. Callus formation and plant regeneration from leaf mesophyll protoplasts of rape plantas (*Brassica napus* L. cv. Zephyr). Plant Sci. Lett. 3:265-271.

Klein, A. S.; Montezinos, D. y Delmer, D. P. 1981. Cellulose and 1,3-glucan synthesis during the early stages of wall regeneration in soybean protoplasts. Planta 152:105-114.

Digitized by Google

Klercker, J. 1982. Eine methode zur isollerung lebender protoplasten ofvers vetensk. Akad. Forth. Sotkh. 49:463.

Koblitz, H. y Koblitz, D. 1982. Experiments on tissue culture in the genus *Lycopersicon* Miller: Shoot formation from protoplasts of tomato long term cultures. Plant Cell Reports 1:147-150.

Kohlenbach, H. W.; Wenczel, G. y Hoffmann, F. 1982. Regeneration of *Brassica napus* plantlets in cultures of isolated protoplasts of haploid stem embryos as compared with leaf protoplasts. Z. Pflanzenphysiol. 105:131-142.

Koop, H. U.; Weber, G. y Schweiger, H. G. 1983. Individual culture of selected single cells and protoplasts in microdroplets of defined media. Z. Pflanzenphysiol. 112:21-34.

Larkin, P. J. 1982. Surgarcane tissue and protoplast culture. Plant Cell Tissue & Organ Culture 1:149-164.

Lin, W. 1981. Inhibition of anion transport in corn root protoplasts. Plant Physiol. 68(2):435-438.

Lloyd, C. W.; Slabas, A. R.; Powell, A. J.; MacDonald, G.; Lowe, S. B. y Peace, G. 1980. Microtubules in higher plant cells and protoplasts. En: Ferenczy, L. y Farkas, G. L. (eds.). Advances in protoplasts research. Akadémiai Kiadó, Budapest. p. 469-474.

Lorz, H.; Larkin, P. J.; Thomson, J. y Scowcroft, W. R. 1983. Improved protoplasts culture and agarose media. Plant Cell Tissue & Organ Culture 2:217-226.

Lu, C.; Vasil, V. y Vasil, I. K. 1981. Isolation and culture of protoplasts of *Panicum maximum* Jack. (Guinea grass): Somatic embryogenesis and plantlet formation. Z. Pflanzenphysiol. 104:311-318.

Magnien, E.; Dalschaert, X. y Faraoni-Sciamanna, P. 1982. Transmission of a cytological heterogeneity from the leaf to the protoplasts in culture. Plant Sci. Lett. 25;291-303.

Malmberg, R. L. y Griesbach, R. J. 1980. The isolation of mitotic and meiotic chromosomes from plant protoplasts. Plant Sci. Lett. 17:141-147.

Meyer, Y. y Chartier, Y. 1981. Hormonal control of mitotic development in tobacco protoplasts. Plant Physiol. 68:1273-1278.

Michayluk, M. R. y Kao, K. N. 1975. A comparative study of sugars and sugar alcohols on cell regeneration and sustained cell division in plant protoplasts. Z. Pflanzenphysiol. 75:181-185.

Muller, J. F.; Missionier, C. y Caboche, M. 1983. Low density growth of cells derived fron *Nicotiana* and *Petunia* protoplasts: Influence of the source of protoplasts and comparison of the growth promoting activity of various auxins. Physiol. Plant 57:35-41.

Digitized by Google

Murashige, T. y Skoog, G. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.

Nagata, T. y Takebe, H. 1970. Cell wall regeneration and cell division in isolated tobacco mesophyll protoplasts. Planta 92:301-308.

——— y ———. 1971. Plating of isolated tobacco mesophyll protoplasts on agar medium. Planta 99:12-20.

Negrutiu, I. 1981. Improved conditions for large scale culture, mutagenesis, and selection of haploid protoplasts of *Nicotiana plumbaginifolia* Viviani. Z. Pflanzenphysiol. 104:431-442.

Nishimura, M.; Graham, D. y Akazawa T. 1976. Isolation of intact chloroplasts and other cell organelles from spinach leaf protoplasts. Plant Physiol. 58:309-314.

Nomura, K.; Nitta, T.; Fujimura, T. y Komamine, A. 1982. Isolation of protoplasts from somatic embryos of carrot. Plant Cell Tissue & Organ Culture 1:211-219.

Nomura, K. L.; Fukuei, K. y Nitta, T. 1983. Culture of protoplasts isolated from somatic embryos of carrot. Plant Sci. Lett. 29:1-7.

Ohyama, K.; Pelcher, L. E. y Horn, D. 1977. A rapid simple method for nuclei isolation from protoplasts. Plant Physiol. 60:179-181.

Patel, K. R.; Shekhrawat, N. S.; Berlya, G. P. y Thorpe, T. A. 1984. Isolation and culture of protoplasts from cotyledons of *Pinus leulteri* D. Dew. Plant Cell Tissue & Organ Culture 3:85-90.

Perlin, D. S. y Spanswick, R. M. 1980. Labelling isolation of plasma membranes from corn leaf protoplasts. Plant Physiol. 65:1053-1057.

Potrykus, I. 1980. The old problem of protoplast culture: Cereals. En: Ferenczy, L. y Farkas, G. L. (eds.). Advances in protoplast research. Akadémiai Kiadó, Budapest, Hungría. p. 243-253.

———; Harms, C. T.; Lorz, H. y Thomas, E. 1977. Callus formation from stem protoplasts of corn (*Zea mays* L.). Mol. Gen. Genet. 156:347-350.

———; ——— y ———. 1979. Multiple-drop-array (MDA) technique for the large scale testing of culture media variations in hanging microdrop cultures of single cell systems; 1: The technique. Plant Sci. Lett. 14:231-235.

———; ——— y ———. 1979b. Callus formation from cell culture protoplasts of corn (*Zea mays* L.). Theor. Appl. Genet. 54:209-214.

Power, J. B.; Frearson, E. M.; George, D.; Evans, P. K.; Berry, S. F. y Cocking, E. C. 1976. The isolation, culture and regeneration of leaf protoplasts in the genus *Petunia*. Plant Sci. Lett. 7:51-55.

Digitized by Google

Raveh, D.; Huberman, E. y Galun, E. 1973. *In vitro* culture of tobacco protoplasts: Use of feeder techniques to support division of cells plated at low densities. In Vitro 9:216-222.

Ruesink, A. 1980. Protoplasts of plant cells. Methods in Enzymology 69:69-84.

Schaefer, A.; Ohyama, K. y Gamborg, O. L. 1981. Detection by agarose gel electrophoresis of nucleases associated with cells and protoplasts from plant suspension cultures using *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. Agric. Biol. Chem. 45:1441-1445.

Schnabl, H.; Boruman, Ch. y Ziegler, H. 1978. Studies on isolated starch containing (*Vicia faba*) and starch deficient (*Allium cepa*) guard cell protoplasts. Planta 149:280-282.

Scowcroft, W. R.; Davey, M. R. y Power, J. B. 1975. Crown gall protoplasts isolation, culture, and ultrastructure. Plant Sci. Lett. 1:451-456.

——— y Larkin, P. J. 1980. Isolation culture and plant regeneration from protoplasts of *Nicotiana debneyi*. Aust. J. Plant Physiol. 7:635-644.

Shahin, E. A. y Shepard, J. F. 1980. Cassava mesophyll protoplasts: Isolation, proliferation and shoot formation. Plant Sci. Lett. 14:459-465.

Shekhawat, N. S. y Galston, A. W. 1983. Isolation, culture and regeneration of moth bean, *Vigna aconitifolia*, leaf protoplasts. Plant Sci. Lett. 32:43-51.

Shepard, J. F. 1982. Cultivar dependent cultural refinements in potato protoplasts regeneration. Plant Sci. Lett. 26:127-132.

——— y Totten, R. E. 1977. Mesophyll cell protoplasts of potato; isolation, proliferation and plant regeneration. Plant Physiol. 60:313-316.

———; Bidney, D. y Shahin, E. 1980. Potato protoplasts in crop improvement. Science 208:17-24.

Slabas, R. A.; Powell, A. J. y Lloyd, C. W. 1980. An improved procedure for the isolation and purification of protoplasts from carrot suspension culture. Planta 147:283-286.

Smith, M. A. L.; Palta, J. P. y McCown, B. H, 1984. The measurement of isotonicity and maintenance of osmotic balance in plant protoplast manipulations. Plant Sci. Lett. 33:249-258.

Smith, R. y Poole, R. J. 1980. Isolation of protoplasts and vacuoles from storage tissue of red beet. Plant Physiol. 66:25-28.

Sondahl, M. R.; Chapman, M. S. y Sharp, W. R. 1980. Protoplast liberation, cell wall reconstitution and callus proliferation in *Coffea arabica* L. callus cultures. Turrialba 30:161-165.

Digitized by Google

Szabados, L.; Hadlaczky, Gy. y Dudits, D. 1981. Uptake of isolated plant chromosomes by plant protoplasts. Planta 151:141-145.

——— y Gaggero, C. 1985. Callus formation from protoplasts of a sugarbeet cell suspension culture. Plant Cell Reports 4:195-198.

——— y Roca, W. 1986. Regeneration of isolated mesophyll and cell suspension protoplasts to plants in *Stylosanthes guianensis*, a tropical forage legume. Plant Cell Reports 5(3):174-177.

Takebe, I.; Lalib, G. y Melchers, G. 1971. Regeneration of whole plants from isolated mesophyll protoplasts of tobacco. Naturwissenschaften 58:318-320.

Takeuchi, Y. y Komamine, A. 1982. Effects of culture conditions on cell division and composition of regenerated cell walls in *Vinca rosea* protoplasts. Plant & Cell Physiol. 23:249-255.

Tallman, G. y Reeck, G. R. 1980. Isolation of nuclei from plant protoplasts without the use of a detergent. Plant Sci. Lett. 18:271-275.

Tewes, A.; Glund, K.; Walther, R. y Reinbothe, H. 1984. High yield isolation and rapid recovery of protoplasts from suspension cultures of tomato (*Lycopersicon sculentum*). Z. Pflanzenphysiol. 113:141-150.

Thomas, E.; King, P. J. y Potrykus, I. 1979. Improvement of crop plants via single cells *in vitro*: An assessment. Z. Pflanzenzuchtung 82:1-30.

Vardi, A.; Spiegel-Roy, P. y Galum, E. 1982. Plant regeneration from *Citrus* protoplasts: Variability in methodological requirements among cultivars and species. Theor. Appl. Genet. 62:171-176.

Vasil, I. K. 1983. Regeneration of plants from single cells of cereals and grasses. En: Lurquin, P. F. y Kleinhofs, A. (eds.). Genetic engineering in eukaryotes. Plenum Publising Corporation. p. 233-252.

——— y Vasil, V. 1980a. Isolation and culture of protoplasts. Int. Rev. Cytol. Suppl. 11B:1-19.

Vasil, V. y Vasil, I. K. 1980b. Isolation and culture of cereal protoplasts: Embryogenesis and plantlet formation from protoplasts of *Pennisetum americanum*. Theor. Appl. Genet. 56:97-99.

Wenzel, G.; Schieder, O.; Przewozny, T.; Sopory, S. K. y Melchers, G. 1979. Comparison of single cell culture derived *Solanum tuberosum* L. plants and a model for their application in breeding programs. Theor. Appl. Genet. 55:49-55.

Widholm, J. M. 1972. The use of flourescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. Stain Tech. 47:189-194.

Digitized by Google

Xu, Z. H.; Davey, M. R. y Cocking, E. C. 1982. Callus formation from root protoplasts of *Glycine max* (soybean). Plant Sci. Lett. 24:111-115.

Zapata, F. J. y Sink, K. C. 1981. Somatic embryogenesis from *Lycopersicon peruvianum* leaf mesophyll protoplasts. Theor. Appl. Genet. 59:265-268.

Digitized by Google

Capítulo 11

Cultivo de anteras y mejoramiento de plantas

W. M. Roca*
V. M. Núñez**
K. Mornan***

* Unidad de Investigación en Biotecnología (UIB), Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia.
** Department of Agronomy and Plant Genetics, St. Paul, Minnesota, E. U.
*** ADO/USAID, Tchad, Africa Central.

Digitized by Google

Introducción

Se ha previsto que las aplicaciones de la biotecnología al mejoramiento de las plantas darán lugar a productos revolucionarios. Los beneficios más inmediatos serán aplicaciones que perfeccionen las técnicas ya existentes y que proporcionen apoyo a los programas de mejoramiento que están actualmente en marcha.

Las metodologías disponibles para obtener cantidades considerables de haploides duplicados permitirán que el fitomejorador fije sistemas genéticos de gametos individuales, que sean reducidos y fáciles de evaluar en cualquier etapa del proceso de mejoramiento; se obtendrán así líneas homocigóticas sin pasar por el proceso de endogamia normal.

Los métodos más ampliamente usados para la creación de haploides y de haploides duplicados se valen de la hibridación interespecífica o intergenérica, y del cultivo de esporas (masculinas o femeninas). La Figura 11.1 muestra diversas vías para lograr la haploidía y su relación con la alternancia de generaciones gametofíticas y esporofíticas en las plantas superiores. Los granos de polen de la papa silvestre (*Solanum phureja*), p. ej., contienen sólo un núcleo generativo causado por una gametogénesis anormal; después de la hibridación interespecífica, con *S. tuberosum* como hembra, la fertilización doble no logra producirse, pero la célula del huevo de *S. tuberosum* es inducida a formar embriones partenogénicamente (Figura 11.1), y por ello éstos serán haploides (Rowe, 1974). Esta vía puede seguirse también en otras especies poliploides.

Otro caso de inducción de haploides mediante hibridación interespecífica ocurre en la cebada (Kasha y Kao, 1970); después de polinizar a *Hordeum vulgare* con *H. bulbosum* silvestre, ocurre un desarrollo anormal de embriones que conduce a la eliminación de los cromosomas de *H. bulbosum* (Figura 11.1); es necesario cultivar in vitro los embriones para producir plantas haploides. Esta vía también se presenta en otras especies de *Hordeum* y en *Triticum* spp. (Baenzinger et al., 1984).

Las células gametofíticas (microsporas o megasporas) se pueden inducir, en el cultivo, a abandonar su curso ontogenético normal para seguir una vía esporofítica que conduzca a la formación de esporofitos haploides. El proceso se llama androgénesis cuando las microsporas originan embriones y plantas (Figura 11.1), y ginegénesis cuando tiene lugar en el cultivo de óvulos y de ovarios (Bossoutrot y Hosemans, 1985). La androgénesis, obtenida mediante el cultivo de anteras, es la técnica más ampliamente usada para la inducción de haploides y ha demostrado tener gran importancia para el fitomejoramiento.

Digitized by Google

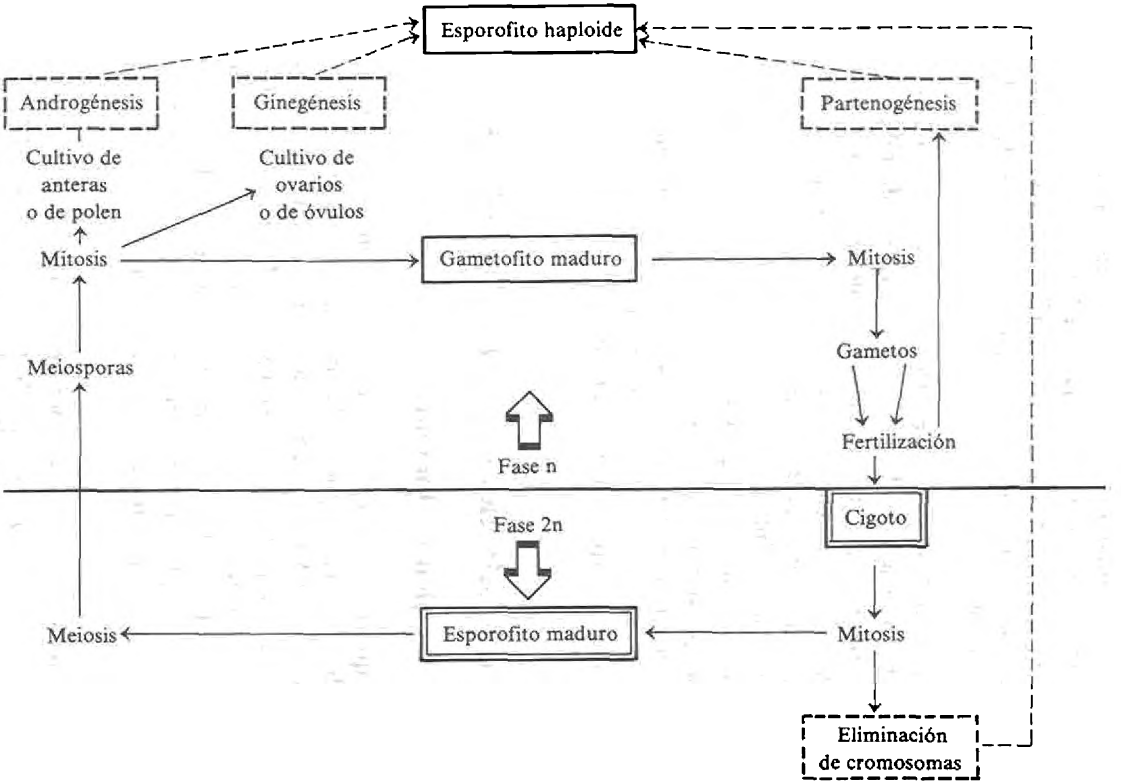


Figura 11.1. Diversas rutas hacia la obtención de la haploidía en plantas superiores, y su relación con la alternación de generaciones gametofíticas y esporofíticas. (Los principales métodos para la obtención de heterofitos haploides emplean técnicas in vitro, como la androgénesis y la ginegénesis; otros procesos recurren a la partenogénesis y a la eliminación de cromosomas después de la hibridación interespecífica o intergenérica.)

Digitized by Google

Cultivo de Anteras

Mediante esta técnica, las anteras inmaduras que contienen polen en una etapa específica de desarrollo se colocan en medios donde el polen inmaduro se divide para formar embriones o callo. Trasferidos éstos a medios de regeneración, se forman plantas. En la mayoría de los casos se producen plantas haploides estériles, pero en algunas especies ocurre una duplicación espontánea de los cromosomas en las etapas de desarrollo del callo y de regeneración de la planta.

Desde que Guha y Maheshwari lo descubrieron en 1964, el cultivo de anteras se ha extendido a más de 150 especies (Dunwell, 1986). Sin embargo, los intentos de integrar esta técnica con el mejoramiento práctico se limitan a unos poquísimos cultivos económicamente importantes, a saber, arroz, cebada, trigo, papa, tabaco, colza oleaginosa, y maíz (Wenzel et al., 1985; Hu y Yang, 1986). Las limitaciones técnicas que afectan a muchas especies, como la renuencia a la regeneración de plantas y los bajos rendimientos de las plantas haploides, han ocasionado el lento desarrollo del mejoramiento genético mediante el cultivo de anteras. En consecuencia, las condiciones que llevan a la haploidía en las plantas cultivadas importantes necesitan desarrollarse o mejorarse.

Condiciones que Afectan el Cultivo de Anteras

Genotipo de las plantas donantes

El genotipo es quizás el factor más importante que afecta el cultivo de anteras. La variabilidad en la respuesta al cultivo de anteras se ha hallado entre especies y dentro de ellas, y se ha demostrado la heredabilidad de esta respuesta (Wenzel y Uhrig, 1981). Dicha 'capacidad para el cultivo de anteras' es particularmente evidente en cultivares de arroz de los tipos Japonica e Indica, de los cuales el primero es más sensible que el último (Cuadro 11.1); asimismo, los genotipos invernales de *B. napus* dan una respuesta más fuerte a ese cultivo que los tipos de primavera (Keller et al., 1987).

Además de la capacidad genotípica general para el cultivo de anteras, se han determinado, en la cebada y en el trigo, rasgos heredados independientemente respecto a componentes específicos de la androgénesis, como la inducción de callo y la regeneración de plantitas (Wenzel et al., 1985; Lazar et al., 1984). Se demostró que ambos rasgos eran altamente heredables, lo que sugería la posibilidad de obtener una ganancia rápida en la selección.

Digitized by Google

Cuadro 11.1. Frecuencia de inducción del callo y de regeneración de plantas verdes en los cultivos de anteras de varias especies cultivadas.

Genotipo donante	Anteras en placa (no.)	Inducción de callo (%)	Regeneración de plantas verdes (%)
Colza[a]			
de primavera (prim.)	—	—	101
de invierno (inv.)	—	—	217
prim. x prim. (F_1)	—	—	40
inv. x inv. (F_1)	—	—	125
prim. x inv. (F_1)	—	—	346
cv. Towe	240	—	160
cv. KWS 24/72	48,222	—	0.1
Papa[a] (2n)			
H78.01/27	3,765	—	68
H81.1001/4	2,107	—	2
Trigo de marzo[a]			
Atys 2	7,970	—	0.2
Orofen	8,691	—	0.02
Arroz[b]			
A (F_2)	3,700	54	2.6
B (F_2)	3,100	53	7.9
C (F_2)	1,700	27	2.5

a. FUENTE: Wenzel et al., 1985 y Keller et al., 1987.
b. FUENTE: CIAT, 1986a. A, B, C = líneas F_2 de cruzamientos triples.

Albinismo

Otro factor importante, especialmente en los cereales, es la ocurrencia de plantas albinas procedentes de polen. Estas plantas representan hasta el 100% de algunas variedades de arroz; a menudo, pero no siempre, las variedades de arroz intensamente albinas se caracterizan también por una alta regeneración de la planta total (verdes más albinas). Sin embargo, esta correlación no vale para los híbridos; en un conjunto de 22 genotipos híbridos de arroz de generación F_1, la relación albina/verde en las plantas varió de sólo 0.7 hasta 11.0, y una relación promedio de 4.1 se obtuvo 'plaqueando' 1200 anteras por cada genotipo[1]. Aunque no se ha comprendido plenamente el fenómeno, hay pruebas de que el albinismo está relacionado con la supresión del ADN de los plástidos (Day y Ellis, 1984) y con deficiencias del ARN ribosomal de los plástidos (Chen, 1986a). El Cuadro 11.1 indica que se puede esperar una respuesta altamente variable, en algunos cultivos, a la inducción del callo y a la regeneración de plantas verdes.

1. Núñez, V. M. Comunicación personal.

Digitized by Google

En el arroz, una fuerte inducción de callo no se correlaciona necesariamente con tasas altas de regeneración de plantas verdes; por consiguiente, la evaluación del germoplasma por su respuesta al cultivo de anteras debe considerar la inducción del callo y la regeneración de plantas verdes partiendo del número total de anteras plaqueadas.

Con frecuencia, la regeneración de plantas en los híbridos F_1 es mayor que el promedio de los valores del progenitor respecto a ese factor en las variedades progenitoras, y además muestra heterosis. En consecuencia, usar plantas híbridas como donantes de anteras se considera un método práctico para aumentar el número de plantas productoras de polen. Estas relaciones se han demostrado en el arroz (Cuadro 11.2) y el trigo (Ouyang, 1986).

Cuadro 11.2. Respuesta dada al cultivo de anteras por algunas variedades de arroz y por sus híbridos F_1 obtenidos de cruzamientos simples y triples.

Progenitores e híbridos	Anteras plaqueadas (no.)	Inducción de callo (%)	Regeneración de plantas verdes (%)
IR 5 (♀)	318	6	0.0
Tox 1010-45-1.1 (♂)	478	24	50.0
F_1 (1/2)	1200	33	56.0
IR 43 (♀)	287	19	7.6
IAC 25 (♂)	257	35	0.0
F_1 (3/4)	1095	35	19.2
IAC 164 (♀)	257	6	0.0
Monolaya (♂)	362	16	3.5
F_1 (5//3/6)	1354	52	11.5

FUENTE: Núñez et al., 1987.

Fisiología de las plantas donantes

El fotoperíodo, la intensidad de la luz, la temperatura y la nutrición mineral de las plantas donantes influye en el rendimiento de los embriones procedentes de microesporas y de las plantitas. La ocurrencia de dos granos de polen morfológica y funcionalmente diferenciados en las anteras maduras —un fenómeno hallado originalmente en el tabaco y confirmado luego en el trigo, la cebada y el arroz— se ha relacionado con la formación in vitro de plantas haploides a partir de polen inmaduro (Haberle-Bors, 1985). Atendiendo a este dimorfismo del polen, sólo el polen que carece de la mayoría de sus elementos estructurales, que da tinción suave, y que es

Digitized by Google

pequeño, será idóneo para iniciar una ruta de desarrollo embriogénico. Se cree que la frecuencia de dichos granos de polen (granos P) está predeterminada, antes del cultivo in vitro, es decir, al comienzo de la floración, por el estado de desarrollo de las plantas donantes. Después de la inducción, el desarrollo y la maduración de los granos P pueden ser afectados por el genotipo y las condiciones del cultivo (Haberle-Bors, 1985). Por consiguiente, el control de las condiciones de crecimiento de las plantas donantes —como el estrés de N, otros estreses nutricionales y ambientales, o los tratamientos que conducen a la feminidad y a la esterilidad (p. ej., los gametocidas)— pueden modificar la respuesta de genotipos recalcitrantes. Este nuevo enfoque depende de la identificación del dimorfismo del polen en las especies de interés.

Desarrollo del polen

Las pequeñas diferencias en el desarrollo del polen darían lugar a cambios notables en la producción de plantas derivadas de polen (Dunwell, 1986). La mejor respuesta se obtuvo cuando las anteras se cultivaron en una etapa del desarrollo del polen comprendida entre la microespora tardía y el polen temprano (Figura 11.2); como indica la figura, el punto de divergencia hacia una vía androgenética está marcado por la ocurrencia de una división mitótica ecuacional de las microesporas.

Para controlar la androgénesis, es crucial la caracterización citológica y bioquímica de las etapas muy tempranas de la evolución de los granos de polen, a saber: la microesporogénesis, la ocurrencia de la división igual de las microesporas, la formación proembriónica, y el desarrollo de los embriones.

Pretratamiento de las anteras

El tratamiento de las anteras con temperatura baja o alta, con choque osmótico, o con otros estímulos tiende a aumentar la producción de plantitas de polen. El tratamiento de las anteras, o de las panículas, de arroz con 35 °C durante 10 a 15 minutos, seguido por un período de 8 días a 10 °C, aumenta la respuesta al cultivo de anteras; un efecto similar, no obstante, se obtiene con un tratamiento de 10 °C durante 8 días solamente. El tratamiento de frío se ha relacionado con una disminución en el albinismo de los cereales, así como con la estimulación de la división mitótica ecuacional (Figura 11.2) de las microesporas androgenéticas (Ouyang, 1986).

Digitized by Google

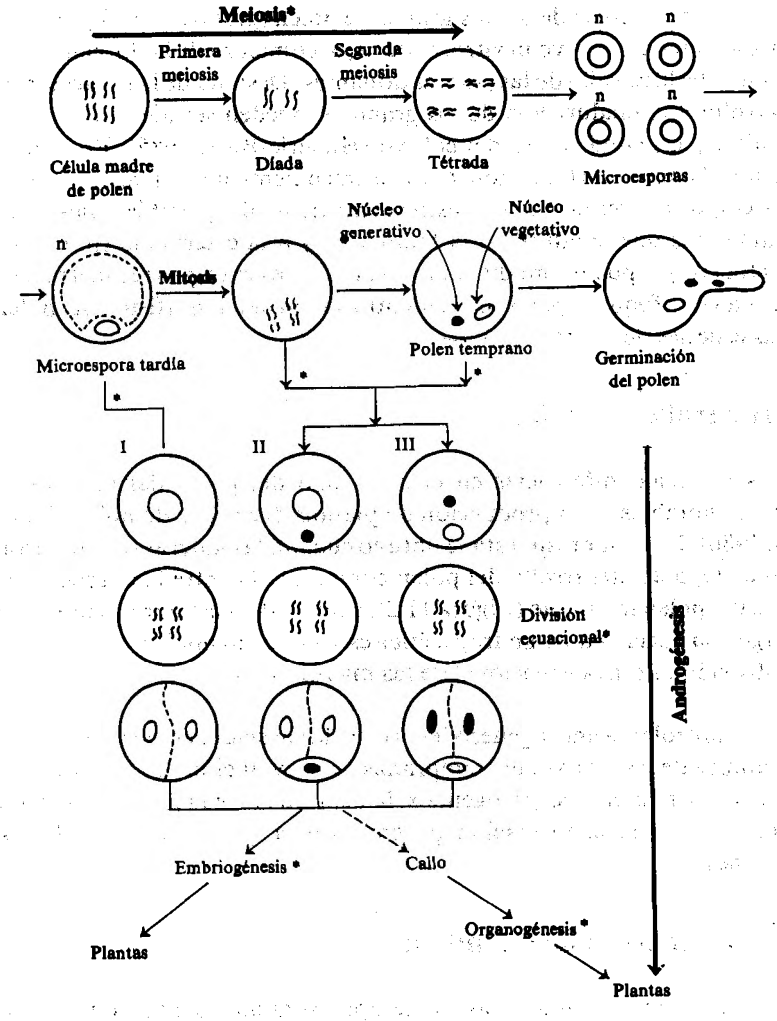


Figura 11.2. Principales eventos citológicos ocurridos en la microesporogénesis y en la androgénesis. Los mecanismos de control del proceso se encuentran en diferentes sitios marcados con (*): a) en la meiosis, para lograr la determinación de los granos de polen embriogénicos; b) entre las etapas de la última microespora y el polen temprano, para obtener la etapa apropiada de polen que responda al cultivo in vitro; c) cuando ocurren divisiones mitóticas en las microesporas, para lograr la iniciación de proembriones; y d) durante la regeneración de la planta a través de la organogénesis o la embriogénesis. I, II y III son las posibles vías que, según la especie de que se trate, pueden tomar la microspora tardía o el polen temprano para llegar a la vía embriogénica o a la organogénica.

Digitized by Google

Medio de cultivo

La técnica del cultivo de anteras en medio líquido desarrollada por investigadores chinos (Chen et al., 1979) elevó enormemente el rendimiento de las plantas androgenéticas. Hay una correlación entre el medio de inducción de callo y la tasa de regeneración de plantas en el arroz (Cuadro 11.3); un porcentaje mayor de regeneración—con respecto al número de anteras plaqueadas—se puede obtener de los callos si éstos se inducen en un medio líquido y no en un medio semisólido. La adición de extracto de papa al medio de inducción aumentó la producción de plantas de polen cuando ese medio era líquido; además, el tipo del agente gelatinizador del medio de regeneración influyó en el rendimiento de las plantitas verdes. En el Capítulo 4 se discuten los agentes gelatinizadores.

Cuadro 11.3. Respuesta del cultivo de anteras del híbrido de arroz F_1 (IR5/Bbt 50// Colombia 1/Tox 1011) a dos medios de cultivo: líquido y agar.

Medio de regeneración[a]	Medio de inducción de callo	Anteras plaqueadas (no.)	Inducción de callo (%)	Regeneración de plantas verdes (%)
Medio 1	Líquido	880	19	11.4
	Agar (0.7%)	824	15	4.1
Medio 2	Líquido	712	35	16.0
	Agar (0.7%)	584	28	4.6

a. Medio 1: MS + 1.1. mg/l de tiamina + 1 mg/l de ANA + 2 mg/l de cinetina + sucrosa al 3%.
Medio 2: 1000 mg/l de KNO_3 + 100 mg/l $(NH_4)_2SO_4$ + 200 mg/l de KH_2PO_4 + 35 mg/l de KCl + 1.1 mg/l de tiamina + 10^{-4} M Fe-EDTA (MS) + 1 mg/l de ANA + 3 mg/l de cinetina + sacarosa al 3% + extracto de papa al 20%.

FUENTE: Martínez et al., 1985.

Otros componentes de los medios de cultivo, p. ej. la sacarosa y los reguladores del crecimiento, también desempeñan un papel en la androgénesis. Las condiciones osmóticas que requieren las microesporas para experimentar una división sostenida deben tenerse en cuenta. En general, se requieren niveles más altos de sacarosa para la inducción del callo y más bajos para la regeneración de las plantas. La inducción del embrión y del callo requieren generalmente, en el cultivo de anteras, una mayor concentración de auxina que la regeneración de plantas.

Digitized by Google

El Cultivo de Anteras Aplicado al Fitomejoramiento

El potenciaí que posee el cultivo de anteras surge de la constitución genética de las células del polen. Las células del polen de los híbridos F_1 contienen la dotación genética de las plantas paternas y las recombinaciones esperadas según las proporciones mendelianas. Estas células son haploides y permiten por ello al mejorador seleccionar eficazmente los recombinantes deseables; además, una vez duplicadas esas células, se establecen rápidamente líneas homocigóticas. Alcanzar rápidamente la homocigosidad constituye una de las aplicaciones más importantes del cultivo de anteras en el desarrollo de variedades nuevas porque, gracias a él, el tiempo, el espacio y los costos necesarios para desarrollar las líneas 'verdaderamente mejoradas' disminuirían considerablemente. Las líneas homocigóticas (R_2) manifestarán la variabilidad inherente a la generación F_2, añadiendo una ventaja: cada individuo habrá fijado su genotipo y no sufrirá segregación adicional.

Dado que en los haploides duplicados no hay dominancia —es decir, el fenotipo equivale al genotipo— la eficiencia de la selección aumenta cuando el mejoramiento se vale del cultivo de anteras. Si se consideran, p. ej., tres genes dominantes, 1/8 de la población de haploides duplicados se seleccionaría fenotípicamente y cada individuo daría origen a plantas 'verdaderamente mejoradas'; no se necesitaría entonces una evaluación adicional respecto a este carácter. Sin embargo, será necesario cultivar familias F_3 partiendo de la población F_2 para separar las plantas verdaderamente mejoradas (1/64) de los individuos segregantes (Baenzinger et aí., 1984).

En cultivos de polinización cruzada, altamente heterocigóticos, la haploidía es el camino para producir rápidamente líneas homocigóticas verdaderas que podrán utilizarse para la producción de cultivares híbridos F_1. Este uso de la haploidía puede dar excelentes resultados en plantas sexualmente propagadas, como el maíz, y asexualmente propagadas, como la yuca.

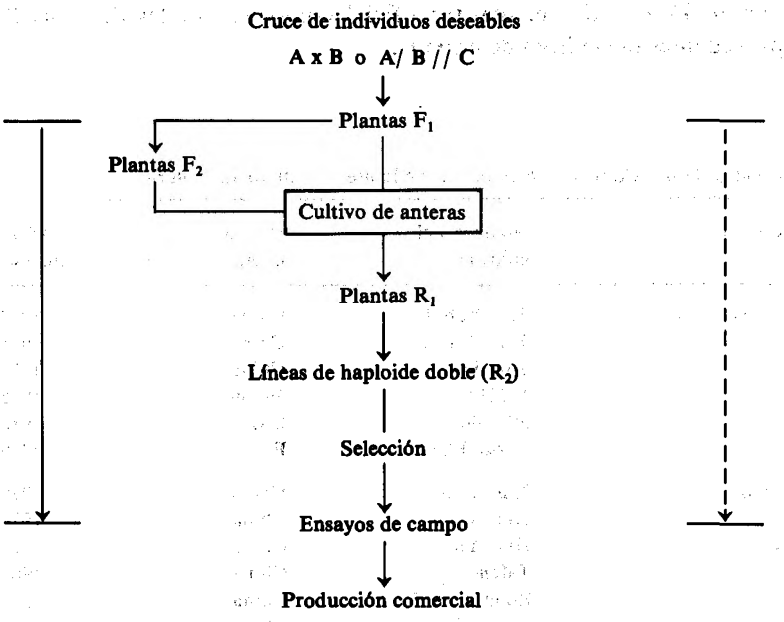
Variedades Obtenidas mediante el Cultivo de Anteras

Como se indicó antes, la producción rápida de plantas homocigóticas diploides es la aplicación más importante del cultivo de anteras al fitomejoramiento. Este cultivo será, por tanto, más útil en aquellas especies que tengan ciclos de crecimiento largos o para aquellas condiciones en que los

Digitized by Google

cultivos de ciclo corto se desarrollen a la tasa de sólo un cultivo por año. Por ejemplo, mediante el cultivo de anteras se puede lograr la homocigocidad en arroz en 7 u 8 meses, mientras que se requieren de 4 a 6 años para obtenerla con técnicas tradicionales; y en el trigo invernal, el uso del cultivo de anteras ahorra de 3 a 4 años en el proceso de su mejoramiento (Figura 11.3).

El cultivo de anteras de tabaco es el sistema más avanzado para desarrollar haploides duplicados; se ha hecho, no obstante, considerable progreso con algunos cereales, como el trigo, la cebada y el arroz. En estos cuatro



——→ Mejoramiento por cultivo de anteras: arroz, 8-9 meses; trigo de invierno, 3 años.

- - - -→ Mejoramiento convencional: arroz, 3-4 años; trigo de invierno, 7 años.

Figura 11.3. La integración del cultivo de anteras en un esquema de fitomejoramiento permite alcanzar la homocigosidad en un tiempo significativamente menor que mediante la endogamia convencional. El tiempo ahorrado empleando ese cultivo comprende desde la excisión de las anteras de las plantas F_1 hasta la producción de líneas homocigóticas (R_2) para los ensayos.

FUENTE: CIAT, 1987; Petelino, 1987.

Digitized by Google

cultivos se han producido 14 cultivares mejorados por medio del cultivo de anteras, y otros cuatro en cuya genealogía interviene un haploide duplicado (Baenzinger et al., 1984; Hu y Yang, 1986; Bollon y Raquin, 1987). Es interesante que la gran mayoría de esos cultivares se haya producido en China (Cuadro 11.4).

Para producir la variedad de trigo Florin en Francia[2], p. ej., se emplearon cerca de 50,000 anteras que fueron plaqueadas de un cruzamiento F_1 hecho en 1978; de ellas, el 0.13% se regeneró como plantas verdes (9 autodiploides y 55 haploides). De 41 haploides duplicados inducidos por la colchicina se seleccionaron 18 líneas R_3 en 1980, y después de cuatro años de pruebas de campo y de pruebas oficiales, se registraron, en 1985, dos líneas como variedades. Así pues, sólo pasaron siete años entre el cruzamiento F_1 inicial y el registro oficial como variedades de estas líneas procedentes del cultivo de anteras.

Cuadro 11.4. Cultivares mejorados mediante el cultivo de anteras.

Cultivo	Nombre del cultivar	País que libera	Año de liberación
Tabaco	Tan Yuh 1	China	1974
	Tan Yuh 2	China	1975
	Tan Yuh 3	China	1977
	F-211*	Japón	1975
	NC-744*	E.U.	1980
	L MAFC*	E.U.	1980
Arroz	Xin Xion	China	1975
	Hua Yu 1	China	1976
	Hua Yu 2	China	1976
	Tafene 1	China	1980
	Zong Hua 2	China	1980
	Zong Hua 8	China	1983
	Zong Hua 9	China	1983
Trigo	Huapei 1	China	1978
	Jinghua 1	China	1980
	Florin	Francia	1985
Maíz	Hua Yu 1	China	1985
	Several*	E.U.	1970

* Cultivares con un haploide duplicado en su genealogía.

2. De Buyser, J. Comunicación personal.

Digitized by Google

Investigación en Cultivo de Anteras en el CIAT

Cultivo de anteras de arroz

A excepción del trabajo hecho en China (Zhenhua et al., 1987) donde algunas variedades derivadas del cultivo de anteras fueron liberadas (Cuadro 11.4) y de las investigaciones colaborativas entre el IRRI y Corea para desarrollar líneas tolerantes al frío (Zapata et al., 1986), no se han hecho muchos esfuerzos para desarrollar técnicas de cultivo de anteras en una gran diversidad de germoplasma de arroz, ni para producir un gran número de líneas autodiploides con el fin de emplearlas en una estrategia convencional de mejoramiento.

El trabajo hecho inicialmente, entre 1980 y 1981, con el cultivo de anteras de arroz en el CIAT se centró en el desarrollo de metodologías (CIAT, 1980; Narváez, 1981). Luego, los esfuerzos colaborativos entre el Programa de Arroz y la Unidad de Investigación en Biotecnología del CIAT se dedicaron al desarrollo de una metodología para la producción en gran escala de plantas derivadas del cultivo de anteras (Núñez, 1984; Martínez et al., 1985; CIAT, 1986a; CIAT, 1986b). El cultivo de anteras de arroz se enfrenta a dos limitaciones principales: la respuesta al cultivo depende del genotipo, y el número de plantas regeneradas procedentes del polen es bajo; por ello se ha prestado atención a la selección de introducciones de germoplasma que respondan al cultivo de anteras (CIAT, 1987).

Como se indicó anteriormente, es típica la gran variabilidad de las accesiones de germoplasma de arroz; no obstante, los híbridos presentan, en general, heterosis en la respuesta al cultivo de anteras. Así, p. ej., mientras la inducción de callo de 24 variedades fluctuó entre 0% y 35%, y la regeneración entre 0% y 7,6% (Martínez et al., 1985), los híbridos F_1 obtenidos con algunas de estas variedades tenían de 30% a 40% de inducción y una regeneración de plantas de 11,5% a 56% (Cuadro 11.2). Usando híbridos F_2 de los genotipos de arroz con mejor respuesta al cultivo de anteras, se puede obtener hasta un 8% en la regeneración de plantas verdes (Cuadro 11.1).

El número de granos de polen capaces de responder al cultivo de anteras depende también de la condición de los medios de cultivo. Dejar flotar las anteras en un medio líquido, p. ej., resultó mejor que colocarlas en un medio semisólido; en aquél, mucho más granos individuales de polen iniciaron la mitosis para formar callos pequeños (Cuadro 11.3).

Digitized by Google

Se obtiene mejor inducción de callo en el medio de papa: no sólo se produjeron en él más callos, sino que el efecto se extendió hasta la regeneración de plantas, que fue alta en este medio de regeneración (Cuadro 11.3). Mejores frecuencias de regeneración se obtuvieron en el medio Murashige y Skoog (1962) complementado con ácido naftalenacético y cinetina (Martínez et al., 1985).

Con el propósito de aumentar la eficiencia del cultivo, se modificaron ligeramente las técnicas de esterilización superficial, el plaqueado de las anteras, el tamaño de la inducción, y las matrices de regeneración (CIAT, 1987).

A pesar de que se necesita un mayor esfuerzo para mejorar el cultivo de anteras de arroz, esta técnica ofrece algunas ventajas importantes:

a. La técnica puede restringirse a los híbridos F_1 o F_2 cuya genealogía contiene genotipos que responden al cultivo de anteras. Esta condición puede comprobarse haciendo una preevaluación del germoplasma por su respuesta al cultivo de anteras. La clasificación de variedades según esa respuesta permitirá calcular el número de anteras necesarias para obtener un híbrido F_1 dado.

b. Alrededor de un 50% de las plantas de arroz regeneradas son haploides duplicados (autodiploides) lo que excluye el uso de la duplicación artificial de cromosomas.

c. Los estudios de progenie sobre híbridos F_1 regenerados de polen señalan que la mayoría de las plantas regeneradas son uniformes y estables; esto significa que la mayor parte de las plantas de arroz diploides, obtenidas por cultivo de anteras, son homocigotos que provienen de microesporas haploides mediante la duplicación espontánea de los cromosomas (Chen, 1986b).

No hay informes sobre la ocurrencia de gametos sin reducir en arroz, ni sobre la endoreduplicación mitótica de cromosomas de microespora; por ello se puede suponer que la autodiploidización del arroz ocurre durante la fase de regeneración de callos in vitro. La presencia de otros niveles de ploidía entre las plantas regeneradas, es decir, plantas haploides, triploides, tetraploides y aneuploides, apoyan esa presunción.

Consideradas estas ventajas, se elaboró en el CIAT un protocolo práctico para el mejoramiento de arroz mediante el cultivo de anteras (Figura 11.4). El proceso empieza con 100 plantas F_1 obtenidas por cruzamiento que producirán 100 líneas R_2 homocigóticas en 7 u 8 meses; en 5 meses más, las líneas R_3 estarán listas para ser evaluadas en diversas áreas

Digitized by Google

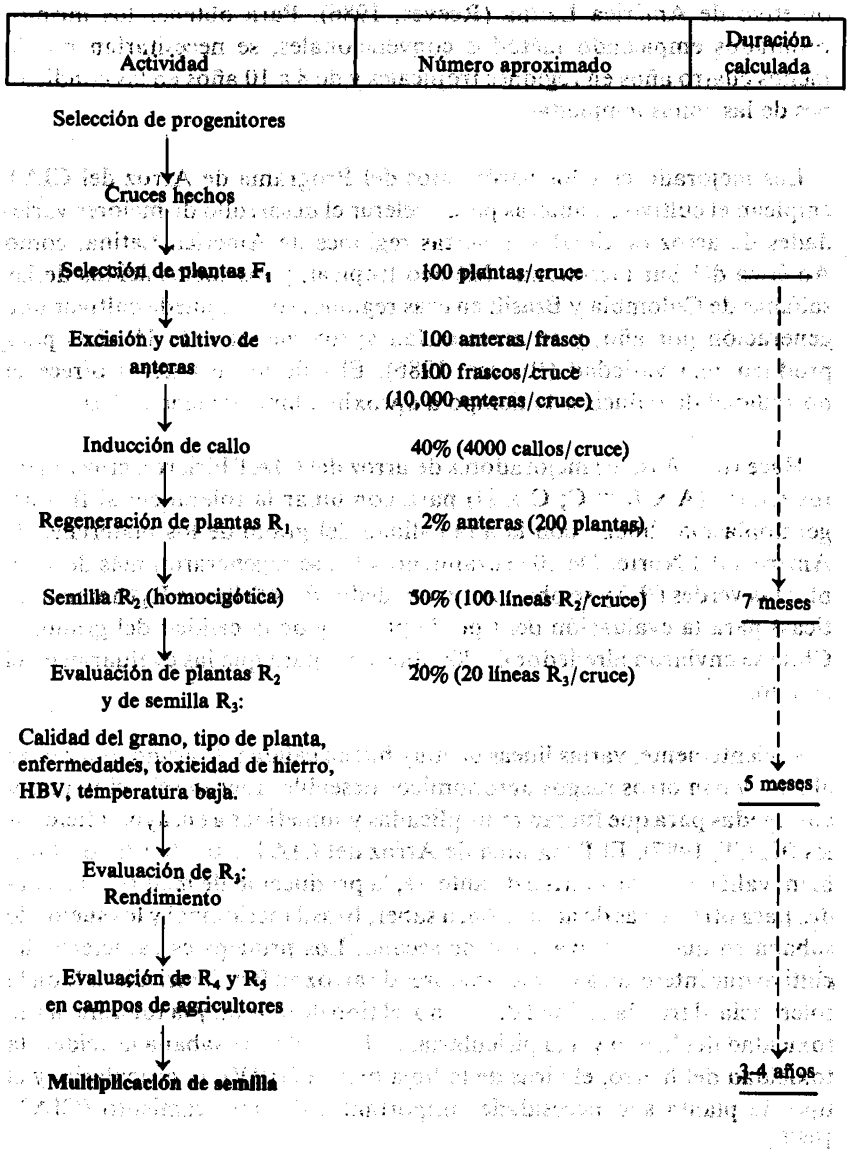


Figura 11.4. Procedimiento general del mejoramiento del arroz mediante el cultivo de anteras. En un año, las líneas homocigóticas (R_3) están listas para ser ensayadas en las áreas de interés. Por la duplicación espontánea de los cromosomas, por lo menos un 50% de las plantas regeneradas se tornan homocigóticas; además, un 90% de las progenies de haploide doble son homogéneas y estables.

FUENTES: CIAT, 1984; Reeves, 1986; CIAT, 1987; CIAT, 1988.

Digitized by Google

objetivo de América Latina (Reeves, 1986). Para obtener los mismos resultados empleando métodos convencionales, se necesitarían por lo menos cuatro años en regiones tropicales y de 8 a 10 años en las condiciones de las zonas templadas.

Los mejoradores y los agrónomos del Programa de Arroz del CIAT emplean el cultivo de anteras para acelerar el desarrollo de mejores variedades de arroz destinadas a ciertas regiones de América Latina, como América del Sur meridional, México tropical, y los suelos ácidos de las sabanas de Colombia y Brasil; en esas regiones sólo se puede cultivar una generación por año, y se necesitarían aproximadamente 15 años para producir una variedad (Reeves, 1986). El cultivo de anteras ofrece la posibilidad de reducir este tiempo a aproximadamente cinco años.

Hace tres años, los mejoradores de arroz del CIAT hicieron cruzamientos triples (A x B = C; C x D) para combinar la tolerancia al frío del germoplasma chileno con la alta calidad del grano de los materiales de América del Norte. De 10 cruzamientos F_2, se regeneraron más de 1200 plantas verdes (R_1) y se obtuvieron alrededor de 900 líneas R_2 (homocigóticas) para la evaluación del tipo de planta y de la calidad del grano. A Chile se enviaron alrededor de 200 líneas R_3 para que las evaluaran en el campo.

Recientemente, varias líneas de muy buena calidad de grano, tolerantes al frío, y con otros rasgos agronómicos deseables fueron seleccionadas y entregadas para que fueran multiplicadas y sometidas a ensayos adicionales (CIAT, 1987). El Programa de Arroz del CIAT está abordando también, valiéndose del cultivo de anteras, la producción de mejores variedades para otras áreas de actuación, a saber, Brasil meridional y los suelos de sabana en que se cultiva arroz de secano. Los principales caracteres del cultivo que interesan a los mejoradores de arroz en Brasil meridional son la tolerancia al frío, la calidad del grano, el tipo de planta, y la tolerancia a la toxicidad del hierro y a la piricularia; en los suelos de sabana la acidez, la toxicidad del hierro, el virus de la hoja blanca (HBV), la piricularia, y el tipo de planta son necesidades importantes del mejoramiento (CIAT, 1987).

Cultivo de anteras de yuca

Se ha iniciado una investigación en que colaboran el Programa de Yuca y la Unidad de Investigación en Biotecnología del CIAT, con el fin de desarrollar métodos para la producción de haploides/dihaploides en yuca.

Digitized by Google

La yuca es una especie halopoliploide altamente heterocigótica (2n =4x =36), y por ello sufre de una fuerte depresión endogámica causada por la autofecundación. Es casi imposible, por tanto, lograr en este cultivo la homocigosidad por autofecundación continua.

La producción de haploides o dihaploides de yuca mediante el cultivo de anteras o de microesporas permitiría alcanzar la homocigosidad rápidamente. Las líneas de yuca homocigóticas o hemicigóticas serían altamente deseables para obtener los siguientes resultados:

a. La expresión de alelos recesivos nocivos que podrían quedar ocultos en un fondo genético siempre heterocigótico.

b. La expresión de alelos disfuncionales recesivos que controlan la cianogénesis; se cree que la falta del glucósido cianogénico linamarina está controlada por alelos recesivos, cuya expresión no ocurre normalmente debido a la heterocigosidad de la yuca.

c. El uso de células de yuca haploides o dihaploides para tratamientos mutagénicos, con mutágenos físicos o químicos, que cambiarían la expresión de rasgos simples tales como la cianogénesis, la calidad proteínica, el contenido de vitamina A, y otros.

d. La identificación de marcadores moleculares genéticos para levantar mapas de genes.

e. La expresión del vigor híbrido de la semilla híbrida F_1 de la yuca mediante el cruzamiento de líneas homocigóticas derivadas del cultivo de anteras.

Tres enfoques de la haploidía de la yuca están en estudio: la androgénesis, la ginogénesis, y los cruzamientos interespecíficos e intergenéricos (Figura 11.1). Tanto el efecto genotípico como las condiciones del medio de cultivo o del pretratamiento serán objeto de estudio. La yuca es todavía un cultivo inexplorado en este aspecto, y requiere por eso una investigación exhaustiva sobre la biología de la flor y del polen, y sobre la reacción de las microesporas a diversos componentes del medio de cultivo y a otros tratamientos físicos o mecánicos de las plantas donantes y de las anteras.

Haploides Duplicados del Cultivo de Anteras

Estabilidad genética

La mayoría de los haploides duplicados producen progenies homogéneas y se pueden usar, por tanto, para fines de mejoramiento. Líneas

Digitized by Google

estables, homocigóticas y diploides se obtienen mediante la duplicación de los cromosomas de células haploides. Se han hecho, sin embargo, observaciones sobre la inestabilidad de plantas derivadas de polen; dicha variabilidad se ha llamado 'variación gametoclonal' (Evans y Sharp, 1986). Además de la variabilidad observada en el nivel de ploidía de las plantas regeneradas de arroz, de trigo (Hu, 1986), y de papa (Wenzel, 1979), se ha hallado segregación en 10% a 12% de las plantas derivadas de polen; este resultado se ha atribuido a fenómenos mutacionales o a anormalidades cromosómicas estructurales, especialmente cuando los haploides duplicados se han regenerado de híbridos F_1 más que de híbridos F_2 (De Buyser y Henry, 1986). Se acepta que alrededor de 90% de las plantas regeneradas de arroz son genéticamente homocigóticas debido a la duplicación espontánea de los cromosomas de las células haploides; las plantas homocigóticas demuestran estabilidad total a medida que aumentan las generaciones (Chen, 1986b).

La segregación ocurrida en las plantas de arroz R_2 afectó la fertilidad, la morfología (altura de la planta, densidad de espigas, forma del grano), y la morfología y la fertilidad juntas. Dicha segregación estaba relacionada con los siguientes fenómenos: a) la variación en el número y la estructura cromosómicos (euploidía, aneuploidía, quimeras, híbridos estructurales y heteroploidía); b) el origen de las plantas, es decir, microesporas que no son haploides; estas plantas serían entonces heterocigóticas; c) las mutaciones genéticas, que pueden ocurrir antes o después de la duplicación espontánea de las células haploides (Chen, 1986a); en el segundo caso, las mutaciones serían heterocigóticas y, en consecuencia, segregarían en la R_2.

El nivel en que debe realizarse la androgénesis dependerá del sistema de mejoramiento y de los objetivos de éste. Por lo tanto, si la variabilidad introducida del material progenitor en la generación F_1 es alta, el número de plantas de haploides duplicados que deben probarse será también alto. Si el cultivo de anteras se lleva a cabo en plantas donantes F_2 ó F_3, el mejorador tendría que usar menos plantas R_2 en esas pruebas, en razón de que al usar plantas F_1 como donantes, sólo hay una oportunidad para la recombinación. El cultivo de anteras aplicado a líneas más avanzadas (F_5 ó F_6) o a variedades establecidas permitiría la expresión de la heterocigosidad residual. La liberación de esta variabilidad debe distinguirse de la variación gametoclonal generada por el cultivo de tejidos.

Desempeño agronómico

No se halló diferencia entre los haploides duplicados de cebada y las líneas homocigóticas desarrolladas por los métodos del pedigrí y de la

Digitized by Google

descendencia de una sola semilla (SSD, en inglés) respecto al rendimiento, a la altura de la planta, y a la fecha de la floración inicial. Los menores rendimientos de las líneas dihaploides de tabaco, que Arcia et al. (1978) consideraron como efecto de una pérdida de heterocigosidad residual, se han atribuido a mutaciones ocasionales que ocurren durante el cultivo de anteras (Baenzinger, 1984). En el trigo, el rendimiento de 12 líneas de haploides duplicados superó el rendimiento promedio de los testigos, y el de cuatro de ellas fue mejor que el del mejor testigo (De Buyser y Henry, 1986).

Los mejoradores de arroz del CIAT han evaluado el rendimiento de líneas R_2 y de líneas segregantes tradicionales (CIAT, 1988). Ninguna diferencia significativa se halló entre el rendimiento de las líneas R_2 y el de las líneas F_3 y F_4 de las cuales se obtuvieron esas líneas R_2. De modo similar, el rendimiento de 111 líneas obtenidas por el cultivo de anteras (R_2) no fue significativamente diferente del de las nueve variedades usadas como donantes de las anteras.

Estos resultados indican que el cultivo de anteras no reduce el rendimiento; en consecuencia, es posible obtener líneas de haploides duplicados de alto rendimiento. El valor de los haploides dobles en mejoramiento dependerá, en grado considerable, de la potencialidad genética del cruzamiento inicial y, en menor grado, de la técnica del cultivo de anteras; por consiguiente, la elección de las plantas progenitoras para hacer los cruzamientos es crítica para el comportamiento de los haploides duplicados.

El Futuro del Cultivo de Anteras

El cultivo de anteras seguirá considerándose el método potencialmente más eficaz y accesible para crear plantas haploides. Si se quiere desarrollar aún más el cultivo de anteras como una técnica usual de mejoramiento, es necesario abordar dos serias limitaciones que tiene cuando se aplica a cultivos como el trigo, el arroz y la papa: su fuerte dependencia genotípica, y el escaso número de plantas regeneradas. Se espera que las técnicas moleculares modernas proporcionen valiosa información sobre la genética de los caracteres relacionados con la respuesta al cultivo de anteras, y faciliten así el desarrollo de nuevas estrategias. Urge, además, lograr que el cultivo de anteras sea accesible a otras especies cultivadas importantes como la yuca y el maíz. También se debe prestar atención a estudios comparativos del comportamiento tanto de líneas derivadas del cultivo de anteras como de líneas convencionales.

Digitized by Google

Aunque el logro de homocigosidad rápida seguirá siendo la ventaja principal del cultivo de anteras, la homogeneidad y la estabilidad de los haploides duplicados permitirán a los mejoradores hacer selecciones más efectivas, especialmente respecto a caracteres que experimentan intensamente el influjo del ambiente o la dominancia genética.

Otras ventajas del cultivo de anteras en el mejoramiento de cultivos son éstas:

a. La obtención de haploides duplicados a partir de híbridos F_1 puede ser útil para desarrollar variedades en forma fija en una estación central, con el fin de distribuirlas en ambientes ecológicos muy diversos y de ensayarlas en ellos.

b. El cultivo de anteras puede ser una fuente útil de variación gametoclonal para el mejoramiento intravarietal.

c. La producción de líneas homocigóticas en especies altamente heterocigóticas, con el propósito de producir líneas puras de diferente genotipo y de facilitar así el uso de la heterosis de la semilla híbrida F_1 en cultivos como la yuca y la papa. En maíz, los haploides duplicados de plantas F_1 o F_2 permitirían fijar la capacidad de combinación dentro de las familias y, por tanto, se podrían evaluar más cruzamientos.

d. Permitir la expresión e identificación de alelos recesivos.

e. Las microesporas o células haploides se pueden usar para la inducción de mutantes y para la selección de caracteres esporofíticos; los mutantes se estabilizarían mediante duplicación cromosomal y se seleccionarían según el fenotipo observado.

f. La introgresión de genes de tipos de germoplasma distantes mediante el restablecimiento de la fertilidad de los haploides duplicados obtenidos de cruzamientos amplios de la F_1.

g. Permitir la rápida introducción de caracteres citoplasmáticos (e.g., citoplasmatic male sterility, CMS) en un fondo genético homocigótico; obtener también la purificación de líneas de restauración de la esterilidad masculina.

h. Emplear las microesporas y las células haploides como receptores para la trasferencia de genes mediante la microinyección, el cocultivo, o la electroporación.

i. Crear y acrecentar reservas citogenéticas y citoplasmáticas de los principales cultivos.

Digitized by Google

Referencias

Arcia, M. A.; Wernsman, E. A. y Burk, L. G. 1978. Performance of anther derived dihaploids and their conventionally inbred parents or lines, in F_1 hybrid, in F_2 generations. Crop Science 18:413-418.

Baenzinger, P. S.; Kudirka, D. T.; Schaeffer, G. W. y Lazar, M. D. 1984. The significance of doubled haploid variation. En: Gustafson, J. P. (ed.). Gene manipulation in plant improvement. Memorias de un simposio, Universidad de Missouri. Plenum Press, Nueva York. p. 385-414.

Bollon, H. y Raquin, C. 1987. Haplomethods: A tool for crop improvement. En: Horisberg, M. (ed.). Nestlé research news. Lausanne, Suiza. p. 81-91.

Bossoutrot, D. y Hosemans, D. 1985. Gynogenesis in *Beta vulgaris* L.: From in vitro culture of unpollinated ovules to the production of doubled haploid plants in soil. Plant Cell Reports 4:300-303.

Chen, Y. 1986a. Anther and pollen culture of rice. En: Hu, H. y Yang, H. (eds.). Haploids of higer plants in vitro. China Acad. Publishing, Beijing. p. 3-25.

———. 1986b. The inheritance of rice pollen plant and its application in crop improvement. En: Hu, H. y Yang, H. (eds.). Haploids of higher plants in vitro. China Acad. Publishing, Beijing. p. 118-136.

———; Tian, W. Z.; Zhangh G. H.; Lu, D. Y. 1979. The study of rice anther and pollen culture in liquid. Acta Genet. Sin. 6:5.

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1980. Genetic Resources Unit. Tissue culture section. En: CIAT: Annual report 1980. Cali, Colombia. p. 54-57.

———. 1984. El cultivo de anteras: un camino más corto para obtener variedades mejoradas. Arroz en las Américas (CIAT, Colombia) 5:1-5.

———. 1986a. Rice improvement. En: CIAT: Rice Program annual report 1985. Cali, Colombia. p. 49-67.

———. 1986b. Rice. En: CIAT. Biotechnology Research Unit: Annual report 1985. Cali, Colombia. p. 63-64.

———. 1987a. CIAT report 1987. Cali, Colombia. p. 20-22.

———. 1987b. Varietal improvement. En: CIAT: Rice Program annual report 1986. Cali, Colombia. p. 1-13.

———. 1988. Activities in non-conventional breeding methods. En: CIAT: Rice Program annual report 1987. Cali, Colombia. p. 136-147.

Day, A. y Ellis, T. H. N. 1984. Chloroplast DNA deletions associated with wheat plants regenerated from pollen: Possible basis for maternal inheritance of chloroplasts. Cell 39:359-368.

Digitized by Google

De Buyser, J. y Henry, Y. 1986. Wheat: production of haploids, performance of doubled haploids, and yield trials. En: Bajaj, Y. P. S. (ed.). Biotechnology in agriculture and forestry; 2: Crops. Springer-Verlag, Berlín. p. 73-88.

Dunwell, J. M. 1986. Pollen, ovule and embryo culture as tools in plant breeding. En: Withers, L. A. y Anderson, P. G. (eds.). Plant tissue culture and its agricultural applications. University of Nothingham, P. Butterworths, Londres. p. 375-404.

Evans, D. A. y Sharp, W. R. 1986. Somaclonal and gametoclonal variation. En: Evans, D.; Sharp, W. y Ammirato, P. V. (eds.). Handbook of plant cell culture; 4: Techniques and applications. MacMillan Publishing, Nueva York. p. 97-132.

Haberle-Bors, E. 1985. *In vitro* haploid formation from pollen: A critical review. Theor. Appl. Genet. 71:361-374.

Hu, H. 1986. Variability and gamete expression in pollen-derived plants in wheat. En: Hu, H. y Yang, H. (eds.). Haploids of higher plants in vitro. China Acad. Publishing, Beijing. p. 67-78.

——— y Yang, H. (eds.). 1986. Haploids of higher plants in vitro. China Acad. Publishing, Beijing. 221 p.

Kasha, K. J. y Kao, K. N. 1970. High frecuency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.). Nature 225:874-876.

Keller, W. A.; Arnison, P. G. y Cardy, B. J. 1987. Haploids from gametophytic cells: Prospects. En: Green, C. E.; Somers, D. A.; Hackett, W. P. y Biesboer, D. D. (eds.). Plant tissue and cell culture: Proceedings of an international symposium. University of Minnesota, Alan R. Liss, Nueva York. p. 223-241.

Lazar, M. D.; Baenzinger, P. S. y Schaeffer, G. W. 1984. Combining abilities and hereditability of callus formation and plantlet regeneration in wheat (*Triticum aestivum* L.) anther cultures. Theor. Appl. Genet. 68:131-134.

Martínez, C. P.; Núñez, V. M. y Roca, W. M. 1985. Importancia del cultivo de anteras en el mejoramiento del arroz. Arroz (Colombia) 34:12-17.

Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15:473-497.

Narváez, J. 1981. Cultivo de tejidos de arroz (*Oryza sativa* L.). Introducción de callo y regeneración de plantas. Tesis. Universidad Nacional de Colombia, Palmira. 95 p.

Nuñez, V. M. 1984. Obtención de líneas homocigotas de arroz (*Oryza sativa* L.) tolerantes a la toxicidad de aluminio utilizando el cultivo de anteras. Tesis. Universidad Nacional de Colombia, Palmira.

Digitized by Google

———; Martínez, C. P.; Narváez, J. y Roca, W. M. 1987. Obtención de líneas homocigotas de arroz (*Oryza sativa* L.) tolerantes a la toxicidad de aluminio utilizando el cultivo de anteras. Siall 4:47-54.

Ouyang, J. 1986. Induction of pollen plants in *Triticum aestivum*. En: Hu, H. y Yang, H. (eds.). Haploids of higher plants *in vitro*. China Acad. Publishing, Beijing. p. 26-41.

Petelino, J. 1987. Biotechnology to improve wheat and corn. Gen. Engineering News: 24.

Reeves, J. W. 1986. New rice varieties in half the time. Span 29:32-33.

Rowe, P. R. 1974. Parthenogenesis following interspecific hybridization. En: Kasha, K. (ed.). Haploids and higher plants. Memorias de un simposio. University of Guelph, Guelph, Canadá. p. 43-52.

Wenzel, G. 1979. Recent progress in microspore culture of crop plants. En: Fourth John Innes Symposium on Haploids. Memorias. p. 185-196.

———; Foroughi-Wehr, B.; Friedt, W. y Kohler, F. 1985. Anther culture in crop plants. En: Biotechnology in international agricultural research. Memorias de un simposio internacional. International Rice Research Institute (IRRI), Manila. p. 65-73.

——— y Uhrig, H. 1981. Breeding for nematode and virus resistance in potato via anther culture. Theor. Appl. Genet. 59:333-340.

Zapata, F. J.; Aldemita, R. R.; Novero, A. H.; Torriz, L. B.; Magaling, L. B.; Mazaredo, A. M.; Vísperas, R. M.; Lim, M. S. y Moon, H. P. 1986. IRRI-Korea collaborative project for the development of cold-tolerant lines through anther culture. IRRI Research Paper Series no. 118. International Rice Research Institute (IRRI), Manila. 7 p.

Zhenhua, A.; Jiansen, L. y Tyonggiang, G. 1987. Rice anther culture breeding in Shanghai Academy of Agricultural Science. En: Annual meeting of the Rockefeller Foundation Program on rice biotechnology. International Rice Research Institute (IRRI), Manila. (Resumen analítico).

Digitized by Google

Capítulo 12

Cultivo de embriones y óvulos

R. E. Litz*

* Tropical Research and Education Center, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, Homestead, Florida, E. U.

Digitized by Google

Introducción

El cultivo de embriones se ha usado para diferentes propósitos, como los de estudiar los requerimientos nutricionales de embriones en desarrollo, rescatar embriones híbridos que se hayan derivado de cruzamientos interespecíficos e intergenéricos, producir monoploides y superar la latencia de las semillas. Igualmente, el cultivo de óvulos intactos se ha empleado para el rescate de embriones (mediante la polinización y fertilización in vitro) y para inducir embriogénesis somática a partir de nucelas de algunas especies de plantas. En algunos artículos recientes se han hecho revisiones de estas áreas.

El desarrollo de los embriones vegetales se caracteriza por dos estados distintos: el estado temprano, que es heterotrófico, y el estado tardío, que es autotrófico. Los embriones globulares heterotróficos se desarrollan a expensas del endosperma y poseen una baja capacidad de síntesis; el desarrollo de los embriones en estado de 'corazón' depende de ciertos nutrimentos como hormonas, aminoácidos, carbohidratos, vitaminas, purinas y pirimidinas que se encuentran en el saco embrionario.

Con la formación de los cotiledones, el embrión pasa a ser autótrofo y se puede aislar de los óvulos y cultivarse in vitro en un medio relativamente simple, que contenga pequeñas cantidades de unos pocos nutrimentos. Diversos estudios con cruzamientos interespecíficos demostraron la importancia del normal desarrollo del endosperma en el desarrollo del embrión. Renner (1914) observó que los embriones híbridos originados de cruzamientos entre *Oenothera biennis* y *O. muricata* y entre *O. biennis* y *O. lamarckiana* crecieron inicialmente en forma normal, pero más tarde tuvieron un crecimiento muy lento debido a la desintegración del endosperma después de la fertilización.

Brink et al. (1947) sugirieron que el aborto de los embriones después de una hibridación amplia se debía probablemente al rompimiento del equilibrio entre el material que constituye los tejidos ovulares, el embrión en desarrollo y el endosperma. El aborto embrionario puede resultar también de anomalías en el desarrollo, lo que se refleja en un funcionamiento alterado del cigoto; en consecuencia, las anormalidades del suspensor afectarán la toma de nutrimentos (Blakeslee et al., 1944).

De acuerdo con Esen et al. (1973), la presencia de un embrión híbrido puede debilitar la formación del endosperma. Esto explica el hecho de que cuando se cruzan cultivares diploides y tetraploides de *Citrus*, muchas semillas con un endosperma normal no tienen embrión, mientras semillas con embriones tienen usualmente un endosperma anormal.

Digitized by Google

El aborto de los embriones, como respuesta a la hibridación interespecífica, puede provocar la proliferación nucelar; este hecho se ha descrito en *Medicago* (Ledingham, 1946), *Datura* (Satina et al., 1950) y *Solanum* (Beamish, 1950), y también en los cruzamientos de *Nicotiana rustica* con *N. glutinosa*, o con *N. tabacum* (Brink et al., 1941). Este fenómeno fue también descrito con respecto al cruzamiento de especies de *Lycopersicon* de diferentes niveles de ploidía (Cooper et al., 1944).

Es posible que los embriones híbridos posean una capacidad sintética más baja que los embriones que resultan de la autofecundación. Esto se aprecia al comparar el desarrollo de embriones obtenidos por autofecundación de *Hibiscus costatus* con el de los embriones híbridos de *H. costatus* con *H. aculeatus*, o con *H. furcellatus* (Asley, 1972).

Cultivo de Embriones

Hanning (1940) fue el primero en demostrar que es posible remover de los óvulos de la planta los embriones de cigotos maduros, y cultivarlos en un medio estéril que contenga los nutrimentos esenciales; en este medio los embriones se pueden desarrollar normalmente y germinar. Laibach (1925; 1929) obtuvo cultivos relativamente exitosos de embriones híbridos maduros procedentes del cruzamiento incompatible de *Linum perenne* x *L. austriacum*, y de ellos recuperó plantas normales.

Raghavan (1976), en una revisión de los avances realizados en el cultivo de embriones de varias especies económicamente importantes, señala entre ellos los siguientes: la hibridación entre algodón americano tetraploide y algodón asiático diploide (Joshi et al., 1966); la obtención de híbridos del cruzamiento incompatible entre *Lycopersicon esculentum* y *L. peruvianum* (Smith, 1944; Choudhury, 1955; Alexander, 1956); y la trasferencia, en el tomate, de resistencia al mosaico y al virus del marchitamiento así como a varias enfermedades producidas por hongos y por el nematodo de la raíz.

El cultivo de embriones ha sido efectivo en el mejoramiento de la cebada, al permitir rescatar los embriones que resultan de la hibridación entre *Hordeum vulgare* y *H. bulbosum*; el híbrido es resistente a las bajas temperaturas invernales y al mildeo (Konzak et al., 1951). Mediante la aplicación de esta técnica se han logrado algunos cruzamientos intergenéricos; por ejemplo, Cooper et al. (1944) cruzaron *Hordeum jubatum* con *Secale cereale*, un cruzamiento en el cual el desarrollo embrionario in vitro termina de 6 a 13 días después de la fertilización.

Digitized by Google

Otra aplicación del cultivo de embriones es el rescate de material de propagación en los frutales deciduos cuyas semillas son generalmente de baja viabilidad (Tukey, 1934; Blake, 1939; Danielsson, 1950); también ha servido para obtener híbridos en especies como peras y albaricoques, en las cuales se presenta aborto de los embriones (Lammerts, 1941).

El cultivo de embriones ha ayudado al mejoramiento genético de especies arbóreas porque acorta el período siembra-floración; los embriones cultivados in vitro no necesitan un período de latencia anterior a la germinación. Asimismo, ha sido efectivo para acortar el ciclo de mejoramiento de *Iris* spp., porque acorta el período de latencia de las semillas que oscila entre unos pocos meses y varios años; esta latencia se debe a algunos inhibidores del crecimiento del embrión presentes en el endosperma (Randolph et al., 1943) y en la cubierta de la semilla (Lenz, 1955). Por medio del cultivo de embriones, es posible acortar la latencia y producir plántulas para el trasplante a las 2 ó 3 semanas.

Factores que afectan el cultivo

Medio de cultivo. En los primeros estudios relacionados con el cultivo de embriones aislados se usó ampliamente la solución de Knop, aunque actualmente se considera que no es un medio óptimo.

El medio modificado de Murashige et al. (1962) parece estar más cerca del medio ideal (Monner, 1978) si se alteran las concentraciones de ciertos componentes. Por ejemplo, la concentración óptima de sacarosa para el crecimiento de embriones en forma de corazón es de 120 g/litro; existe en los embriones inmaduros en cultivo una tendencia a germinar precozmente, dando como resultado plántulas deformes con una probabilidad relativamente baja de sobrevivir (Dietrich, 1924); los niveles altos de sacarosa previenen la germinación precoz y proveen una fuente de carbohidratos mejor que otros azúcares.

Para embriones aislados de óvulos muy jóvenes se usan algunos medios relativamente complejos; los nutrimentos pueden incluir aminoácidos, vitaminas y varios extractos de plantas, además de los componentes orgánicos y minerales del medio. El agua de coco (AC), no procesada en el autoclave pero esterilizada por medio de filtración, ha sido muy benéfica para el cultivo de embriones de ciertas especies de plantas (van Overbeek, 1941); con la adición de glutamina o CH aumenta su efecto (Norstog, 1961). Los extractos del endosperma de otras plantas o del mesocarpo de los frutos tienen también un efecto estimulante en el crecimiento y desarrollo de los embriones.

Digitized by Google

Osmolaridad. El endosperma líquido empleado en los medios para embriones muy jóvenes tiene una osmolaridad alta (Kerr et al., 1944); incrementando la concentración de sacarosa en el medio es posible cultivar embriones muy jóvenes provenientes de varias especies de plantas. La sustitución de compuestos metabólicamente inertes, como el manitol o el glicerol, por sacarosa sugiere que el 2% de esta sustancia provee las condiciones energéticas óptimas para el crecimiento, mientras que el óptimo de osmolaridad puede variar dependiendo del estado de desarrollo del embrión aislado (Rietsema et al., 1953).

Monnier (1978) describió el uso de un sistema para cultivar embriones inmaduros. El medio de cultivo, que contiene una concentración alta de sacarosa, está ubicado en el centro del recipiente de cultivo y rodeado a su vez de otro medio que contiene una concentración más baja de sacarosa. Después de un tiempo, la osmolaridad en la parte central del recipiente de cultivo se reduce debido a la difusión de agua desde el medio que lo rodea; este fenómeno provee un gradiente continuo de concentraciones de sacarosa durante el desarrollo embrionario.

Reguladores del crecimiento. El efecto de los reguladores del crecimiento en el cultivo de embriones no es muy claro. Raghavan (1976) ha sugerido que el control hormonal del desarrollo embrionario puede estar correlacionado con el control físico del mismo cuando se mantiene una osmolaridad alta del medio.

Procedimiento para el cultivo de embriones de papaya

La papaya (*Carica papaya*) es susceptible al virus del anillo de la papaya (PRV) mientras que *C. cauliflora* es resistente, y esta resistencia se confiere a través de un solo gen dominante. Sin embargo, *C. cauliflora* y *C. papaya* son sexualmente incompatibles; aunque el embrión se desarrolla durante 1 a 2 meses después de la polinización, aborta generalmente a los 60 ó 70 días debido a que el endosperma no se desarrolla.

El procedimiento para rescatar los embriones híbridos comprende los siguientes pasos (Khuspe et al., 1980):

1) Remover las semillas de papaya de los frutos inmaduros, 2 meses después de la polinización con *C. cauliflora*; esterilizarlas con alcohol de 70% durante 5 minutos y dejarlas luego en una solución del 20% (v/v) de NaOCl de uso doméstico, durante 10 a 15 minutos. Después de enjuagar tres veces con agua destilada, las semillas se cortan para remover el embrión.

Digitized by Google

Los embriones están dentro del ambiente estéril del saco embrionario; de allí se pueden aislar con facilidad, aunque esta operación se debe hacer minuciosamente con el fin de evitar daños al mismo embrión o al suspensor (particularmente si los embriones son muy inmaduros). El aislamiento del embrión se facilita cuando el endosperma no se ha desarrollado. Otra alternativa consiste en aislar el embrión conjuntamente con la cubierta del integumento.

2) Inocular los embriones en un medio de cultivo estéril. En este caso se usa el medio basal de White (1954), el cual tiene 20 g/litro de sacarosa, 0.25 mg/litro de molibdato de sodio, 0.27 mg/litro de cloruro de cobre, 8 g/litro de agar, y un pH ajustado a 5.7 antes de su esterilización; ésta se hace en el autoclave durante 15 a 20 minutos a 1.1 kg/cm^2 y 121 °C. Cualquier recipiente (tubo de ensayo, caja Petri) es adecuado.

3) Incubar los embriones en la oscuridad a una temperatura de 25 °C durante 30 días. Al cabo de este tiempo se producirá una limitada germinación.

4) Trasferir las plántulas obtenidas a condiciones de luz (1.2 klux) con un fotoperíodo de 12 horas, durante 2 a 3 semanas.

5) Después de ese tiempo, colocar las plántulas (5 cm) en un medio de cultivo que contenga vitaminas y CH (400 mg/litro). En el lapso de otras 2 a 3 semanas se obtienen plántulas suficientemente vigorosas para el trasplante.

6) Trasferir las plántulas a una mezcla de turba y vermiculita (en la proporción de 1:1) y colocarlas bajo un rocío intermitente durante aproximadamente 2 semanas. Como alternativa, la planta se puede encerrar con su maceta en una bolsa de plástico durante 2 semanas, hasta cuando esté suficientemente vigorosa.

Todas las disecciones y trasferencias se deben realizar en una cámara estéril, y todos los instrumentos se deben esterilizar antes de usarlos. Las disecciones se deben hacer con bisturí no. 11; para efectuar el aislamiento del embrión es necesario utilizar un microscopio de disección.

Cultivo de Ovulos para la Hibridación

En ciertos cruzamientos interespecíficos, el cultivo de un óvulo completo ha sido más efectivo para el rescate de embriones que el cultivo del embrión

Digitized by Google

aislado. Cuando se dejan intactas las frágiles estructuras embrionarias (por ejemplo, el suspensor o el embrión globular mismo), hay menor posibilidad de que el embrión se dañe; además, el cultivo del óvulo intacto puede ayudar a la absorción de nutrimentos por el embrión. Haynes (1954) observó que el cultivo de embriones intactos de papa con 16 células, con preacondicionamiento durante unos pocos días, les permitió sobrevivir y desarrollarse mucho más rápidamente que los embriones aislados y cultivados mientras completaban su tiempo de desarrollo. Cuando se comparó el cultivo de óvulos con el cultivo de embriones de *Hevea brasiliensis* se obtuvieron resultados similares (Muzik, 1956).

Withner (1942) cultivó óvulos resultantes de cruces interespecíficos de ciertas especies de orquídeas y pudo acortar así el período entre la fertilización y la maduración de las semillas de esas plantas.

La inducción de poliembrionía en óvulos in vitro ha sido posible en varias especies incluyendo *Anethum* sp. (Johri et al., 1963), *Foeniculum vulgare, Trachyspermun ammi, Ammi majus* y *Coriander sativum* (Johri et al., 1966). Litz et al. (1981) describieron la poliembrionía in vitro en óvulos derivados de la hibridación de *Carica papaya* con *C. cauliflora*, lo que incrementa la eficiencia de la hibridación.

El cultivo de óvulos se ha usado para rescatar embriones derivados de cruzamientos interespecíficos. Así se obtuvo un híbrido entre especies de algodón del viejo y del nuevo mundo (Joshi, 1962; Joshi et al., 1972). Litz et al. (1982, 1983) y Moore et al. (1984) usaron el cultivo de óvulos para rescatar embriones de *Carica papaya* x *C. cauliflora*. El cultivo de óvulos también ha sido útil para rescatar híbridos intergenéricos, por ejemplo entre *Lolium perenne* x *Festuca rubra* (Nitsche et al., 1976) y para rescatar embriones abortados en uvas sin semilla, variedad Thompson (Emershad et al., 1984).

Factores que afectan el cultivo

Placenta. La velocidad del desarrollo embrionario en los cultivos de óvulos se puede aumentar, algunas veces, por medio del cultivo de óvulos con la placenta todavía adherida a ellos (Chopra et al., 1963). La placenta de *Capsicum* puede estimular el desarrollo de los óvulos trasplantados de varias especies de diferentes familias (Melnick et al., 1964).

Osmolaridad. La concentración osmótica del medio afecta el desarrollo de los embriones separados y también el cultivo de óvulos (Wakisuka et al., 1974). Los óvulos de *Petunia hybrida*, removidos y cultivados tres días

Digitized by Google

después de la polinización, requieren 8% de sacarosa mientras que los cultivados 4 días después de la polinización requieren 6% de sacarosa.

Reguladores de crecimiento. El AC esterilizada por filtración (Sachar et al., 1959) y la KIN (Maheshwari, 1958; Maheshwari et al., 1961), usadas conjuntamente, estimulan el crecimiento y el desarrollo de embriones en los cultivos de óvulos. La CH usada junto con el AC han sido efectivas para el desarrollo de óvulos de *Abelmoschus esculentus* (Bajaj, 1964).

Procedimiento para el cultivo de óvulos de papaya

Litz et al. (1982 y 1983) idearon el siguiente procedimiento:

1) Cosechar los frutos inmaduros de papaya entre los 30 y los 70 días después de que se ha efectuado la polinización con polen de *C. cauliflora*. La superficie de cada fruto se esteriliza durante 30 minutos con una solución de 20 a 30% (v/v) de NaOCl, de uso doméstico; después de esto no es necesario lavar con agua destilada. Los frutos se dividen longitudinalmente con un cuchillo estéril y los óvulos se remueven usando pinzas esterilizadas.

2) Sembrar los óvulos en cajas Petri previamente esterilizadas. El medio de cultivo es el de Murashige y Skoog (1962), modificado por la adición de 60 g/litro de sacarosa, de 400 mg/litro de glutamina, de 8 g/litro de agar, de 20% (v/v) de AC esterilizada, y de 1 a 2 mg/litro de BAP. El pH se debe ajustar a 5.7 antes de someter el medio al autoclave, a 1.1 kg/cm^2 y 121 °C, durante 15 minutos.

3) Incubar los cultivos a 25 °C bajo una fuente de luz (1.1 klux) con un fotoperíodo de 16 horas. Después de 5 a 6 semanas, la mayoría de los óvulos más inmaduros se abren dejando libre una masa de embriones, y de callo derivado del embrión híbrido. Los óvulos más maduros se deben disectar con el fin de determinar si el embrión se ha desarrollado o si la poliembrionía ha sido inducida.

4) Subcultivar el callo. Se puede usar el mismo medio, pero añadiendo 2 mg/litro de 2,4-D en lugar de BAP o AC, para incrementar la cantidad de callo; esto ocurre más eficientemente en medio líquido. La embriogénesis somática es evidente cuando el callo híbrido se subcultiva en un medio libre de 2,4-D. La maduración y la germinación de los embriones somáticos derivados de los embriones sexuales (resultantes del cruzamiento entre *C. papaya* y *C. cauliflora*) ocurren en un medio sin reguladores del crecimiento.

Digitized by Google

5) Trasferir las plántulas a un medio de trasplante hasta cuando alcancen su crecimiento normal.

Obtención de Monoploides

Kao et al. (1969) fueron los primeros en informar sobre el uso del cultivo de embriones para producir plantas haploides de cebada. Normalmente, cuando se cruza *Hordeum vulgare* con *H. bulbosum*, los cromosomas de esta última especie son eliminados del embrión porque el crecimiento de las células haploides es más lento que el de las diploides; usando en cambio la técnica del cultivo de embriones, es posible aislar haploides y cultivarlos in vitro hasta la madurez, lo que hace posible la obtención de plantas haploides de *H. vulgare*.

Procedimiento para la producción de monoploides en cebada

Kao et al. (1969) desarrollaron el siguiente procedimiento:

1) Exponer las plantas de *H. vulgare* y de *H. bulbosum* a un fotoperíodo de 18 horas (84×10^3 lux) y a temperaturas de 18 °C durante el día y de 13 °C durante la noche. Bajo estas condiciones las flores aparecen aproximadamente al mes y medio, aunque el tiempo de floración puede variar, dependiendo del cultivar usado.

2) Emascular las flores de *H. vulgare* 2 ó 3 días antes de la antesis, removiendo las anteras con unas pinzas. Para ello, se corta con unas tijeras el tercio superior de la corola de las flores y al día siguiente se remueven las anteras, después de que hayan emergido a través del corte. Para detectar una posible autopolinización accidental, se debe observar la presencia del endosperma en las semillas, ya que éstas no lo tienen cuando provienen del cruzamiento con *H. bulbosum*.

3) A los 2 días después de la emasculación, aplicar el polen de *H. bulbosum* al estigma de las flores de *H. vulgare*.

4) Cosechar las espigas 20 a 30 días después de la polinización, y esterilizarlas superficialmente durante 5 minutos con una solución de NaOCl de uso doméstico, al 20%. Enjuagar luego con agua destilada esterilizada.

5) Abrir los frutos con una aguja de disección usando una cámara limpia (esterilizada) e instrumentos estériles, y con la ayuda de un microscopio de disección con un aumento de 10X.

Digitized by Google

6) Cultivar el embrión de tal manera que la parte ventral esté en contacto con el medio; el medio de cultivo usado es B5 (Gamborg et al., 1968) solidificado con agar. Los embriones se incuban a 15-25 °C durante 2 semanas en la oscuridad, para evitar la germinación precoz.

7) Trasferir los embriones diferenciados a la luz, con un fotoperíodo de 15 h (500-1000 lux). Cuando las plantas se hayan establecido, trasferirlas a una fuente de luz de alta intensidad, por ejemplo 40-50 x 10^3 lux.

8) Trasplantar las plantas obtenidas a un suelo liviano y cultivarlas bajo un rocío intermitente hasta cuando estén suficientemente vigorosas.

Los monoploides de cebada se pueden distinguir porque presentan ápices erectos, hojas sin pubescencia y tallos delgados. Los híbridos entre *H. vulgare* y *H. bubosum* generalmente tienen hojas anchas y hojas y tallos pubescentes, y presentan un gran número de rizomas.

Fertilización de Ovulos in Vitro

El cultivo de embriones y óvulos se ha usado exitosamente en la obtención de híbridos provenientes de cruzamientos interespecíficos e intergenéricos, en los cuales el endosperma no se desarrolla normalmente. La fertilización de óvulos in vitro se ha desarrollado como otra alternativa para realizar cruzamientos y para solucionar los problemas de autoincompatibilidad.

Hay barreras fisiológicas que previenen la fusión de gametos en las especies autoincompatibles; en algunas plantas ocurre la inhibición de la germinación del polen, y también se inhibe el crecimiento del polen dentro del estilo. Los procesos inhibidores que ocurren en el estigma o dentro del estilo se pueden superar con el cultivo de óvulos conjuntamente con los granos de polen en germinación.

El éxito de la fertilización de óvulos in vitro depende de ciertos factores. Tanto la edad del óvulo como la del polen se deben determinar cuidadosamente para detectar los estados de desarrollo apropiados para la germinación del polen in vitro y para la fertilización del óvulo; la composición del medio de cultivo es también importante para lograr una germinación normal del polen y un desarrollo normal del óvulo fertilizado. Las condiciones deben posibilitar una alta frecuencia de semillas viables.

Karta et al. (1962) demostraron por primera vez la fertilización de óvulos cultivados in vitro usando *Papaver somniferum*. Aplicaron a los óvulos en cultivo, no polinizados, granos de polen de la misma especie de planta y

Digitized by Google

obtuvieron la germinación de los granos de polen con la subsiguiente fertilización de los óvulos; así obtuvieron semillas normales en el mismo medio. Desde entonces, se han polinizado in vitro óvulos de varias especies, por ejemplo, *Dianthus caryophyllus*, *Nicotiana tabacum*, *N. rustica*, *Argemone mexicana*, *Escheschlozia californica*, *Petunia violacea*, *Antirrhinum majus* y *Dicranostigma franchetianum* (Rangaswamy, 1977; Kanta et al., 1963; Maheshwari et al., 1964; Zenkteler, 1965; Rangaswamy et al., 1969). Todas estas fertilizaciones fueron efectuadas con especies autocompatibles.

Rangaswamy et al. (1967) demostraron que la polinización de óvulos aislados no era factible para superar la autoincompatibilidad de *Petunia axilaris*; sin embargo, si se polinizaba in vitro la placenta con los óvulos adheridos a ella, se producía la fertilización y el desarrollo normal del embrión y del endosperma. La polinización de los óvulos unidos a la placenta supera algunas de las dificultades que se presentan en el cultivo de embriones; son problemas debidos regularmente a la formación excesiva de callos o a los daños causados al embrión. El empleo de este método permitió superar también la autoincompatibilidad de *Petunia hybrida* (Niimi, 1970; Wagner et al., 1973).

También se ha logrado la hibridación interespecífica e intergenérica en especies incompatibles tales como *Melandrium album* x *M. rubrum* y *M. album* x *Silene schafta* (Zenkteler, 1967, 1970; Zenkteler et al., 1975).

Embriogenésis Somática a Partir de Nucelas

El cultivo de óvulos tiene otra aplicación en la regeneración de embriones adventicios y de callos embriogénicos a partir de las nucelas de óvulos jóvenes en plantas leñosas. En muchas plantas, particularmente de familias cuyas especies son predominantemente tropicales, las nucelas tienen la capacidad de producir embriones adventicios in vitro; la producción de tales embriones se puede estimular in vitro en éstas y en otras especies, cuya nucela no es normalmente embriogénica.

Por embriogénesis somática, originada directamente en explantes de nucelas o de callos provenientes de plantas leñosas, se ha regenerado un número de tales plantas; la lista incluye especies y cultivares poliembriónicos y monoembriónicos de *Citrus* (Maheshwari et al., 1958; Rangan et al., 1968), y de mango *Mangifera indica* (Litz et al., 1984); y especies monoembriónicas de manzana *Malus domestica* (Eichholtz et al., 1979), de *Ribes rubrum* (Zatyko et al., 1975), y de uva *Vitis vinifera* (Mullins et al., 1976);

Digitized by Google

también incluye especies de árboles frutales de la familia Myrtaceae que possen poliembrionía (Litz, 1984b y 1984c).

A partir de óvulos se han inducido embriones somáticos de *Citrus* (Button et al., 1971). También se ha obtenido la embriogénesis somática en cultivos nucelares de ciertas especies de cucurbitáceas, como *Luffa cylindrica* y *Trichosanthes anguina* (Rangaswamy et al., 1975). Los estudios de embriogénesis somática obtenida de óvulos en cultivo y de explantes nucelares han sido objeto de varias revisiones recientes (Button et al., 1977; Spiegel-Roy et al., 1980; Litz et al., 1985).

En muchas plantas leñosas los callos regenerados se deben obtener de embriones o de plántulas, ya que cuando provienen de tejidos maduros pierden la mayor parte de su potencial regenerador de plantas. Teniendo en cuenta el éxito alcanzado con los cultivos nucelares para regenerar especies de plantas leñosas comúnmente difíciles de cultivar in vitro, el cultivo nucelar se puede utilizar para muchas especies de árboles.

Obtención de embriones somáticos de la nucela de óvulos de mango

Litz et al. (1982) y Litz (1984a) desarrollaron el siguiente procedimiento:

1) Determinar el estado de desarrollo del embrión cigótico en las plantas monoembriónicas, o del grupo de embriones en los cultivares poliembriónicos. Normalmente, es preferible utilizar óvulos en los que el saco embrionario haya sido llenado por el embrión o los embriones en crecimiento; en el mango, esto ocurre de los 40 a los 60 días después de la polinización, dependiendo del cultivar utilizado.

2) Esterilizar la superficie de las frutas inmaduras sumergiéndolas durante 20 a 30 minutos en una solución de 20% a 30% de NaOCl (normalmente usada en labores domésticas). Trabajar en una cámara estéril.

3) Remover, bajo condiciones asépticas, los óvulos de las frutas y trasferirlos a cajas Petri que contengan el medio de Murashige et al. (1962) modificado. Para preparar este medio, se usa la mitad de las sales mayores, más 60 g/litro de sacarosa, 400 mg/litro de glutamina, 100 mg/litro de ácido ascórbico, 20% (v/v) de AC esterilizada por filtración, y 8 g/litro de agar; se ajusta el pH a 5.7 y se somete el medio al autoclave durante 16 a 20 minutos, a 121 ^{0}C y a 1.1 kg/cm^{2}.

Digitized by Google

4) Después de 2 a 3 semanas, disectar los óvulos y desechar cuidadosamente el embrión cigótico de los óvulos monoembriónicos o el grupo de embriones de los óvulos poliembriónicos; trasferir la nucela a un medio fresco, de la misma formulación anterior, o que contenga de 1 a 2 mg/litro de 2,4-D en lugar del AC. En algunos cultivares poliembriónicos de mango, el embrión cigótico aborta después de la fertilización; en este caso, el grupo de embriones adventicios nucelares se puede usar como un explante.

5) A las 3 ó 4 semanas, cuando se hace evidente la formación del callo a partir de la nucela, subcultivar los callos embriogénicos; usar medio líquido con 2,4-D para obtener bastante cantidad de callos.

6) Trasferir los callos a un medio sin 2,4-D, con el fin de estimular la embriogénesis, como también la maduración y la germinación de los embriones adventicios.

Referencias

Alexander, L. J. 1956. Embryo culture of tomato interspecific hybrids. Phytopathology 46:6. (Resumen analítico.)

Ashley, T. 1972. Zigoti shrinkage and subsequent development in some *Hibiscus* hybrids. Planta 108:303-317.

Bajaj, Y. P. S. 1964. Development of ovules of *Abelmoschus esculentus* L. var. *Pusa Sawani* in vitro. Proc. Natl. Inst. Sci. India 30B:175-185.

Beamish, K. I. 1950. Seed failure following hybridization between the hexaploid *Solanum demissum* and four diploid *Solanum* species. Amer. J. Bot. 42:297-304.

Blake, M. A. 1939. Some results of crosses of early ripening varieties of peaches. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 37:232-241.

Blakeslee, A. F. y Satina, S. 1944. New hybrids from incompatible crosses in *Datura* through culture of excised embryos on malt media. Science 99:331-334.

Brink, R. A. y Cooper, D. C. 1941. Incomplete seed failure as a result of somatoplastic sterility. Genetics 26:487-505.

——— y ———: 1947. The endosperm in seed development. Bot. Rev. 13:423-541.

Button, J. y Bornman, C. H. 1971. Development of nucellar plants from unpollinated and unfertilized ovules of the Washington navel orange in vitro. J. S. Afr. Bot. 37:127-134.

Digitized by Google

——— y Kochba, J. 1977. Tissue culture in the citrus industry. En: Reinert, J. y Bajaj, Y. P. S. (eds.). Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture. Springer-Verlag, Alemania. p. 70-92.

Chopra, R. N. y Sabharwal, P. S. 1963. In vitro culture of ovules of *Gynandropsis gynandra* (L.) Briq. and *Impatiens balsamina* L. En: Maheshwari, P. y Rangaswamy, N. S. (eds.). Plant tissue and organ culture: A symposium of the International Society of Plant Morphology. University of Delhi, Delhi, India. p. 257-264.

Choudhury, B. 1955. Embryo culture technique; 3: Growth of hybrid embryos *Lycopersicon esculentum peruvianum* in culture medium. Indian Jour. Hort. 12:155-156.

Cooper, D. C. y Brink, R. A. 1944. Collapse of the seed following the mating of *Hordeum jubatum* x *Secale cereale*. Genetics 29:370-390.

Danielsson, B. 1950. Embryokulturer av stenfrukttrad. Sver. Pomol. Foren. Arsskr. Stockholm 51:200-206.

Dieterich, K. 1924. Uber kultur von embryonen ausserhalfb des samens. Flora 117:379-417.

Eichholtz D.; Robitaille, H.A. y Hasegawa, P.M. 1979. Adventive embryology in apple. HortScience 14:699-700.

Emershad, R. L. y Ramming, D. W. 1984. In ovulo embryo culture of *Vitis vinifera* L. cv. Thompson seedless. Amer. J. Bot. 71:873-877.

Esen, A. y Soost, R. K. 1973. Seed development in Citrus with special reference to 2x and 4x crosses. Amer. J. Bot. 60:448-462.

Gamborg, O. L.; Miller, R. A. y Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50:151-158.

Hannig, E. 1904. Zür physiologie pflanzlicher embryonen; 1: Uber die culture von cruciferen-embryonen ausserhalb des embryosacks. Bot. Ztg. 62:45-80.

Haynes, F. L. 1954. Potato embryo culture. Amer. Potato J. 31:282-288.

Johri, B. M. y Sehgal, C. B. 1963. Chemical induction of polyembryony *Anethum graveolens* L. Naturwiss. 50:47-48.

——— y ———. 1966. Growth responses of ovaries of *Anethum*, *Foeniculum* and *Trachyspermum*. Pytomorphology 16:364-378.

Joshi, P. C. 1962. In vitro growth of cotton ovules. En: Plant embryology: A symposium. Council of Scientific and Industrial Research, Nueva Delhi, India. p. 199-204.

——— y Johri, B. M. 1972. In vitro growth of ovules of *Gossypium hirsutum*. Phytomorphology 22:195-209.

Digitized by Google

——— y Pundir, N. S. 1966. Growth of ovules in the cross *Gossypium arboreum* x *G. hirsutum* in vivo and in vitro. Indian Cotton Jour. 20:23-29.

Karta, K. y Maheshwari, P. 1963. Intraovarian pollination in some Papaveraceae. Phytomorphology 13:215-229.

———; Rangaswamy, N. S. y Maheshwari, P. 1962. Test-tube fertilization in a flowering plant. Nature 194:1214-1217.

Kao, K. N. y Kasha, K. J. 1969. Haploidy from interspecific crosses with tetraploid barley. En: Nialn, R. A. (ed.). Barley genetics. Washington State University Press. v. 2, p. 82-88.

Kerr, T. y Anderson, D. B. 1944. Osmotic quantities in growing cotton bolls. Plant Physiol. 19:338-349.

Khuspe, S. S.; Hendre, R. R.; Mascarenhas, A. F. y Jagannathan, V. 1980. Utilization of tissue culture to isolate interspecific hybrids in *Carica papaya* L. En: Rao, P. S.; Heble, M. R. y Chadha, M. S. (eds.). Plant tissue culture, genetic manipulation, and somatic hybridization of plant cells. Bhabba Atomic Research Committee (BARC), Bombay, India. p. 198-205.

Konzak, C. F.; Randolph, L. F. y Jensen, N. F. 1951. Embryo culture of barley species hybrids: Cytological studies of *Hordeum sativum* x *Hordeum bulbosum*. J. Hered. 42:125-134.

Laibach, F. 1925. Das Taubwerden von Bastardsamen und die kunstliche Aufzucht früh absterbender Bastardembryonen. Zeitschr. Bot. 17:417-459.

———. 1929. Ectogenesis in plants. Jour. Hered. 20: 201-208.

Lammerts, W.E. 1942. Embryoculture an effective technique for shortening the breeding cycle of deciduous trees and increasing germination of hybrid seeds. Am. J. Bot. 29:166-171.

Ledingham, G. F. 1946. Cytological and development studies of hybrids between *Medicago sativa* and a diploid form of *Medicago falcata*. Genetics 25:1-15.

Lenz, L. W. 1955. Studies in *Iris* embryo culture; 1: Germination of embryos of the subsection *Hexapogon* Benth. (sect. *Regelia sensu* Dykes). Aliso 3:173-182.

Litz, R. E. 1984a. In vitro somatic embryogenesis from nucellar callus of monoembryonic mango. HortScience 19:715-717.

———. 1984b. In vitro somatic embryogenesis from callus of jaboticaba, *Myrciaria cauliflora*. HortScience 19:62-64.

———. 1984c. In vitro responses of adventitious embryos of two polyembryonic *Eugenia* species. HortScience 19:720-722.

——— y Conover, R. A. 1981. In vitro polyembryony in *Carica papaya* L. ovules. Z. Pflanzenphysiol. 104:285-288.

Digitized by Google

——— y ———. 1982. In vitro somatic embryogenesis and plant regeneration from *Carica papaya* L. ovular callus. Plant Sci. Lett. 26:153-158.

——— y ———. 1983. High frequency somatic embryogenesis from *Carica* suspension cultures. Ann. Bot. 51:683-686.

———, Knight, R. J. y Gazit, S. 1982. Somatic embryos from cultured ovules of polyembryonic *Mangifera indica* L. Plant Cell Rpt. 1:264-266.

———; ——— y ———. 1984. *In vitro* somatic embryogenesis from *Mangifera indica* L. callus. Scientia Hort. 22:233-240.

———; Moore, G. A. y Srinivasan, C. 1985. In vitro systems for propagation and improvement of tropical fruits and palms. Hort. Rev. 7.

Maheshwari, N. 1958. In vitro culture of excised ovules of *Papaver somniferum*. Science 127:342.

——— y Lal, M. 1961. In vitro culture of excised ovules of *Papaver somniferum* L. Phytomorphology 11:307-314.

Maheshwari, P. y Karta, K. 1964. Control of fertilization. En: Linskens, H. F. (ed.). Pollen physiology and fertilization. North-Holland Publ., Amsterdam, Holanda. p. 187-193.

——— y Rangaswamy, N. S. 1958. Polyembryony and in vitro culture of embryos of *Citrus* and *Mangifera*. Indian J. Hort. 15:275-282.

Melnick, V. M.; Holm, L. y Struckmeyer, B. E. 1964. Physiological studies on fruit development by means of ovule transplantation *in vivo*. Science 145:609-611.

Monnier, M. 1978. Culture of zygotic embryos. En: Thorpe, T. A. (ed.). Frontiers of plant tissue culture 1978. International Association for Plant Tissue Culture, Calgary, Canadá. p. 277-295.

Moore, G. A. y Litz, R. E. 1984. Biochemical markers for *Carica papaya*, *C. cauliflora* and plants from somatic embryos of their hybrid. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 109:213-218.

Mullins, M. G. y Srinivasan, C. 1976. Somatic embryos and plantlets from an ancient clone of the grapevine (cv. Cabernet-Sauvignon) by apomixis in vitro. J. Exp. Bot. 27:1022-1030.

Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15:473-497.

Muzik, T. J. 1956. Studies on the development of the embryo and seed of *Hevea brasiliensis* in culture. Lloydia 19:86-91.

Nhmi, Y. 1970. In vitro fertilization in the self-incompatible plant *Petunia hybrida*. J. Jap. Soc. HortSci. 39:345-352.

Digitized by Google

Nitzsche, W. y Hennig, L. 1976. Fruchtknotenkultur bei Grasern. Z. Pflanzenzucht 77:80-82.

Norstog, K. 1961. The growth and differentiation of cultured barley embryos. Amer. Jour. Bot. 48:876-884.

Raghavan, V. 1976. Experimental embryogenesis in vascular plants. Academic Press, Nueva York.

———. 1977. Applied aspects of embryo culture. En: Reinert, J. y Bajaj, Y. P. S. (eds.). Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture. Springer-Verlag, Alemania. p. 375-397.

——— y Srivastava, P.S. 1982. Embryo culture. En: Johri, B. M. (ed.). Experimental embriology of vascular plants. Springer-Verlag, Alemania. p. 195-230.

Randolph, L. F. 1945. Embryo culture of Iris seed. Bull. Amer. Iris Soc. 97:33-45.

——— y Cox, L. G. 1943. Factors influencing the germination of Iris seed and the relation of inhibiting substances to embryo dormancy. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 43:284-300.

Rangan, T. 1982. Ovary, ovule, and nucellus culture. En: Johri, B. M. (ed.). Experimental embryology of vascular plants. Springer-Verlag, Alemania. p. 105-129.

———; Murashige, T. y Bitters, W. P. 1968. In vitro initiation of nucellar embryos in monoembryonic Citrus. HortScience 3:226-227.

Rangaswamy, N. S. 1977. Application of in vitro pollination and in vitro fertilization. En: Reinert, J. y Bajaj, Y. P. S. (eds.). Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture. Springer-Verlag, Alemania. p. 412-425.

———. 1982. Nucellus as an experimental system in basic and applied tissue culture research. En: Rao, A. N. (ed.). Tissue culture of economically important plants. Committee on Science and Technology in Developing Countries (COSTED) and ANBS, Singapur. p. 269-286.

——— y Shivanna, K. R. 1967. Induction of gamete compatibility and seed formation in axenic cultures of a diploid self-incompatible species of *Petunia*. Nature 216:937-939.

——— y ———. 1969. Test-tube fertilization *Dicranostigma franchetianum* (Prain) Fedde. Current Sci. 38:257-259.

——— y ———. 1975. Nucellus culture of two cucurbits *Luffa cylindrica* and *Trichosanthes anguina*. Ann. Bot. 39:193-196.

Renner, O. 1914. Befruchtung und Embryobildung bei *Oenothera lamarckiana* und einigen verwandten Arten. Flora 107:115-150.

Digitized by Google

Rietsema, J.; Satina, S. y Blakeslee, A. F. 1953. The effect of sucrose on the growth of *Datura stramonium* embryos in vitro. Amer. J. Bot. 40:538-545.

Sachar, R. C. y Kapoor, M. 1959. In vitro culture of ovules of *Zephyranthes*. Phytomorphology 9:147-156.

Satina, S.; Rappaport, J. y Blakeslee, A. F. 1950. Ovular tumours connected with incompatible crosses in *Datura*. Am. J. Bot. 37:576-586.

Smith, P. G. 1944. Embryo culture of a tomato species hybrid. Proc. Am. Soc. Hort. Sci. 44:413-416.

Spiegel-Roy, P. y Kochba, J. 1980. Embryogenesis in *Citrus* tissue cultures. En: Fiechter, A. (ed.). Advances in biochemical engineering, plant and cell cultures. Springer-Verlag, Alemania. p. 27-48.

Tukey, H. B. 1944. The excised-embryo method of testing the germinability of fruit seed with particular reference to peach seed. Proc. Am. Soc. Hort. Sci. 45:211-219.

van Overbeek, J. 1941. Hormonal control of embryo and seedling: Cold in coconut milk essential for growth and development of very young *Datura* embryos. Science 94:350-351.

Wagner, G. y Hess, D. 1972. *In vitro*-Befruchtungen bei *Petunia hybrida*. Z. Pflanzenphysiol. 69:262-269.

Wakisuka, T. y Nakajima, T. 1974. Effect of cultural conditions on the in vitro development of ovules in *Petunia* hybrids. Vilm. Jpn. J. Breed. 24:182-187.

Withner, C. L. 1942. Nutrition experiments with orchid seedlings. Bull. Orchid Soc. 1:112-114.

Yeung, E. C.; Thorpe, T. A. y Jensen, C. J. 1981. In vitro fertilization and embryo culture. En: Thorpe, T. A. (ed.). Plant tissue culture methods and applications in agriculture. Academic Press, Nueva York. p. 253-271.

Zatyko, J. M.; Simon, I. y Szabo, C. S. 1975. Induction of polyembryony in cultivated ovules of red currant. Plant Sci. Lett. 4:281-283.

Zenkteler, M. 1965. Test-tube fertilization in *Dianthus caryophyllus* Linn. Naturwissenschaften 23:645-646.

———. 1967. Test-tube fertilization in ovules in *Melandrium album* Mill. with pollen grains of several species of the *Caryophyllaceae* family. Experientia 23:775.

———. 1970. Test-tube fertilization of ovules in *Melandrium album* Mill. with pollen grains of *Datura stramonium*. Experientia 26:661-662.

———; Misiura, E. y Guzowska, I. 1975. Studies in obtaining hybrid embryos in test tubes. En: Johri, B. M. Form, structure and function in plants. Meerut, Sarita Prakashan, India. p. 180-187.

Digitized by Google

Capítulo 13

Estabilidad genotípica en células, tejidos y plantas derivadas de cultivos in vitro

A. D. Krikorian*

Agradecimientos

El autor reconoce de manera especial la contribución de los asistentes y asociados de investigación que a través de los años han participado en diferentes proyectos de investigación en su laboratorio. También agradece a la NASA su apoyo financiero durante un extenso período, así como a la Cambridge Philosophical Society por permitirle usar los resúmenes de Krikorian (1982).

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

Digitized by Google

Introducción

Durante muchos años se ha reconocido que los cultivos asépticos, especialmente los de callos, de células libres y de protoplastos, producen progenies que difieren considerablemente del material inicial.

Antes de que los procedimientos de multiplicación clonal por explantes con estructura organizada —como ápices caulinares o yemas laterales— se empezaran a utilizar ampliamente, la variación se consideraba, por lo general, como una consecuencia de los cambios cromosómicos ocurridos durante el proceso del cultivo. Se consideraba a menudo que el fracaso observado en los callos o en las células cultivadas para organizarse y producir plántulas era el resultado de una amplia gama de trastornos citológicos (Krikorian et al., 1983). Sin embargo, a medida que mejoraron las tecnologías de cultivo y que se observó la frecuente recuperación de plantas en el caso de algunos genotipos bastante atípicos (Gleba et al., 1984), el potencial para sacar provecho de todo tipo de variación se consideró cada vez más como un beneficio adicional de los métodos de cultivo in vitro.

Desde hace algún tiempo se habla sobre los beneficios prácticos que se obtendrán de la ingeniería genética del ADN recombinante en las plantas superiores (Bottino, 1975; Brock, 1977). Sin embargo, es significativo que las pocas plantas mejoradas como resultado de las 'nuevas tecnologías', y disponibles hasta el momento, provengan de variantes y mutantes espontáneos derivados de cultivos in vitro (Scowcroft et al., 1982; Larkin et al., 1983; Hanson, 1984; Evans et al., 1984).

Todavía hay que verificar si la mayoría de las variaciones obtenidas en las plantas productoras de semilla son heredables o no (Evans et al., 1983); en todo caso, hay un número significativo de tales plantas cuya estabilidad es suficiente para sugerir que es posible incrementar la cantidad de variantes útiles.

En los próximos años, los trabajos sobre la naturaleza y el control de la estabilidad en los sistemas de cultivo aséptico ocuparán los esfuerzos de muchos científicos. Aunque el conocimiento actual de todos estos aspectos es muy fragmentario, cada vez es más claro que en un sistema dado podrían operar uno o varios mecanismos que produzcan la variación encontrada. Entre estos mecanismos, los siguientes pueden desempeñar un papel importante: la segregación de ciertos tipos celulares presentes en el explante primario, las mutaciones o cambios ocasionados por el medio de cultivo, las presiones de selección, los reordenamientos cromosómicos y otras modificaciones del cariotipo, y las interacciones núcleo-citoplasma.

Digitized by Google

En resumen, lo que muchos denominan actualmente variación somaclonal (Brettell et al., 1979; Larkin et al., 1981; Scowcroft et al., 1982) es un fenómeno bien establecido, pero cuyas causas, hasta el momento, son oscuras y posiblemente sigan siendo temas de investigaciones especiales. Algunas de las posibles causas inmediatas de la variación fenotípica de las plantas regeneradas son:

a. Prevalencia del cariotipo específico de plantas y tejidos polisomáticos, quiméricos y de mosaicos.

b. Cambios en el cariotipo, debidos a una respuesta diferencial a los procedimientos de cultivo (composición del medio de cultivo o del ambiente).

c. Aneuploides no separables en el cultivo.

d. Cese mitótico que lleva a líneas poliploides.

e. Reordenamiento de genes somáticos o mutaciones del cariotipo.

f. Amplificación o disminución de genes.

g. Reordenamiento de mutaciones en genomas de los organelos.

h. Interacciones núcleo-citoplasma alteradas, que dan como resultado cambios de regulación.

i. Reorganización súbita del genoma por transposones.

j. Efectos de inversiones, traslocaciones, y otros accidentes cromosómicos.

Actualmente se vive un período inicial de comprensión de los cambios genéticos y epigenéticos que ocurren en los cultivos in vitro y en las plantas derivadas de tales cultivos (Earle et al., 1982; Chaleff, 1981 y 1983; Krikorian et al., 1983; Reisch, 1983).

Cultivo in Vitro como Fuente de Variación y de Nuevos Genotipos

Como se discutió en el Capítulo 5, existen estrategias de multiplicación clonal que pueden reducir al mínimo la posibilidad de inducir cambios indeseables o inestabilidad genética; los métodos que favorecen la estabilidad son aquellos que se basan en unidades de propágulos con una organización previa, tales como meristemas, yemas laterales, nudos, y otras. En

Digitized by Google

este contexto, las estrategias de propagación se pueden considerar como equivalentes a un tipo de "horticultura en un vaso de cultivo bajo condiciones asépticas".

Swingle (1940, 1952), Dermen (1960), Dore (1965) y Hartmann et al. (1984) tratan excelentemente los principios comprometidos en la organogénesis y en la regeneración de plantas superiores, según la perspectiva de la propagación. En sus discusiones se encuentran las implicaciones para la estabilidad genética y la variación.

Sistemas de micropropagación a partir de explantes organizados

Una consideración importante es que incluso cuando se utilizan propágulos tradicionales altamente organizados, como son los esquejes radicales o caulinares, hay algunas plantas que presentan mayor tendencia que otras a formar mutaciones de yemas y diversificaciones.

No existe motivo para pensar que el desempeño de tales plantas en cultivos asépticos sea muy diferente (Conger, 1977; Zimmerman, 1981). En realidad, la formación de mutantes o mutaciones en la horticultura convencional y en la agricultura se ha estudiado inadecuadamente, y se requiere más investigación en esta importante área; sin duda, la facilidad o la dificultad relativas para inducir las mutaciones útiles en forma controlada es la base del 'fitomejoramiento mutacional' (Sigburbjornsson, 1977; Broertjes et al., 1978; IAEA, 1982).

En este momento no está claro cuáles son las causas de las mutaciones bajo condiciones de cultivo en el campo. Hace algunos años se pensaba que los reguladores del crecimiento de la planta eran mutágenos per se, lo cual todavía no está tan bien establecido. (Singh et al., 1975; Carlson et al., 1983; Dolezel et al., 1984). Desde otra perspectiva, muchos investigadores están convencidos de que los monocultivos se deberían evitar, ya que aumentan la vulnerabilidad de las cosechas (Day, 1973; Marshall, 1977; Duvick, 1978); de esta manera la utilización de material variable para las siembras masivas se percibiría como una alternativa para mantener la estabilidad de las cosechas.

Organogénesis

La formación de órganos en explantes de callos se conoce como la ruta de la organogénesis indirecta. Un callo sin estructura organizada puede

Digitized by Google

dar origen a brotes y raíces; el tamaño del callo del cual pueden emerger estructuras organizadas varía considerablemente.

Vasil et al. (1965) fueron quienes primero describieron la obtención de una planta de tabaco madura a partir de una sola célula cultivada inicialmente en una microcámara. La célula se mantuvo en 'microcultivo', en gota suspendida, donde se dividió progresivamente en un grupo de células y luego formó una masa de callo; ésta fue inducida a producir brotes y raíces en un medio sólido.

No hubo indicación de que ocurriese una embriogénesis somática o una embrionía adventicia similares a las que se presentaban en la zanahoria (ver el Capítulo 5, Figuras 5.3 y 5.4). Sin embargo, desde la perspectiva de la propagación clonal, la importancia particular de ese trabajo era que el genotipo alterado de las células que originaban la masa de callo se reflejaría en la planta resultante (Broertjes et al., 1980).

Por esa razón, Murashige et al. (1966) recuperaron un número de plantas de tabaco genotípicamente atípicas, incluyendo poliploides. En cualquier caso, para poder predecir la magnitud de la variación que se esperaría en la progenie de plantas de células totipotentes o de masas de callo, se tendría que establecer la magnitud del cambio, y el nivel en que ocurre, en una preparación particular de células cultivadas (Mitra et al., 1960; Muir, 1965; Partanen, 1965; Zosimovich y Kunakh, 1975; Sunderland, 1977; D'Amato et al., 1980; Krikorian et al., 1983; Constantin, 1981; Evans y Reed, 1981).

Embriogénesis somática

Es indudable que los métodos utilizados en la iniciación de cultivos in vitro tienen una gran importancia en el desarrollo posterior de tales cultivos y en su capacidad para expresar genotipos anormales. Las posibilidades de obtener variación en las progenies son mayores en las células en crecimiento, que se convertirían en masas de callo con posibilidad de que, mediante manipulación, produzcan posteriormente brotes y raíces. Por otra parte, la generación de plántulas a partir de células, tanto por embriogénesis somática indirecta como directa, es una oportunidad para obtener altos niveles de fidelidad genética, porque permite seleccionar las deseables desde el inicio, o por lo menos desde muy temprano, en el caso de qua haya una respuesta bastante uniforme.

En esencia, lo anterior significa que se está haciendo una selección para obtener uniformidad y para multiplicar más tarde las unidades no diferenciadas (ya sea células o unidades proembrionarias), de las que se generan

Digitized by Google

las plántulas. Esta selección es la base misma del 'arte' en el manejo de las suspensiones celulares morfogenéticamente competentes. Sin embargo, aquí no acaba todo: el tamaño de la unidad de la que emergen los embriones somáticos tiene también gran importancia en la capacidad morfogenética.

Desde cuando aparecieron los primeros informes sobre la totipotencialidad, ha sido preocupación de muchos investigadores determinar si las plántulas se originan de embriones somáticos derivados de una sola célula o de pequeños grupos de células, cultivados en suspensión o en un medio semisólido (Krikorian, 1982). Este problema no se ha resuelto completamente todavía.

Jakob Reiner y su asociado Backs-Husemann, en la Universidad Libre de Berlin, realizaron el seguimiento cinematográfico de la formación de un embrión somático de zanahoria a partir de una célula única, usando una preparación de gota suspendida. En el laboratorio de SUNY, en Stony Brook, N. Y., también se siguió en varias ocasiones el desarrollo secuencial de muchos embriones somáticos de zanahoria provenientes de células 'marcadas' dispersas en un medio semisólido, por medio de una cámara fija, durante más de tres semanas.

Las divisiones celulares y su posterior crecimiento no son nada fáciles de seguir, debido a problemas técnicos. Por ejemplo, a causa de su distribución en el agar, la mayoría de las unidades celulares no se pueden enfocar fácilmente, ni siquiera mediante el uso de un microscopio invertido. Ciertas unidades celulares, que se encuentran en las primeras etapas de su desarrollo, pueden ser súbitamente sobrepasadas por unidades adyacentes que en principio estaban en reposo; aún más, otras unidades que tenían un aparente potencial para desarrollar embriones, no se desarrollan finalmente en embriones sino en callos.

Algunas veces se desarrolla primero una estructura proembrionaria globular, y se produce rápidamente un embrión en forma de corazón; en otros casos, las células se dividen y dan origen a una masa globular, dentro o en la periferia, de la cual una sola célula se divide y origina uno o varios embriones somáticos; debido a que esto último ocurre con más frecuencia, todavía sigue abierta la insistente pregunta sobre la frecuencia del desarrollo de una estructura similar a un suspensor.

En la mayoría de las preparaciones realizadas en SUNY, Stony Brook, se encuentra con más frecuencia un pequeño glóbulo del que emerge y crece un embrión somático de una sola célula. Parece que la opinión de otros investigadores, de que los embriones de zanahoria ineludiblemente

Digitized by Google

se desarrollan en la superficie a partir de grupos de células relativamente grandes, refleja simplemente una falla porque empiezan con suspensiones celulares finamente filtradas (Smith y Street, 1974). De cualquier manera, no hay duda de que en una sola preparación pueden presentarse, lo que ocurre a menudo, varias posibilidades de desarrollo.

La Figura 13.1 resume algunas de las vías mencionadas para la embriogénesis somática de *Daucus carota*; los eventos indicados debajo de la línea diagonal del diagrama representan las secuencias en el medio semisólido, y los dibujados encima representan los que se llevan a cabo en los cultivos líquidos. En ambos casos, un explante primario (1) se puede estimular para producir células en suspensión (2, 3) o una masa de callo.

Las células que se dividen pueden derivarse de células cambiales epidérmicas, subepidérmicas, corticales o perivasculares. La secuencia 1 a 7" de la figura representa un sistema más directo que el de 3" a 10 en el área inferior. Las células en suspensión (2) pueden multiplicarse y producir masas celulares proembrionarias o complejas (3) que, a su vez, se comprometen en un curso de embriogénesis somática (4,5,6). La etapa en forma de corazón (6) crece y forma un embrión bipolar normal (7).

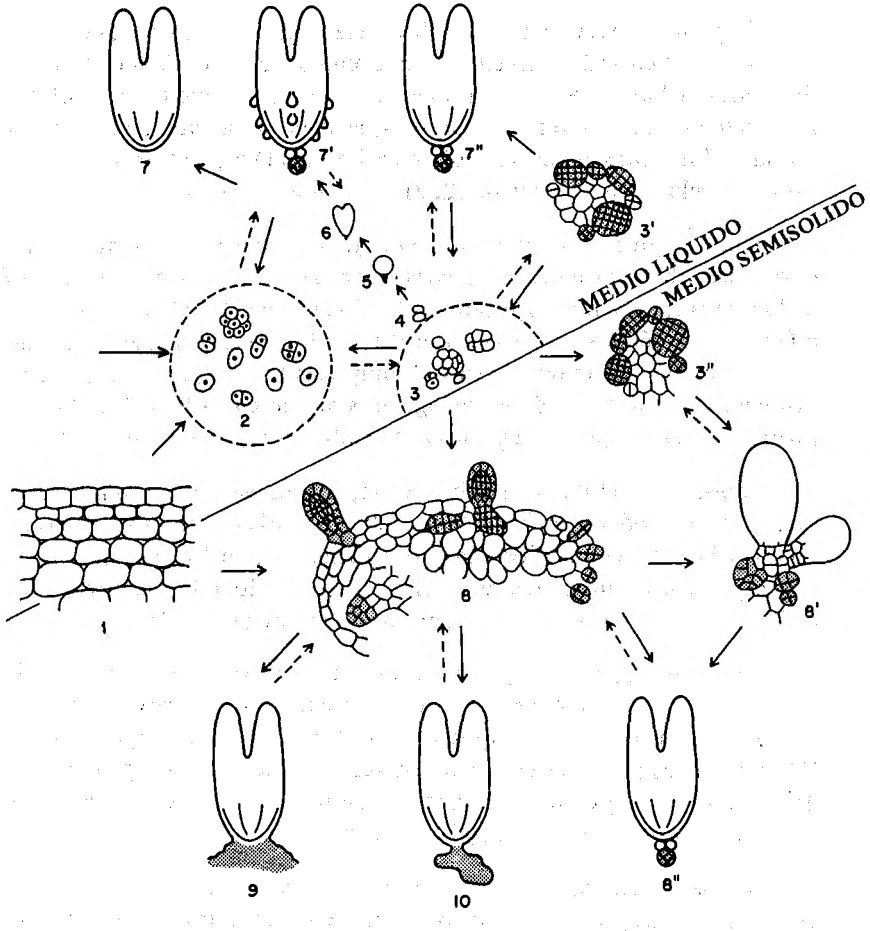
Un complejo celular proembrionario, o una estructura similar a un suspensor, es evidente en 7' y 7" pero falta en 7. El embrión somático en 7' muestra las yemas embrionarias adventicias que se forman del eje, las cuales pueden ser 'descamadas' en el medio (como lo indica la dirección de la flecha) y dar origen a otras plántulas no cigóticas (6,5,4).

En realidad, las células proembrionarias, que aparecen como células formadas en 7' y 7", pueden también ser descamadas y así se convierten en la fuente de otras células totipotentes (2,3) o de grandes grupos celulares (3'). Las masas celulares en 3' pueden descomponerse en grupos menores de células (3), o pueden originar embriones somáticos discretos (que muestran la estructura similar al suspensor).

En el medio semisólido parece haber una mayor tendencia a que los grupos celulares proembrionarios (3") no se separen, tal vez porque no se agitan ni se someten a filtración; así dan lugar frecuentemente a complejos celulares de los que pueden originarse uno o más embriones mediante un proceso de formación de yemas (8'); éstas se pueden remover y el complejo celular proembrionario estará una vez más en evidencia (8").

La gran masa de callo que aparece en el centro (8) muestra un rango de eventos morfogenéticos en el proceso. Se aprecian grupos adventicios de células con estructuras organizadas, de donde se pueden formar brotes o

Digitized by Google



Digitized by Google

Figura 13.1. Algunos eventos morfogenéticos en el cultivo in vitro de zanahoria (*Daucus carota*), usando medio líquido (área superior respecto a la línea diagonal) y medio semisólido (área inferior respecto a esa línea). Este diagrama se basa en parte en Haccius (1973) pero fue modificado con detalles surgidos de la experiencia del autor de este capítulo.

1	=	explante primario	
2	=	células en suspensión	
3	=	masas celulares proembrionarias	
4	=	primera división embriogénica	Ruta de embriogénesis somática
5	=	embrión globular	
6	=	embrión acorazonado	
7	=	embrión bipolar normal	
3'	=	grupo celular grande	Vías embriogénicas alternas en medio sólido
7'	=	embrión somático (con células proembrionarias y yemas adventicias)	
7"	=	embrión somático (con células proembrionarias)	
8	=	masa de callo con embriones inducidos (embriogénesis indirecta)	
9	=	embrión no cigótico (con polos cerrados)	Embriones bipolares normales
10	=	embrión no cigótico (con polos cerrados)	
3"	=	masas proembrionarias	Vías embriogénicas alternas en medio líquido
8'	=	complejo celular (origina embriones formando yemas)	
8"	=	embrión no cigótico (con células proembrionarias)	

Digitized by Google

raíces; los centros de crecimiento epidérmicos o subepidérmicos y los corticales aparecen también en diferentes etapas de división, y los complejos proembrionarios que ellos originan producen embriones no cigóticos con polos cerrados (8",9,10), es decir, sin filamentos vasculares de conexión entre el embrión y el callo progenitor. Sin embargo, el número de células en el complejo proembrionario puede tener una relación significativa en la composición genómica del cultivo, ya que es posible que esas células no sean genéticamente idénticas o de origen uniforme.

El esfuerzo que se ha hecho para aclarar el origen preciso de los embriones somáticos, especialemente los de células cultivadas en suspensión, no ha sido particularmente efectivo, ya que ni los cigotos in situ ni las células somáticas puras en cultivo pueden convertirse en embriones sin pasar primero por un estado de proembrión multicelular, pequeño y globular.

Base Cariológica de la Variación

En el Capítulo 5 se recalcó que, desde el punto de vista práctico de la multiplicación clonal, determinar si los embriones somáticos se originan de una sola o de varias células es un problema de naturaleza académica, ya que mientras la capacidad de expresión coordinada del genoma permanezca inalterada en cada célula, incluso las unidades que comprendan muchas células originarían, en teoría, plantas genética y fenotípicamente uniformes.

Sin embargo, desde el punto de vista de la ingeniería genética es muy importante diferenciar ese origen; en este caso, sería esencial manipular o modificar las células aisladas o los protoplastos, y obtener de las células así modificadas (nominalmente idénticas) la generación clonal de un gran número de plantas. La producción de embriones somáticos bipolares sería el medio preferido de multiplicación clonal masiva (Krikorian, 1982).

Si el investigador se limita a modificar una sola célula y a producir de ella una masa de callo, debe aplicar un tratamiento adicional para inducir un crecimiento organizado que conduzca a la regeneración de la planta entera directamente; este proceso está restringido a métodos de organogénesis adventicia a partir de callos, de puntas de brote obtenidas por excisión, o de una ramificación axilar precoz, hasta lograr la multiplicación clonal.

Si no hubiera seguridad de trabajar con una sola célula, podrían presentarse serios problemas adicionales. Si el genoma cromosómico y extracromosómico variase de una célula a otra dentro de una masa, la obtención

Digitized by Google

de un mosaico o una quimera estaría virtualmente garantizada (Cramer, 1954; Neilson-Jones, 1969; Broertjes et al., 1980; Norris et al., 1983; Marcotrigiano y Stewart, 1984).

Las poblaciones celulares cuyos componentes difieren en sus números cromosómicos en el mismo individuo (mixoploides) no son tan raras como se supondría (Dermen, 1960; Bennett, 1984); son muy comunes, en especial en aquellas plantas que se propagan principalmente por medios vegetativos (Nagl, 1978). El papel del desarrollo, si acaso existe, de las células euploides y aneuploides dentro de un individuo —que en otras condiciones sería diploide— no ha sido aún determinado rigurosamente (Khush, 1973).

Es claro que estos tipos de alteraciones somáticas son también responsables de dar origen a individuos genotípicamente diferentes. Esto está bien documentado en especies de plantas comestibles del género *Colocasia*, propagadas vegetativamente (Sharma y Sarkar, 1963).

Se está de acuerdo, generalmente, en que uno de los tipos específicos de mixoploides —el fenómeno de la polisomatía o endopoliploidización— debería preocupar también a quienes buscan utilizar los cultivos celulares como un medio de multiplicación clonal. Hace mucho tiempo, D'Amato (1952) revisó la relación entre la endopoliploidía y la diferenciación en plantas que normalmente serían diploides; desde entonces se ha demostrado continuamente que aun los cultivos frescos establecidos sin el uso de reguladores de crecimiento pueden contener células poliploides (Nagl, 1978). Algunos investigadores pensaron inicialmente que este hecho se debía a la presencia de hormonas añadidas al medio, pero ahora es claro que refleja el estado del explante primario (Partanen, 1963a, 1963b; 1965).

Estrategias para Modificar la Variabilidad

No hay duda de que las aberraciones cromosómicas, especialmente la aneuploidía y la poliploidía, son comunes en células y tejidos cultivados asépticamente (D'Amato, 1975, 1977; Sunderland, 1977; D'Amato et al., 1980; Bayliss, 1980). Por esta razón, muchos investigadores insisten en que se hagan todos los esfuerzos posibles para evitar el estado de callo, ya sea en medios semisólidos o en medios líquidos.

Actualmente, muchos investigadores sostienen que la única estrategia realista para mantener la estabilidad genotípica es adoptar sistemas que estimulen la tendencia natural de algunas plantas de producir ramas axilares precoces, o yemas adventicias, en un explante primario. Se argumenta que hay demasiados riesgos de que ocurran cambios cromosómicos

Digitized by Google

al inducir callos, y que incluso sería un desastre considerar la inducción de embriones somáticos a partir de suspensiones celulares para lograr los objetivos de la micropropagación clonal.

No se puede negar que tal vez las técnicas más fáciles y seguras en la multiplicación clonal incluyan las llamadas técnicas de micropropagación (véase el Capítulo 5); pero si se desea que el área del cultivo de tejidos vegetales progrese, no se debe dudar de trabajar con células genéticamente uniformes. Ya se han mencionado las importantes implicaciones de este trabajo según la forma en que se establecen los cultivos.

Aunque se desee pasar por alto el argumento anterior, no se puede generalizar la idea de evitar el callo y las células libres, ya que hay insuficiencia de datos críticos sobre la estabilidad genética en varios tipos de suspensiones celulares capaces de producir plántulas. No existe, por tanto, una base adecuada para tal generalización. Gran parte de la literatura trata del callo y de las células cultivadas o de las raíces derivadas del callo, en vez de tratar de las plántulas que de ellos se originan (Muir, 1965; Torrey, 1967; D'Amato et al., 1980; Bayliss, 1980).

Se han realizado muy pocos estudios cuidadosos sobre el cariotipo de las células al momento de su colocación en cultivo, sobre su cariotipo posterior como células libres o callos, y sobre las plántulas producidas por éstos. Muy pocas veces se han presentado datos sobre la edad de los cultivos de los que se derivan las plantas anormales (D'Amato, 1977; Evans et al., 1981; Reisch, 1983). Sólo por esa razón hay suficientes bases para considerar que, si se encuentran cambios cromosómicos en cultivos sin estructura organizada, la diferencia no se trasmite a las plántulas producidas.

En realidad, se han hecho trabajos en esos casos y en otros en que los embriones somáticos o estructuras organizadas parecen desarrollarse preferencialmente de células que tienen complementos cromosómicos normales. Un ejemplo extremo de esto lo representa el trabajo de Sheridan (1975), quien durante más de 14 años ha mantenido en un medio líquido líneas celulares morfogenéticamente competentes de *Lillium*; estos cultivos han conservado su ploidía normal y han formado plantas normales durante un tiempo más prolongado que cualquier otro cultivo registrado.

Desde hace varios años se sabe que las suspensiones celulares de zanahoria pueden conservarse de tal manera que den origen preferencialmente a una progenie normal. Steward y sus colaboradores, basados en la fidelidad del fenotipo expresado por las plantas de esa especie que ellos produjeron, sospecharon desde muy temprano que se trataba de clones en el sentido estricto de la palabra. Rápidamente se iniciaron trabajos citológicos al respecto.

Digitized by Google

Aunque había cierta diversidad en la constitución nuclear de algunas de las poblaciones de células de zanahoria multiplicadas en medio líquido, no se pudieron detectar aberraciones cromosómicas en las plántulas derivadas de las suspensiones; bajo estas condiciones, aparentemente sólo aquellas células con genotipo normal condujeron al desarrollo de embriones somáticos. Después de un estudio con ápices de raíces de 200 plantas, se observó que las plantas regeneradas parecían ser diploides cariológicamente normales, y se abandonó el plan original de examinar un total de 1000 ápices (Mitra et al., 1960); desafortunadamente, las técnicas disponibles en ese momento no permitían realizar determinaciones críticas del cariotipo.

Aunque todavía permanece abierta la pregunta del genotipo levemente alterado sin consecuencias detectables, es improbable que se presenten serios problemas, ya que todos los detalles fenotípicos se manifiestan con precisión en la zanahoria, aun la presencia de vesículas que contienen antocianina en una inflorescencia que de otra manera sería blanca (Steward et al., 1964).

También Mok et al. (1976) ha informado sobre la recuperación, aunque en menor escala, de plantas diploides normales obtenidas de callos radicales de zanahoria, aunque también existían en esos cultivos células con números variables de cromosomas.

Estudios sin publicar, efectuados en el laboratorio de SUNY, Stony Brook, revelan que las plantas cultivadas de zanahoria presentan siempre un fenotipo normal a lo largo de su ciclo completo de desarrollo (de plantas jóvenes a plantas maduras con flores y semillas), si las suspensiones de las que se derivan las células iniciadoras de los embriones se mantienen en cultivo durante períodos relativamente cortos (menores de un año). Las plantas originadas de células que se mantuvieron en suspensión durante períodos largos mostraron cierto número de aberrraciones fenotípicas. Se utilizaron varios caracteres morfológicos estándar como base para comparar las plantas regeneradas con la planta de la que se tomó el explante primario.

Por lo tanto, se podría sugerir que el proceso de regeneración de plántulas a partir de células sería, en algunos casos, un método para seleccionar genotipos específicos, ya sea del 'tipo silvestre' o del 'mutante', ya que son éstos los que preferentemente originan la planta. Según esta opinión, entre los millones de células contenidas en un solo matraz de regeneración, sólo aquéllas que presentan esta capacidad genética para el desarrollo se verían favorecidas y seleccionadas en términos de un crecimiento adicional y de su supervivencia.

Digitized by Google

Otros trabajos, que muestran la existencia de aberraciones cromosómicas, aumentos potencialmente indiseables en la ploidía, y otros fenómenos (Murashige et al., 1966; Malnassy et al., 1970; Syono et al., 1972), presentan hallazgos experimentales según los cuales ni siquiera reordenamientos cromosómicos extremos, como las traslocaciones, ejercen una influencia cualitativa o cuantitativa en la morfología o en la fisiología.

En estos casos, la posición de la ruptuta de los cromosomas parece ser más importante que la longitud de los segmentos intercambiados. Así, según el criterio de la multiplicación clonal, la relación entre el tipo de embrión somático y la planta que éste origina sería estrictamente clonal. Las poblaciones clonales de genotipo idéntico serían de mayor interés teórico, ya que el estudio del comportamiento de las células cultivadas debe incluir trabajos cada vez más frecuentes sobre los factores que estabilizan o rompen la ploidía normal o el genotipo (Van't Hof, 1974; Vig et al., 1981; Nilan et al., 1981; Rieger et al., 1981).

Si existe una comprensión profunda de la planta que se va a multiplicar, cualquier tendencia hacia la producción de aberraciones cromosómicas en las células cultivadas o en los tejidos puede reducirse al mínimo, o incluso eliminarse, seleccionando el sitio del que se toma el explante primario, o usando los reguladores del crecimiento, o acortando el período de cultivo (Sunderland, 1977; Bayliss, 1977, 1980; Skirvin, 1978; Krikorian et al., 1983).

El restablecimiento frecuente de cultivos frescos obtenidos de embriones somáticos citológicamente normales, o de plántulas que todavía se conserven asépticas, no sólo evitaría cualquier dificultad potencial causada por aberraciones citológicas sino que sería una práctica conveniente, ya que a menudo es difícil obtener explantes axénicos primarios de plantas cultivadas en el campo o en recipientes.

Actualmente se trabaja con miras al desarrollo de métodos criogénicos que permitan mantener bancos de genes en estado congelado; si las líneas celulares totipotentes pudieran mantenerse congeladas y restablecerse después, se podría avanzar hacia la preservación de cualidades genéticas, en una línea específica.

Hay situaciones en que el uso de técnicas como el bandeo cromosómico permitiría también a los investigadores detectar los cambios. Dependiendo del pronóstico de las poblaciones de células totipotentes examinadas, las suspensiones celulares se podrían descartar o las plántulas se podrían cultivar a voluntad. Después de todo, los investigadores discriminan por lo regular las plantas que no concuerdan fenotípicamente (y también, se

Digitized by Google

presume, genotípicamente) incluso cuando hacen la multiplicación vegetativa mediante técnicas no asépticas de cultivo; es la 'variación casual' en términos hortícolas.

A pesar de esta última opción, no se deberían subestimar los problemas imprevistos. En efecto, debe hacerse hincapié en que los análisis de cariotipo o los cromosómicos globales (o aun detallados) presentan graves limitaciones, ya que por ese medio se pueden detectar solamente cambios sustanciales, anomalías o aberraciones; Krikorian et al. (1983) discuten los procedimientos metodológicos de esos análisis. Sin embargo, en las plantas propagadas vegetativamente, en las cuales el análisis genético convencional no puede efectuarse, el investigador estaría limitado a hacer un análisis isoenzimático y, por último, estaría obligado a cultivar las plántulas hasta su madurez, para su evaluación en el campo o en el invernadero. Sin duda, esto es costoso y requiere mucho tiempo.

También se encontrarán otros problemas, incluyendo el reto de establecer o refinar la interpretación de lo que quiere decir la palabra clon (ver Capítulo 5). Más importante aún sería que la 'programación' del genoma (Sibi, 1976) y la modificación de su expresión según el desarrollo (Raman et al., 1980) fuera lo que caracterizara el estado clonal; así, las técnicas de cultivo nunca originarían material estrictamente clonal como generalmente se considera.

A medida que se aprende más sobre el genoma de las plantas y sobre cómo 'trabaja' la genética en su desarrollo, cambiaría también nuestra apreciación de lo que significa el estado clonal. Claramente, hay mucha plasticidad en el genoma de las plantas (Morisset y Boutin, 1984).

Por otra parte, se sabe que los efectos epigenéticos pueden observarse en las plantas cultivadas y en los productos de células cultivadas que son cariológicamente normales (Sibi, 1976; Siminovitch, 1976). Un ejemplo de un efecto epigenético expresado en el cultivo es la producción de formas foliares adultas o juveniles según la fuente del explante primario (Brink, 1962; Stoutemeyer et al., 1965; Marcavillaca et al., 1967; Banks, 1979).

Otro ejemplo sería el plagiotropismo del brote en plantas leñosas derivadas del cultivo in vitro; esto es particularmente válido para las coníferas. Aunque es posible recuperar plantas con brotes ortótropos de plantas derivadas de cultivos que presentan plagiotropismo, el procedimiento consume tiempo y recursos humanos (Franclet, 1977; Franclet et al., 1980).

También se pueden encontrar efectos estrictamente fisiológicos en el fenotipo. En la azucena amarilla cultivada en condiciones controladas se

Digitized by Google

pueden inducir fenotipos maduros en plántulas muy jóvenes, mediante la limitación del intercambio gaseoso (Fitter el al., 1985). Igualmente, Hussey et al. (1981) han llamado la atención sobre 'la morfología del etileno' en clones de papa multiplicados en recipientes de cultivo sellados. Los nudos de estas plántulas fenotípicamente diferentes producen brotes normales cuando se trasfieren a recipientes con tapones poco ajustados. A diferencia de lo que ocurre con la papa, en la azucena amarilla el efecto abarca toda la planta, y se produce un cambio del fenotipo foliar de juvenil a maduro, lo que también se refleja en la morfología radical.

Los cambios en la morfología de *Hemerocallis* sp. y de la papa no son permamentes, es decir, se pueden revertir rápidamente; esto indica que tales cambios son fisiológicos y no epigenéticos (Brink, 1962).

Variación Espontánea y Aumentada: Variación Somaclonal

Si los cambios cromosómicos y no cromosómicos persisten en las plántulas regeneradas, tal vez se pueda sacar provecho de este resultado no sólo desde el punto de vista científico —en términos de comprensión del desarrollo— sino desde el práctico, considerándolo una fuente potencialmente valiosa de variación intraclonal. Ya que se puede seleccionar un gran número de células totipotentes en una situación dada, las oportunidades de que se presenten estas variaciones serían así mayores que si se utilizasen masas de callo o esquejes (Skirvin, 1978; Meredith y Carlson, 1978).

En realidad, los sistemas celulares, en combinación con el uso de mutágenos como el etil-metano-sulfonato, permitirían inducir numerosas mutaciones y algunas al menos serían útiles. Aunque la selección plantea todavía un problema real, debería ser posible seleccionar, a largo plazo, un número significativo de 'mutaciones' deseables.

Un ejemplo de variación somaclonal se puede encontrar en la caña de azúcar (Krishnamurthi, 1981; 1982). Las plantas derivadas de callos mostraron resistencia a la enfermedad de Fiji cuando Krishnamurthi et al. (1974) evaluaron el desempeño de esos clones bajo condiciones de campo. Antes de las técnicas de cultivo de tejidos no era posible la duplicación del número de cromosomas de la caña de azúcar por medio de métodos convencionales. Los poliploides derivados de cultivos in vitro han abierto la vía para el desarrollo de una serie aneuploide que permite verificar el

Digitized by Google

potencial de rendimiento de plantas que, por el número de cromosomas, no estaban anteriormente disponibles (Heinz y Mee, 1970; Mee, 1977; Nickell, 1977).

Posiblemente no se puede sacar provecho de las variaciones inducidas por el cultivo in vitro en otras especies, como parece suceder con la caña de azúcar (Heinz et al., 1977; Lat et al., 1976; Liu et al., 1978; Larkin et al., 1983); no obstante, una cuidadosa selección de los organismos de prueba podría dar resultados inesperados o favorables. La regeneración de un geranio perfumado diferente, a partir de una quimera, es sólo un ejemplo (Skirvin et al., 1976; Janick et al., 1977; Sigurbjornsson, 1977; IAEA, 1982).

Los protoplastos ofrecen tal vez el mayor potencial para recuperar plantas de diferentes genotipos. Aunque las técnicas para el manejo de protoplastos se están desarrollando y evaluando todavía, se han obtenido resultados significativos en unas pocas especies (Giles, 1983). Tal vez el caso que recibió más publicidad es el de la papa (*Solanum* spp.) especie en la cual es posible producir los protoplastos de células foliares, regenerar sus paredes, y desarrollar plántulas de callos (Shepard, 1981, 1982; Sree Ramalu et al., 1983).

En un gran número de plantas de papa sometidas a pruebas de campo se ha observado una variación considerable en la progenie derivada del cultivo, especialmente en términos del fenotipo y de la susceptibilidad a las enfermedades. Todavía no se ha investigado totalmente si las diferencias observadas derivan de que las plántulas se regeneraron de células que genéticamente no eran homogéneas, o porque se presentó ya sea una fusión espontánea o agregación durante la primera etapa de regeneración de la pared y en su posterior división o ya un 'reajuste' del genoma durante el cultivo. Más adelante se hacen algunos comentarios adicionales.

Un aspecto crítico en la evaluación de las causas de la variación somaclonal es el factor tiempo. Como se mencionó antes, los cambios en el cariotipo ocurren a medida que los cultivos se mantienen durante períodos de tiempo cada vez mayores; por consiguiente, se podría esperar un aumento en las anomalías concomitante con esos períodos. Sin embargo, recuérdese que las plantas regeneradas no siempre reflejan totalmente las anomalías de las células cultivadas; puede ocurrir una selección antes de la regeneración.

La situación se complica en este campo de la investigación, ya que en plantas derivadas de cultivos hay tantos recuentos de estabilidad como de

Digitized by Google

inestabilidad. Un buen ejemplo de este conflicto es el cultivo de protoplastos de papa, especie en la cual Wenzel et al. (1979) observaron uniformidad en plantas derivadas de protoplastos. Unas pocas plantas presentaron variación en la forma del tubérculo, pero esto sucedió sólo después de un largo período de cultivo. La leve variación observada se explicó como una aneuploidía inducida por el cultivo.

Utilizando el cultivar de papa 'Russet Burbank' para seleccionar 10,000 clones derivados de protoplastos, Shepard (1981) encontró variación en la forma de los tubérculos, en el rendimiento, en la morfología general de las plantas, y en la resistencia al añublo o tizón temprano y al tardío; no se determinó la base genética de esa variación. En un análisis adicional de 65 clones, Secor et al. (1981) estudiaron 35 características fenotípicas; cada clon se diferenciaba del progenitor Russet Burbank por lo menos en una característica.

Las diferencias entre los resultados de los estudios mencionados pueden explicarse así: mientras que Wenzel seleccionó relativamente pocos clones (211), Shepard seleccionó más de 10,000. Las fuentes de protoplastos eran diferentes: mientras Shepard utilizó mesófilo foliar, Wenzel usó cultivos de punta de tallo; los niveles de ploidía también eran diferentes: Shepard utilizó 4X, y Wenzel 2X.

Se sabe que la fuente del explante tiene a veces un efecto significativo en el nivel y en el tipo de la variación observada en los regenerantes. Plantas de piña (*Ananas comosus* [L. Merr.]) se regeneraron de callos derivados de cuatro fuentes diferentes de explantes (sincarpo, vástago, corona y yemas axilares) y mostraron diferentes tipos y grados de variación (Wakasa, 1979). Así, la selección adecuada del explante sería, en ciertas situaciones, el factor determinante en el aumento o en la disminución de la frecuencia de la variación somaclonal.

Ya se han mencionado las variantes somaclonales que muestran tolerancia o resistencia a varias enfermedades causadas por hongos o virus; cabe mencionar también un mutante de tomate que presenta un aumento en la acumulación de materia seca (Evans et al., 1984). Se hace hincapié en que es esencial hacer la selección de las variantes somaclonales entre plantas agronómicamente importantes, con un equipo profesional de fitomejoradores o agrónomos; sus integrantes deben estar tan familiarizados con la planta en cuestión, que serán capaces de detectar las variantes rápidamente (casi por prueba selectiva), basados esencialmente en el fenotipo. No se trata necesariamente de buscar respuestas o variación de 'todo o nada'; los cambios sutiles, pero reales, son exactamente los que se desea hallar.

Digitized by Google

Las variantes que se deben buscar en un somaclón para que éste sea potencialmente útil requieren un conocimiento práctico del cultivo. El descubrimiento de la tolerancia a unos grados adicionales de temperatura alta en una población de maíz o de soya, en el campo, podría ser un adelanto importante; igualmente, la tolerancia a una disminución de varios grados de temperatura en una de las especies tropicales o subtropicales de *Eucalyptus* podría ser bien acogida en las zonas templadas. Un aumento del 5% en la materia sólida del fruto del tomate es a menudo suficiente para que ese tomate tenga una gran importancia en la industria de enlatados; y así sucesivamente.

Esto significa que el investigador debe establecer los límites tolerables de la variación somaclonal, en consulta con los expertos de campo y también con los economistas y administradores de empresas.

Referencias

Banks, M. A. 1979. Plant regeneration from callus from the growth phases of English ivy, *Hedera helix* L. Z. Pflanzenphysiol. 92:349-353.

Bayliss, M. W. 1977. Factors affecting the frequency of tetraploid cells in predominantly diploid suspensions of *Daucus carota*. Protoplasma 92:109-115.

———. 1980. Chromosomal variation in plant tissues in culture. En: Vasil, I. K. (ed.). Perspectives in plant cell and tissue culture. Int. Rev. Cytol. Suppl. 11A:113-144.

Bennett, M. D. 1984. The genome, the natural karyotype, and biosystematics. En: Grant, W. F. (ed.). Plant biosystematics. Academic Press, Nueva York. p. 41-66.

Bottino, P. J. 1975. The potential of genetic manipulation in plant cell cultures for plant breeding. Radiation Botany 15:1-16.

Brettell, R. I. S. e Ingram, D. S. 1979. Tissue culture in the production of novel disease-resistant crop plants. Bio. Rev. 54:329-345.

Brink, R. A. 1962. Phase change in higher plants and somatic cell heredity. Quarterly Review of Biology 37:1-22.

Brock, R. D. 1977. Genetic engineering and plant improvement. Journal of the Australian Institute of Agricultural Sciences 43:14-21.

Broertjes, C. y van Harten, A. M. 1978. Application of mutation breeding methods in the improvement of vegetatively propagated crops: An interpretative literature review. Elsevier Scientific Publishing, Nueva York.

Digitized by Google

——— y Keen, A. 1980. Adventitious shoots: Do they develop from one cell? Euphytica 29:73-87.

Carlson, E. A.; Cicarrone, D. H.; Jay, G. D.; Moss, L. J.; Levy, R. S. y Meyers, T. K. 1983. Effets biologiques des phénoxyherbicides sur le *Drosophila melanogaster*. En: Comité National d'Investigation des Consequences de la Guerre Chimique Americaine au Viet Nam; Les herbicides et defoliants employés dans la guerre: Les effets a long terme sur l'homme et la nature. Ha Noi, Viet Nam. v. 3, p. 190-199.

Chaleff, R. S. 1981. Genetics of higher plants: Applications of cell culture. Cambridge University Press, Cambridge, Inglaterra.

———. 1983. Isolation of agronomically useful mutants from plant cell cultures. Science 219:676-682.

Conger, B. V. (ed.). 1977. Principles and practices of cloning agricultural plants via in vitro techniques. CRC Press, Boca Ratón, Florida, E.U.

Constantin, M. J. 1981. Chromosome instability in cell and tissue cultures and regenerated plants. Environ. Exptl. Botany 21:359-368.

Cramer, P. J. S. 1954. Chimeras. Bibliographia Genetica 16:193-381.

D'Amato, F. 1952. Polyploidy in the differentiation and function of tissues and cells of plants. Caryologia 4:311-358.

———. 1975. The problem of genetic stability in plant cell and tissue cultures. En: Crop genetic resources for today and tomorrow. IBP 2. University Press, Cambridge, Inglaterra. p. 335-348.

———. 1977. Cytogenetics of genetic stability in plant cell and tissue cultures. En: Reinert, J. y Bajaj, Y. P. S. (eds.). Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture. Springer-Verlag, Nueva York. p. 333-374.

———; Bennici, A.; Cionni, P. G.; Baroncelli, S. y Lupi, M. C. 1980. Nuclear fragmentation followed by mitosis as mechanism for wide chromosome number variation in tissue cultures: It's implications for plantlet regeneration. En: Sala, F.; Parisi, R.; Cella, R. y Ciferri, O. (eds.). Plant cell cultures: Results and perspectives. Elsevier, Nueva York. p. 67-72.

Day, P. R. 1973. Genetic variability of crops. Ann. Rev. Phytopathol. 11:293-312.

Dermen, H. 1960. Nature of plant sports. American Horticulture Magazine 39:123-173.

Dolezel, J. y Novak, F. J. 1984. Effect of plant tissue culture media on the frequency of somatic mutations in *Tradescantia* stamen hairs. Z. Pflanzenphysiol. 114:51-58.

Doré, J. 1965. Physiology of regeneration in cormophytes. En: Ruhland, W. (ed.). Encyclopedia of plant physiology. Springer-Verlag, Berlín. 15(2):1-91.

Digitized by Google

Duvick, D. N. 1978. Risks of monoculture via clonal propagation. En: Hughes, K.; Henke, R. y Constantin, M. (eds.). Propagation of higher plants through tissue culture. U.S. Department of Energy, Technical Information Center, Washington, D.C. p. 73-83.

Earle, E. D. y Demarly, Y. (eds.) 1982. Variability in plants regenerated from tissue culture. Praeger Publishers, Nueva York.

Evans, D. A. y Reed, S. M. 1981. Cytogenetic techniques. En: Thorpe, T. A. (ed.). Plant tissue culture: Methods and applications in agriculture. Academic Press, Nueva York. p. 213-240.

——— y Sharp, W. R. 1983. Single gene mutations in tomato plants regenerated from tissue culture. Science 221:949-951.

———; Sharp, W. R. y Medina-Filho, H. P. 1984. Somaclonal variation and gametoclonal variation. Am. J. Bot. 71:759-774.

Fitter, M. S. y Krikorian, A. D. 1985. Mature phenotype in *Hemerocallis* plantlets generated *in vitro*. Journal of Plant Physiology 121(2):97-101.

Franclet, A. 1977. Manipulation des pieds-mères et amélioration de la qualité des boutures. Etudes et recherches de l'Association Forêt-Cellulose (AFOCEL), no. 8. 22 p.

———; David, A.; David, H. y Boulay, M. 1980. Première mise en évidence morphologique d'un rajeunissement de méristemes primaires caulinaires de pin maritime agé (*Pinus pinaster* Sol.). Comptes Rendus a l'Academie des Sciences Paris 290 D:927-930.

Giles, K. Ł. (ed.) 1983. Plant protoplasts. Int. Rev. Cytol. Suppl. 16. Academic Press, Nueva York.

Gleba, Y. Y. y Sytnik, K. M. 1984. Protoplast fusion: Genetic engineering in higher plants. Monographs in theoretical and applied genetics 8. Springer-Verlag, Nueva York.

Haccius, B. 1973. Les premiers stades des embryons végétaux zygotiques et somatiques sont-ils différents ou non? Soc. Bot. Fr. Mémoires 1973. p. 201-206.

Hanson, M. P. 1984. Cell culture and recombinant DNA methods for understanding and improving salt tolerance of plants. En: Staples R. C. y Toenniessen, G. H. (eds.). Salinity tolerance in plants. John Wiley, Nueva York. p. 335-359.

Hartmann, H. T. y Kester, D. E. 1984. Plant propagation: Principles and practices. 4 ed. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N.J., E.U.

Heinz, D. J. y Mee, G. W. P. 1970. Colchicine-induced polyploids from cell suspension cultures of sugarcane. Crop Science 10:696-699.

Digitized by Google

———; Krishnamurthi, M.; Nickell, L. G. y Maretzki, A. 1977. Cell, tissue and organ culture in sugarcane improvement. En: Reinert, J. y Bajaj, Y. P. S. (eds.). Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture. Springer-Verlag, Nueva York. p. 3-17.

Hussey, G. y Stacey, N. J. 1981. In vitro propagation of potato (*Solanum tuberosum* L.). Ann. Bot. 48:787-796.

IAEA (International Atomic Energy Agency). 1982. Induced mutations in vegetatively propagated plants; 2: Proceedings of the Final Research Co-ordination Meeting on the Improvement of Vegetatively Propagated Crops and Tree Crops through Induced Mutations, Coimbatore, India, 1980. Viena.

Janick, J.; Skirvin, R. M. y Janders, R. B. 1977. Comparison of in vitro tissue culture systems in scented geranium. J. Hered. 68:62-64.

Khush, G. S. 1973. Cytogenetics of aneuploids. Academic Press, Nueva York.

Krikorian, A. D. 1982. Cloning higher plants from aseptically cultured tissues and cells. Biol. Rev. 57:151-218.

———; O'Connor, S. A. y Fitter, M. S. 1983. Chromosome number variation and karyotype stability in cultures and culture-derived plants. En: Evans, D. A.; Sharp, W. R.; Ammirato, P. V. y Yamada, Y. (eds.). Handbook of plant cell culture. MacMillan Publishing, Nueva York. v. 1, p. 541-581.

Krishnamurthi, M. 1981. Sugarcane improvement through tissue culture and review of progress. En: Rao, A. N. (ed.). Tissue culture of economically important plants. Asian Network for Biological Sciences y Committee on Science and Technology in Developing Countries (COSTED), Singapur. p. 70-77.

———. 1982. Disease resistance in sugarcane developed through tissue culture. En: Fujiwara, A. (ed.). Plant tissue culture 1982. Jap. Assoc. Plant Tissue Cult. (Tokio) p. 769-770.

——— y Tlaskal, J. 1974. Fiji disease resistant *Saccharum officinarum* var. Pindar sub-clones from tissue culture. Proc. Int. Soc. Sugarcane Technol. 15: 130-137.

Larkin, P. J. y Scowcroft, W. R. 1981. Somaclonal variation: A novel source of variability from cell culture for plant improvement. Theoret. Appl. Genet. 60:197-214.

——— y ———. 1983. Somaclonal variation and eyespot toxin tolerance in sugarcane. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 2:111-121.

Lat, J. B. y Lantin, M. M. 1976. Agronomic performance of sugarcane clones derived from callus tissue. Philippine Journal of Crop Science 1:117-123.

Digitized by Google

Liu, M. C. y Chen, W. H. 1978. Tissue and cell culture as aids to sugarcane breeding; 2: Performance and yield potential of callus derived lines. Euphytica 27:273-282.

Malnassy, P. y Ellison, J.H. 1970. Asparagus tetraploids from callus tissue. HortScience 5:444-445.

Marcavillaca, M. C. y Montaldi, E. R. 1967. Diferentes formas de hojas producidas por yemas adventicias inducidas experimentalmente en hojas aisladas de *Nicotiana tabacum* L. y *Passiflora caerulea* L. Revista de Investigaciones Agropecuarias INTA (Buenos Aires) 2(4):1-7.

Marcotrigiano, M. y Stewart, R. N. 1984. All variegated plants are not chimeras. Science 223:505.

Marshall, D. R. 1977. The advantages and hazards of genetic homogeneity. Annals of the New York Academy of Sciences 287:1-20.

Mee, G. W. P. 1977. Production of triploid sugarcane clones. Hawaiian Sugarcane Planters Association Annual Report for 1977. p. 8-9.

Meredith, C. P. y Carlson, P. S. 1978. Genetic variation in cultured plant cells. En: Hughes, K.; Henke, R. y Constantin, M. (eds.). Propagation of higher plants through tissue culture. U.S. Department of Energy, Technical Information Center, Washington, D. C. p. 166-176.

Mitra, J.; Mapes, M. O. y Steward, F. C. 1960. Growth and organized development of cultured cells; 4: The behavior of the nucleus. Amer. J. Bot. 47:357-368.

Mok, M.; Gabelman, W. H. y Skoog, F. 1976. Carotenoid synthesis in tissue cultures of *Daucus carota* L. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 101:442-449.

Morisset, P. y Boutin, C. 1984. The biosystematic importance of phenotypic plasticity. En: Grant, W. F. (ed.). Plant biosystematics. Academic Press, Nueva York. p. 293-306.

Muir, W. H. 1965. Influence of variation in chromosome number on differentiation in plant tissue cultures. En: White, P. R. y Grove, A. R. (eds.). Proceedings of the International Conference on Plant Tissue Culture, Pennsylvania State University, 1963. McCutchan Publishing, Berkeley, California, E.U. p. 485-492.

Murashige, T. y Nakano, R. 1966. Tissue culture as a potential tool in obtaining polyploid plants. Journal of Heredity 57:115-118.

Nagl, W. 1978. Endopolyploidy and polyteny in differentiation and evolution. North-Holland Publishing, Amsterdam, Holanda.

Neilson-Jones, W. 1969. Plant chimeras. Methuen and Company, Nueva York.

Nickell, L. G. 1977. Crop improvement in sugarcane: Studies using in vitro methods. Crop Science 17:717-719.

Digitized by Google

Nilan, R. A. y Veleminsky, J. 1981. Mutagenicity of selected chemicals in barley test systems. En: DeSerres, F. J. y Shelby, M. D. (eds.). Comparative chemical mutagenesis. Plenum Press, Nueva York. p. 291-320.

Norris, R.; Smith, R. H. y Vaughn, K. C. 1983. Plant chimeras used to establish de novo origin of shoots. Science 220:75-76.

Partanen, C. R. 1963a. Plant tissue culture in relation to developmental citology. Int. Rev. Cytol. 15:215-243.

———. 1963b. The validity of auxin-induced divisions in plants as evidence of endopolyploidy. Exptl. Cell Res. 31:597-599.

———. 1965. Cytological behavior of plant tissues in vitro as a reflection of potentialities *in vivo*. En: White, P. R. y Grove, A. R. (eds.). Proceedings of an international conference on plant tissue culture. McCutchan Publishing, Berkeley, California, E.U. p. 463-471.

Raman, K.; Walden, D. B. y Greyson, R. I. 1980. Propagation of *Zea mays* L. by shoot tip culture: A feasibility study. Ann. Bot. 45:183-189.

Reisch, B. 1983. Genetic variability in regenerated plants. En: Evans, D. A.; Sharp, W. R.; Ammirato, P. V. y Yamada, Y. (eds.). Handbook of plant cell culture. MacMillan Publishing, Nueva York. v. 1, p. 748-769.

Rieger, R.; Michaelis, A.; Schubert, I.; Kaina, B. y Heindorff, K. 1981. Mutagenicity of selected chemicals in *Vicia faba* and *Allium cepa* test systems. En: De Serres, F. J. y Shelby, M. D. (eds.). Comparative chemical mutagenesis. Plenum Press, Nueva York. p. 339-351.

Scowcroft, W. R. y Larkin, P. J. 1982. Somaclonal variation: A new option for plant improvement. En: Vasil, I. K.; Scowcroft, W. R. y Frey, K. J. (eds.). Plant improvement and somatic cell genetics. Academic Press, Nueva York. p. 159-178.

Secor, G. A. y Shepard, J. F. 1981. Variability of protoplast-derived potato clones. Crop Science 21:102-105.

Sharma, A. y Sarkar, A. K. 1963. Cytological analysis of different cytotypes of *Colocasia antiquorum*. Botanical Society of Bengal Bulletin (Calcuta) 17:16-22.

Shepard, J. F. 1981. Protoplasts as sources of disease resistance in plants. Ann. Rev. Phytopathol. 19:145-155.

———. 1982. The regeneration of potato plants from leaf-cell protoplasts. Sci. Amer. 246:154-166.

Sheridan, W. F. 1975. Plant generation and chromosome stability in tissue cultures. En: Ledoux, L. (ed.). Genetic manipulations with plant material. Plenum Publishing, Nueva York. p. 263-295.

Digitized by Google

Sibi, M. 1976. La notion de programme génétique chez les végétaux superieurs; 2: Aspect expérimental; obtention de variants par cultures de tissus *in vitro* sur *Lactuca sativa* L. Ann. Amélior. Plantes (París) 26:523-547.

Sigburbjornsson, B. (ed.) 1977. Manual on mutation breeding. 2 ed. Technical reports series, no. 119. International Atomic Energy Agency (IAEA), Viena.

Siminovitch, L. 1976. On the nature of heritable variation in cultured somatic cells. Cell 7:1-11.

Singh, B. O. y Harvey, B. L. 1975. Does 2,4-D induce mitotic irregularities in plant tissue culture? Experientia 32:785-787.

Skirvin, R. M. 1978. Natural and induced variation in tissue culture. Euphytica 27:241-266.

——— y Janick, J. 1976. 'Velvet Rose' *Pelargonium*, a scented geranium. HortScience 11:61-62.

Smith, S. M. y Street, H. E. 1974. The decline of embryogenic potential as callus and suspension cultures of carrot (*Daucus carota* L.) are serially subcultured. Ann. Bot. 38:223-241.

Sree Ramulu, K.; Dijkhuis, P. y Roest, S. 1983. Phenotypic variation and ploidy level of plants regenerated from protoplasts of tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Bintje). Theoret. Appl. Genet. 65:329-338.

Steward, F. C.; Mapes, M. O.; Kent, A. E. y Holsten, R. D. 1964. Growth and development of cultured plant cells. Science 143:20-27.

Stoutemeyer, V. T. y Britt, O. K. 1965. The behavior of tissue cultures from English and Algerian ivy in different growth phases. Amer. J. Bot. 52:805-810.

Sunderland, N. 1977. Nuclear cytology. En: Street, H. E. (ed.). Plant tissue and cell culture. 2 ed. University of California Press, Berkeley, E.U. p. 177-205.

Swingle, C. F. 1940. Regeneration and vegetative propagation. Bot. Rev. 6:301-355.

———. 1952. Regeneration and vegetative propagation. Bot. Rev. 18:1-13.

Syono, K. y Furuya, T. 1972. Abnormal flower formation of tobacco plants regenerated from callus culture. Botan. Mag. (Tokio) 85:273-283.

Torrey, J. G. 1967. Morphogenesis in relation to chromosomal constitution in long term-plant tissue cultures. Physiol. Plant. 20:265-275.

Van't Hof, J. 1974. Control of the cell cycle in higher plants. En: Padilla, G. M.; Cameron, I. L. y Zimmerman, A. (eds.). Cell cycle controls. Academic Press, Nueva York. p. 77-85.

Vasil, I. K. y Hildebrandt, A. C. 1965. Differentiation of tobacco plants from single, isolated cells in microculture. Science 150:889-892.

Digitized by Google

Vig, B. K. y Sung, R. 1981. Mutagenicity of selected chemicals in soybean test systems. En: De Serres, F. J. y Shelby, M. D. (eds.). Comparative chemical mutagenesis. Plenum Press, Nueva York. p. 257-290.

Wakasa, K. 1979. Variation in the plants differentiated from tissue culture of pineapple. Jpn. J. Breed. 29:13-22.

Wenzel, G.; Schieder, O.; Przewozny, T.; Sopory, S.K. y Melchers, G. 1979. A comparison of single cell derived *Solanum tuberosum* plants and a model for their application in breeding programs. Theor. Appl. Genet. 55:49-55.

Zimmerman, R. H. 1981. Genetic stability of horticultural plants propagated by tissue culture. Int. Plant Propag. Soc. Proc. 31:118-126.

Zosimovich, V. P. y Kunakh, V. A. 1975. Levels, types, and origin of chromosome aberrations in cultures of isolated plant tissues. Sov. Genet. 11:685-693.

Digitized by Google

Capítulo 14

Variación somaclonal y su aplicación al mejoramiento de cultivos

E. Tabares*
J. Pachón**
W. M. Roca*

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

Digitized by Google

Variación Somaclonal

Está plenamente comprobado que ocurren modificaciones genéticas en las células y los tejidos cultivados in vitro. Muchas de estas modificaciones se manifiestan como mutaciones heredables a las progenies de las plantas regeneradas. Este fenómeno se conoce como variación somaclonal (Larkin y Scowcroft, 1981).

Las observaciones hechas indican que esta variación, que se recupera en las plantas regeneradas, resulta tanto de las diferencias genéticas que preexisten en las células somáticas del explante como de efectos inducidos por los componentes del medio de cultivo. Por consiguiente, la variación somaclonal puede usarse, con mucha frecuencia, para recuperar la variación genética natural de una variedad.

A diferencia de otros procesos de variación genética, se ha encontrado variación somaclonal en la progenie del 15% de las plantas regeneradas; la tasa de ocurrencia de mutaciones espontáneas, p. ej., es sólo de una en un millón.

La variación somaclonal es superior también al mejoramiento por mutaciones inducidas puesto que en las plantas regeneradas que derivan de células individuales, la ocurrencia de mosaicos es mínima. En la mayor parte de los casos, por tanto, los somaclones pueden estabilizarse en una generación; las mutaciones, en cambio, requieren varias generaciones y retrocruces. La regeneración de plantas actúa como un filtro que elimina casi todos los cambios deletéreos; los cambios genéticos que interfieren con la regeneración de las plantas —por ejemplo, un bloqueo en el metabolismo primario— no pasan por variación somaclonal a las plantas regeneradas.

La variación somaclonal puede causar una variación temporal (epigenética) o una variación genética. Por definición, los cambios epigenéticos no se trasmiten meióticamente, razón por la cual no son útiles en el fitomejoramiento. Una variación fenotípica tiene valor en el fitomejoramiento si proviene de una verdadera modificación del material genético, ya que una variación celular puede provenir bien de una mutación, de un cambio epigenético o de una combinación de ambos procesos (Meins, 1983).

Causas y manifestaciones

Un buen número de revisiones recientes sobre la variación somaclonal han tratado aspectos de este tema como su ubicuidad, sus posibles causas,

Digitized by Google

y su impacto potencial en el mejoramiento vegetal (Orton, 1984; Evans et al., 1984; Larkin et al., 1984; Scowcroft et al., 1987; Karp y Bright, 1985). Por su parte, los mecanismos que dan origen a la variación somaclonal son un tema de gran importancia, cuyo conocimiento permitirá principalmente aumentar el nivel de variabilidad y lograr una manipulación eficiente de las características que se desea modificar.

Es necesario entender los mecanismos que dan lugar a la inestabilidad genética durante el cultivo de tejidos, por razones de orden práctico. En primer lugar, la variación somaclonal es deseable para aumentar la ocurrencia de variabilidad en el mejoramiento de plantas; es además importante donde la uniformidad de las plantas obtenidas del cultivo de tejidos sea esencial, como en la micropropagación rápida; es importante, en tercer lugar, para la conservación del germoplasma in vitro; y es necesaria, finalmente, para controlar el mecanismo que genera esa misma variación.

Varios análisis han revelado un amplio espectro de eventos mutacionales que ocurren durante el cultivo de tejidos. Son ellos, por ejemplo, los mutantes que obran como clásicos mutantes mendelianos; los cambios genéticos que afectan caracteres controlados por familias multigénicas y que influyen en determinados rasgos poligénicos; y los cambios que resultan de la aparición de elementos trasportables (Scowcroft, 1984). La poliploidía y la aneuploidía, por su parte, son variantes que ocurren frecuentemente a consecuencia de reordenamientos cromosómicos, tales como duplicaciones, deficiencias, traslocaciones, y otros intercambios (Scowcroft et al., 1987).

El origen de la variación no siempre es claro, y puede diferir entre una planta y otra. Puede ser, por ejemplo, un reordenamiento cromosómico, considerado el principal mecanismo que genera la variación somaclonal; puede deberse también a un entrecruce (crossing over) somático, a un intercambio de cromátidas hermanas, a una alteración de los nucleótidos por metilación, a una perturbación de la replicación del ADN por culpa de un depósito de nucleótidos alterados, o también al silenciamiento o activación de genes por mutaciones ocurridas en regiones no codificadas.

En varias especies cultivadas se ha detectado variación somaclonal, y se ha demostrado el control genético de las mutaciones —mediante pruebas de trasmisión genética o análisis de ADN— sólo en las siguientes: en tomate (color del fruto, resistencia a las enfermedades), en tabaco (color de la hoja, manchas en la hoja), en alfalfa (color de la flor), en papa (número de copias del ADN ribosomal, patrón de restricción del ADN mitocondrial), en trigo (patrón de la izoenzima ADH), y en arroz.

Digitized by Google

Se han detectado cambios en el ADN mitocondrial del maíz y la papa. La poliploidía es el cambio más frecuente observado en los somaclones. Otra variación significativa encontrada en éstos es la recombinación mitótica, que puede ser causa de mutaciones homocigóticas de genes individuales. Además, se han detectado mutaciones simples en los genes nucleares de los somaclones, y también variaciones en los genes citoplasmáticos.

Dado que los fitomejoradores han tenido acceso solamente a la variación trasmitida normalmente por meiosis, la recuperación de los productos de la recombinación mitótica en los somaclones constituye la fuente de una nueva variación genética para el fitomejoramiento.

Una mutación de un solo gen ocurre en los somaclones cuando la variación no aparece en las plantas regeneradas (SC_1) pero sí aparece en una proporción de 3:1 en la progenie (SC_2) de la autofecundación. Para comprobar que el carácter en cuestión es controlado por un solo gen, se deben realizar pruebas de progenie en plantas individuales SC_2 seleccionadas: así se identifican segregantes y no segregantes y se asegura la trasmisión 3:1 a las poblaciones segregantes. Las plantas mutantes no deben variar en la generación SC_3.

El procedimiento general para buscar y seleccionar la variación somaclonal dentro de una variedad dada es el siguiente: 1) regeneración de plantas a partir de callos; 2) crecimiento de las plantas en el invernadero hasta la madurez (plantas SC_1) e identificación de las plantas SC_1 fértiles (por la formación de flores, frutos y semillas); 3) identificación de líneas mejoradas respecto a caracteres específicos dentro de las plantas SC_2, en el invernadero, y traslado al campo de muestras, duplicadas de semillas SC_2, de los nuevos somaclones identificados; 4) pruebas de campo según un diseño experimental apropiado para evaluar la estabilidad de los somaclones; será necesario hacer selecciones en las plantas SC_2, para comprobar la estabilidad hereditaria; 5) reintroducción de las nuevas líneas promisorias en el cultivo de tejidos, para explorar algún carácter adicional o para mejorar el comportamiento agronómico de un somaclón relacionado con ellas; este último paso expresa el objetivo del uso de la variación somaclonal.

Potencial para el mejoramiento de plantas

Uno de los mayores beneficios de la variación somaclonal es la obtención de variabilidad genética en cultivares agroeconómicamente útiles, la cual se ha obtenido tradicionalmente recurriendo a la hibridación.

Digitized by Google

Los somaclones mutantes pueden enriquecerse durante el cultivo in vitro con las siguientes características: resistencia a enfermedades y a herbicidas, y tolerancia al estrés químico o ambiental. Además, la introgresión de genes de cultivares silvestres en especies cultivables es posible a juzgar por el reordenamiento de cromosomas observado hasta ahora en las plantas regeneradas in vitro. En general, esta técnica es relativamente sencilla, comparada con la del DNA recombinante, y es también una buena fuente de variabilidad genética; las plantas se pueden manipular fácilmente y se evalúan como parte de un programa de mejoramiento (Evans y Sharp, 1986).

La variación somaclonal será muy útil para incorporar nuevas características a una variedad, o para modificar las que ésta tiene; en efecto, la variabilidad genética inherente al somacultivo permite mejorar significativamente el valor agronómico de una especie cultivada.

En conclusión, el futuro desarrollo de la variación somaclonal depende del uso que hagan de ella los programas de mejoramiento y del establecimiento de una relación provechosa entre los investigadores del cultivo de tejidos, los genetistas y los fitomejoradores.

Variación Somaclonal en el Género *Stylosanthes*

El género *Stylosanthes* contiene algunas especies forrajeras de importancia económica que han mejorado la producción ganadera en los países de la zona tórrida. Se caracterizan ellas por su alto rendimiento de materia verde obtenida por corte, su buen crecimiento en suelos relativamente pobres, su tolerancia a la acidez, su resistencia a la sequía, su propagación y mantenimiento fáciles, y su buen comportamiento en praderas en asociación con las gramíneas. Producen forraje de gran calidad y de alto valor nutritivo y resisten el pastoreo continuo, pero desaparecen bajo el pastoreo intenso.

Stylosanthes guianensis es una leguminosa forrajera distribuida ampliamente en el centro y sur de América tropical. Ya fue introducida en Australia, Africa, Asia, y recientemente en los Estados Unidos (McIlroy, 1973).

Esta leguminosa es muy promisoria, especialmente sus cultivares del grupo 'tardío', a pesar de que el ataque de la enfermedad antracnosis, causada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides*, limita un poco su

Digitized by Google

producción (Lenné et al., 1983). La antracnosis es una enfermedad endémica, ampliamente difundida en las regiones tropicales del centro y sur de América.

La eficiencia en el mejoramiento de una especie vegetal depende de la disponibilidad de la variación genética, de la selección, de la fijación genética, y de la rápida propagación de los materiales sobresalientes. Los métodos de cultivo de tejidos pueden integrarse a un programa de mejoramiento para aumentar la eficiencia de algunos de los procesos mencionados (Jaramillo, 1982).

Tres programas de fitomejoramiento se enfocan actualmente hacia *S. guianensis* (Cameron et al., 1984). Uno de ellos aplica intensamente la evaluación de repeticiones vegetativas de cruzamientos al azar, para seleccionar genotipos superiores de *S. guianensis*; este programa utilizaría, con grandes beneficios, la repetición en gran escala que proporcionan las técnicas in vitro. Cualquier programa de fitomejoramiento se puede beneficiar de las nuevas fuentes de variabilidad genética si éstas aportan genes que no se puedan obtener fácilmente de fuentes convencionales. De especial valor serían los nuevos atributos genéticos logrados en las variedades ya adaptadas.

En este capítulo se estudia la importancia de la variación somaclonal obtenida mediante el cultivo de tejidos in vitro de *S. guianensis.*

La regeneración de plantas a partir del cultivo de callos ha sido demostrada en varias especies del género *Stylosanthes*: *S. capitata* y *S. leiocarpa* (Mroginski y Kartha, 1984), *S. hamata* (Scowcroft y Adamson, 1976), *S. guianensis* (Mroginski y Kartha, 1981; Meijer y Steinbiss, 1983), y *S. humilis* (Meijer, 1982).

También han sido regeneradas plantas de suspensiones celulares de *S. guianensis* (Mroginski y Kartha, 1984; Meijer y Steinbiss, 1983). En cambio, los informes sobre cultivo de protoplastos de leguminosas han sido escasos hasta ahora (Mroginski y Kartha, 1984); se han obtenido resultados promisorios en *Trifolium repens* (Gresshoff, 1980), en *Medicago sativa* (Dos Santos et al., 1980; Kao y Michayluk, 1980; Johnson et al., 1981; Latunde-Dada y Lucas, 1983), y en *M. arborea* (Mariotti et al., 1984).

El aislamiento y el cultivo de los protoplastos de *Stylosanthes* se considera difícil (Mroginski y Kartha, 1984); la regeneración de plantas ha sido lograda solamente de protoplastos derivados de suspensiones celulares de *S. guianensis* donde la eficiencia de plaqueo fue relativamente baja (Meijer

Digitized by Google

y Steinbiss, 1983). Szabados y Roca (1986) regeneraron plantas de dos accesiones de *S. guianensis* partiendo de mesófilos foliares y de suspensiones celulares.

Materiales y métodos

Las semillas de *Stylosanthes guianensis* var. *pauciflora* CIAT 2243 fueron proporcionadas por el Dr. John Miles, del Programa de Pastos Tropicales del CIAT; provenían de una línea que venía de seis generaciones descendientes de una sola semilla mediante autopolinización, razón por la cual esas plantas se consideraron altamente autógamas y uniformes. Las semillas fueron esterilizadas con etanol al 70% (5 minutos) y con hipoclorito de sodio al 5% (8 minutos), y enseguida recibieron tres enjuagues con agua destilada estéril; luego se colocaron en tubos de ensayo que contenía el medio MS sin hormonas y solidificado con agar al 0.8%, con un pH de 5.8. Las semillas se colocaron en la oscuridad a 26 °C durante 7 días para que germinaran, al cabo de los cuales se seleccionó una planta para la toma de explantes.

Se tomaron segmentos foliares de 4 mm^2, y segmentos de hipocótilo de 5 mm de largo, que fueron plaqueados en cajas Petri que contenían el medio MS suplementado con piridoxina (1.0 mg/litro), ácido nicotínico (1.0 mg/litro), inositol (100 mg/litro), tiamina (1.0 mg/litro), ácido naftalenacético (2.0 mg/litro) y bencilaminopurina (8.0 mg/litro).

Los cultivos se incubaron a 27 °C, con una iluminación de 2000 lux y un fotoperíodo de 16/8 horas. Los primeros callos se observaron hacia los 12 días de cultivo; los callos de hoja eran compactos, clorofílicos, y ligeramente mejores que los callos provenientes del hipocótilo.

Los callos fueron inducidos, mantenidos y subcultivados en M.S. con 2.0 mg/litro de ANA y 8.0 mg/litro de BAP, en luz continua; los subcultivados se hicieron con 30 días de intervalo. Se indujo la organogénesis colocando los callos en el medio 4E (este medio está compuesto por MS, vitaminas B5, 2% de sacarosa, 0.04 mg/litro de BAP, 0.05 mg/litro de GA_3, 0.02 mg/litro de ANA, y 0.8% de agar; el pH era de 5.8).

Los callos fueron subcultivados de 30 a 60 días después de que los originales se habían establecido. Tanto de los callos originales como de los subcultivados se regeneraron plantas. Las plántulas de dos meses de edad, que tenían buen sistema radicular, fueron trasferidas a una cámara de crecimiento con buena humedad relativa; cuando habían adquirido cierta consistencia, fueron trasplantadas a potes de 8 lb que contenían una mezcla de suelo:arena de 3:1, se colocaron en el invernadero hasta su total

Digitized by Google

crecimiento, y finalmente se evaluaron. Las plantas regeneradas (plantas SC_1, según la terminología de Larkin et al., 1984) fueron clasificadas según su fuente de explante (hoja o hipocótilo) y según su origen (primero y segundo subcultivo). Se obtuvieron 114 plantas (Cuadro 14.1).

Cuadro 14.1. Efecto del subcultivo sobre el nivel de ploidía en *S. guianensis*.

Subcultivo[a]	Ploidía		Totales
	2X (%)	4X (%)	
SO	83.1	17.0	71
S1	66.7	33.3	24
S2	79.0	21.1	19
Total			114

a. SO = ciclo original; S1 = primer subcultivo; S2 = segundo subcultivo.

Evaluación en el invernadero de plantas SC_1. Las plantas regeneradas crecieron, hasta su madurez, en el invernadero. Las plantas se evaluaron individualmente, antes de cosechar su semilla, para medir en ellas el grado de variabilidad. Se tomaron como base de la evaluación los parámetros más importantes, a saber, nivel de ploidía, altura de la planta, número de tallos, longitud de los entrenudos, tamaño de las hojas, tamaño de la flor, producción de semilla, y peso de 100 semillas; asimismo, se evaluó la respuesta a las inoculaciones con una suspensión de esporas de tres cepas de *Colletotrichum gloeosporioides*: 46 B-CPAC, 2315 y 1808-CPAC, tarea en la que colaboró la sección de Fitopatología de Pastos Tropicales del CIAT.

En cada una de las plantas SC_1 se midió la anchura y la longitud de la hoja (en cm, promedio de 10 hojas por planta) y de las flores (en cm, promedio de 3 flores por planta); la longitud de los entrenudos (en cm), como promedio de los tres primeros entrenudos situados bajo la primera hoja completamente extendida, en cada uno de los tres tallos escogidos al azar en cada planta; la longitud del tallo más largo (en cm); el peso de 100 semillas (en mg); y la producción de semilla durante 2 meses de producción. En todas las medidas se compararon los diploides regenerados partiendo del cultivo de tejidos, las plantas testigo, y los tetraploides producidos.

Evaluación de campo de las progenies SC_2. Para comprobar si ocurre variabilidad heredable en el cultivo in vitro de tejidos de *S. guianensis*, y para evaluar el tipo y el grado de esa variabilidad, 77 plantas SC_1 (67

Digitized by Google

diploides y 10 tetraploides) produjeron suficiente semilla para la evaluación siguiente, es decir, de las progenies SC_2. Estas, junto con la progenie autopolinizada de cuatro plantas individuales de la línea autógama CIAT 2243, se evaluaron en una prueba de campo en la subestación del CIAT situada en Santander de Quilichao, Colombia (3º 06' lat. N, 990 msnm) en un suelo de arcilla orgánica de alta acidez (7.5% de materia orgánica, 74% de arcilla, pH 4.0). Se trasplantaron al campo plántulas de cinco semanas de edad, en un diseño de bloques completos al azar con 15 repeticiones. Las unidades experimentales, de una sola planta, se espaciaron en centros de 1 x 1 m. Las plantas se observaron durante un período de 12 meses y se evaluaron en esas unidades las siguientes características morfológicas:

1. Area foliar. Promedio de cinco hojas, tomadas al azar, por planta; las muestras se tomaron a los ocho meses del trasplante, y se midieron en un medidor de área portátil LICOR LI-3000 equipado con una estructura de trasportador LI-3050A (LICOR Inc., Lincoln, Nebraska, E.U.).

2. Longitud del entrenudo. Promedio de los primeros tres entrenudos situados debajo de la primera hoja completamente extendida, en tres tallos tomados al azar por planta, cuatro meses después del trasplante.

3. Respuesta al ataque de antracnosis. Esta enfermedad, causada por *Colletotrichum gloeosporioides*, se evaluó como el promedio de seis mediciones hechas a intervalos mensuales, a los tres y a los ocho meses después del trasplante; se empleó una escala visual desde 0 (= ninguna enfermedad) hasta 5 (= planta muerta).

4. Cobertura de planta. Se midió a los cuatro meses del trasplante, tomando como referencia la rama más larga en la base del tallo.

5. Número de ramas basales. Se contaron a los tres meses del trasplante.

6. Rendimiento de semilla. Se evaluó en plantas maduras cosechadas aproximadamente un año después del trasplante; las plantas enteras se cortaron y se secaron y la semilla se trilló manualmente.

7. Peso de 100 semillas.

8. Materia seca. Se obtuvo la proporción de MS en el forraje cosechado un año después del trasplante, aproximadamente.

Los rasgos morfológicos se evaluaron en las 15 repeticiones, excepto el área foliar que se midió en siete repeticiones.

Los datos fueron sometidos a análisis estándar de varianza. Los 79 grados de libertad asignables a 'progenies' se distribuyeron en tres comparaciones ortogonales: una comparación entre las 70 líneas diploides (69 g.l.);

Digitized by Google

una comparación entre las 10 líneas tetraploides (9 g.l.); y una comparación de grado único de libertad entre diploides y tetraploides (Figura 14.1). Donde se detectaron diferencias entre líneas diploides por la prueba de F ($P < 0.05$), las líneas individuales se compararon con los promedios de las cuatro progenies testigo mediante la prueba de t, usando el término error agrupado.

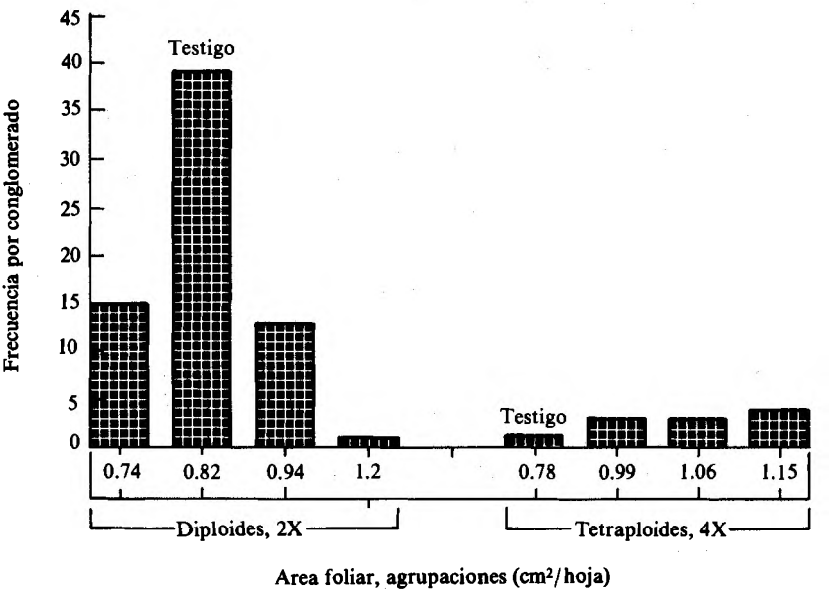


Figura 14.1. Si se clasifican en grupos de área foliar que difieren significativamente entre sí ($P < 0.05$), los conglomerados de líneas diploides presentan un área foliar que está tanto por encima como por debajo del testigo. Una línea 2X tiene valores muy altos. Todas las líneas 4X superan al testigo.

Cuando se midieron variables comparables, o sea, dimensiones de la hoja versus área foliar, longitud del entrenudo, longitud del tallo, peso de 100 semillas, así como ataque de antracnosis (Figura 14.2) y porcentaje de materia seca (Figura 14.3) —tanto en la planta progenitora (SC_1) como en las progenies (SC_2)— se calculó la regresión del promedio de la progenie respecto al valor de la planta progenitora. Estas regresiones se calcularon separadamente para los diploides (excluyendo los testigos) y para los tetraploides.

Digitized by Google

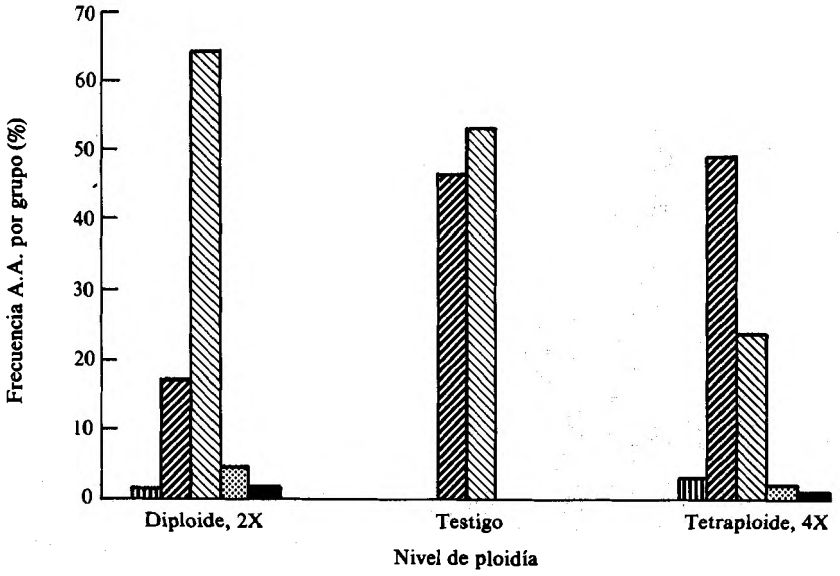


Figura 14.2. Efecto de la antracnosis respecto al nivel de ploidía. La variación en el rango del ataque de antracnosis tanto en un grupo de linaje 2X como en un grupo 4X tiende hacia ambos lados de la escala. La planta testigo, en cambio, presenta una calificación muy alta (2 y 3) en la escala de ataque de la enfermedad. A.A. = de ataque de antracnosis.

Resultados: diploides difieren de tetraploides

En las progenies SC_1. Del análisis estadístico realizado para comparar el comportamiento de los diploides producidos in vitro, de los tetraploides y de las plantas testigo (provenientes éstas de semilla) se obtuvieron los resultados indicados en el Cuadro 14.2. Se encontraron diferencias significativas entre los diploides, los tetraploides y el testigo en la altura de planta, la longitud del entrenudo, la producción de semilla, el peso de 100 semillas, así como en la diferente respuesta a la inoculación con las tres cepas ya mencionadas. Estas diferencias se atribuyeron al cambio en el nivel de ploidía.

En las progenies SC_2. En cinco de los ocho rasgos medidos, las líneas diploides y tetraploides difirieron entre sí (Cuadro 14.3). Donde se midieron los rasgos comparables en las generaciones SC_1 y SC_2, las diferencias entre tetraploides y diploides se ajustaron al mismo esquema, es decir,

Digitized by Google

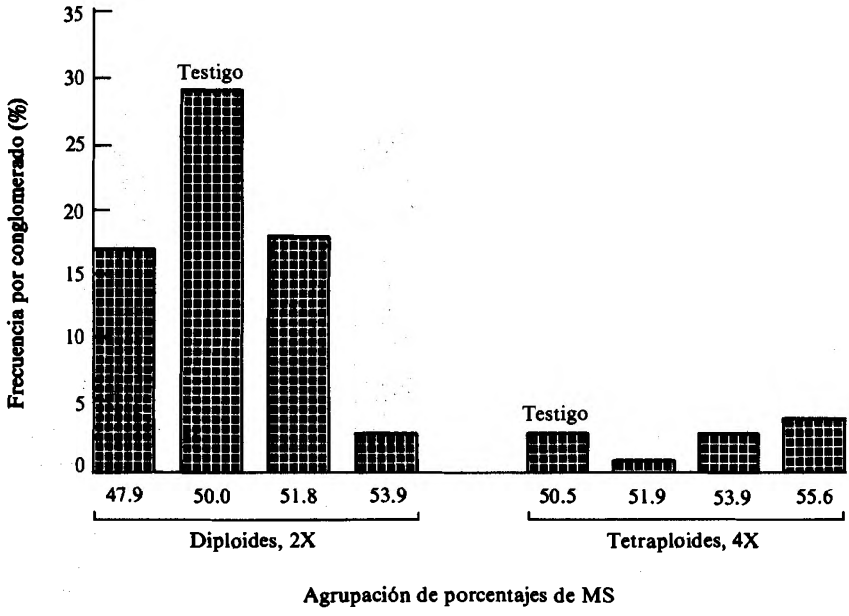


Figura 14.3. Agrupación según el porcentaje de materia seca (PMS). Como en la Figura 14.1 (agrupaciones según el área foliar), hay líneas 2X por debajo (según la frecuencia en la población, principalmente) y por encima (según el PMS) del testigo ($P < 0.05$). La mayor parte de las líneas 4X tienen un contenido de materia seca (en porcentaje) más alto que el del testigo; el máximo PMS, en promedio, se presentó en las líneas 4X.

Cuadro 14.2. Morfología de las plantas SC_1 de *S. guianensis* CIAT 2243 regeneradas a partir de cultivos de callos, por comparación con las plantas testigo.

Plantas[a]		Altura	Longitud de	Brotes	Relación ancho/largo		Pubs.[b]
Tipo	No.	de planta (m)	entrenudo (cm)	por pie (no.)	En hoja	En flor	
Testigo	6	1.2	3.6	23	0.20	0.50	2
2X (Dipl.)	72	1.3	4.5	23	0.13	0.46	3
4X (Tetr.)	24	1.5	5.5	17	0.21	0.60	4

a. Dipl. = diploide, Tetr. = tetraploide.
b. Pubescencia (= Pubs.) evaluada en plantas de 5 meses aplicando la escala: 1 = ausente; 2 = baja; 3 = moderada; 4 = alta; 5 = muy alta.

Digitized by Google

Cuadro 14.3. Medias[a] de siete caracteres evaluados en la progenie autogámica de plantas diploides o tetraploides de *Stylosanthes guianensis*, regeneradas de un cultivo de tejidos.

Carácter	Media en plantas:[b]	
	Diploides	Tetraploides
Area foliar[c] (cm^2)	0.818	1.142***
Tallos[d] (no.)	3.3	3.3 n.s.
Longitud del entrenudo[e] (cm)	4.16	4.32**
Radio máximo de la planta[f] (cm)	97.4	75.7***
Materia orgánica (%)	50.14	54.03***
Reacción a la antracnosis (calificación)[g]	2.7	2.5 n.s.
Rendimiento de semilla (g/planta)	0.317	0.093***
Peso de 100 semillas (mg)	219.4	217.8 n.s.

a. Tomadas en 15 repeticiones de planta individual.
b. Se evaluaron 70 diploides y 10 tetraploides.
c. Media de cinco hojas por unidad experimental (planta).
d. Número de ramas procedentes de la base del tallo principal.
e. Media de tres entrenudos medidos en cada uno de los tres tallos evaluados en cada unidad experimental.
f. Longitud de la rama lateral más larga.
g. Media de seis evaluaciones visuales de la severidad de la enfermedad hechas durante un período de 6 meses según una escala de 7 puntos, donde 0 = sin síntomas, b = planta muerta.

, * Hay diferencia en las medias a $P < 0.01$ o $P < 0.001$, respectivamente; n.s. = las medias no difieren a $P > 0.05$.

hojas más grandes, entrenudos más largos y tallos más cortos en las tetraploides que en las diploides. El peso de la semilla de las plantas tetraploides SC_1 fue mayor que el de las diploides, pero no se diferenció por ploidía en las líneas SC_2.

Evaluación de campo de la progenie SC_3. Las semillas autopolinizadas obtenidas de las líneas SC_2 germinaron en el invernadero, y las plántulas de dos meses de edad se llevaron luego al campo (en la subestación CIAT-Quilichao) y se compararon con la línea testigo CIAT 2243. Estas líneas fueron seleccionadas según las evaluaciones realizadas en la generación SC_2 (Cuadro 14.4).

En la segunda generación sexual, ninguna de las líneas diploides difirió del testigo; no obstante, la línea 26 fue significativamente más tolerante a la antracnosis que la línea testigo, y la línea 5 (tetraploide) mostró una tolerancia y un vigor significativamente altos con relación al testigo.

Estos resultados demuestran que las tres características mencionadas en las líneas 26 y 5 fueron estables y se trasmitieron a sus progenies en la

Digitized by Google

Cuadro 14.4. Características principales evaluadas en las líneas SC_3 seleccionadas.

Línea SC_2 (serie)	Ploidía	Características principales
18	2X	Area foliar, vigor
26	2X	Reacción a antracnosis, producción de semilla
52	2X	Vigor
57	2X	Vigor
5	4X	Vigor, reacción a antracnosis

generación SC_3. Asimismo, los fenotipos raros observados en la generación SC_2, como plantas cloróticas y plantas de tipo arbustivo, fueron trasmitidos también a su progenie (líneas SC_3).

Discusión: tetraploidía estable y regeneración

La inducción de la variación heredable mediante el cultivo in vitro se ha demostrado en varias especies vegetales (Larkin et al., 1984), aunque no lo había sido anteriormente para *S. guianensis*. El principal efecto que el cultivo in vitro de callos causó en la línea *S. guianensis* empleada fue una tasa relativamente alta de inducción de tetraploidía. El hecho de que los tetraploides difirieran fenotípicamente de los diploides sugiere que la inducción de la tetraploidía se puede explotar para el mejoramiento de *S. guianensis*. Aparentemente, las diferencias fenotípicas entre los genotipos tetraploides y diploides inducidos son estables, por lo menos más allá de una generación sexual. Sin embargo, hubo indicios de que el rendimiento de semilla sería menor en las líneas tetraploides que en las diploides, lo cual se explica por el nivel de ploidía.

La evaluación de varios caracteres fenotípicos reveló un amplio rango de variación entre los diploides regenerados in vitro, los tetraploides y el testigo, y señaló además la ocurrencia de doblamiento cromosómico. Se indujo también variación heredable de varios caracteres en las líneas diploides y tetraploides.

En algunos de los caracteres analizados hubo diferentes significancias entre las líneas diploides y tetraploides, y dentro de ellas, así como entre las progenies y el testigo (Figuras 14.1 y 14.2).

Se trasfirieron en total 114 plantas regeneradas; de ellas, el 80% parecen morfológicamente normales, aunque hubo una considerable variación en

Digitized by Google

el vigor observado en dos generaciones sexuales, SC_2 y SC_3. Las demás plantas exhibieron anormalidades respecto a la forma y al tamaño de la hoja, al grosor del tallo, a la longitud de los entrenudos, y al color de la flor. Este estudio mostró finalmente que es posible regenerar varios fenotipos de *S. guianensis* partiendo del cultivo de tejidos de esta leguminosa.

La regeneración de un gran número de plantas permitiría la obtención de genotipos con variantes útiles que podrían utilizarse en un programa de mejoramiento que considere como las líneas resistentes a enfermedades o con tolerancia al estrés ambiental.

Variación Somaclonal en el Arroz

La variación ocurrida en líneas somaclonales de arroz y la herencia de tal variación han sido estudiadas por diversos autores. La evidencia obtenida por ellos indica que para caracteres de gran importancia económica como la altura, la habilidad de macollamiento, la floración, y la fertilidad del grano se puede generar variación heredable por la vía del somacultivo (Oono, 1983; Sun et al., 1983; Jun, 1987).

Aunque se conoce poco acerca de la naturaleza y de los mecanismos particulares de la variación somaclonal, estudios como los realizados por Fukui (1983) señalan que tales variaciones se producen durante el estado de callo en forma independiente y, a veces, simultánea. Este aspecto es muy importante puesto que las variedades de amplia aceptación comercial, en las cuales se requiere modificar uno o varios caracteres indeseables, se pueden mejorar por este método.

El presente trabajo se realizó en el CIAT (Pachón, 1988) y tuvo dos objetivos: primero, evaluar el potencial de la variación somaclonal para mejorar algunas variedades comerciales de arroz, y segundo, determinar los caracteres de importancia económica que pueden variar por la vía somaclonal y su frecuencia de variación.

Se evaluaron progenies somaclonales de ocho variedades comerciales de arroz sembradas en América Latina: CICA 8, Oryzica 1, IRGA 409, IAC 165, Bluebelle, BG 90-2, Oro, Diamante, y la línea CT 6513-7-Ca-1 del Programa de Arroz del CIAT.

Los callos se indujeron sobre el medio básico de Murashige y Skoog (1962) suplementado con 1360 mg/litro de extracto de levadura, 300 mg/litro de caseína hidrolizada, 1.5 g/litro de Gelrite, 60 g/litro de azúcar, 2 mg/litro de 2,4-D, 2 mg/litro de ANA, 3 mg/litro de cinetina, 2 mg/litro

Digitized by Google

de tiamina, 2 mg/litro de glicina, 0.5 mg/litro de piridoxina, y 0.5 mg/litro de ácido nicotínico.

La regeneración de las plántulas se logró sobre el medio MS suplementado con 100 mg/litro de inositol, 1.5 g/litro de Gelrite, 30 g/litro de azúcar, 1 mg/litro de ANA, 4 mg/litro de cinetina, 3 mg/litro de tiamina, 2 mg/litro de glicina, 0.5 mg/litro de piridoxina y 0.5 mg/litro de ácido nicotínico.

Las plantas regeneradas se adaptaron a condiciones ambientales en el invernadero, y de allí se trasplantaron al campo hasta que se recolectó su semilla. Cada somaclón obtenido dio origen a una línea somaclonal que fue evaluada respecto a caracteres como el vigor inicial, la altura, la habilidad de macollamiento, la esterilidad, la resistencia a piricularia (*Pyricularia oryzae* Cav.), la tolerancia a la toxicidad del hierro, la longitud del grano, el 'centro blanco,' y el contenido de amilosa. Todos los caracteres medidos se analizaron y compararon estadísticamente contra el respectivo genotipo donante.

Se obtuvieron 5425 líneas somaclonales provenientes de igual número de plantas regeneradas (Cuadro 14.5). Los mayores porcentajes de variación se observaron en los caracteres vigor inicial, floración, altura, macollamiento, y centro blanco (Figura 14.4). Se encontró un intenso efecto del genotipo donador en la frecuencia de variación de características como la floración, la altura y el macollamiento.

Cuadro 14.5. Número de somaclones obtenidos a partir de panículasinmaduras de nueve genotipos de arroz (*Oryza sativa* L.)

Genotipo	Somaclones (no.)
CICA 8	1429
BG 90-2	984
IRGA 409	837
Bluebelle	808
IAC 165	611
CT 6513-7-Ca-1	405
Oryzica 1	160
Oro	118
Diamante	73
Total	5425

Digitized by Google

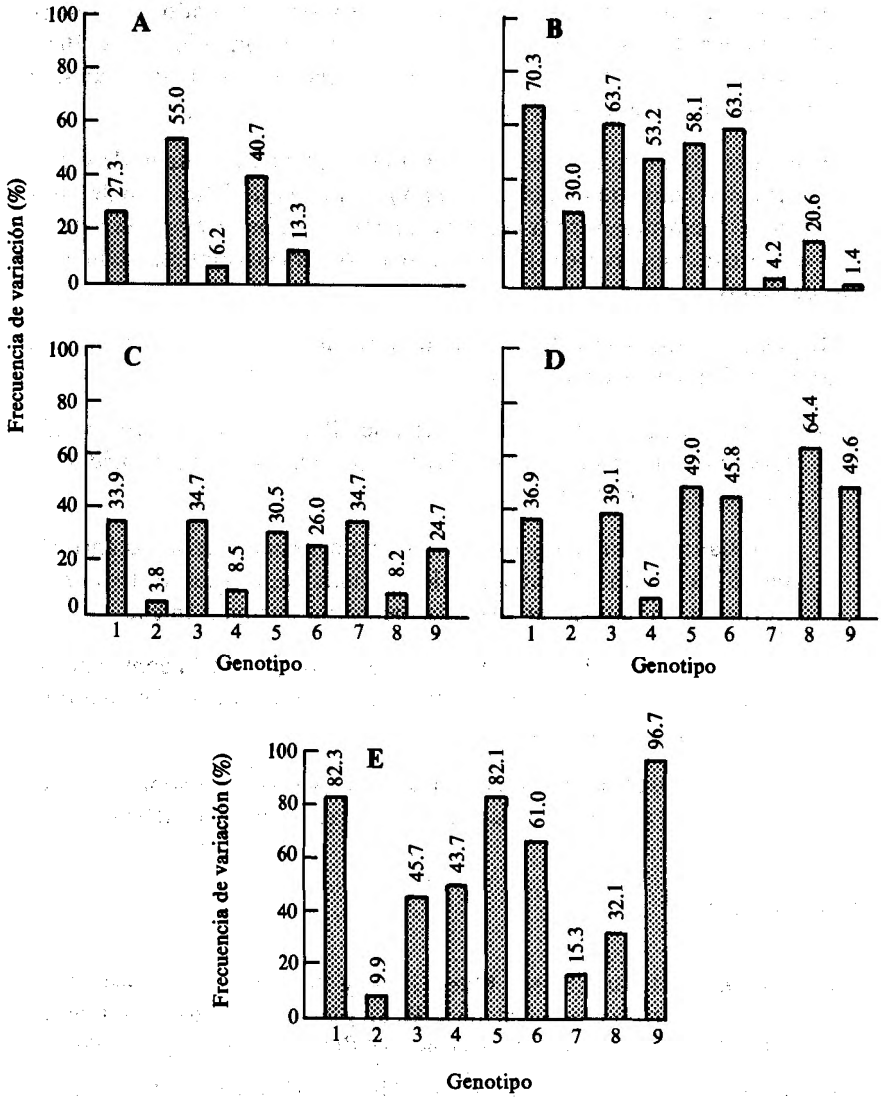


Figura 14.4. Frecuencias de variación de cinco caracteres evaluados en las líneas somaclonales de nueve genotipos de arroz. A) Vigor inicial; B) floración; C) macollamiento; D) altura; E) centro blanco. Genotipos: 1 = CICA 8, 2 = *Oryzica* 1, 3 = Bluebelle, 4 = IAC 165, 5 = IRGA 409, 6 = AG 90-2, 7 = Oro, 8 = Diamante, 9 = CT 6513-7-Ca-1.

Digitized by Google

Con respecto a la resistencia a la piricularia y a la tolerancia a la toxicidad por hierro, la gran mayoría de los somaclonales presentaron comportamientos similares a los de los genotipos donadores; sólo se hallaron pocas líneas variantes que pertenecían a los genotipos IAC 165 y CT 6513-7-Ca-1; esas líneas deben reevaluarse para constatar que han sido el resultado de cambios genéticos estables.

Conviene anotar que el hecho de encontrar altos porcentajes de variación para determinada característica no garantiza que éstos sean de utilidad para el mejoramiento; la ausencia de control sobre el tipo y la magnitud de los cambios favorece la obtención de otras variaciones, además de las deseadas.

De este estudio sobre la variación somaclonal del arroz se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- La incidencia del centro blanco de la semilla presentó un alto porcentaje de variación en los somaclones si se compara con esa incidencia en los genotipos donantes.
- Los mayores porcentajes de variación de las características agronómicas de las líneas somaclonales se hallaron (en ese orden) en la floración, la altura, el macollamiento, y el vigor inicial.
- Existe influencia del genotipo en la variación generada dentro de las líneas somaclonales para características como la floración, la altura de la planta y el macollamiento.
- Los resultados observados indican que la variación somaclonal es una fuente potencial importante de variabilidad genética.

Referencias

Cameron, D. F.; Hutton, E. M.; Miles, J. W. y Brolmann, J. B. 1984. Plant breeding in *Stylosanthes*. En: Stace, H. M. y Edye, L. A. (eds.). The biology and agronomy of *Stylosanthes*. Academic Press, Australia. p. 589-606.

Dos Santos, A. U. P.; Outka, D. E.; Cocking, E. C. y Davey, M. R. 1980. Organogenesis and somatic embriogenesis in tissue derived from leaf protoplast and leaf explants of *Medicago sativa*. Z. Pflanzenphysiol. 99:261-270.

Edye, L. A.; Grof, B. y Wolker, B. 1984. Agronomic variation and potential utilization of *Stylosanthes*. En: The biology and agronomy of *Stylosanthes*. p. 547-570.

Digitized by Google

Evans, D. A. y Sharp, W. R. 1983. Single gene mutations in tomatoe plants regenerated from tissue culture. Science 221:949-951.

——— y ———. 1986. Somaclonal and gametoclonal variation. En: Evans, D. A.; Sharp, W. R. y Ammirato, P. V. (eds.). Handbook of plant cell culture. MacMillan Publishing, Nueva York. v. 4, p. 97-132.

———; ——— y Medina Filho, H. P. 1984. Somaclonal and gametoclonal variations. Am. J. Bot. 71(6):759-774.

Fukui, K. 1983. Sequential occurrence of mutations in a growing rice callus. Theor. Appl. Genet. 65:225-230.

Gresshoff, P. M. 1980. In vitro culture of white clover: Callus, suspension, protoplast culture and plant regeneration. Bot. Gaz. 46:157-164.

Jaramillo, S. 1982. Estudios sobre la inducción de callo y la regeneración de plantas de *Stylosanthes* spp. *in vitro*. Tesis (MS). Programa de estudios para graduados, Universidad Nacional/ICA, Bogotá, Colombia. 110 p.

Johnson, L. B.; Stuteville, D. L.; Higgins, R. K, y Skinner, D. Z. 1981. Regeneration of alfalfa plants from protoplasts of selected Regen S. clones. Plant Sci. Lett. 20:297-304.

Jun, C. 1987. Improvement of rice through somaculture. Tesis (Ph.D.). Louisiana State University, E.U.

Kao, K. N. y Michayluk, M. R. 1980. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of alfalfa. Z. Pflanzenphysiol. 96:135-141.

Karp, A. y Bright, S. 1985. On the causes and origins of somaclonal variation. Oxford Surveys on Plant Molecular and Cell Biology 2:199-234.

Larkin, P. J. y Scowcroft, W. R. 1981. Somaclonal variation: A novel source of variability from cell culture for plant improvement. Theor. Appl. Gen. 60:197-214.

———; Ryan, S. A.; Bretell, R. y Scowcroft, W. R. 1984. Heritable somaclonal variation in wheat. Theor. Appl. Genet. 67:443-455.

Latunde-Dada, A. O. y Lucas, J. A. 1983. Somaclonal variation and reaction to *Verticillium* wilt in *Medicago sativa* L. plants regenerated from protoplasts. Plant Sci. Lett. 32:205-211.

Lenné, J. M.; Vargas, A. y Torres, C. 1983. Descripción de las enfermedades de las principales leguminosas forrajeras tropicales: Guía de estudio. (CIAT Serie 04SP-03.03). Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. 50 p.

Mariotti, D.; Arcioni, S. y Pezzoti, M. 1984. Regeneration of *Medicago arborea* L. plants from tissue and protoplasts culture of different organ origin. Plant Sci. Lett. 37:149-156.

Digitized by Google

McIlroy, R. J. 1973. Introducción al cultivo de los pastos tropicales. Editorial Limusa, México. 168 p.

Meijer, E. G. M. 1982. High frequency plant regeneration from hypocotyl- and leaf-derived tissue cultures of the tropical pasture legume *Stylosanthes humilis*. Physiol. Plant. 56:381-385.

——— y Steinbiss, H. H. 1983. Plantlet regeneration from suspension and protoplast cultures of the tropical pasture legume *Stylosanthes guyanensis* (Aubl.) Sw. Ann. Bot. 52:305-310.

Meins, F. Jr. 1983. Heritable variation in plant cell culture. Ann. Rev. Plant Physiol. 34:327-346.

Mroginski, L. A. y Kartha, K. K. 1981. Regeneration of plants from callus tissue of the forage legume *Stylosanthes guianensis*. Plant Sci. Let. 23:245-251.

——— y ———. 1984. Tissue culture of legumes for crop improvement. Plant Breed. Rev. 2:215-264.

Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15:473-479.

Oono, K. 1983. Genetic variability in rice plants regenerated from cell culture. En: IRRI (International Rice Research Institute) (ed.). Cell and tissue culture techniques for cereal crop improvement. Science Press, Beijing, China. p. 95-104.

Orton, T. J. 1983. Experimental approaches to the study of somaclonal variation. Plant Molec. Biol. Rep. 1:67-76.

———. 1984. Somaclonal variation: Theoretical and practical considerations. En: Gustafson, J. P. (ed.). Gene manipulation in plant improvement. Academic Press, Nueva York. p. 273-298.

Pachón, J. 1988. Uso de la variación somaclonal en el mejoramiento de algunos caracteres de importancia económica en el arroz (*Oryza sativa* L.). Tesis. Universidad Javeriana, Bogotá.

Roca, W. M. 1986. Biotecnología de plantas: Nuevas oportunidades para la agroindustria. En: Agroindustria 2000. Sociedad de Agricultores y Ganaderos del Valle, Cali, Colombia. 12 p.

Scowcroft, W. R. 1984. Genetic variability. En: Tissue culture: Impact on germplasm conservation and utilization. International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR), Roma. 41 p.

——— y Adamson, J. A. 1976. Organogenesis from callus cultures of the legume *Stylosanthes hamata*. Plant Sci. Lett. 7:39-42.

Digitized by Google

———; Brettell, R. I. S.; Ryan, S. A.; Davies, P. A. y Pallotta, M. A. 1987. Somaclonal variation and genomic flux. En: Plant tissue and cell culture. p. 275-286.

Sun, Z. X.; Zhao, C. Z.; Zheng, K. L.; Qi, X. F. y Fu, Y. P. 1983. Somaclonal genetics of rice (*Oryza sativa* L.). Theor. Appl. Genet. 67:67-73.

Szabados, L. y Roca, W. M. 1986. Regeneration of isolated mesophyll and cell suspension protoplasts to plants in *Stylosanthes guianensis*, a tropical forage legume. Plant Cell Reports 5:174-177.

Digitized by Google

Capítulo 15

Variabilidad y selección de poblaciones generadas in vitro

J. A. Mariotti*

* Facultad de Agronomía y Zootecnia, Universidad Nacional de Tucumán, San Miguel de Tucumán, Argentina.

Digitized by Google

Introducción

El cultivo de tejidos y células vegetales in vitro se ha considerado frecuentemente como una alternativa frente a los métodos convencionales de mejoramiento genético en especies de importancia económica. Esta alternativa requiere de algún mecanismo capaz tanto de generar variabilidad genética in vitro como de regenerar plántulas a partir de dichas variantes genéticas.

En la caña de azúcar, por ejemplo, el cultivo de células in vitro permite inducir, por lo menos en algunos casos, una variabilidad genética seleccionable, la cual está asociada con 'mosaicos cromosómicos' que presumiblemente se presentarían en algunas variedades o clones (Heinz et al., 1971). A partir de tales variantes cromosómicas se pueden regenerar plantas de diferente constitución genética, las cuales se estabilizarían en poblaciones capaces de reproducirse en forma agámica y que serían, eventualmente, susceptibles de selección por sus características cualitativas o cuantitativas de interés agronómico.

Una serie de supuestos permitirán formular un modelo biométrico con su correspondiente interpretación; partiendo de él, una población de la naturaleza antes descrita se caracterizaría por los efectos genéticos y ambientales determinantes de la expresión fenotípica individual.

Cabe mencionar que algunas variantes fenotípicas seleccionables, especialmente en las primeras etapas de la reproducción clonal, pueden no estar asociadas con efectos genéticos estables; es el caso de los llamados efectos clonales o efectos 'C', de determinación probablemente extracromosómica, que tienden a desaparecer en el curso de algunas generaciones de reproducción asexual. Es muy posible que, en la determinación de los fenotipos, los efectos 'C' se sumen y se confundan con los efectos genéticos estables, afectando consecuentemente las estimaciones del valor fitotécnico potencial de las poblaciones así originadas.

Estimación del Grado de Determinación Genética

La falta de variabilidad genética en una población se traduce en una determinación genética nula, lo cual descalifica cualquier intento de seleccionar tipos superiores en ella; en este caso, la totalidad de la variación observada se puede atribuir a efectos ambientales aleatorios no susceptibles de selección dirigida.

Digitized by Google

La expresión fenotípica individual se puede definir con un modelo biométrico simple según la expresión 1:

$$X_{ij} = \mu_o + G_i + E_{ij} \quad (1)$$

Los términos de la ecuación representan lo siguiente:

X_{ij} = la expresión fenotípica individual del genotipo *i* en un réplica cualquiera *j*;

μ_o = el parámetro de la posición poblacional (media) para el carácter investigado;

G_i = el efecto particular del genotipo *i* que afecta por igual a todas las réplicas de dicho genotipo, y se expresa como desvío respecto de la media poblacional;

E_{ij} = el efecto ambiental asociado con la réplica *j* del genotipo i; es un efecto particular de cada réplica en cada genotipo, y se expresa también como un desvío respecto de la media poblacional.

Tanto los efectos G_i como los E_{ij} se suponen aleatorios en este modelo, que entonces se autodefine como de tipo II (Steel et al., 1980).

El efecto G_i es, en realidad, una resultante de efectos genéticos y extragenéticos; los efectos genéticos estables que componen la expresión fenotípica resultan del balance de los efectos aditivos, de dominancia y epistáticos sobre el carácter en cuestión. A estos efectos genéticos estables deben sumarse efectos genéticos de estabilidad relativa, referidos a la interacción genotipo-ambiente.

El componente G_i del modelo biométrico incluye también los efectos 'C' que son de relativa inestabilidad aunque, por lo general, de tendencia definida; estos efectos 'C' interfieren con la expresión del componente genético, afectando la capacidad de diagnóstico y el pronóstico de las técnicas biométricas.

Hechas estas consideraciones generales, se acepta que la varianza fenotípica poblacional (σ^2_P) está compuesta por una porción correspondiente a la variabilidad aportada por el componente G_i y por otra porción atribuible al E_{ij}; estos términos constituyen la expresión (2):

$$\sigma^2_P = \sigma^2_G + \sigma^2_E \quad (2)$$

donde:

σ^2_G = la variación genotípica, la cual puede estar acrecentada por los efectos 'C', cuando éstos ocurran.

Digitized by Google

σ^2_E = la variabilidad no seleccionable, de origen ambiental.

En (2) no hay una manera directa de estimar la σ^2_G. En cambio, se puede estimar la σ^2_E con distintas aproximaciones y con diferentes grados de confiabilidad.

Los pesos relativos de los componentes de la variación determinan el grado de determinación genética (GDG), a veces mencionado como la 'heredabilidad en el sentido amplio' (h^2).

$$GDG = h^2 = \sigma^2_G / \sigma^2_P \quad (3)$$

En el caso de que ocurran efectos 'C', la expresión (3) se puede interpretar como un límite superior o máximo para el GDG, lo cual afectará la eficiencia de esta estimación en una magnitud desconocida.

Caso 1: una sola repetición por genotipo

En el caso de que la población cuente con una sola repetición por genotipo, la varianza se puede interpretar sólo en términos de la σ^2_P; y se requiere, en consecuencia, un estimador independiente (testigo) de la varianza ambiental.

En materiales reproducidos clonalmente, uno o varios clones independientes se pueden repetir en forma aleatoria, conjuntamente con la población base; en este caso, para estimar la variación ambiental es preferible (aunque no excluyente) utilizar como clon testigo el mismo clon madre replicado. En cualquier caso, se debe suponer que la variación ambiental (σ^2_E), estimada a partir de los clones testigo repetidos, representa bien la variación ambiental que realmente se ha producido en la población; esta suposición no sería necesariamente correcta si han ocurrido variaciones espontáneas, p.ej., una mutación. La estabilidad relativa respecto a las variaciones del ambiente es también una cualidad genética que caracteriza y diferencia a muchos genotipos.

Con estas limitaciones, la σ^2_G poblacional puede entonces estimarse mediante la expresión (4):

$$\sigma^2_G = \sigma^2_P - \sigma^2_E \quad (4)$$

donde:

σ^2_E = estimación independiente de la variación ambiental a que están sometidos los integrantes de la población investigada.

Esta es una manera sencilla, aunque extremadamente rudimentaria, de estimar la σ^2_G poblacional de un carácter cuantitativo; la confiabilidad

Digitized by Google

depende en este caso de cuán eficientemente se haya estimado la σ^2_G con los procedimientos descritos. El ejemplo que sigue sirve para ilustrar el manejo de esta información.

Ejemplo: subclones de caña de azúcar. A partir de cultivos in vitro, se obtuvo una población de subclones de caña de azúcar de la variedad NA 56-79; se desea investigar la posibilidad de que en estos materiales se haya inducido variabilidad genética con respecto a la característica 'contenido de sacarosa'.

Los subclones se han reproducido en parcelas experimentales únicas, y el clon madre (NA 56-79) se ha intercalado con repeticiones en el mismo experimento. Tanto en la población base, cuya probable variabilidad se desea analizar, como en el clon madre utilizado como testigo, se hicieron controles del contenido de sacarosa por los métodos convencionales de laboratorio. Los datos, analizados estadísticamente, permitieron estimar los parámetros de posición y dispersión que se consignan en el Cuadro 15.1.

Cuadro 15.1. Estadísticos de posición y dispersión del rendimiento sacarino en el clon madre y en subclones de caña de azúcar del cultivar NA 56-79.

Estadísticos	Clon madre	Subclones
Media[a]	11.52 (μ_C)	10.82 (μ_0)
Varianza	0.6337 (σ^2_E)	1.4659 (σ^2_P)
Desviación estándar	0.7960 (σ_E)	1.2107 (σ_P)
Coeficiente de variación	0.0691 (CV_E)	0.1119 (CV_P)

a. Del rendimiento o contendio de sacarosa, medido en porcentaje.

FUENTE: Ploper et al., 1978.

Con los resultados experimentales que presenta el cuadro mencionado se pueden estimar la varianza genética poblacional (σ^2_G) y el grado de determinación genética (GDG) para el carácter en cuestión, empleando las expresiones (3) y (5), respectivamente.

$$\sigma^2_G = 1.4659 - 0.6337 = 0.8322$$
$$GDG = 0.8322 / 1.4659 = 0.5677 \text{ ; GDG, \%} = 56.8\%$$

Si en el carácter analizado se presentase una correlación entre medias y varianzas poblacionales, en la estimación de la σ^2_E podría proponerse una corrección para referirla a la media poblacional que corresponda, haciendo para ello uso de la siguiente expresión:

Digitized by Google

$$\sigma^{2'}_E \text{ (corregida)} = \sigma^2_E \ (\mu_0/\mu_C)^2$$
$$= 0.6337 \ (10.82/11.52)^2 = 0.5590$$

Con esta nueva aproximación, la variación debida al genotipo (σ^2_G) y el grado de determinación genética (GDG) serían:

$$\sigma^2_G = \sigma^2_P - \sigma^{2'}_E = 1.4659 - 0.5590 = 0.9069$$
$$GDG = 0.9069/1.4659 = 0.6187; \ GDG, \% = 61.87\%$$

A partir de las estimaciones de la σ^2_G puede estimarse también el coeficiente de variación genética (CV_G), que relaciona la variabilidad genética de la población con la media poblacional.

Continuando con el ejemplo, se usará la última estimación de la σ^2_G poblacional como punto de partida para calcular la desviación genética estándar (σ_G), y a partir de ésta calcular el coeficiente de variación (CV_G).

$$\sigma_G = \sqrt{\sigma^2_G} = \sqrt{0.9069} = 0.9523$$
$$CV_G = \sigma_G/\mu_0 = 0.9523/10.82 = 0.088 \ ; \ CV_G, \% = 8.8\%$$

A partir de los coeficientes de variación, existe otra forma de estimar el GDG mediante la expresión (5):

$$GDG = (CV_G/CV_P)^2 \qquad (5)$$

El grado de determinación genética (GDG) permite describir la varianza que no se puede explicar por los efectos ambientales como una proporción de la varianza total existente en la población; por lo tanto, tiene valor para el diagnóstico en la investigación del potencial fitotécnico de la población base.

Caso 2: se repiten los genotipos de la población

En este caso, se supone que cada uno de los genotipos K_1 que integran la población investigada desde el punto de vista de su potencial fitotécnico ha sido repetido K_2 veces en un diseño experimental apropiado.

Sobre la base del mismo modelo biométrico expuesto en el Caso 1, el efecto G_i se mide ahora a partir del promedio de las K_2 repeticiones distribuidas aleatoriamente en un diseño experimental definido. Las repeticiones tienden a reducir el error de la interacción genotipo-ambiente (en lo que se refiere a efectos microambientales), y reducen, parcialmente, algunos de los efectos 'C'.

Digitized by Google

Por otra parte, se puede emprender una estimación más directa y confiable de la σ^2_E, por cuanto ahora participan en dicha estimación los K_1 genotipos investigados en lugar de uno solo o de unos pocos genotipos independientes como lo requería la situación expuesta en el Caso 1. La σ^2_E, como estimación, está condicionada a las variaciones micro y macroambientales, como se comentó anteriormente.

La repetición de los genotipos y el uso de un diseño experimental permiten realizar un análisis convencional de la varianza. La varianza total del experimento puede separarse en efectos independientes atribuibles a diferentes causas. Las diferencias 'entre genotipos' y 'entre repeticiones de un mismo genotipo' permiten una estimación más ajustada de los parámetros supuestamente genéticos y ambientales que determinan la expresión fenotípica.

Ejemplo: subclones de caña de azúcar repetidos. Se supone una población constituida por 90 (K_1) genotipos (subclones) obtenidos a partir de cultivos in vitro de la variedad NA 56-79, dispuestos en un experimento completamente al azar, con 2 repeticiones (K_2) por entrada. El carácter investigado es el mismo del ejemplo anterior, o sea, el contenido de sacarosa. En el Cuadro 15.2 se presentan los resultados obtenidos en un análisis de varianza convencional, al que se han agregado los valores esperados de las varianzas respectivas.

Cuadro 15.2. Análisis de la varianza y esperanzas de los cuadrados medios en subclones de caña de azúcar de la variedad NA 56-79.

Causas de variación	Grados de libertad	Cuadrados medios	Esperanza de los cuadrados medios
Entre genotipos	$K_1 - 1 = 89$	$(CM_1) = 2.3728$	$\sigma^2_E + K_2\sigma^2_G$
Entre repeticiones dentro de los gentotipos	$K_1(K_2 - 1) = 90$	$(CM_2) = 0.5590$	σ^2_E
Total	$K_1.K_2 - 1 = 179$		

Igualando los cuadrados medios con sus respectivas esperanzas en términos biométricos, se pueden estimar las variaciones de origen ambiental y de presunto origen genético:

$$\sigma^2_E = CM_2 = 0.559$$

$$\sigma^2_G = (CM_1 - CM_2)/K_2 = \frac{2.3728 - 0.559}{2} = 0.9069$$

Digitized by Google

de donde resultaría nuevamente la estimación del GDG a partir de (3).

$$\sigma_P = \sigma^2_G + \sigma^2_E = 0.9069 + 0.559 = 1.4659$$

$$GDG = \sigma^2_G / \sigma^2_D = \frac{0.9096}{1.4659} = 0.6187 \; ; \; GDG, \% = 61.87\%$$

Este ejemplo ha sido preparado de tal manera que en ambos casos se obtengan estimaciones idénticas del GDG y se facilite así la ejemplificación en el tema siguiente. En la práctica, en este segundo caso se espera obtener una estimación del GDG menor que en el caso de la réplica única, debido a la ya explicada tendencia de las repeticiones a neutralizar tanto los efectos de la interacción genotipo-ambiente como algunos efectos 'C'.

Selección y Progreso Genético

La detección de la variación residual no explicada por causas ambientales, y que presuntamente tiene causas genéticas estables, permite ejercer algún tipo de selección dirigida en la población en cuestión. Mediante este proceso selectivo, se pretende conservar los genotipos más convenientes y descartar aquéllos que no concuerdan con los objetivos del mejoramiento genético.

Existen técnicas biométricas simples para pronosticar el éxito de la selección en términos del progreso genético esperado; están basadas en algunos supuestos adicionales respecto a la distribución de los componentes del fenotipo.

La expresión (6) describe la respuesta esperada (R) a la selección, en función del diferencial de selección (S) y del grado de determinación genética (GDG):

$$R = GDG \, . \, S \qquad (6)$$

El diferencial de selección ($S = \mu_S - \mu_0$) expresa la media fenotípica de los individuos seleccionados en la población como desvío de la media poblacional antes de iniciarse el proceso selectivo. La respuesta a la selección ($R = \mu_1 - \mu_0$) expresa, también en términos de desvío respecto de la media poblacional original, la media de la población en la generación siguiente a la selección (Figura 15.1).

Si se realiza un experimento de selección en la población original (G_0) y se observa la respuesta real en la siguiente generación (G_1), se pueden conocer los verdaderos valores de S y de R, y a partir de éstos determinar,

Digitized by Google

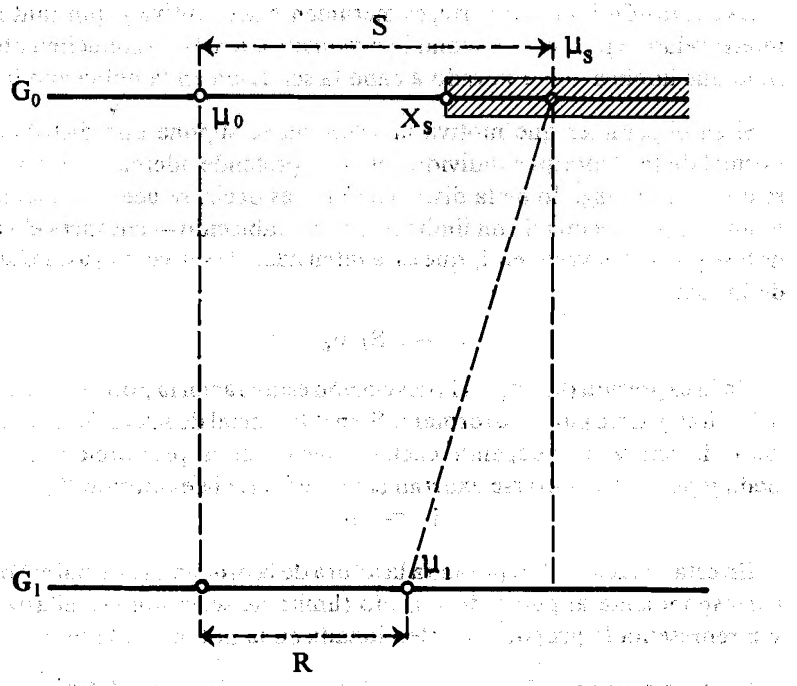


Figura 15.1. Medias, diferencial de selección y respuesta. El área sombreada (línea superior) indica la porción seleccionada en la población base.

G_0 = generación 0, en la que ocurre la selección.

G_1 = generación siguiente a la de selección.

μ_0 = media poblacional en la G_0.

μ_S = media de los fenotipos seleccionables en la G_0.

μ_1 = media poblacional en la G_1, suponiendo ausencia de interacción genotipo-ambiente.

X_S = límite de selección y punto de truncado.

S = diferencial de selección.

R = respuesta a la selección.

mediante la expresión (7), lo que se conoce como 'grado de determinación genética liberado' (GDG_R). Este expresa la verdadera determinación genética que la población sometida a selección pone de manifiesto:

$$GDG_R = R / S \qquad (7)$$

Digitized by Google

La expresión 6, por su parte, es meramente descriptiva y, por tanto, de interés relativo para el seleccionador; requiere además un conocimiento de S, lo que implica haber llevado a cabo la selección en la población base.

Si en el carácter que motiva la selección se supone una distribución normal de los fenotipos individuales, y se pretende además efectuar una selección por sesgado de la distribución —es decir, se aceptan todos los fenotipos por encima de un límite inferior establecido— entonces el valor de S se puede convertir en i, que es la intensidad de selección ya que ésta se define así:

$$i = S/\sigma_P \qquad (8)$$

En la expresión (8), σ_P es la desviación estándar en la población base de selección, y sirve para trasformar a S en diferencial de selección estandarizado, i. Este valor i depende exclusivamente de la proporción seleccionada y puede encontrarse exactamente mediante la expresión (9):

$$i = hp \qquad (9)$$

En esta ecuación, *h* representa la altura de la ordenada normal estándar correspondiente al punto de sesgado (límite de selección estandarizado) y p representa la proporción seleccionada en la población base.

Para las presiones de selección más usuales, tales como 0.5%, 1%, 5%, 10%, 20%, 30% y 50%, los valores de i son respectivamente los siguientes: 2.892, 2.665, 2.063, 1.755, 1.400, 1.159 y 0.798.

Esta particularidad de i permite trasformar la expresión descriptiva de la respuesta a la selección en una expresión de pronóstico, si se admite una cierta presión selectiva teórica. El progreso se puede valorar en forma cuantitativa, lo que permite comparar situaciones experimentales y procedimientos de selección diferentes. Las expresiones (10) y (11) pronostican los progresos absolutos y relativos esperados de la selección.

$$R = i \,.\, GDG \,.\, \sigma_P \qquad (10)$$

$$R, \% = i \,.\, GDG \,.\, CV_P, \% \qquad (11)$$

De estas expresiones, donde CV_P es el coeficiente de variación fenotípico de la población base, se puede inferir que, al menos en principio, se esperarían mayores progresos por selección en las siguientes condiciones:

a. Cuando se aplican presiones selectivas relativamente mayores, lo que por sí solo determinaría el crecimiento de i.

b. Cuando el GDG efectivo sea mayor, lo que está determinado por un CV_G relativamente elevado.

Digitized by Google

c. Cuando la variabilidad fenotípica de la población base sea mayor, lo que asegura una mayor discriminación con respecto a los efectos de la selección.

No obstante, esta expectativa de progreso no se cumple necesariamente por varias razones, que no serán analizadas aquí; ese hecho determinaría un desajuste entre los progresos esperados y aquéllos verdaderamente logrados por la selección.

Ejemplo: progreso esperado de la selección en subclones de caña de azúcar. De acuerdo con los datos consignados en el Cuadro 15.1, la característica 'contenido de sacarosa' de la caña de azúcar presenta, en la población base, una media $\mu_0 = 10.82$ y una desviación $\sigma_P = 1.2107$.

Por otra parte, en la población se había establecido, para esta característica, un residuo de variabilidad que no se puede explicar solamente por efectos ambientales aleatorios, y que, cuando sea determinado por efectos genéticos estables, permitirá una selección efectiva de la población en cuestión. El GDG estimado en la población base fue de 0.6187.

Si se establece una presión selectiva tal que permita conservar el 10% de los mejores fenotipos (respecto al contenido de sacarosa) se pueden estimar el progreso absoluto y el relativo que, con respecto a la media de la población base, se esperan de dicha selección. Como se vio anteriormente, a una selección propuesta del 10% corresponde un valor de intensidad de selección $i = 1.755$, si se supone que hay una distribución normal del carácter objeto de la selección. Se pueden entonces efectuar estas estimaciones empleando las expresiones (10) y (11), así:

$$R = 1.755 \times 0.6187 \times 1.2107 = 1.315$$

$$R, \% = 1.755 \times 0.6187 \times 11.19 = 12.15\%$$

El primer resultado (1.315) indica el valor absoluto que, como desvío respecto a la media poblacional, se espera después de aplicar en la siguiente generación clonal el criterio selectivo en cuestión. La media esperada (μ_1) en la generación G_1 equivaldría entonces a la media inicial más ese desvío.

$$\mu_1 = 10.82 + 1.315 = 12.135 \qquad (12)$$

El segundo resultado obtenido (12.15%) expresa la misma ganancia, pero con relación a la media poblacional. Esta segunda expresión (donde $CV_P = 0.1119$ puede indicarse como $CV_P * 100$ o como CVP, %) permite una comparación directa entre los resultados pronosticados para diferentes procedimientos de selección, e incluso para diferentes características, cosa que no sería posible hacer con el valor absoluto del progreso genético.

Digitized by Google

Una dificultad que se presenta frecuentemente en este tipo de investigación es la comparación con el testigo (por ejemplo, el clon madre). En ocasiones, es deseable conocer la frecuencia relativa de los subclones que superan al testigo, o el progreso esperado cuando se toma como límite de selección la media del testigo.

En el Cuadro 15.1 se consigna la media del clon madre (var. NA 56-79), el cual se utilizó como testigo en el experimento que se describe (μ_C = 11.52). La frecuencia relativa de los fenotipos que en la población base superen esta media se halla fácilmente con la ayuda de cualquier tabla de áreas de la distribución normal estandarizada, en el supuesto de que la distribución del carácter sea normal (Fisher et al., 1963). El procedimiento consiste en una trasformación 'z', calculando este valor z mediante la expresión (13) y hallando el área correspondiente en la tabla antes descrita.

$$z = (\mu_C - \mu_0)/\sigma_P \qquad (13)$$

$$= (11.520 - 10.082)/1.2107 = 0.578$$

En la tabla de áreas, el valor de z calculado corresponde a un área de 0.7183 (valor encontrado por interpolación); esta área pertenece a la extrema izquierda de la población. Con respecto al área total, que se considera igual a la unidad, el área hallada deja, hacia la derecha de la distribución, otra área de 28.17% aproximadamente; ésta corresponde al porcentaje seleccionado, si el criterio de selección ha sido descartar todos los fenotipos que no alcancen, por lo menos, el valor medio del testigo.

Para una presión selectiva de esta magnitud se puede calcular exactamente la intensidad de selección, i, haciendo uso de la expresión (8). Sin embargo, se puede lograr una aproximación razonable con el método gráfico (Falconer, 1981), con el cual se obtiene, para este caso, un valor i = 1.25 (aproximadamente).

Sustituyendo ahora valores en las expresiones (10) y (11) se obtienen los resultados siguientes:

$$R = 1.25 \times 0.6187 \times 1.2107 = 0.936$$

$$R, \% = 1.25 \times 0.6187 \times 11.19 = 8.65\%$$

Estos valores tienen idéntica interpretación que los anteriores, excepto por la menor presión selectiva utilizada (28.2% frente al 10% utilizado en el primer caso); esta diferencia explica los menores progresos absolutos y relativos que se alcanzan con el criterio selectivo propuesto.

Digitized by Google

Cabe mencionar finalmente la relativa confiabilidad que le atribuye el fitotecnista a estas estimaciones basadas en modelos biométricos teóricos. Ya se dijo anteriormente que es frecuente observar desajustes significativos entre los progresos esperados en virtud de estas consideraciones teóricas y los progresos realmente alcanzados en la práctica de la selección; esta falta de concordancia provendría de una de estas dos causas:

a. Una falla de los modelos biométricos o genéticos propuestos —o de ambos— para la interpretación de la expresión fenotípica; si se comprueba, debe conducir a una investigación de la eficacia de tales modelos y, eventualmente, a la formulación de modelos alternativos más realistas, aunque no necesariamente más complejos.

b. Una segunda causa, en el supuesto de que los modelos sean correctos, es una deficiente estimación de los parámetros poblacionales e individuales; esta falla puede corregirse mejorando la calidad del experimento, que está asociada, la mayor parte de las veces, con el uso de diseños apropiados y de poblaciones y muestras de tamaño mayor.

La aplicación de las ideas de la genética biométrica ha contribuido notablemente, en los últimos 30 años, al conocimiento de la expresión y estabilidad de los caracteres cuantitativos, y también al progreso del mejoramiento genético convencional. Es evidente que tales ideas serán también de gran utilidad en la caracterización y en el aprovechamiento de nuevas aproximaciones al mejoramiento genético, como las descritas en esta obra.

Referencias

Falconer, D. S. 1981. Introduction to quantitative genetics. Longman Group, Londres. 340 p.

Fisher, E. A. y Yates, F. 1963. Tablas estadísticas para investigadores. Aguilar, Madrid. 131 p.

Heinz, D. J. y Mee, G. W. P. 1971. Morphologic, cytogenetic and enzymatic variation in *Saccharum* species hybrid clones derived from callus tissue. Amer. J. Bot. 58:257-262.

Ploper, L. D. y Mariotti, J. A. 1978. Variabilidad en subclones obtenidos de cultivos de tejidos en caña de azúcar. Rev. Ind. Agric. (Tucumán) 55:59-64.

Steel, R. G. D. y Torrie, J. H. 1980. Principles and procedures of statistics: A biometrical approach. McGraw-Hill, Nueva York. 633 p.

Digitized by Google

Capítulo 16

Análisis e interpretación estadística de la experimentación in vitro

J. A. Izquierdo*
Y. López F.**

* Producción Vegetal, FAO/RLAC, Santiago, Chile.
** Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, Palmira, Colombia.

Digitized by Google

Introducción

El valor de una tecnología depende de la capacidad que tenga la investigación para mantenerla en avance continuo. En lo que concierne al cultivo de células y tejidos vegetales, la obtención de soluciones técnicas implica la utilización empírica del método de prueba y error; la investigación debe validar las hipótesis sugeridas por experiencias anteriores, por observaciones y por el estado actual de la información en áreas específicas, acción que es esencial para la generación de tecnología en este campo del cultivo de tejidos.

Necesidad de la Evaluación Estadística

Con relativa frecuencia, los investigadores —y muy especialmente los que realizan su trabajo en las condiciones del laboratorio— se preguntan: ¿Es la evaluación estadística una verdadera necesidad para este tipo específico de experimentación?

La falta de criterios elementales para que el investigador pueda contestar esta pregunta ha hecho que, frecuentemente, los resultados presentados en la literatura relacionada con el cultivo de tejidos no estén caracterizados por la consistencia de los datos y por la repetibilidad de los protocolos experimentales.

Para responder esa pregunta, es necesario tener en cuenta, en primer lugar, la variabilidad de los materiales biológicos que debe manipular el investigador, ya que la variación fenotípica (F) de los individuos es el resultado del efecto conjunto de la carga genética (G) por el efecto de los factores ambientales (A), según la expresión:

$$F = G \times A$$

Es posible deducir, por tanto, que las diferencias entre los individuos son debidas a diferencias genéticas y ambientales que se hallan fuera del control razonable del experimentador. El reconocimiento de la existencia de esta variabilidad implica reconocer la dificultad de evaluar una práctica que ha sido efectuada sobre una sola unidad experimental. Un experimento con una sola repetición suministra siempre una medida muy pobre del efecto de la práctica o tratamiento aplicado; cuando no hay al menos dos unidades experimentales tratadas similarmente, no es posible la medición del error experimental. Este es, precisamente, la medida de la variabilidad que se halla fuera del control del investigador.

Digitized by Google

Por esa razón, el tratamiento estadístico de una colección de datos experimentales permite hacer la estimación sin sesgo del efecto de los tratamientos sobre el material investigado, y la evaluación de las diferencias obtenidas entre los tratamientos mediante pruebas de significancia basadas en la medida del error experimental. Estas pruebas valoran la probabilidad de que las diferencias halladas entre los tratamientos ocurran únicamente como efecto del azar, es decir, de la parte no controlada del experimento.

Por consiguiente, se acepta que la forma razonable de conocer la magnitud de los efectos de ciertos factores sobre el material biológico aislado en forma de unidad (llámese ésta parcela, tubo de ensayo o caja Petri) y de medir el efecto del azar sobre esas unidades, es planear un experimento según criterios que fijen de antemano las hipótesis formuladas sobre él y los métodos específicos de llevarlo a cabo. Estos criterios determinarán las características de lo que se llama el diseño del experimento.

Principios Inherentes al Diseño de Experimentos

Los investigadores consideran, en general, tres principios fundamentales en el diseño de un experimento, los cuales cobran una importancia particular en las áreas del cultivo de tejidos y de la biotecnología.

A. Repeticiones

Significa que un tratamiento debe ser repetido, o asignado a dos unidades experimentales diferentes por lo menos, con el fin de proveer un estimador del error experimental y permitir una medida más precisa del efecto de los tratamientos.

1. Número de repeticiones

¿Cuántas veces debe aplicarse un tratamiento a la unidad experimental? En otras palabras: ¿Cuántas unidades experimentales por tratamiento hay que incluir en un diseño para que la estimación de la variación debida al error experimental sea lo más precisa posible?

Tal pregunta puede responderse de manera un tanto diferente según el campo al que pertenezca el experimento:

Digitized by Google

- Experimentos agrícolas: Se han escrito textos excelentes en dondé se resuelve el problema del número de repeticiones de este tipo de experimentos; aunque ese número varía según las características de los materiales ensayados, las pautas encontradas para calcularlo por los biometristas y expertos en investigación de cultivos coinciden.

- Experimentos de biotecnología: La naturaleza de los materiales empleados y las condiciones físicas en las cuales se desarrolla la investigación en esta ciencia deben considerarse antes de establecer el número de repeticiones de estos experimentos.

Características de los materiales. Por su naturaleza, los materiales biológicos ensayados con más frecuencia (explantes, células aisladas, protoplastos) son, normalmente, de tamaño pequeño; por consiguiente, son muy sensibles a los pequeños cambios en los niveles de los factores externos. Una pequeña masa de células, por ejemplo, puede ser más sensible a un cambio minúsculo en la cantidad de minerales, vitaminas u hormonas de su medio que una planta entera que crece en un medio variable pero normal. Por tal razón, es muy probable que ese pequeño conjunto de células exprese características que, por causa de la regulación cibernética, un organismo completo más grande no pueda expresar ni con la misma rapidez ni en la misma magnitud.

Las altas variaciones que se presentan en este tipo de investigaciones tienen así una explicación, y deben tenerse en cuenta a la hora de determinar el número de repeticiones con que se diseña un experimento particular.

Condiciones físicas de los experimentos. a) *En los cuartos de crecimiento:* Se supone que estos cuartos están dotados de condiciones controladas; no obstante, están expuestos a condiciones locales y a gradientes de baja intensidad que pueden afectar la uniformidad con que cada factor ambiental llega a cada uno de los materiales ensayados en cada una de las unidades experimentales.

Así, por ejemplo, a veces es difícil garantizar plenamente que las fuentes de luz están colocadas de tal forma que la intensidad y la calidad de la luz son las mismas para todas las unidades experimentales; con frecuencia se detectan gradientes de iluminación que pueden alterar la respuesta de los materiales en estudio.

La humedad está asociada con diversos problemas patológicos difíciles de controlar en una cámara de crecimiento y que pueden afectar notablemente el curso y los resultados de los experimentos; esos problemas están ligados a fenómenos respiratorios en que las respuestas de los materiales a las concentraciones de oxígeno inducen un cambio diferencial en las

Digitized by Google

concentraciones parciales de otros gases como el CO_2. El efecto de este gas en la cámara de crecimiento también debe tenerse en cuenta. Aunque se supone que estas condiciones son uniformes para todas las unidades experimentales, en realidad se establecen coeficientes de variación que, sin tener en cuenta la discusión anterior, serían inexplicables.

Se dispone normalmente de cuartos de crecimiento y de cámaras controladas de pequeñas dimensiones; por consiguiente, el número de unidades experimentales está restringido por el factor espacio. Esta limitación debe considerarse cuando se proyecta un experimento y se calculan tanto el número de factores que se investigará como el número de repeticiones necesario para hacer una buena estimación del efecto de un factor dado.

b) *En el invernadero y la casa de malla*: Los materiales que se investigan en estos espacios son, casi siempre, de tamaño mayor que los materiales considerados en la sección anterior; se esperaría, por tanto, que sus respuestas a los efectos de los tratamientos fueran un tanto menos variables. Sin embargo, en un invernadero se encuentran también, con frecuencia, altos índices de variación que, como en el caso anterior, se explican por gradientes de luz, de temperatura o de humedad que pueden medirse con relativa facilidad. El tamaño relativamente grande de las unidades experimentales reduce las limitaciones de la escogencia tanto del número de tratamientos como del número de repeticiones a la hora de hacer el diseño del experimento.

2. Solución general al problema del número de repeticiones

La solución está contenida en la siguiente expresión:

$$N = C V^2 / \sigma^2 \qquad (1)$$

donde:

V = coeficiente de variación
σ = diferencia entre medias extremas
C = parámetro que es función del sesgo de error y de la distribución de las medias.

Los valores de V, σ y C deben encontrarse empíricamente, es decir, el empleo de la fórmula implica el conocimiento previo de la variabilidad de los materiales que se investigarán, y éste se obtiene de un ensayo diseñado para tal propósito.

Se puede afirmar, entonces, que el número de repeticiones de un experimento depende de la magnitud de las diferencias que se quieran detectar y

Digitized by Google

de la variabilidad de los datos con los cuales se trabaja. En la práctica, esta afirmación es una limitación importante, ya que para determinar el número de repeticiones se debe gastar tiempo, trabajo y materiales, es decir, aumentar el costo del ensayo, condición que muchas instituciones aceptan con dificultad. El número de repeticiones queda así limitado por la dificultad de conocer de antemano la variabilidad de los materiales ante las condiciones del ensayo.

Como se deduce de la expresión (1), otra limitación de este problema es el hecho de que en los ensayos de laboratorio se encuentran con frecuencia coeficientes de variabilidad muy grandes. Siendo el número de repeticiones directamente proporcional al cuadrado del coeficiente de variación, el valor de N será muy alto (hasta 30 ó 40 repeticiones) de tal modo que, siguiendo sólo este criterio, los experimentos se harían impracticables.

En estos casos, es indispensable el criterio biológico del investigador quien debe conocer, tanto como sea posible, las características biológicas de sus materiales y especialmente lo que se espera de ellos no sólo respecto a su variabilidad sino a su respuesta biológica.

B. Aleatorización

Este principio permite obtener estimaciones sin riesgo del error experimental y de las medias de los tratamientos. Es muy importante en el diseño de experimentos de biotenología porque en éstos hay grandes variaciones.

La aleatorización consiste en la asignación de los tratamientos a las unidades experimentales de tal forma que todas ellas tengan una oportunidad equitativa de recibir el tratamiento. Para tal efecto se acude a tablas de números aleatorios, a conteos sencillos con fichas, o a tablas generadas por un computador.

C. Control local

La gran mayoría de los experimentos que se llevan a cabo en biotecnología tienen diseños factoriales en arreglos hechos completamente al azar; su ventaja es la sencillez pero su desventaja es que no consideran las limitaciones impuestas por los gradientes antes mencionados y esto afecta la magnitud del error experimental.

El control local, mediante restricciones en la aleatorización del diseño, significa una reducción en el error experimental. Este control se hace por el

Digitized by Google

'sistema de bloques' que consiste en la asignación sistemática de las repeticiones en bloques según el sentido del gradiente; de este modo se garantiza que las repeticiones de cada tratamiento reciban efectos del factor considerado (luz, humedad, temperatura) que tengan la misma magnitud. La práctica de los bloques permite entonces extraer el efecto del gradiente del total del error experimental.

Método Científico

Es importante recordar algunas nociones relacionadas con la planeación del experimento. En general, se admite que el método científico es el procedimiento empleado para hacer investigación, y que comprende cuatro actividades:

a. Observación de los hechos o fenómenos.
b. Elaboración de hipótesis que sirvan como marco de explicación de tales fenómenos.
c. Experimentación.
d. Interpretación de los resultados y confrontación de éstos con las hipótesis.

Por consiguiente, el experimento es una herramienta que el investigador utiliza para descubrir algo desconocido o para someter a prueba un principio o una hipótesis.

Características de un buen experimento

Un experimento bien planeado ostenta cuatro características básicas:

Simplicidad. Con frecuencia se pretende responder a demasiadas preguntas con un solo experimento; esta actitud complica el diseño y el manejo del experimento de tal modo que la información obtenida es confusa y difícil de interpretar desde el punto de vista biológico. Lo razonable es diseñar experimentos en que los tratamientos y el arreglo experimental sean consistentes con pocos objetivos bien definidos.

Grado de precisión. Se garantiza que el experimento puede medir diferencias entre los tratamientos con el grado de precisión que requiere el investigador. Por ello, el manejo mismo del experimento, en su aspecto operativo, es de suma importancia.

Ausencia de error sistemático. Se garantiza esta característica mediante la aleatorización y el sistema de bloques, los cuales reducen tanto el sesgo

Digitized by Google

debido a una asignación sistemática de los tratamientos como el efecto sistemático de los gradientes.

Validez de las conclusiones. En un experimento bien planeado se pretende lograr la universalidad de las conclusiones, es decir, que tengan un rango de validez tan amplio como sea posible. Una forma de conseguirlo es distribuyendo las repeticiones en el tiempo y en el espacio; de este modo se sabe si el efecto de los factores sobre la unidad experimental varía de un mes a otro, de un semestre a otro, de la época seca a la lluviosa, o de un sitio a otro.

Tres normas sencillas permiten pues adquirir las características mencionadas: a) diseñar repeticiones; b) hacer la aleatorización de los tratamientos; y c) solicitar la ayuda del estadístico o del biometrista si surgen dificultades de diseño o de interpretación estadística de los resultados. La mayor parte de los pasos que se dan en el manejo de un experimento no son de orden estadístico; no obstante, el manejo estadístico constituye una parte muy importante de la experimentación.

Los criterios anteriores son especialmente importantes en el desarrollo de la experimentación en el cultivo de células y tejidos. Aunque a menudo se considera que las condiciones in vitro ofrecen un mayor control de la variabilidad externa, la utilización cuidadosa de la estadística, en este caso, es una condición inherente a la credibilidad actual y futura de esta nueva biotecnología. La consistencia y la repetibilidad de los resultados deben estar bajo el amparo estricto del rigor estadístico; estos criterios faltan a menudo en publicaciones de trabajos sobre cultivo de tejidos.

El presente capítulo sugiere a los investigadores criterios útiles para la interpretación estadística de los resultados en el cultivo de células y tejidos. No pretende ser una contribución a la tan poblada área de la estadística ya que existen numerosos y apropiados libros y revisiones sobre estadística experimental agrícola (Cochran, 1971; Cochran et al., 1950; Cox, 1958; Draper et al., 1966; Little et al., 1975; Steel et al., 1960), los cuales se pueden y deben utilizar como guía en el diseño de los experimentos y en los análisis de los resultados.

Este capítulo está dedicado a investigadores que comprenden la necesidad del criterio probabilístico y que, habiendo tomado algún curso básico de estadística experimental, aceptan que el análisis de varianza (ANOVA) es el mecanismo de prueba de hipótesis.

Digitized by Google

Interpretación de las Respuestas a las Dosis

El propósito obvio de un experimento es resolver las preguntas planteadas en las hipótesis; sin embargo, muchas veces los resultados se interpretan y presentan con poca o ninguna referencia a la pregunta original.

En el cultivo de tejidos, una de las preguntas que se formulan más comúnmente es la que se refiere a la dosis óptima de un regulador del crecimiento u otro constituyente del medio de cultivo; también es frecuente interrogarse sobre los factores ambientales (temperatura, humedad, etc). El siguiente es un ejemplo acerca de la relación dosis-respuesta.

Se trata de un experimento cuyo objetivo es determinar el efecto del Al^{+++} en la reducción del crecimiento de callos originados a partir de cotiledones de alfalfa; se hicieron 7 tratamientos consistentes en 7 dosis de Al^{+++} aplicado al medio de cultivo, y la toxicidad se evaluó en términos de peso fresco (variable 1) y de diámetro del callo (variable 2), a los 30 días (Cuadro 16.1).

Cuadro 16.1. Respuesta[a] de los callos de cotiledones de alfalfa a varias dosis de aluminio, en términos de peso fresco y diámetro.

Al^{+++} (dosis)	Variable 1 (mg de peso fresco)	Variable 2 (mm de Θ)
0	222 a	9 d
1	202 ab	12 cd
2	205 ab	15 bc
3	186 bc	22 a
4	164 cd	19 ab
5	156 cd	17 b
6	147 d	11 cd

a. Respuestas a los 30 días de iniciado el tratamiento.

La pregunta simple, útil y directa que el investigador debería haberse planteado era: ¿Qué relación existe entre la dosis de Al^{+++} y la respuesta del tejido? Sin embargo, a menudo predomina otra pregunta menos útil y que además es mucho más difícil de responder: de los 21 posibles pares (o combinaciones) de tratamientos, ¿cuál o cuáles son diferentes respecto a los demás?

Digitized by Google

En forma general, en las publicaciones sobre cultivos de tejidos se observa una tendencia a responder el segundo tipo de pregunta, con resultados similares a los que presenta el Cuadro 16.1. Es obvio que la primera pregunta no ha sido contestada en el caso de la variable 1 (peso fresco) a pesar de que es inherente al objetivo del experimento; para obtener esa respuesta es necesario hacer la distribución de la suma de cuadrados (Cuadro 16.2).

Cuadro 16.2. Distribución de la suma de cuadrados (S.C.) de los tratamientos en cuanto al peso fresco (variable 1).

Fuente de variación	g.l.	S.C.	Distribución (% del total)
Tratamiento	6	23805	—
Efecto lineal	1	22885	96
Efecto residual	5	920	4

La situación que presenta el Cuadro 16.2 puede ilustrarse en la Figura 16.1, en donde se observa una relación lineal altamente significativa que explica el 96% de la variación de la respuesta. En estas condiciones la segunda pregunta, sobre cuáles tratamientos son significativamente diferentes de los demás, es irrelevante; estamos frente a una relación lineal y, dentro del rango probado, todos los niveles (dosis) de tratamiento producen efectos siempre diferentes. El mejor estimador de los efectos de los tratamientos está constituido por los puntos de la ecuación de regresión.

Existen otras relaciones entre dosis y respuestas. La variable 2 (diámetro) presenta una respuesta curvilínea (Figura 16.2) y la interpretación de estos resultados puede ser aún más confusa en términos de la identificación de los tratamientos con respuestas significativamente diferentes. Sin embargo, la participación de los efectos de los tratamientos muestra que los componentes lineales y cuadráticos explican el 85% de la variabilidad en las respuestas (Cuadro 16.3). Por lo tanto, se podría resumir simplemente diciendo que la respuesta encontrada en este caso es una curva de segundo grado.

Los ejemplos anteriores tienen el objetivo de mostrar que siempre que se establezca una serie de dosis se debe intentar un esfuerzo por encontrar la relación dosis-respuesta.

Digitized by Google

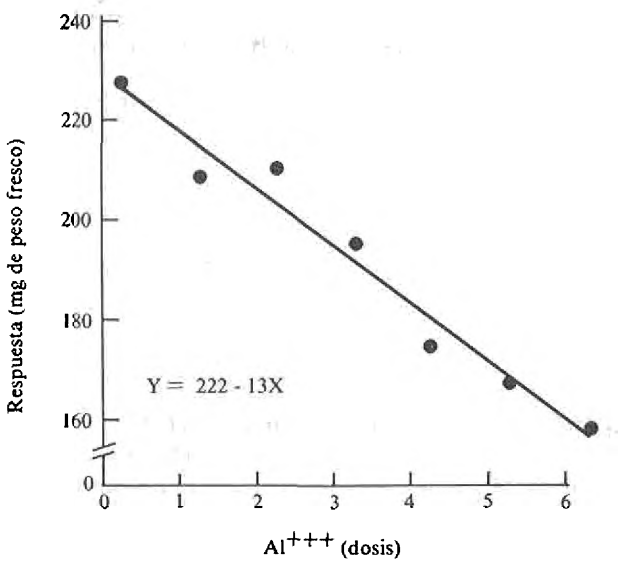


Figura 16.1. Regresión lineal que representa la respuesta del callo (mg de peso fresco) a las diferentes dosis de Al^{+++} del medio de cultivo.

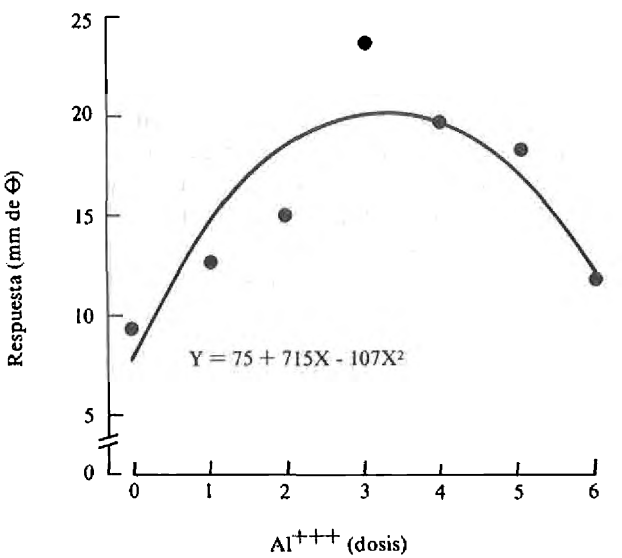


Figura 16.2. Curva de segundo grado que muestra la relación entre la dosis de Al^{+++} y la respuesta de los callos (mm de Θ)

Digitized by Google

Cuadro 16.3. Distribución de las sumas de cuadrados (S.C.) de los tratamientos respecto al diámetro del callo (variable 2).

Fuentes de variación	g.l.	S.C.	Distribución (% del total)
Tratamiento	6	650.0	—
Efectos:			
Lineal	1	71.5	11
Cuadrático	1	482.0	74
Cúbico	1	40.8	6
Residual	3	55.7	9

En la experimentación in vitro es común el arreglo factorial de tratamientos. En este arreglo se utilizan dos o más factores a distintas concentraciones y en todas las combinaciones posibles. Es un enfoque diferente de los anteriores; en éstos se quería saber cómo era la relación dosis-respuesta. Las preguntas lógicas ahora son: ¿Cuál es el efecto de cada factor? ¿Hay interacciones entre los factores? ¿Depende la respuesta de un factor del nivel del otro?

El Cuadro 16.4 corresponde a un ejemplo en el cual se obtuvieron las medias de respuestas a cada tratamiento o combinación de tres factores con dos niveles cada uno (arreglo factorial 2^3).

Las letras con que se intenta clasificar los promedios explican confusamente los efectos de los tratamientos. En cambio, si se realiza el reparto de la suma de cuadrados debida a los tratamientos entre los efectos de los principales de éstos y los efectos de las interacciones (Cuadro 16.5), se encuentra que el factor A tiene el efecto más importante y explica más del 83% del total de la variación; el factor B cuenta por el 12% de la suma de cuadrados, y no existe evidencia de efecto del factor C o de las interacciones. En este caso entonces sólo es importante presentar los efectos de los factores A y B (Cuadro 16.6).

En un nuevo ejemplo, combinando el análisis factorial y el estudio de tendencias en las respuestas de los tratamientos, se pretende ilustrar cómo se pueden interpretar y presentar las interacciones. Si se toman los niveles 2 x 2 x 4 en los tres factores respectivos A, B y C, siendo C el tiempo de exposición, obviamente las preguntas que se deben formular son las siguientes: ¿Cuáles son los efectos de los factores A y B? ¿Existe relación entre la respuesta y el tiempo de exposición? ¿Existe alguna interacción significativa entre los tres factores? Estas preguntas no se pueden responder con una presentación como la del Cuadro 16.7.

Digitized by Google

Cuadro 16.4. Respuestas a los tratamientos de un arreglo factorial 2^3.

Tratamientos (combinación de factores)	Respuestas
A B C	14.4 b
A B c	8.5 b
A b C	15.2 ab
A b c	13.0 ab
a B C	21.4 a
a B c	18.6 ab
a b C	22.6 a
a b c	22.7 a

Cuadro 16.5. Distribución de la suma de cuadrados (S.C.) del arreglo factorial 2^3.

Fuente de variación	g.l.	S.C.	Efecto relativo (% del total)
Tratamientos	7	877	—
Factor A	1	730	83
Factor B	1	107	12
Factor C	1	23	3
A x B	1	8	2
A x C	1	1	
B x C	1	3	
A x B x C	1	5	

Cuadro 16.6. Efecto promedio de los factores.

Factor	Efecto promedio[a]
A	11.8
a	21.3
B	14.7
b	18.4

a. Se expresa en las unidades de los datos originales o de las respuestas indicadas en el Cuadro 16.4.

Digitized by Google

Cuadro 16.7. Respuesta a la interacción de los factores A, B y C.

Nivel de A	Nivel de B	Respuestas según nivel de C			
		0	1	2	3
1	1	74 c	92 c	108 b	134 b
1	2	48 b	108 d	156 c	292 d
2	1	12 a	18 a	76 a	92 a
2	2	18 a	58 b	90 ab	162 c

Si se distribuyen los 15 grados de libertad de los tratamientos, se puede encontrar una explicación acerca de los efectos de varios factores y de sus interacciones (Cuadro 16.8). Se observa que el 92% de la variación en los tratamientos se debe a cuatro efectos: el principal de A, el principal de B, la tendencia lineal del factor C, y la interacción entre el factor B y la tendencia lineal del factor C. Estos resultados se pueden presentar en forma gráfica (Figuras 16.3 y 16.4).

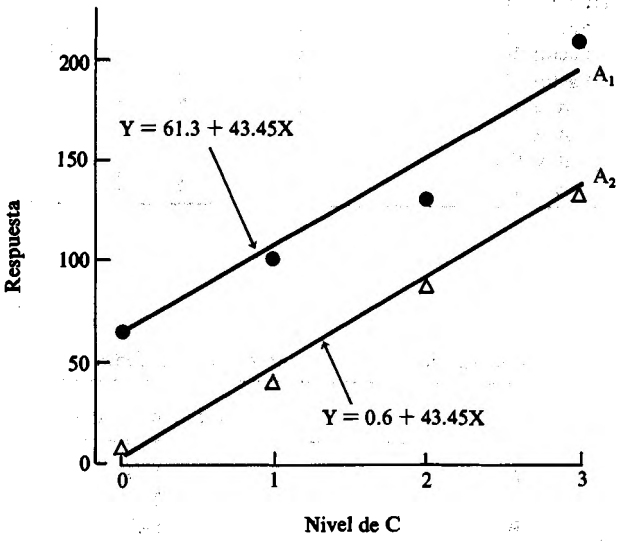


Figura 16.3. Regresiones lineales que representan la respuesta (Y) a los dos niveles del factor A en los cuatro niveles del C.

Digitized by Google

Cuadro 16.8. Distribución de la suma de cuadrados (S.C.) de los tratamientos.

Fuente de variación	g.l.	S.C.	Distribución (% del total)
Tratamientos	15	216083	—
Factor A	1	44287	20.5
Factor B	1	19927	9.2
A x B	1	817	0.4
C lineal	1	113274	52.4
C cuadrático	1	2977	1.4
C cúbico	1	163	0.1
A x C lineal	1	1717	0.8
B x C lineal	1	21094	9.8
Residual[a]	7	11827	5.5

a. Corresponde a la S.C. debida a los tratamientos y no incluida en la descomposición anterior. Algunos autores llaman 'residuo' al error experimental.

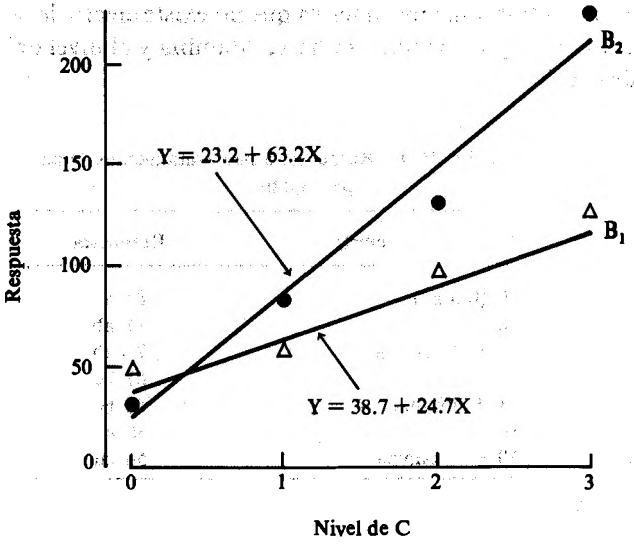


Figura 16.4. Regresiones lineales que representan la respuesta a los dos niveles del factor B en los cuatro niveles del C.

Digitized by Google

El experimento ilustra otro punto importante: que el significado de la F de los tratamientos con 15 grados de libertad es confuso; así, en el ejemplo se observa que F es el promedio de 4 grados de libertad altamente significativos y de 11 que no lo son. En estas circunstancias muchas veces los investigadores detienen el análisis estadístico y la interpretación cuando encuentran que el F de los tratamientos no es significativo, lo cual ha conducido a una interpretación incompleta e incorrecta de los experimentos. Por lo tanto, importa en estos casos distribuir los grados de libertad de los tratamientos, para visualizar los efectos de los factores principales y de las interacciones.

Al respecto se puede analizar otro ejemplo: hay siete tratamientos, uno de los cuales se considera como testigo, y se establecen tres niveles en la relación 2:5:10, aplicados con o sin adición de una vitamina. Los resultados se presentan en el (Cuadro 16.9).

En este ejemplo la factorización fue incompleta. Específicamente, se debió incluir un tratamiento con la vitamina sola; además, no existe aparentemente una justificación lógica para la serie particular de tratamientos. Es recomendable que, cuando se realicen estudios sobre la relación entre dosis y respuestas, se utilicen series de niveles establecidos en progresiones aritméticas. A pesar de lo anterior, la distribución de los efectos de los tratamientos muestra que no existe efecto de las vitaminas y que tampoco hay interacción entre la vitamina y el nivel del tratamiento (Cuadro 16.10).

Cuadro 16.9. Respuesta a siete tratamientos de un experimento.

Tratamiento (nivel)	Respuesta
0 (testigo)	81 a
2	77 ab
2 + Vitamina	74 ab
5	67 bc
5 + Vitamina	66 bc
10	50 d
10 + Vitamina	56 cd

Los resultados descartan el efecto de la vitamina. El análisis de regresión (Figura 16.5) indica que en la distribución de las sumas de los cuadrado de los tratamientos, un 98% de la variación se explica por una respuesta de tipo lineal (Cuadro 16.11).

Digitized by Google

Cuadro 16.10. Distribución de la suma de cuadrados (S.C.) de tratamientos de otro experimento.

Fuente de variación	g.l.	S.C.	Distribución (% del total)
Tratamientos	6	3216	—
Testigo vs. otros	1	915	28
Lineal vs. otros	1	2249	70
Vitamina	1	0	0
Residual	3	52	2

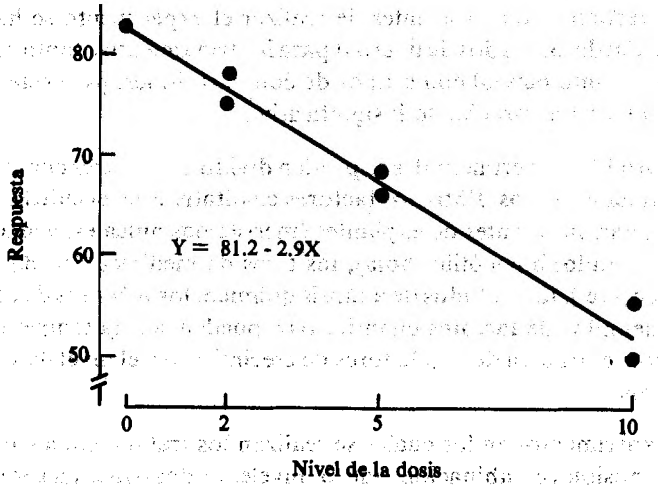


Figura 16.5. Recta de regresión que representa la respuesta dada al nivel de la dosis.

Cuadro 16.11. Distribución de la suma de cuadrados de tratamientos.

Fuente de variación	g.l.	S.C.	Distribución (% del total)
Tratamientos	6	3216	—
Lineal	1	3164	98
Desviación del modelo lineal	5	52	2

Digitized by Google

Se ha mencionado anteriormente la distribución de los efectos de los tratamientos como ejemplo del manejo e interpretación de los resultados. Sin embargo esta técnica, altamente recomendada por los estadísticos, es a menudo desconocida o no se considera en los análisis estadísticos de los resultados que se publican abundantemente en nuestros días. Por otro lado, se nota un abuso en la utilización de gráficas y cuadros de valores promedio más o menos la desviación estándar. Por ello la técnica de la distribución de las sumas de cuadrados de los tratamientos merece una especial consideración.

Distribución de los Efectos de los Tratamientos

Es muy recomendable que antes de realizar el experimento se haga una distribución de los grados de libertad para los tratamientos, tanto en forma individual como parcial con grupos de comparaciones; para este reparto no se requiere una prueba de F significativa.

Las variables experimentales se pueden dividir en factores cualitativos y factores cuantitativos. Entre los factores cualitativos en el cultivo in vitro pueden estar: las fuentes de explantes (meristemas apicales, yemas axilares, raíces, tallo, hipocótilo, hoja), los tipos de medios (MS, B5, White, Anderson, etc.), los métodos de análisis químico, los métodos de conteo, y otros. Ejemplos de factores cuantitativos pueden ser: la temperatura, el pH, la concentración de reguladores de crecimiento y el nivel de sacarosa, entre otros.

Los experimentos en los cuales se realizan los tratamientos a partir de todas las posibles combinaciones de los niveles de dos o más factores, tanto cualitativos como cuantitativos, son llamados experimentos factoriales. En este caso, el término factorial solamente describe la naturaleza del tratamiento y no el diseño del mismo.

Cuando se establecen factores cuantitativos, el análisis de regresión es la técnica más apropiada (Draper et al., 1966). En este caso, los grados de libertad de los tratamientos y la suma de cuadrados se deben distribuir entre los componentes debidos al efecto lineal, al efecto cuadrático, al efecto cúbico, y a otros polinomios de orden superior. Si hay suficiente conocimiento teórico para especificar una relación matemática entre las respuestas y el factor (relación logística, Mitscherlich, Gompertz, etc.), se debe aplicar la ecuación particular a los resultados.

Sin embargo, en la mayoría de la experimentación in vitro la relación matemática es tan compleja que todavía no se han encontrado buenas

Digitized by Google

aproximaciones, mediante modelos polinómicos apropiados, para explicar fenómenos tales como la diferenciación o la embriogénesis somática, ni aun sucesos tan comunes como la organogénesis adventicia. Si los niveles de los tratamientos están igualmente espaciados e igualmente repetidos, la computación para obtener los componentes lineales, cuadráticos, y de otro grado de las regresiones se simplifica por el uso de polinomios ortogonales (Little et al., 1975; Steel et al., 1960; Gómez et al. 1976).

Procedimientos de Comparación Múltiple

Existen situaciones en las cuales los procedimientos de comparación múltiple, como es la prueba de rango triple de Duncan, resultan apropiados (Petersen, 1977); esta situación se presenta cuando se compara un arreglo al azar de genotipos o sustancias químicas. En estos casos, un número de pruebas estadísticas puede ayudar a la interpretación de los resultados de los experimentos. Sin embargo, los resultados que se han publicado, en cultivo de tejidos, fisiología, horticultura y otras áreas, denotan un abuso en la utilización de las comparaciones múltiples.

Uno de los objetivos, en el caso discutido, es poner alerta al investigador de un cultivo in vitro acerca del mal uso de esas técnicas. Las comparaciones múltiples no son apropiadas en los siguientes casos: a) en experimentos en los cuales los tratamientos están establecidos a partir de niveles de una variable cuantitativa; b) para combinaciones factoriales de dos o más factores, o dos o más niveles en cada factor; c) para tratamientos cuantitativos que fueron formulados en combinaciones lineales de particular interés (Petersen, 1977).

Existen muchos textos de estadística que contienen discusiones sobre este tema (Gómez et al., 1976; Little et al., 1975; Steel, et al., 1960) y también trabajos de revisión (Chew 1976 y 1980; Petersen, 1977); por lo tanto, sólo es importante delinear sucintamente las ventajas y desventajas de cada prueba.

Diferencia mínima significativa de Fisher

La diferencia mínima significativa (DMS) consiste en aplicar la prueba t de Student a cualquier par de medias, pero se debe usar solamente si en el análisis de varianza el valor F del tratamiento es significativo; con esta protección, la DMS se transforma en una de las más poderosas técnicas de comparación múltiple (Chew, 1976; 1980).

Digitized by Google

Considerando que esta comparación múltiple es ampliamente conocida por los investigadores de cultivos in vitro, solamente queda agregar que, aparte de ofrecer la protección necesaria, esta prueba permite utilizar tratamientos desigualmente repetidos y también puede servir para la estimación de intervalos.

Prueba de rango múltiple de Newman-Keuls

Este método no requiere un valor F significativo en el análisis de varianza y es utilizable cuando los tratamientos están igualmente repetidos. Para aplicarlo se organizan los promedios en forma ascendente, pero en vez de comparar las diferencias entre cualquier par de medias contra un valor constante, como en la DMS, se utiliza una magnitud variable. A pesar de que esta prueba es intuitivamente más interesante que la DMS, no ha sido muy aceptada y, además, tiene una tasa de error bastante confusa (Chew, 1980).

Diferencia significativa de Tukey (HSD)

Esta prueba requiere un número igual de repeticiones por tratamiento. Presenta la simplicidad de la DMS, en la cual una magnitud constante permite probar todas las diferencias entre todos los pares de tratamientos; dos tratamientos se declaran diferentes si la magnitud absoluta de la diferencia entre sus medias excede el HSD.

El HSD de Tukey se puede usar también para construir intervalos de confianza simultáneos para todos estos pares de tratamientos. En este caso, se denomina prueba de rango múltiple de Tukey, y el HSD tiene un criterio altamente conservador; sin embargo, ofrece la ventaja de su aplicabilidad.

Método de Scheffé

El método de Scheffé, al igual que el HSD de Tukey, es aplicable a contrastes generales y no solamente a comparaciones apareadas. Puede tener una aplicación específica en el caso de que los promedios provengan de observaciones de diferentes tratamientos con varianzas desiguales.

A pesar de esta restricción, que inclusive involucra la prohibición de realizar el análisis general de varianza, el método de Scheffé podría ser utilizado en estos casos.

Digitized by Google

Prueba de rango múltiple de Duncan

Esta prueba, que constituye el método de comparación múltiple más utilizado, supone que las medias de los tratamientos no están correlacionadas. El procedimiento es similar al de la prueba de Newman-Keuls excepto en el nivel de protección que éste necesita, ya que según Chew (1980) existe una mayor probabilidad de error del tipo I. Esto hace que la prueba de rango múltiple de Duncan sea muy poderosa, lo cual significa una mayor probabilidad de detectar las diferencias cuando ellas existen.

Los investigadores están a menudo más interesados en encontrar diferencias que en no encontrarlas, y por esta razón el procedimiento de Duncan ha recibido una amplia aceptación entre ellos.

Originalmente, esta prueba fue propuesta en el análisis de varianza sin la protección de un valor F significativo de tratamientos, pero ahora se exige la significancia de la prueba F como una condición necesaria para su aplicación. Una desventaja del método es que no posee capacidad para estimar los intervalos simultáneos.

En determinados sentidos, las pruebas DMS, Newman-Keuls y Tukey son casos particulares de la prueba de Duncan, y ésta se considera apropiada para comparaciones apareadas de medias no correlacionadas con igual número de repeticiones.

En contraste con la prueba DMS, en la cual se calcula solamente un valor que se usa en todas las comparaciones, la prueba de rango múltiple de Duncan establece un conjunto de diferencias significativas que van aumentando según la distancia entre las posiciones o el ordenamiento de las dos medias que se comparan. A pesar de que se necesitan operaciones adicionales para la aplicación de la prueba de Duncan, ésta se puede usar para probar diferencias entre pares de tratamientos sin considerar el número de los mismos.

Se han cometido abusos con la prueba de Duncan al mostrar diferencias sin la requerida protección de un valor F significativo en el ANDEVA, y eso ha llevado al descrédito de la misma. Sin embargo, estudios estadísticos detallados muestran que la prueba de rango múltiple de Duncan es una herramienta útil, si se utiliza apropiadamente.

Comparaciones con el testigo

El procedimiento de Dunnett presenta una forma de establecer intervalos simultáneos o comparaciones múltiples del testigo con cada uno de los

Digitized by Google

otros tratamientos; en él se supone que los tratamientos tienen igual número de repeticiones.

Este procedimiento permite separar todos los tratamientos que son tan buenos como el testigo o mejores que él (Chew, 1976; Gómez et al., 1976). Tiene total validez cuando el investigador no desea ajustar una curva a las dosis, y le interesa comparar el testigo con cada uno de los otros niveles. Este es el caso de algunos estudios de toxicidad donde el objetivo del experimento es determinar la dosis más baja a la cual todavía existe una respuesta observable.

Hechas estas consideraciones, es importante recalcar que las pruebas de comparaciones múltiples son totalmente inapropiadas si existe la posibilidad de repartir los tratamientos en sus sumas cuadradas específicas. Esta alternativa siempre es factible si los tratamientos son de estructura factorial, o si constan de varios niveles de un factor cuantitativo. En este último caso, si existe una regresión significativa entre la respuesta y las dosis, todos los niveles (incluyendo los intermedios) no utilizados en el experimento son estadísticamente diferentes; se recomienda entonces utilizar comparaciones múltiples sólo en el caso de factores cualitativos.

Se han realizado esfuerzos para determinar el grado de precisión con que cada comparación múltiple realiza la separación de medias. Por ejemplo, se ha comprobado que la DMS de Bayes es casi tan poderosa como la DMS de Fischer, sin tener la alta probabilidad de errores de tipo I que caracteriza a este último.

Heterogeneidad in Vitro

Generalmente, la heterogeneidad ambiental en experimentos in vitro se subestima aduciendo que existe un control de las condiciones (iluminación, temperatura, HR) bajo las cuales se obtienen las respuestas. Esto no está suficientemente respaldado en las publicaciones y, generalmente, no se indica la cantidad de variación explicada por los tratamientos (coeficiente de variación).

Se sabe que tubos adyacentes en los cuales se siembra simultáneamente el mismo tipo de explante con el mismo medio producen resultados diferentes; entre las causas de esa falta de consistencia figuran los gradientes de iluminación y de temperatura dentro de las cámaras y los cuartos de crecimiento. En estas condiciones es acertado caracterizar la heterogeneidad ambiental, lo que puede ser a veces un prerrequisito para la elección de técnicas experimentales de alta precisión.

Digitized by Google

Muchas veces el investigador se enfrenta a un inapropiado diseño del cuarto de cultivo por errores de construcción o de distribución de los equipos. Factores como la localización de puertas y unidades de aire acondicionado, el calor desprendido por tubos, lámparas o equipo auxiliar, el tipo de estanterías, el sistemas de iluminación, el aislamiento y las dimensiones de los cuartos influyen en la creación de gradientes en las condiciones básicas. Si tales factores son modificables a un costo y tiempo apropiados, el investigador no debe dudar en mejorar sus condiciones ambientales; si no es posible, es oportuno conocer, por lo menos, con qué heterogeneidad está trabajando.

El índice de heterogeneidad proporciona un valor de caracterización y es menos complicado que realizar una prueba de uniformidad. Dicho índice requiere sólo de datos de experimentos con repeticiones donde se puedan obtener distintos tamaños de unidades experimentales, y está basado en la relación que existe entre la varianza de la parcela y el tamaño de la misma (Gómez et al., 1976):

$$V_x = \frac{V_1}{X_b}; \quad \log V_x = \log V_1 - b \log x \qquad (2)$$

Por consiguiente, renombrando los términos:

$$\log V_x = a + b \log x \qquad (3)$$

siendo b el coeficiente de heterogeneidad.

Ejemplo: Se trata de un experimento con un diseño de parcelas divididas, constituido por seis parcelas principales (niveles de citocinina) y 13 genotipos (meristemas apicales de cultivares de fresa) como subparcelas; se hicieron tres repeticiones. La unidad experimental consistió en 10 meristemas cultivados en un frasco de un litro, de sección cuadrada, y que ocupa un área de 80 cm^2. La parcela principal ocupa un área de 1100 cm^2 (los frascos se ubican en fila dejando 5 cm entre uno y otro). El área de cada bloque (repetición) es de 6600 cm^2.

Del análisis de varianza se obtienen los cuadrados medios (CM) correspondientes a los bloques (M_1), a la parcela principal [error *a*: (M_2)] y a la subparcela [error *b*: (M_3)] Con estos CM se pueden calcular las varianzas entre parcelas de varios tamaños.

Digitized by Google

Varianza

Las expresiones para calcular las varianzas son:

$$V'_1 = M_1 \quad (4)$$

$$V'_2 = \frac{r\,(a\text{-}1)\,M_2 + (v\text{-}1)\,M_1}{r \cdot a} \quad (5)$$

$$V'_3 = \frac{r.a\,(b\text{-}1)\,M_3 + r\,(a\text{-}1)\,M_2 + (r\text{-}1)\,M_1}{(r.a.b) - 1} \quad (6)$$

El análisis se presenta numéricamente en el Cuadro 16.12.

Cuadro 16.12. Análisis de varianza para un diseño de parcelas divididas con 6 parcelas principales y 13 subparcelas.

Fuente de variación	g.l.	CM
Bloques (M_1)	2	1,141,670
Parcela principal (PP)	5	5,480,847
Error *a* (M_2)	10	433,767
Subparcela (SP)	12	17,294,508
PP x SP	60	682,046
Error *b* (M_3)	144	330,593

Las varianzas para las distintas parcelas serían:

$V'_1 = 1{,}141{,}670$

$V'_2 = 488{,}325$

$V'_3 = 344{,}197$

Sin embargo, antes de comparar esas varianzas es necesario convertirlas a otras que estén en relación con un área comparable, así:

$V_1 = V'_1/78 = 14{,}637$
$V_2 = V'_2/13 = 37{,}563$
$V_3 = V'_3/1 = 344{,}197$

Con la fórmula (3) se puede calcular una regresión lineal entre las varianzas *V* y el tamaño de la parcela, en términos del número de unidades

Digitized by Google

que la componen. Se obtuvieron un coeficiente de regresión $b = 0.74$ y un coeficiente de determinación $R^2 = 0.984^{**}$.

El valor b es una medida cuantitativa de la heterogeneidad en el ambiente, y en valor absoluto indica el grado de correlación entre parcelas experimentales adyacentes. El valor de b varía de +1 a 0. Cuanto más grande (en términos absolutos) sea el valor de b, más baja será la heterogeneidad ambiental. En casos en que se detecten coeficientes bajos ($b = 0.25$), ellos se pueden utilizar para reorientar los bloques, el tamaño de la parcela experimental o el número de repeticiones para obtener un mayor control experimental.

Referencias

Chew, V. 1976. Comparing treatment means: A compendium. HortScience 11:348-357.

———. 1980. Testing differences among means: Correct interpretations and some alternatives. HortScience 15:467-470.

Cochran, W. G. 1971. Técnicas de muestreo. Consejo Económico Centroamericano (CEC), México.

——— y Cox, G. N. 1950. Experimental designs. Wiley and Sons, Nueva York.

Cox, D. R. 1958. Planning of experiments. Wiley and Sons, Nueva York.

Draper, N. R. y Smith, H. 1966. Applied regression analysis. Wiley and Sons, Nueva York.

Dudewicz, E. J. 1976. Ranking and selection procedures. En: Introduction to statistics and probability. Holt, Rinehart and Winston, Nueva York.

Gómez, K. A. y Gómez, A. A. 1976. Statistical procedures for agricultural research with emphasis on rice. International Rice Research Institute (IRRI), Los Baños, Filipinas.

Little, T. M. 1981. Interpretation and presentation of results. HortScience 16:637-640.

———. 1978. If Galileo published in HortScience. HortScience 13:504-506.

——— y Hills, F. J. 1975. Statistical methods in agricultural research. University of California, Davis, California, E.U.

Petersen, R. G. 1977. Use and misuse of multiple comparison procedures. Agron. J. 69:205-206.

Steel, R. G. D. y Torrie, J. H. 1960. Principles and procedures of statistics. McGraw-Hill, Nueva York.

Digitized by Google

Parte B

Aplicaciones del Cultivo de Tejidos a Especies Vegetales Económicamente Importantes

Digitized by Google

Capítulo 17

Eliminación de virus y propagación de clones en la yuca (*Manihot esculenta* Crantz)

W. M. Roca*
B. Nolt**
G. Mafla*
J. Roa***
R. Reyes***

* Unidad de Investigación en Biotecnología (UIB), Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia.
** Programa de Frijol, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia.
*** Unidad de Recursos Genéticos (URG), Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia.

Digitized by Google

Introducción

La yuca es, entre los cultivos que proporcionan alimentos básicos, uno de los más importantes de los trópicos bajos. Las raíces de la yuca son la principal fuente de calorías para casi 600 millones de personas de Africa, Asia Suroriental, América Latina, el Lejano Oriente, y Oceanía. Pequeños agricultores cultivan tradicionalmente la yuca en condiciones de clima y suelo que generalmente dificultan la obtención de otros cultivos sin insumos muy costosos. El rendimiento actual varía de 6 a 10 t/ha por año; sin embargo, hay un potencial en la yuca para duplicar o aun triplicar dicho rendimiento si se aplica una tecnología mejorada simple (Cock, 1982).

La yuca es una especie altamente heterocigótica y poliploide ($2n = 4x = 36$), razón por la cual se propaga tradicionalmente por esquejes caulinares o estacas y no por semilla sexual. Los agricultores obtienen el material de siembra del cultivo anterior o de fincas vecinas; en promedio, se pueden obtener 10 estacas de una planta de yuca madura cada año. Los organismos patógenos sistémicos, como los virus, pueden trasmitirse mediante el material de siembra por generaciones sucesivas; estos organismos no sólo afectan el rendimiento de los cultivares locales de yuca, sino que se han convertido en una limitación importante para el mantenimiento de los bancos de germoplasma y para el intercambio internacional y regional de clones.

Mejorar la yuca por su resistencia a los virus es tarea difícil y no permite la rehabilitación de variedades que ya poseen atributos agronómicos valiosos. En consecuencia, la producción de material de siembra de alta calidad es una necesidad para mantener el rendimiento y la calidad de los cultivares locales (Lozano et al., 1983b). Ahora bien, las técnicas de cultivo de tejidos se han usado para propagar cultivos que se multiplican vegetativamente, entre ellos la yuca, en condiciones de sanidad vegetal (Roca, 1985; Schilde-Rentscheller y Roca, 1986).

Eliminación de los Virus de la Yuca

Las enfermedades causadas por virus afectan seriamente el rendimiento y la calidad de la yuca en las principales regiones cultivadoras de esa raíz en el mundo. En Africa, el virus más importante es el que causa la enfermedad del mosaico africano de la yuca (ACMD), responsable de pérdidas de rendimiento hasta del 90% (Bock y Guthrie, 1976). En América Latina existen diversos virus y organismos similares a los virus, y se ha informado

Digitized by Google

sobre otros nuevos. La enfermedad cuero de sapo (FSD) reduce el rendimiento de 80% a 100% (Lozano et al., 1983a); el virus del mosaico común de la yuca (CCMV), ampliamente difundido en América Latina, reduce el rendimiento hasta en un 60% (Costa y Kitayima, 1972); y la enfermedad del mosaico caribeño (CMD), localizada en la costa norte de Colombia, puede causar pérdidas del rendimiento de 30% a 40% (CIAT, 1983). Recientemente se descubrieron el virus X de la yuca (CsXV) y el que causa la enfermedad del virus latente, ambos de considerable importancia (CIAT, 1986).

Técnica para la eliminación de los virus

Termoterapia y cultivo de tejidos apicales. Partiendo del trabajo original de Kartha et al. (1974), las técnicas de cultivo de puntas meristémicas[1] relacionadas con la termoterapia se desarrollaron en el CIAT; el propósito era eliminar los virus de las variedades de yuca infectadas (CIAT, 1982). El desarrollo de técnicas sensibles para el diagnóstico de los virus ha contribuido enormemente a la producción de clones de yuca en que se ha probado la ausencia de organismos patógenos. La eliminación de los virus depende, en alto grado, de la exposición de las estacas con brotes a una temperatura alta (40 °C diurna y 35 °C nocturna) durante 3 a 4 semanas, antes de la excisión de las puntas meristémicas. El tamaño de las puntas usadas para el cultivo in vitro es también importante cuando se trata de excluir un virus, especialmente si las estacas no se expusieron a termoterapia (Cuadro 17.1). La aplicación de termoterapia antes del cultivo de meristemas condujo a la exclusión, en un 100%, de los cuatro virus, aun cuando dos de ellos infectaran una planta (Cuadro 17.1).

Las puntas meristémicas se cortan de las yemas terminales de estacas cultivadas bajo termoterapia, y se implantan en la superficie del medio de cultivo que contenga las sales minerales de Murashige y Skoog (1962), complementadas con 100 mg/litro de inositol, 1 mg/litro de tiamina, sucrosa al 2%, 0.04 mg/litro de BAP, 0.05 mg/litro de AG y 0.02 mg/litro de ANA. El medio se hace semisólido con 0.8% de agar lavado. Los cultivos se incuban a una temperatura de 27 a 28 °C, con una iluminación de 600 a 1000 lux durante unos 15 días, y luego de 3000 a 4000 lux, y en un fotoperíodo de 12 h.

1. En este trabajo, el término 'punta meristémica' se refiere a la cúpula meristémica apical, rodeada por uno o dos primordios, de la hoja más joven; y la expresión 'sometido a pruebas de presencia de patógenos' (pathogen-tested) se refiere a plantas o estructuras vegetales probadas para establecer la ausencia de virus después del cultivo de puntas meristémicas.

Digitized by Google

Cuadro 17.1. Efecto de la termoterapia y del tamaño de los meristemas en el resultado de la eliminación de cuatro virus, en tres variedades de yuca infectadas con ellos.

Variedad de yuca	Virus	Tratamiento		Indización (planta$^+$/total)[c]	
		Termoterapia[a]	Tamaño del meristema[b]	ELISA	dsRNA
Secundina	CsXV	sí	pequeño	0/12	0/7
		sí	grande	0/2	—
		no	pequeño	0/2	0/2
		no	grande	5/5	4/5
MPar 51	CCMV	sí	pequeño	0/1	—
		sí	grande	4/4	—
MCol 33	CsVX	sí	pequeño	0/7	0/6
	Mosaico	sí	grande	0/2	0/3
	FSD	no	pequeño	1/4	1/2
		no	grande	4/5	4/4

a. 40 °C diurna y 35 °C nocturna, con 12 h de fotoperíodo, durante 3 semanas.
b. Pequeño: 0.1 a 0.2 mm; grande: 0.5 a 0.7 mm.
c. Número de plantas positivas (con virus)/total de plantas probadas.

FUENTE: CIAT, 1985.

Micropropagación. Después de un lapso de 3 a 4 semanas, las puntas meristémicas se han convertido en brotes con raíces o con un callo basal pequeño; cada brote es micropropagado por esquejes de un solo nudo (Roca et al., 1984). Cuando las plantitas han desarrollado de tres a cuatro hojas, la primera prueba de virus se lleva a cabo empleando de una a dos hojas pequeñas.

Pruebas virológicas. Técnicas de indización altamente sensibles se han desarrollado para los virus de yuca más conocidos (Cuadro 17.1). Las pruebas se hacen in vitro y en plantas que se han trasladado al invernadero. Aunque la técnica de eliminación de virus descrita en este trabajo ha demostrado ser altamente eficiente, la indización de plantas regeneradas es necesaria. La indización de los virus de la yuca comprende las siguientes técnicas:

- ELISA para el CCMV y el CsXV.
- El dsRNA que comprende el aislamiento de especies de ARN vírico y su visualización mediante la electroforesis de geles (Gabriel et al., 1987); la técnica dsRNA se usa para todos los virus ARN conocidos de la yuca, p. ej., CsXV, FSD, CCMV, y los virus latentes.

Digitized by Google

- La inoculación mecánica de savia foliar en plantas de *Chenopodium quinoa*; induce lesiones locales cloróticas cuando el CCMV y el CsXV están presentes.

- La detección de síntomas de mosaico en la variedad de yuca Secundina cuando se injerta en materiales con afecciones virales; ésta es una prueba confiable de la enfermedad del mosaico caribeño (CMD).

La inoculación mecánica y las pruebas de injerto se aplican solamente a plantas de maceta en el invernadero. La Figura 17.1 representa gráficamente la metodología general empleada para eliminar los virus de los clones de yuca.

Conservación de Clones de Yuca Sometidos a Pruebas de Patógenos

Es posible mantener in vitro muestras de material limpio para que la nueva propagación de plantas sanas pueda hacerse en cualquier momento; el mantenimiento in vitro evita la recontaminación con organismos patógenos. El germoplasma de yuca se ha mantenido tradicionalmente en cultivos vegetativos continuos establecidos en el campo. El mantenimiento en el campo tiene un costo alto, y a menudo expone el germoplasma valioso a pérdidas por ataques de plagas o de enfermedades, por cambios climáticos y por problemas del suelo.

La Figura 17.2 presenta las interrelaciones que hay entre las diversas formas de conservación in vitro del germoplasma de yuca y la eliminación de enfermedades, la micropropagación, la distribución y la conservación tradicional mediante semillas y en plantaciones de campo. La colección activa incluye el mantenimiento de campo tradicional y una nueva técnica de conservación bajo condiciones de crecimiento lento. La colección activa está disponible en forma de plantitas conservadas en tubos de ensayo individuales, que pueden micropropagarse y llevarse al campo. La colección de base está representada por la semilla sexual conservada y por la criopreservación de puntas meristémicas; estas colecciones son una forma de almacenamiento de germoplasma a largo plazo.

Digitized by Google

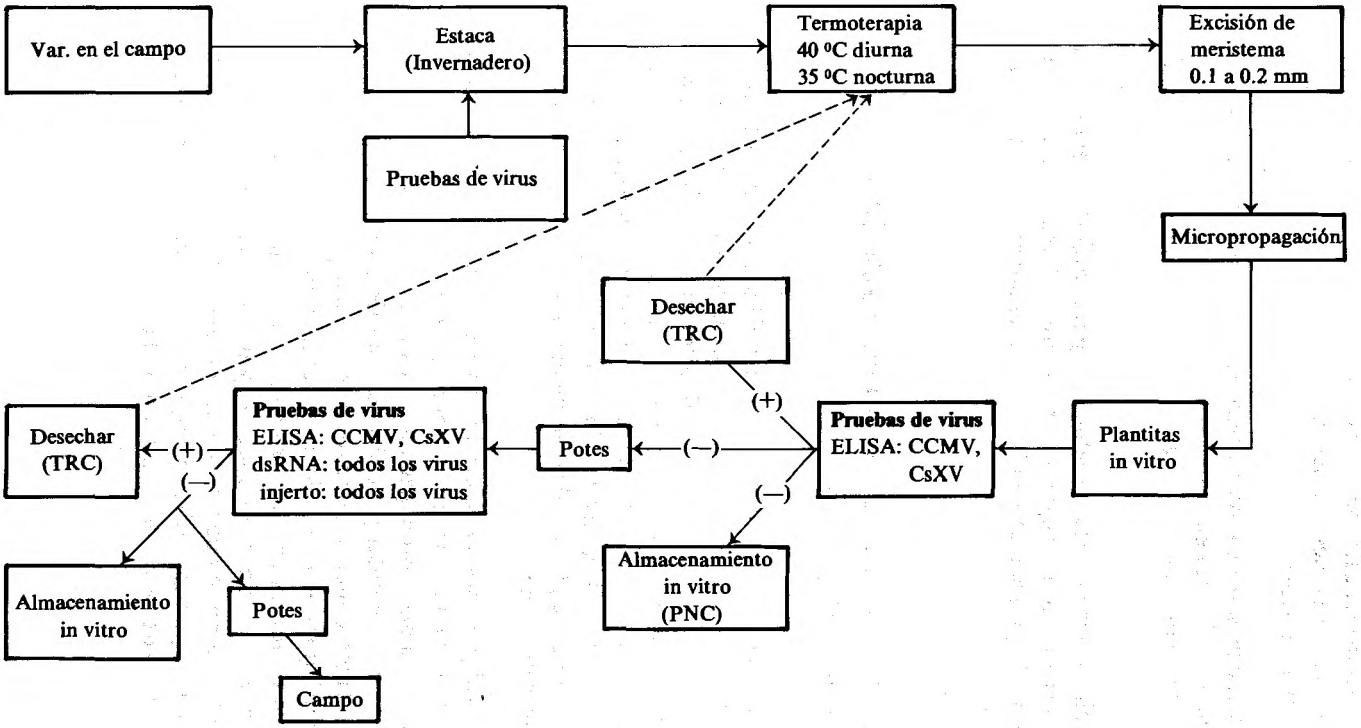


Figura 17.1. Metodología empleada para la eliminación de virus de las variedades de yuca infectadas con ellos. Se usan la termoterapia y las técnicas de cultivo de puntas meristémicas, junto con ensayos muy sensibles a los virus. La micropropagación se incorpora al esquema para indicar el incremento de los cultivos derivados de puntas meristémicas. El proceso total, desde la termoterapia hasta las plantas sometidas a pruebas de presencia de patógenos (en macetas de invernadero), toma aproximadamente 3 meses. Var.= variedad. TRC = termoterapia (al material in vitro) y recomenzar el ciclo, cuando haya escasez de material. PNC = si la prueba virológica (última) es negativa (-), se conserva el material.

Digitized by Google

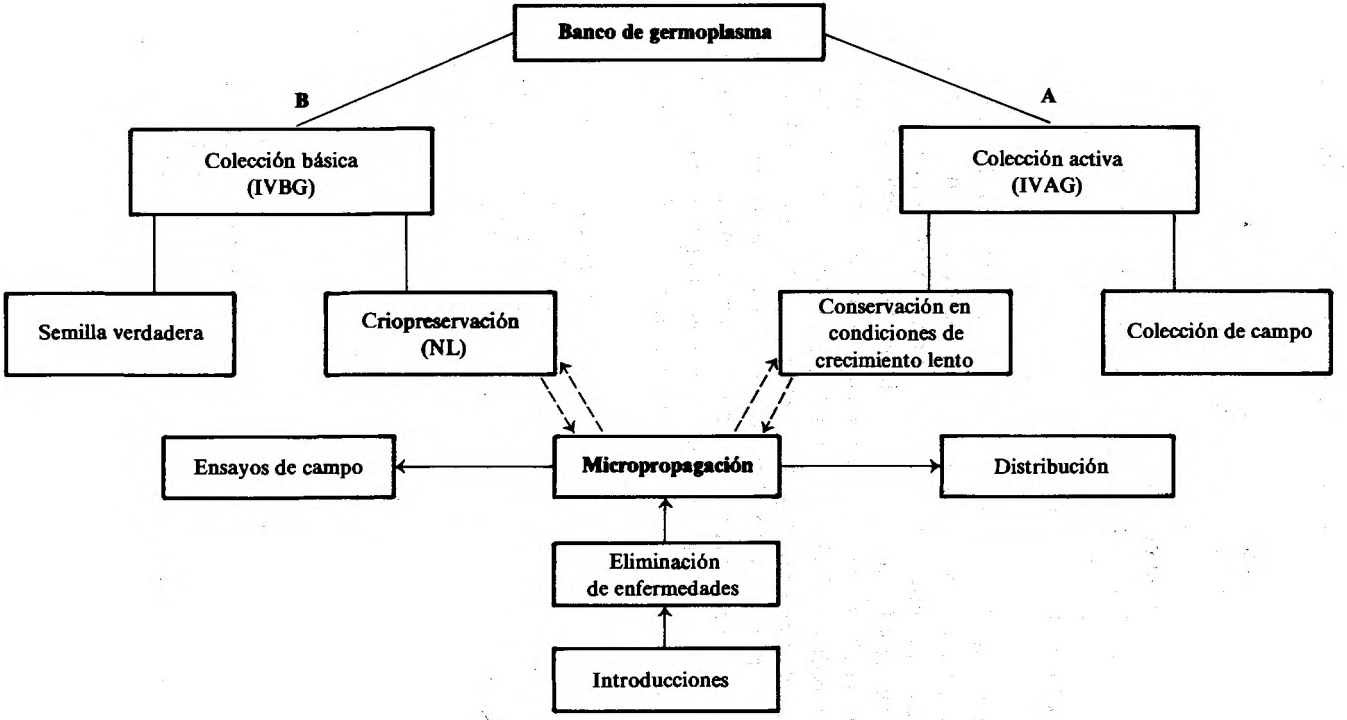


Figura 17.2 Interrelaciones entre las diversas metodologías de conservación in vitro del germoplasma de yuca, de un lado, y del otro, la micropropagación y la conservación convencional de la semilla y del cultivo en el campo. Obsérvese que se proponen dos tipos de conservación in vitro: A) el banco activo de genes in vitro (IVAG) que se halla en crecimiento lento, el cual, junto con la colección de campo, constituye la colección activa de germoplasma; y B) el banco básico de genes in vitro (IVBG) que se halla en criopreservación, el cual, junto con la colección de semilla sexual, constituye la colección de base. En el CIAT, el IVAG de yuca se halla en operación rutinaria, pero el IVBG se encuentra todavía en etapa experimental. NL = nitrógeno líquido.

Digitized by Google

Intercambio Internacional de Germoplasma de Yuca

Como se indicó anteriormente, varios organismos patógenos de la yuca se pueden difundir a través de las fronteras de los países, trasportados en las estacas de yuca. Esta difusión ocurre frecuentemente sin signos notorios y es especialmente crítica si la yuca se mueve de su centro de origen a otras regiones del mundo. Hay además ciertas enfermedades de la yuca que están geográficamente confinadas; por ejemplo, no se ha informado de la presencia de ACMD en las Américas.

Se han desarrollado técnicas de cultivo in vitro asociadas con la metodología de las pruebas que detectan organismos patógenos, con el fin de facilitar el intercambio internacional de germoplasma en forma de clones (Schilde-Rentscheler y Roca, 1987); esto se ha hecho sobre todo con yuca (Roca, 1986). Los cultivos de ápices meristémicos de plantas madre sometidas a las pruebas de presencia de organismos patógenos se establecen en medio estéril, en el que enraizan, y se empacan para distribuirlas (Roca et al., 1983). Es costumbre preparar plantitas individuales en tubos de ensayo o grupos de hasta 10 plantitas en un mismo recipiente, para distribuirlas a otras regiones; estos grupos adelantan un poco el endurecimiento de las plantitas antes de que el destinatario las trasfiera a macetas (Figura 17.3).

En los últimos 7 años, más de 200 clones elite de yuca y casi 300 accesiones de germoplasma han sido enviados por el CIAT a 32 países. Se ha suministrado capacitación especial a los destinatarios de los envíos en la manipulación de los cultivos, para que puedan recuperar mejor las plantas para su siembra en maceta y luego en el campo (Roca et al., 1984). En varios países, los clones de yuca despachados in vitro han sido multiplicados y ensayados agronómicamente en diversas localidades; por ejemplo, de unos pocos cultivos despachados a China 3 años atrás, uno de los mejores híbridos se ha propagado masivamente y ha sido ensayado en 15 localidades en la provincia de Guandong, con un aumento del rendimiento 80% mayor, en promedio, que el de las variedades locales.[2] De modo similar, más de 2000 cultivares de yuca se han introducido al CIAT desde diversos países mediante las técnicas in vitro; estos materiales se han micropropagado, se han probado para detectar organismos patógenos, y se han llevado al campo para su evaluación (Figura 17.3).

2. Chun Yen, K. Comunicación personal.

Digitized by Google

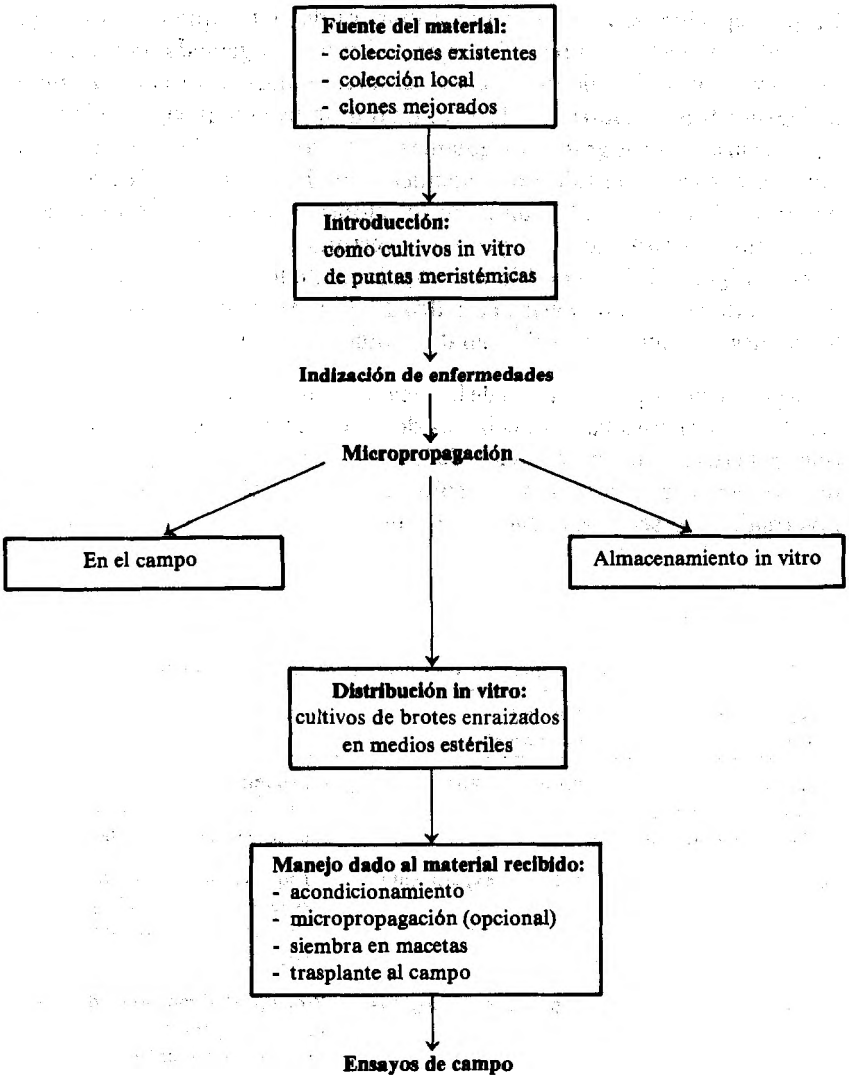


Figura 17.3. Flujo del material cuando se intercambia el germoplasma de yuca empleando técnicas de cultivo in vitro. Obsérvese que la indización de enfermedades y la micropropagación son fundamentales para el proceso de introducción y distribución de germoplasma.

Digitized by Google

Propagación in Vitro de Clones de Yuca

La propagación in vitro es la única manera de evitar que los clones, ya probados respecto a la presencia de organismos patógenos, se contaminen de nuevo por acción de los insectos, el aire, el agua u otros organismos patógenos trasportados por el suelo. La multiplicación in vitro de la yuca es necesaria para lograr los siguientes fines: a) aumentar el número de cultivos derivados de ápices meristémicos para hacer pruebas de presencia de virus (Figura 17.1); b) aumentar los clones ya probados respecto a la presencia de organismos patógenos para estimular el intercambio internacional (Figura 17.3); c) multiplicar rápidamente los clones seleccionados para producir 'semilla' básica (Cuadro 17.2); y d) propagar masivamente los clones elite que se trasplantan directamente al campo.

El potencial de propagación de la yuca in vitro supera ampliamente el de las técnicas mejoradas, es decir, las de invernadero. Sin embargo, para fines prácticos, una combinación de la técnica más simple de propagación in vitro, a saber, el cultivo de un solo nudo, con la técnica más simple de invernadero, o sea, los esquejes de tallo de dos nudos, y empleando la

Cuadro 17.2. Producción de material de 'siembra' de yuca para certificación.

Categoría de la semilla	Entidad responsable	Técnica de multiplicación[a]
Genética Cultivares locales Variedades nuevas	Fitomejorador	- Esquejes in vitro (un solo nudo) - Esquejes de tallo de dos nudos o esquejes simples de hoja y nudo
Básica[b]	Estación experimental	- Esquejes de dos nudos o esquejes simples de hoja y nudo - Propagación tradicional de estacas
Registrada	Agricultores escogidos	Propagación tradicional de estacas Fincas cooperadoras Empresas de semillas
Certificada[b]	Agricultores escogidos	Propagación tradicional de estacas Fincas cooperadoras Empresas de semillas

a. Empieza con clones probados respecto a la presencia de patógenos, que se obtuvieron mediante cultivo in vitro de puntas meristémicas y por termoterapia.
b. Puede reciclarse varias veces para acrecentar las reservas.

FUENTE: Domínguez, 1985.

Digitized by Google

técnica tradicional de las estacas (Cock et al., 1982), es posible satisfacer casi todas las necesidades actuales de multiplicación de la yuca (Cuadro 17.3).

Cuadro 17.3. Potencial de propagación de las técnicas tradicionales (en el campo), de las mejoradas (en el invernadero), y de las desarrolladas in vitro para mantener el germoplasma de yuca.

Técnica	Estacas/planta madre[a]
Tradicional (por estacas)	1×10^2
De invernadero[b]	
Estacas caulinares de 2 yemas	12×10^3
Esquejes de una sola hoja con nudo	50×10^3
In vitro	
Cultivos de un solo nudo (3 nudos/mes)	65×10^3
Cultivos de brotes múltiples (10 brotes/mes)	65×10^4
Embriogénesis somática[c]	—

a. O también: estacas/cultivo inicial; se considera un rendimiento de 10 estacas comerciales por planta madura.
b. Partiendo de 150 estacas caulinares por planta en un año, y de 100 esquejes de nudo por planta en 6 meses.
c. Tiene un potencial de millones de plantas por año, que debe comprobarse.

Micropropagación Mediante Cultivos de un Solo Nudo

La técnica más simple de micropropagación in vitro de la yuca es el cultivo de segmentos nodales obtenidos de plantitas derivadas de puntas meristémicas. Esta técnica es útil para incrementar la reserva de plantitas in vitro que se destinarán a las pruebas de virus, a la siembra en macetas y al trasplante en el campo.

La mano de obra intensiva sería la limitación principal de esta técnica. Se pueden obtener de tres a cinco plantitas por cultivo cada mes. Se usan dos medios: a) para nudos con yema axilar incipiente, el medio es el mismo descrito arriba para un cultivo de ápices meristémicos; b) para nudos con yemas axilares grandes y visibles, y para ápices de tallo, se usa un medio más simple: 1/3 de sales MS, 100 mg/litro de inositol, 1 mg/litro de tiamina, sucrosa al 2%, 0.01 mg/litro de ANA, y agar lavado al 0.8% (Roca et al., 1984).

Digitized by Google

Micropropagación Mediante Cultivos de Brote Múltiple

Los requerimientos para lograr una multiplicación muy rápida de clones elite se pueden satisfacer mediante la inducción de cultivos de brote múltiple iniciados con puntas meristémicas (Roca, 1984). En teoría, se producirían hasta 65 x 10^4 estacas en 18 meses empleando esta técnica; en ella, la adición de una dosis alta (1.0-5.0 mg/litro) de BAP rompe la dominancia apical y da origen a un cultivo en roseta. La trasferencia de cultivos en roseta a un medio libre de BAP pero enriquecido con AG, promueve el crecimiento de yemas axilares que formarán de 10 a 20 brotes por cultivo. Una limitación importante de esta técnica es su relativa complejidad; sin embargo, es posible simplificarla empleando brotes axilares más grandes de estacas que hayan emitido ya brotes en el invernadero.

Micropropagación por Embriogénesis Somática

Se ha desarrollado una técnica para regenerar plantas de yuca, eficaz y reproducible, mediante la inducción de embriones somáticos en el tejido embriogénico derivado de segmentos de hoja inmadura. Se halló que eran necesarios altos niveles de 2,4-D (8 a 16 mg/litro) para la inducción del tejido embriogénico bajo iluminación continua. Las plantitas se desarrollaron a partir de embriones primarios o secundarios en presencia de BAP y de AG (Szabados et al., 1987). La estabilidad de las plantas regeneradas se demostró a través de evaluaciones morfológicas y bioquímicas.

Esta técnica permite cultivar un gran número de embriones somáticos o de tejidos embriogénicos en pequeños volúmenes de medios líquidos; hay aquí, por tanto, un potencial para la regeneración de millones de plantas por año. Una posibilidad atractiva es el desarrollo de técnicas de encapsulación de embriones para la producción de semilla artificial. Dicha tecnología facilitaría no sólo la siembra directa de embriones en el campo, sino también la conservación y el trasporte de germoplasma de yuca en una forma mucho más simple, como se hace con los cultivos de puntas meristémicas.

Rehabilitación de Cultivares Regionales de Yuca

Después de la termoterapia y del cultivo de puntas meristémicas, se han obtenido algunas veces aumentos del rendimiento de más del 100% (Roca,

Digitized by Google

1984); sin embargo, el rendimiento se reduce más tarde en un 50%, más o menos. Este descenso gradual en el rendimiento y en la calidad de los cultivares locales de yuca sería el resultado de la acumulación de organismos patógenos que puede manifestarse por síntomas, aunque a veces permanece latente.

La recuperación del rendimiento y de la calidad de los cultivares locales es quizás la aplicación actual más importante de la micropropagación. Como el desarrollo de variedades nuevas de yuca es una tarea a largo plazo, la rehabilitación de cultivares locales constituye una estrategia a corto plazo para la producción de yuca en las regiones pobres de los trópicos. Los siguientes ejemplos ilustran esta proposición:

a. La primera demostración de recuperación del rendimiento de la yuca mediante la micropropagación ocurrió en los cultivares Llanera y CMC-40; el primero es una variedad muy antigua que se cultiva en Colombia, y el segundo una introducción de Brasil, más reciente. El descenso en el rendimiento fue más evidente en Llanera que en CMC-40 durante los últimos 10 años. Después de la termoterapia y del cultivo de ápices de meristemas, se obtuvo un incremento en el rendimiento de 50%, en promedio, el primer año. El segundo año, el aumento medio del rendimiento de ambos cultivares era de un 25%. Se espera, no obstante, que se reduzca la recuperación del rendimiento a causa de la recontaminación del material limpio.

La reinfección ocurrirá con mayor o menor rapidez según la enfermedad de que se trate; por ello, los virus trasmitidos por los insectos causan una reinfección más rápida que aquellos trasmitidos mecánicamente. El aumento del rendimiento depende también de las características climatológicas de la localidad en que se cultive la yuca; mientras en CIAT-Palmira un clon de yuca libre de enfermedades similares a micoplasmas (antólisis) duplicó el rendimiento (36 kg/ha) del testigo enfermo, en Media Luna, en la costa norte colombiana, el rendimiento de ese clon no presentó diferencia significativa respecto al testigo (CIAT, 1985).

b. El cultivar de yuca Secundina es muy apreciado en la costa del norte de Colombia, pero es altamente susceptible a la enfermedad del mosaico caribeño (CMD); las significativas reducciones del rendimiento de Secundina registradas en los campos de los agricultores fueron, evidentemente, un efecto del CMD. El material enfermo fue tratado con termoterapia o por medio del cultivo de puntas meristémicas y se sometió a pruebas de presencia de patógenos. Estacas de un año de edad de plantas regeneradas se llevaron a la costa norte de Colombia y se cultivaron, junto con testigos que no habían sido micropropagados, en los campos de los agricultores. Al final del primer año, se triplicaron los rendimientos de raíces frescas y de

Digitized by Google

almidón. Si el material de siembra que no había sido micropropagado se seleccionaba cuidadosamente en la finca, el aumento del rendimiento (18%) causado por la limpieza de la enfermedad era todavía significativo (Cuadro 17.4). En las generaciones sucesivas hubo una disminución gradual del rendimiento, y después de años de cultivo continuo, el rendimiento era ya similar al del testigo (Cuadro 17.5). Esta reducción del rendimiento se atribuyó a la recontaminación con el virus (Lozano et al., 1983a; CIAT, 1985), lo que señala que el material se debe renovar antes de que el rendimiento descienda a un nivel económicamente indeseable. Para atender esta necesidad se requiere un esquema de producción de 'semilla'.

Cuadro 17.4. Influencia del origen del material de 'siembra' en el rendimiento y en la calidad del cultivar de yuca Secundina.

Material de 'siembra' (procedencia)	Rendimiento[1] (t/ha)		Reducción del rendimiento (%)
	Raíces	Almidón	
De cultivo de puntas meristémicas	24.0 a	7.9 a	0
De campos de agricultores, seleccionado	19.6 b	6.2 b	18.3
De campos de agricultores, sin seleccionar	7.3 c	2.4 c	69.5

1. Los valores seguidos por la misma letra no difieren significativamente ($P \leq 0.05$).

FUENTE: Lozano et al., 1983b.

Cuadro 17.5. Rendimiento del cultivar de yuca Secundina durante los 4 años siguientes a su micropropagación (termoterapia y cultivo de meristemas).

Ciclo o año de cultivo[1]	Rendimiento[2] (t/ha)	
	Raíces frescas	Almidón
Material micropropagado		
I	30.2 a	8.9 a
II	25.9 ab	7.7 ab
III	20.7 b	6.1 b
IV	17.6 c	5.2 c
Testigo[3]	17.0 c	5.3 c

1. El material de siembra para cada ciclo se obtuvo del ciclo precedente.
2. Los promedios seguidos por la misma letra no son significativos ($P \leq 0.05$).
3. El material de siembra se obtuvo de los campos de los agricultores.

FUENTE: CIAT, 1985.

Digitized by Google

c. El cuero de sapo (FSD) es endémico en una región de pequeños cultivadores de yuca al sur de Colombia; apareció en el cultivar local Quilcacé y en un cultivar recientemente introducido, M Col 113, los cuales han desaparecido prácticamente porque sus rendimientos son muy bajos (de 4 a 7 t/ha). Se limpió entonces la enfermedad en ambos cultivares, y se distribuyeron a los agricultores, para hacer un ensayo, estacas tomadas de plantas de un año de edad. Un aumento significativo del rendimiento de ambos cultivares se registró el primer año y el segundo, aunque en éste descendió la tasa de aumento del rendimiento (Cuadro 17.6). Este fenómeno se atribuyó a la reinfección por virus trasmitidos por insectos. El descenso gradual del rendimiento que experimentan los cultivares limpios se puede retardar si se emplean mejores prácticas de manejo; ese descenso era significativo cuando el cultivo no se protegía de los insectos con plaguicidas o cuando se obtenía material de siembra de los campos de los agricultores (Cuadro 17.7).

Es posible, en consecuencia, usar técnicas de propagación in vitro para rehabilitar los cultivares regionales de yuca cuya producción se haya deteriorado por la acumulación de organismos patógenos. El desarrollo reciente del procesamiento y de la utilización de la yuca, es decir, la elaboración de productos de yuca secos para la industria, creará mayor demanda de material de 'siembra' de alta calidad entre los agricultores. Se usarán técnicas nuevas y tradicionales para desarrollar esquemas de certificación de la 'semilla' asexual de la yuca. Un esquema de este tipo se presenta en el Cuadro 17.2; en él aparece el cultivo in vitro al comienzo,

Cuadro 17.6. Rendimiento de dos cultivares de yuca limpios de la enfermedad cuero de sapo (FSD) y cultivados durante 2 años consecutivos en una región donde la FSD es endémica.

Cultivar[a]	Ciclo o año de cultivo[b]	Rendimiento (t/ha)		Plantas enfermas a la cosecha (%)
		Raíces	Almidón	
Quilcacé	I	17.4	5.3	0.0
	II	12.9	3.9	10.4
Testigo		7.5	2.1	100.0
MCol 113	I	16.5	4.3	6.2
	II	7.2	1.9	28.5
Testigo		4.6	1.2	100.0

a. Estacas obtenidas de material básico limpiado mediante termoterapiay cultivo de ápices meristémicos.
b. Estacas obtenidas de los campos de los agricultores.

Digitized by Google

Cuadro 17.7. Efecto del tratamiento con plaguicidas en el rendimiento de cuatro variedades de yuca previamente limpiadas mediante la micropropagación.

Fuente del material de 'siembra'	Tratamiento con plaguicida	Rendimiento[1] (t/ha)	
		Raíces frescas	Almidón
Cultivo de puntas meristémicas	sí	36.6 a	9.2 a
Campos de los agricultores	sí	27.7 b	8.3 b
Cultivo de puntas meristémicas	no	24.6 b	6.8 b
Campos de los agricultores	no	18.4 c	5.3 c

1. Los promedios seguidos por la misma letra no son significativos ($P \leq 0.05$).

FUENTE: CIAT, 1984.

cuando se producen clones sometidos a pruebas de presencia de organismos patógenos, y cuando se hace la micropropagación de una reserva limpia de material genético. El mantenimiento de reservas limpias de germoplasma en un laboratorio central y el intercambio de clones, probados respecto a la presencia de organismos patógenos, con otras unidades de producción de semilla se facilitarían mucho si se emplearan las técnicas de cultivo in vitro descritas en este capítulo.

Referencias

Bock, K. R. y Guthrie, E. J. 1976. Recent advances in research on cassava viruses in East Africa. En: African cassava mosaic workshop. Memorias. International Development Research Centre (IDRC), Ottawa, Canadá. 11 p.

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1982. Cultivo de tejidos. En: Informe anual del Programa de Yuca, 1981. Cali, Colombia. p. 115-126.

———. 1983. Pathology. En: Cassava Program annual report 1982. Cali, Colombia. p. 97-118.

———. 1984. Pathology. En: Cassava Program annual report 1983. Cali, Colombia. p. 371-400.

———. 1985. Pathology. En: Cassava Program annual report 1984. Cali, Colombia. p. 99-120.

———. 1986. Cassava Program annual report 1985. Cali, Colombia. p. 264-282.

Cock, J. H. 1982. Cassava: A basic energy source in the tropics. Science 218:755-763.

Digitized by Google

———; Toro, J. C. y Roca, W. M. 1982. Multiplicación acelerada de material genético promisorio de yuca: Guía de estudio. CIAT, Cali, Colombia. [Serie 04SC-06-06]. 28 p.

Costa, A. S. y Kitajima, E. W. 1972. Studies on virus and mycoplasma diseases of the cassava plant in Brazil. En: Cassava mosaic workshop. Memorias. International Institute of Tropical Agriculture (IITA), Ibadán, Nigeria. p. 1-8.

Domínguez, C. 1985. Oportunidades para la industrialización y comercialización de material de 'siembra' de papa y yuca. Semillas para América Latina (CIAT) 5:8-9.

Gabriel, C. J.; Walsh, R. y Nolt, B. L. 1987. Detection and immunoblot eletrophoresis of cassava dsRNAs. Phytopath. 76:1132. (Resumen.)

Kartha, K. K.; Gamborg, O. L.; Constabel, F. y Shyluk, J. P. 1974. Regeneration of cassava plants from shoot apical meristem. Plant Sci. Lett. 2:107-113.

Lozano, J. C.; Jayasinghe, U. y Pineda, B. 1983a. Viral diseases affecting cassava in the Americas. Cassava Newsletter (CIAT) 7:1-4.

———; Pineda, B. y Jayasinghe, U. 1983b. Effect of cutting quality on cassava (*Manihot esculenta* Crantz) performance. En: Sixth Symposium of the International Tropical Root Crops Society. Memorias. Lima, Perú.

Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant 15:473-497.

Roca, W. M. 1984. Cassava. En: Sharp, W. R.; Evans, D. A.; Ammirato, P. V. y Yamada, Y. (eds.). Handbook of plant cell culture; 2: Crop species. MacMillan Publishing, Nueva York. p. 269-301.

———. 1985. In vitro clonal propagation to eliminate crop diseases. En: Biotechnology in international agricultural research. Memorias. International Rice Research Institute (IRRI), Manila. p. 3-10.

———. 1986. Cassava. En: León, J. y Withers, L. (eds.). Guidelines for seed exchange and plant introduction in tropical crops. Paper 76, FAO, Roma. p. 43-47.

———; Rodríguez, J.; Beltrán, J.; Roa, J. y Mafla, G. 1983. Tissue culture for the conservation and international exchange of germplasm. En: Fujiwara, A. (ed.). Plant tissue culture 1982: Fifth Symposium on International Plant Tissue Culture. Tokio. p. 771-772.

———; Rodríguez, J. A.; Mafla, G. y Roa, J. 1984. Procedures for recovering cassava clones distributed in vitro. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. 8 p.

Digitized by Google

Schilde-Rentscheller, L. y Roca, W. M. 1986. Virus elimination in potato and cassava. En: Cock, J. (ed.). Global workshop on root and tuber crops propagation. Memorias. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. p. 89-95.

——— y ———. 1987. Tissue culture for the international exchange of potato and cassava germplasm. En: Bajaj, V. P. S. (ed.). Biotechnology in agriculture and forestry. Springer-Verlag, Berlín, v. 3, p. 453-465.

Szabados, L.; Hoyos, R. y Roca, W. M. 1987. In vitro somatic embryogenesis and plant regeneration of cassava. Plant Cell Reports 6:248-251.

Digitized by Google

Capítulo 18

Cultivo de tejidos de camote

R. L. Jarret*

* Tropical Research and Education Center, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, Homestead, Florida, E. U.

Digitized by Google

Introducción

El camote (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) pertenece a la familia de las Convolvuláceas que contiene aproximadamente 50 géneros y 1200 especies. Varios miembros de esta familia tienen importancia económica ya sea como malezas o como plantas ornamentales; sólo la *Ipomoea batatas* se cultiva comercialmente como alimento, y la batata es la única especie del género que tiene raíces comestibles. Actualmente, el camote ocupa el sexto lugar entre los alimentos más importantes del mundo. La producción mundial, en 1983, superó las 114,842 toneladas (FAO, 1984). El camote, además de ser consumido por sus carbohidratos, es una fuente importante de almidón para uso industrial en el Japón, donde actualmente se investiga también su potencial en la producción de alcohol carburante.

Las pruebas disponibles indican que el centro de diversificación del camote se encuentra entre el sur de México y el norte de América del Sur (Jones et al., 1986). Sin embargo, todavía no se ha encontrado su ubicación exacta. Según Edmond (1971), el camote fue domesticado en América Central y en las islas tropicales del Pacífico antes de la era cristiana. En las Américas, tanto los Mayas como las civilizaciones peruanas de los Andes cultivaron el camote y diseminaron su cultivo al norte de México, a las Antillas occidentales, y a otras regiones de América del Sur. En el Pacífico, el cultivo del camote se extendió a Nueva Zelanda. En el siglo XVI los exploradores españoles llevaron esta raíz carnosa a España de donde se extendió a otros países de Europa y Africa. El camote llegó a St. Thomas, lejos de la costa de Africa, hacia 1563. Los exploradores españoles llevaron también este cultivo a las Filipinas y a las Antillas Orientales, y de allí fue diseminado por los portugueses a la India y Malasia. En el siglo XVII, los marineros chinos de Fukien llevaron estas raíces de las Filipinas a varias regiones del sur de la China, a Taiwan y al Japón. El cultivo del camote ya se encontraba bien establecido en los Estados Unidos hacia finales del siglo XVIII (Edmond, 1971).

El camote es un hexaploide natural (Jones, 1965) a diferencia de la mayor parte de los miembros del género que son diploides ($2n = 30$) o, en raras ocasiones, tetraploides (Jones, 1968). Algunos investigadores japoneses (Nishiyama et al., 1975) obtuvieron híbridos hexaploides artificiales a partir de clones diploides y tetraploides relacionados; las hibridaciones interespecíficas, por consiguiente, son posibles. El comportamiento cromosómico durante la meiosis sugiere que los clones hexaploides se originaron en las polinizaciones cruzadas naturales entre progenitores silvestres

Digitized by Google

tetraploides y diploides, que fueron seguidas por duplicación cromosómica. La recopilación más reciente de información taxonómica sobre el género *Ipomoea* es la de Austin (1978).

El cultivo del camote está expuesto al ataque de una gran variedad de plagas (Bouwkamp, 1985), especialmente enfermedades micóticas, virus, e insectos dañinos. Hasta el momento, los fitomejoradores del camote han tenido mucho éxito en incorporar resistencia a estas plagas (Jones et al., 1986). Sin embargo, ciertas incompatibilidades han ocasionado dificultades en la hibridación de los progenitores seleccionados cuando se trata, por ejemplo, de introducir nuevos genes mediante una hibridación interespecífica o intergenérica. Para una revisión de las estrategias y objetivos actuales del fitomejoramiento del camote, el lector puede referirse a Jones (1980) y a Jones et al. (1986).

Técnicas del Cultivo in Vitro

La eliminación de los patógenos de las plantas, especialmente de los virus, constituye un prerequisito para la producción de material limpio para la siembra y para el intercambio internacional del germoplasma. La alta incidencia de la infección viral, dentro de los clones más cultivados, ha motivado a numerosos investigadores a ensayar técnicas para su eliminación como las siguientes: el injerto de ápices in vivo (Hildebrand, 1957; Holmes, 1956); el tratamiento con calor de los materiales de siembra (Hildebrand, 1964; Hildebrand y Brierley, 1960); el cultivo in vitro de ápices cortados o de meristemas (Elliot, 1969; Mori, 1971; Nielsen, 1960); o una combinación de las técnicas anteriores (Over de Linden y Elliot, 1971; Kuo et al., 1985; Love et al., 1986). Este capítulo discutirá solamente las técnicas in vitro.

Cultivos de ápices y de meristemas

Nielsen (1960) cultivó meristemas de camote en un medio definido carente de reguladores del crecimiento. El desarrollo de los brotes avanzó lentamente y sólo se recuperaron las plántulas 3 a 10 meses después. Elliot (1969) cultivó los meristemas y los ápices de brotes de cuatro clones de camote en diversos medios de cultivo; el medio MS, de Murashige y Skoog (1962), uno de los ensayados, estimuló más el explante como se observó en la supervivencia y ulterior crecimiento de los tejidos de éste. Sin embargo, se observó que el ácido nicotínico, la piridoxina, el HCl y la glicina no eran esenciales para la supervivencia del explante o para el desarrollo de la

Digitized by Google

plántula. Los meristemas cultivados en un medio semisólido produjeron una cantidad levemente mayor de callo a diferencia de aquéllos cultivados en puentes de papel filtro. Además, las raíces adventicias se formaron con mayor frecuencia en los meristemas cultivados en el medio semisólido. Tanto el ácido giberélico (GA_3) como el agua de coco reprimieron el crecimiento de los brotes y raíces. La formación de raíces y el desarrollo de la plántula fueron más rápidos en el medio que contenía ácido naftalenacético (ANA) como único regulador del crecimiento.

Over de Linden y Elliot (1971) cultivaron los meristemas apicales de varios cultivares de *Ipomoea* después de aplicar un tratamiento térmico al material vegetativo (38 °C durante 4 a 12 semanas). Los explantes se cultivaron en el medio MS complementado con 1 mg/litro de ANA, cuando se partía de meristemas, o con 1 mg/litro de ácido indol-3-butírico (AIB), cuando se partía de las puntas de los brotes. En el cultivar Owaiaka Red se logró eliminar el virus sólo cuando se cultivaron puntas de brotes de 2 mm de largo que provenían de una planta progenitora tratada con termoterapia durante 12 semanas. Otros cultivares, sin embargo, requerían un pretratamiento menos vigoroso. Mori (1971) también informó sobre la eliminación exitosa de virus en clones de camote que fueron sometidos a un protocolo similar.

Alconero et al. (1975) cultivaron meristemas de 0.4 a 0.8 mm de largo, aislados de yemas axilares, en el medio basal MS modificado. Se informó que el ácido 3-indolacético (AIA) era más efectivo que el ANA como fuente de auxina, solo o en combinación con N-6-furfurilaminopurina (cinetina). El desarrollo de las plántulas se estimuló más al añadir ácido fólico (1 mg/litro). Las plántulas fueron producidas bajo una amplia gama de combinaciones de AIA/cinetina y la existencia de una interacción significativa del tipo genotipo/hormona se hizo evidente. Algunos de los brotes regenerados fueron atípicos; sin embargo, la producción de brotes atípicos se redujo a un mínimo cuando los meristemas se cultivaron en un medio MS complementado con 2 mg/litro de cinetina y 1 mg/litro de AIA. El 47% de las plantas regeneradas dieron un índice libre de virus cuando se empleó *I. setosa* como planta indicadora.

Litz y Conover (1978) investigaron la capacidad de varios medios de cultivo para sostener el crecimiento de ápices meristemáticos de camote, con miras a utilizar la técnica para lograr una rápida propagación clonal. Los dos cultivares investigados fueron White Star y PI 315343. Las puntas de brote de las yemas axilares y apicales (3.0 mm de longitud) se cultivaron en medio MS basal que se complementó con 10 g/litro de carbón activado y 0.5-2.0 mg/litro de AIB ó 0.5-2.0 mg/litro de cinetina combinados con 0.05-2.0 mg/litro de AIA. Una semana después se observó la formación de

Digitized by Google

callo en la superficie cortada de los explantes, el cual, desde entonces, se removió periódicamente. Los explantes de White Star se regeneraron en un medio basal que contenía 1 mg/litro de AIB. La regeneración de los brotes, a partir de las puntas de explante, tomó unas cinco semanas; los cultivos que se iniciaron a partir de yemas axilares, en cambio, requirieron varias semanas más. Frecuentemente, las raíces adventicias se formaban a partir del callo, en la superficie cortada del explante y en la base de las plántulas en desarrollo. Las pequeñas plántulas se habían establecido en unas ocho semanas cuando se usaron puntas de brote como explantes, y en 2 a 3 semanas más cuando se utilizaron explantes de yemas laterales.

Liao y Chung (1979) informaron sobre la eliminación de virus en el cultivar Tainung 63 cuando extirparon meristemas de 0.3 a 0.6 mm de largo de plantas que habían sido expuestas previamente a 38-42 °C durante 28 días. Los meristemas se cultivaron en un medio MS complementado con 4-6 mg/litro de BAP y se incubaron durante 30-50 días en las siguientes condiciones: 25 °C, débil intensidad de luz y fotoperíodo de 16 horas. Los brotes desarrollados se trasladaron a un medio MS modificado con 2 mg/litro de cinetina que estimularía un desarrollo adicional; las plántulas completas se recuperaron en un lapso de 65 a 120 días. Dos terceras partes de las plantas regeneradas no manifestaron síntomas virales después de ser inoculadas mediante trasmisión mecánica o de ser injertadas en *I. nil.*

Kuo et al. (1985) describieron recientemente un procedimiento para eliminar los virus A (SPV-A) y N (SPV-N) del camote mediante el cultivo de meristemas. Siguiendo este procedimiento, se cortaron meristemas (0.2-0.4 mm de longitud) en ápices obtenidos de raíces que habían sido almacenadas y que retoñaron a 30-35 °C. Los meristemas se cultivaron en un medio basal MS modificado que se complementó con 1.0 mg/litro de AIA y 1.0 mg/litro de cinetina, y se incubaron a 23 W m^{-2} en un fotoperíodo de 15 horas a 22-32 °C. Aunque se observó alguna variación entre los genotipos, las plántulas se recuperaban generalmente de 40 a 60 días después de iniciado el cultivo. El porcentaje promedio de plántulas establecidas, para cada uno de los 14 cultivares examinados, fue de 40% (en un rango de 8-87%). Las plántulas individuales se propagaron también por cultivo de esquejes uninodales. El 83% de las plántulas regeneradas estaba libre de SPV-A y SPV-N, como lo indicó la prueba ELISA (ver Capítulo 30). Las partes regeneradas infectadas con el virus no mostraron síntomas de enfermedad.

Por lo menos en un caso se obtuvo un nuevo cultivar, ya sea directamente de una mutación somática o de una quimera, durante los procedimientos que se siguieron para eliminar el virus (Moyer y Collins, 1983).

Digitized by Google

Love et al. (1986) han descrito en detalle los procedimientos para el cultivo de meristemas y para la eliminación de virus en el camote, de los cuales se tratará al final de este capítulo.

Embriogénesis somática

Varios informes han presentado recientemente protocolos detallados para estimular la embriogénesis en cultivos de tejidos de camote. Estas técnicas serán muy útiles porque facilitarán la propagación rápida de material de siembra libre de enfermedades, el intercambio de germoplasma, y el mejoramiento genético de ese cultivo.

Jarret et al. (1984) estimularon la embriogénesis somática partiendo de puntas de brotes cultivados, en numerosos cultivares introducidos de camote. Las yemas terminales y axilares se cultivaron en un medio basal MS modificado que se suplementó con 0.1 a 3.0 mg/litro de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). En presencia del 2,4-D fue evidente la aparición de varios tipos de callo morfológicamente diferentes, varias semanas después de iniciado el cultivo. El color del callo embriogénico iba del blanco al amarillo pálido, y su superficie era compacta y lisa. Los embriones somáticos podían detectarse a simple vista a las 3 ó 4 semanas del comienzo del cultivo. Las auxinas inhibieron el desarrollo del embrión más allá de la etapa corazón-torpedo, y sólo se recuperaron plantas enteras después de trasferir los 'embrioides' individuales, o conglomerados de callo embriogénico, al medio basal carente de hormonas. La concentración de auxinas, el genotipo de la planta de origen, y la posición original del explante afectan, antes del inicio del cultivo, la ocurrencia de la embriogénesis. Los explantes tomados de las porciones apicales del brote responden mejor.

Liu y Cantliffe (1984) cultivaron explantes de hoja, de ápice meristemático, de tallo y de raíz de camote, en un medio MS modificado que contenía 6% de sacarosa y 0.5 a 4.0 mg/litro de 2,4-D. En presencia de 2,4-D todos los tejidos produjeron fácilmente callo; más tarde se logró producir callo embriogénico. Las superficies abaxiales —no las adaxiales ni las cortadas— de los explantes foliares y de los ápices formaron un callo embriogénico en MS suplementado con 0.5-2.0 mg/litro de 2,4-D; este mismo callo se inició a lo largo de las superficies cortadas de los explantes de tallo y de raíz, cuando éstos se cultivaron en MS más 1.0 mg/litro de 2,4-D. El subcultivo del callo en MS suplementado con 2.0 mg/litro de 2,4-D, 2.0 mg/litro de cinetina, y 20% (v/v) de agua de coco desproteinizada sirvió de soporte para una continua proliferación celular y para la producción de

Digitized by Google

embriones somáticos durante un período superior a nueve meses. Se observó que la gemación secundaria, en los embriones somáticos en desarrollo, ocurría en la superficie de los cotiledones y de los hipocótilos. Como se informó anteriormente (Jarret et al., 1984), el desarrollo del embrión en presencia del 2,4-D no pasó de la etapa acorazonada. La maduración del embrión y la germinación ocurrieron al hacer la trasferencia al medio basal libre de auxinas. Las plántulas establecidas crecieron rápidamente después de su trasferencia al suelo, y fueron fenotípicamente similares a la planta progenitora.

En un estudio más reciente, Templeton-Somers y Collins (1986) analizaron la heredabilidad de la regeneración de plantas en el cultivo de tejidos de camote. Una población de polinización libre, formada por 12 líneas parentales y 12 progenitores, se seleccionó según dos características: el crecimiento del callo in vitro y la regeneración. Los cultivos de callo se iniciaron a partir de explantes tomados tanto del pecíolo de hojas jóvenes como de pequeñas puntas de brote, y se siguieron los procedimientos descritos por Jarret et al. (1984) y por Seghal (1975). De este modo se obtuvieron los cultivos organogénicos y embriogénicos. Los efectos genotípicos estaban altamente correlacionados con las tasas de crecimiento del callo, con su textura y con su color después de dos subcultivos sucesivos. La tasa de crecimiento del callo, en los subcultivos segundo y tercero, siempre se halló correlacionada negativamente con una posterior regeneración de la raíz o del brote originados de ese callo. Las características del crecimiento temprano del callo no estaban correlacionadas con la aparición posterior de la embriogénesis o de la organogénesis.

Aislamiento y cultivo de protoplastos y de células del mesófilo

Actualmente la información disponible sobre los procedimientos para aislar y cultivar protoplastos partiendo de tejidos de camote es escasa. Sin embargo, a medida que surjan técnicas estándar para la trasferencia de genes, será cada vez más importante desarrollar técnicas para la regeneración de plantas a partir de células y protoplastos aislados.

Wu y Ma (1979) aislaron protoplastos de células de callo provenientes del tallo del camote que habían sido incubadas en una formulación de sales basales complementada con 2% de celulasa, 20 mM de $CaCl_2.2H_2O$, y 0.8 M de manitol. Después de cinco horas ocurrió la liberación de los protoplastos. Luego se sembraron los protoplastos cuya concentración fluctuaba entre 1 x 10^5 y 2 x 10^5 protoplastos/ml, en un medio MS semisólido modificado y complementado con 0.3 mg/litro de ANA,

Digitized by Google

0.1 mg/litro de 2,4-D, 0.1 mg/litro de cinetina, y de 4 a 5% de agua de coco; el resultado fue una rápida regeneración de la pared celular. Se obtuvo también la división celular y la formación (de la colonia) de callo. No se observó la formación de órganos.

La división celular de los protoplastos de camote recién aislados se pudo alcanzar gracias a una modificación de la técnica de capa celular-'reservorio' (Bidney y Shepard, 1980). Los protoplastos se habían aislado de secciones del pecíolo partidas longitudinalmente y se sometieron a un tratamiento con una solución que contenía 0.2% de macerozima R-10, 0.4% de celulasa (Onozuka R-10), 1/4 de elementos mayores de MS (excepto NH_4NO_3), sacarosa 0.3 M, 10 mg/litro de hidrolisado de caseína (HC), y ácido sulfónico 2-N-morfolinoetano (MES) 5 mM, durante 4 horas a 28 °C, en un agitador rotatorio a 45 rpm. Los protoplastos liberados se recogieron en botellas de Babcock. Los cuadrantes opuestos (I y III) de la caja Petri recibieron el medio del reservorio; éste se componía de sales basales MS complementadas con vitaminas, HC, D-manitol, y sacarosa 15 mM, y solidificadas con agar al 0.5%. A los cuadrantes II y IV se trasladaron, mediante una pipeta, los protoplastos mezclados con un medio de capa celular que consistía en una formulación MS basal suplementada con hidrolisado de caseína, ANA y BAP, y solidificada con agar al 0.4%. Los cultivos se incubaron en un fotoperíodo de 24 horas, bajo una iluminación de 1000 lux a 28 °C. Después de dos semanas, la eficiencia de siembra para los dos cultivares ensayados fue de 60 a 70%; una eficiencia similar se logró sembrando protoplastos en densidades de 2×10^3, 5×10^3, y 10×10^3 protoplastos/ml.

Aunque en el sistema de capa celular-reservorio la eficiencia de siembra fue mayor, los protoplastos sembrados en un medio de capa celular lograron también la división celular y la formación de colonias, aunque más lentamente y con menor eficiencia de siembra. Dos factores importantes aumentaron la división celular y la formación de colonias: los bajos niveles de auxinas en el medio de la capa celular, y la afluencia de manitol desde el medio del reservorio. Los altos niveles de sacarosa favorecieron el comienzo de la división celular; sin embargo, la reducción gradual de la sacarosa fue útil para el desarrollo de la colonia. Las colonias derivadas de protoplastos se trasladaron exitosamente al medio libre de auxinas para obtener mayor proliferación del callo. Aunque se observó la formación ocasional de raíces, no se formó el brote ni el embrioide.

Según este mismo informe, se aislaron enzimáticamente células de mesófilo foliar de los cultivares Jewel y Centennial. Se colocaron bandas de tejido foliar en una solución de 2% de sucrosa, 2% de macerozima

Digitized by Google

(Yakult Biochem), 0.5% (p/v) de polivinilpirrolidona (PVP-10), y se incubaron a 28 °C en un agitador rotatorio (100 rpm). Las células liberadas se recolectaron después de 5 horas, se centrifugaron a 150*g*, se resuspendieron de nuevo en una solución que contenía 2% de sacarosa y 50% de sales MS (excepto NH_4NO_3), se centrifugaron nuevamente, y se resuspendieron en una concentración de 10^6 células/ml. Los protoplastos de estas células no se aislaron con éxito.

Las mayores eficiencias de siembra se obtuvieron siguiendo la técnica celular de capa-reservorio, como se hizo con los protoplastos. El medio de la capa celular contenía las sales MS estándar, menos el NH_4NO_3, y además los siguientes compuestos (en mg/litro): ribósido de cinetina (0.5), 2,4-D (1.0), HC (50), D-biotina (0.5), ácido fólico (5.0), glicina (2.0), tiamina-HCl (0.5), e i-inositol (100). Los cultivos se incubaron a 28 °C, con un fotoperíodo de 16 horas y bajo una iluminación de 2000 lux.

La división de las células de mesófilo ocurrió, generalmente, 14 días después de sembradas, y las divisiones posteriores dieron como resultado la formación de una colonia (día 20). Las eficiencias de siembra fluctuaron entre 30 y 35% a una densidad celular de 1 a 5 x 10^4 células/ml. La división celular dependió sobremanera de la intensidad inicial de la luz después de la siembra y de la temperatura de incubación del cultivo.

Eilers et al. (1986) aislaron protoplastos de tallo de plantas de camote cultivadas en el invernadero. Los protoplastos aislados se cultivaron en un medio basal complementado con diversas concentraciones de BAP, ANA, espermidina, espermina y putrecina. Seis días después se hizo un análisis estadístico para detectar, de una parte, interacciones entre esos componentes del medio y, de otra, la función de estas interacciones en la eficiencia de siembra del protoplasto. Se hallaron interacciones significativas entre ANA y BAP, ANA y putrecina, y putrecina y espermina. La espermidina no tuvo ningún efecto significativo en la eficiencia de siembra, en el rango de concentraciones ensayadas.

Organogénesis

Gunckel et al. (1972), en un esfuerzo por estimular la formación de órganos a partir de tejidos cultivados de camote, cultivaron pequeños cilindros de tejido radical de almacenamiento en la solución salina de White (1963) complementada con varios compuestos orgánicos, y los incubaron a 25 °C, en un fotoperíodo de 12 horas con luz de baja intensidad. En ausencia de aditivos, los explantes presentaron una leve formación de callo y sufrieron senescencia. Entre las auxinas ensayadas (ANA, AIA y

Digitized by Google

2,4-D), el AIA fue el más eficaz como promotor de la formación de raíces adventicias y de callo. La producción de callo, partiendo de los explantes de raíces de almacenamiento, dependía del suplemento orgánico, del cultivar, de la orientación del explante, y de los efectos de la polaridad tisular. El callo proveniente de los explantes del cultivar Centennial fue óptimo cuando se utilizó un medio basal complementado con AIA y 2,4-D. El ANA fue menos efectivo que el AIA en la estimulación de las raíces; otros suplementos orgánicos, como el sulfato de adenina y el GA_3, utilizados ya sea en forma individual o combinados, estimularon la formación de raíces. En términos generales, la formación de raíces adventicias estaba correlacionada positivamente con el crecimiento del callo.

Fue evidente el efecto de polaridad. Los cilindros del cultivar Centennial produjeron raíces abundantes sólo cuando se cultivaron en posición horizontal sobre el medio de cultivo. Se ha indicado que los efectos de polaridad pueden ser ocasionados por los gradientes de auxina/citocinina que se desarrollan dentro de la raíz de almacenamiento; tales efectos eran reversibles manipulando las concentraciones de la auxina y de la citocinina en el medio de cultivo. Los brotes se formaron de explantes de dos de los tres cultivares que se examinaron. Yellow Jersey produjo brotes en el medio basal complementado con agua de coco, sulfato de adenina, cinetina, GA_3, y AIA. Los explantes de Centennial produjeron brotes adventicios en el medio básico suplementado con cinetina, GA_3, AIA, 2,4-D y agua de coco o sulfato de adenina.

Yamaguchi y Nakajima (1974) investigaron la regulación hormonal en la formación de órganos, partiendo de discos de tejido radical de almacenamiento. Los explantes se cultivaron en un medio basal que contenía sales de White (White, 1963), 0.5% (p/v) de extracto de levadura y 5% de sacarosa. El medio básico complementado con ANA estimuló la formación de raíces abundantes; sin embargo, la eficiencia de esta auxina dependía del tiempo de poscosecha de la raíz de almacenamiento de la que provenía el explante: si el tejido era de mayor edad, los explantes producían mayor cantidad de raíces adventicias en comparación con explantes de raíces de almacenamiento recién cosechadas. Esta respuesta podía invertirse al añadir cinetina al medio de cultivo. Los investigadores sugirieron que los niveles endógenos de auxina y citocinina en la raíz de almacenamiento eran un factor importante en la respuesta obtenida in vitro. En varios cultivares, la formación de brotes adventicios era estimulada en un medio basal que contenía 2,4-D pero carecía de zeatina. El ácido abscísico (ABA), cuya actividad en la formación de brotes en los cultivos de tejido de camote ha sido demostrada por Yamaguchi y Nakajima (1972), se añadió luego al medio que, junto con el 2,4-D, estimuló aún más la formación de

Digitized by Google

brotes en explantes de raíces de almacenamiento de mayor edad. Se ha sugerido que este efecto es causado por los altos niveles de citocinina endógena de las ralces mayores, los cuales inhiben la formación de yemas o brotes a menos que se contrarresten con ABA.

En 1975, Seghal informó sobre la inducción de yemas adventicias en los explantes foliares cultivados. Se cultivaron hojas inmaduras de 1 cm de longitud en medio basal MS modificado y suplementado con varios compuestos orgánicos. Ocurrió un rápido crecimiento del callo en el medio basal suplementado con 0.5 mg/litro de 2,4-D y 0.1 mg/litro de cinetina. En este medio no se formaron órganos. Sin embargo, al trasladar este callo al medio MS suplementado con 1.0 mg/litro de AIA, la formación de raíces fue rápida y abundante. En cambio, el callo que se trasfirió al medio MS suplementado con 10 a 20 mg/litro de sulfato de adenina, produjo tanto ralces como brotes después de cuatro semanas. Posteriormente, de estas yemas adventicias se regeneraron plantas enteras.

Antoni y Folquer (1975) cultivaron secciones de raíz de almacenamiento del camote que contenían partes del tejido cambial, en un medio MS suplementado con 3 mg/litro de 2,4-D y 10% de agua de coco; ocho días después fue evidente la formación de callo en estos explantes. Una proliferación adicional de callo ocurrió en este medio, pero tres meses más tarde los explantes se trasladaron al medio MS con agua de coco pero sin 2,4-D, o a las sales minerales de White (White, 1963) que contenían 0.5 mg/litro de ABA. No se logró la formación de órganos.

Hwang et al. (1983) cultivaron diferentes tejidos de camote, incluyendo puntas de brotes, yemas axilares, trozos de hoja, secciones de pecíolo, y discos del tejido radical de almacenamiento, en el medio MS modificado que contenía 0.1 mg/litro de AIA y 2.0 mg/litro de BA. En este medio, los ápices y las yemas axilares se desarrollaron luego como plántulas. El desarrollo del callo se observó solamente en los explantes foliares; se formaron raíces y brotes en los explantes de pecíolo. En los explantes de raíces de almacenamiento se formó el callo y se desarrollaron yemas de brotes adventicios, algunas de las cuales continuaron desarrollándose hasta convertirse en plántulas establecidas. La respuesta de los explantes de raíz de almacenamiento dependía del genotipo y de la posición original del explante en la raíz. Los explantes provenientes de las regiones proximales de la raíz de almacenamiento producían abundantes yemas mientras que aquéllos de las regiones distales de la misma raíz emitían raíces abundantes. Además, los explantes de las ralces recién cosechadas respondieron más que aquéllos de las raíces que habían estado almacenadas

Digitized by Google

durante algunos meses. Aunque se observaron numerosas yemas adventicias, sólo un pequeño porcentaje de ellas (4%) se desarrolló para producir brotes.

Carswell y Locy (1984) cultivaron explantes de tallo, de hoja y de raíz de almacenamiento del cultivar de camote Jewel, en un medio modificado MS que se suplementó con ANA (0.1-10.0 mg/litro) y BA (0.1-10.0 mg/litro) agregados independientemente o en combinaciones factoriales. La formación de callo a partir de explantes de hoja o de tallo fue más marcada en un medio que contenía 1 mg/litro de ANA y 10 mg/litro de AIA. La elevada proporción auxina/citocinina favoreció la formación de raíces a partir de este callo. La regeneración del brote resultó afectada tanto por el régimen hormonal del medio de cultivo como por la edad del cultivo. Treinta días después, sólo los explantes que se cultivaron en el medio basal suplementado con 1 mg/litro de ANA y con 0.1 mg/litro de BA emitieron raíces adventicias. Sin embargo, 70 días más tarde se formaron brotes en diversos medios caracterizados por múltiples relaciones auxina/citocinina en diferentes concentraciones. Los brotes formados a partir de las raíces adventicias procedían generalmente de los puntos de origen de las raíces laterales. Se formaron raíces en todos los explantes en presencia y en ausencia de luz; las yemas de brotes, en cambio, no se formaron en la oscuridad. La capacidad de formación de brotes procedentes de las raíces adventicias disminuyó al separarlos del explante primario.

Cultivo de anteras

Tsai y Lin (1973a) fueron los primeros en informar sobre las tentativas de regeneración de plantas de camote mediante la androgénesis. Anteras que contenían granos de polen en una etapa indeterminada de desarrollo se inocularon en el medio de Blayde (1966) complementado con 2 mg/litro de 2,4-D y de cinetina. En este medio las anteras produjeron un callo abundante de un color similar al de la raíz de almacenamiento del cultivar de donde se habían obtenido las anteras. El porcentaje de anteras que formaban callo dependía en gran parte del genotipo. La proliferación continua del callo se logró trasfiriendo las anteras al medio de Blayde (1966) que contenía 2 mg/litro de 2,4-D y de AIA. El agua de coco y el 2,4-D actuaron sinergísticamente para estimular el crecimiento del callo. No se informó sobre formación de órganos.

Tsai y Lin (1973b), en un artículo análogo al anterior, definieron mejor los componentes del medio que estimula la rápida proliferación del callo derivado de las anteras del camote. El estudio demostró que la sacarosa, en

Digitized by Google

una concentración óptima de 4 a 5%, tenía un efecto altamente significativo en el crecimiento del callo. Los períodos de cultivo mayores de 30 días causaron un cambio en el pH del medio; éste, sin embargo, mantenido en un rango de 5 a 7, no tuvo efectos significativos en el crecimiento del callo. Otras condiciones ambientales, como la temperatura de 30 °C y la oscuridad, estimularon también el crecimiento del callo.

Kobayashi y Shikata (1975) cultivaron granos de polen uninucleados en varias formulaciones de sales suplementadas con diversos reguladores de crecimiento y vitaminas. En todos los medios basales que contenían de 1 a 2 mg/litro de 2,4-D y 2 mg/litro de cinetina se estimuló la formación de callo. En algunos casos se observó la formación inicial de raíces en el callo. El callo continuó proliferando cuando se subcultivó en el medio MS que contenía 2 mg/litro de AIA y 2 mg/litro de cinetina. La diferenciación de las raíces en el callo subcultivado fue inducida por la trasferencia del callo al medio de White x 1/2 (White, 1963) que contenía 1 mg/litro de cinetina y 4 mg/litro de extracto de levadura. Los cultivos se conservaron a 1500 lux, a 25 °C, en un fotoperíodo de 12 horas. En este medio, las raíces adventicias se alargaron con facilidad. La diferenciación de la yema del brote, partiendo de estas raíces, se estimuló cuando éstas se cultivaron en un medio basal que contenía niveles elevados de sacarosa (4-12%), y de ABA (0.1-1.0 mg/litro) o cinetina (0.1-1.0 mg/litro). El conteo cromosómico de las células madre del polen de las plantas regeneradas fue n = 45.

Seghal (1978) informó sobre la regeneración de plántulas a partir del cultivo de anteras del camote, pero no especificó el cultivar. Las anteras en diferentes etapas de desarrollo (desde la célula uninucleada hasta el polen de dos células) se sembraron en un medio MS suplementado con varias auxinas y citocininas, individualmente o en combinación. No todos los tratamientos tuvieron efecto en la estimulación directa de la androgénesis. Sin embargo, se formó abundante callo de la pared de la antera y de los tejidos conectivos cuando éstos se sembraron en un medio MS suplementado con 1 mg/litro de 2,4-D, 1 mg/litro de zeatina o de cinetina, y 1 mg/litro de AIA. El callo que se obtuvo de las anteras cultivadas en el medio MS con 10 a 20 mg/litro de sulfato de adenina y 1 mg/litro de 2,4-D fue de apariencia nodular, y presentó diferenciación en estructuras 'similares al brote' cuando se trasladó al medio basal MS carente de hormonas. No se recuperaron plantas enteras.

Tsai y Tseng (1979) cultivaron anteras que contenían polen en la etapa uninucleada de desarrollo, en los medios MS y de Blayde (Blayde, 1966) suplementados con varios reguladores del crecimiento. El medio MS fue superior al de Blayde en cuanto a su capacidad para promover la formación de callo. El medio MS suplementado con 2 mg/litro de 2,4-D, con

Digitized by Google

AIA y con cinetina fue la combinación más efectiva para lograr la formación del callo, según la respuesta obtenida de anteras de cinco cultivares de camote. El subcultivo de este callo en el medio MS suplementado con diversas combinaciones de ABA (0.1-1.0 mg/litro), fomentó la formación de embrioides. La eficacia del ABA en promover la formación de embrioides dependía del genotipo de la antera. La formación de raíces, en cambio, ocurrió en una amplia gama de formulaciones de medios y de cultivares. Los embrioides germinaron cuando se trasfirieron al medio MS suplementado con AIA y cinetina, y de ellos se recuperaron más tarde plantas enteras. No se indicó el conteo cromosómico de las plantas regeneradas.

Estudios con suspensiones celulares

Además de los estudios anteriores, que han hecho hincapié en la morfogénesis, varios investigadores han utilizado suspensiones celulares de camote, o de especies relacionadas, para examinar diversos fenómenos como la síntesis enzimática, la producción de metabolitos secundarios, y la nutrición mineral de la célula individual. Aunque estos estudios no están directamente relacionados con el mejoramiento de cultivos, han ayudado a definir las condiciones para el cultivo continuo de las células de camote.

Yoshida et al. (1970) investigaron la captación de K, Ca y Mg en las suspensiones celulares de camote. El callo se inició en un medio MS modificado que se suplementó con 2,4-D y extracto de levadura. El calcio estimuló la captación de K en las células de tabaco pero no en las de camote; en éstas la captación de potasio fue mayor que la de Ca o Mg. En síntesis, el orden de afinidad para la captación de cationes era K > Mg > Ca.

Sasaki et al. (1972) compararon los perfiles isoenzimáticos del tejido radical de almacenamiento del camote con los del callo cultivado en agar y con aquéllos de las suspensiones celulares líquidas. Los cultivos de callo se iniciaron en el medio de White (1963) que contenía 2,4-D; las suspensiones líquidas y los cultivos posteriores de callo se iniciaron a partir de ese primer callo y se mantuvieron en el medio PRL-4 de Gamborg modificado mediante la adición de 0.2% de casaminoácidos en lugar de aminas. Las isoenzimas de la fosfoglucoisomerasa (PGI) se separaron en una columna de celulosa DEAE. En el tejido radical de almacenamiento se identificaron tres formas de PGI: I, II, y III. En las células cultivadas en líquido faltaban las isoenzimas II y III, mientras las cultivadas en agar poseían las isoenzimas II y III pero no la I. Cantidades equivalentes de actividad (por mg de proteína) se recuperaron de todas las muestras.

Veliky et al. (1976) informaron que se requería menos de 0.3 mM de Mg para sostener el crecimiento óptimo de una suspensión celular de *Ipomoea*

Digitized by Google

sp. (batatilla), en presencia de 2% de sacarosa. La captación de Mg por las células aumentó al incrementar el Mg y el pH en el medio de cultivo. El exceso de Mg se podía extraer fácilmente triturando las células en agua destilada; esto indica que dichas células captan una cantidad de Mg mayor de la requerida para su crecimiento.

Zink y Veliky (1977) examinaron la asimilación de nitrógeno y la regulación de la actividad de las enzimas nitritoreductasa y nitratoreductasa en las células cultivadas de la batatilla. Las células de *Ipomoea* sp. prefirieron el amonio como fuente de N durante las primeras etapas del ciclo de crecimiento, y posteriormente asimilaron el ion nitrato independientemente de la presencia o ausencia del amonio. Las enzimas necesarias para asimilar el nitrato fueron inducidas por el mismo nitrato. La adición de amonio a las células preinducidas para la actividad de la reductasa no causó una supresión de la síntesis enzimática; en cambio, cuando se añadió nitrato a las células que asimilaban amonio, el resultado fue un bajo nivel de inducción enzimática de ambas reductasas. Cuando el nitrato y el amonio se hallaban presentes inicialmente en el medio, el amonio se utilizó rápidamente. Sin embargo, no ocurrió una inducción de las reductasas durante las 24 horas en que fue baja la asimilación del nitrato. Después de la inducción, la actividad de la reductasa aumentó rápidamente hasta alcanzar niveles más altos que los de las células cultivadas continuamente en presencia del nitrato. En estos cultivos celulares el amonio produce efectos similares a la represión en la actividad de la reductasa.

Zink (1980) examinó los efectos del GA_3 en la formación de fosfatasas, en dos líneas celulares de *Ipomoea* sp. en las cuales, efectivamente, el GA_3 alteraba diferencialmente la actividad de esas enzimas. El pH del medio de cultivo y la adición de fosfato inorgánico reprimían la actividad de la fosfatasa, según se había demostrado anteriormente (Zink y Veliky, 1979). El GA_3 reprimió la actividad de la fosfatasa después de un período inicial de crecimiento celular de tres días. Los efectos de represión del GA_3 y del fosfato inorgánico fueron aditivos. En la segunda línea celular, los niveles de la actividad enzimática en las fracciones solubles y particuladas aumentaron en presencia del GA_3 durante las primeras etapas de crecimiento celular, y luego declinaron. Parece que el GA_3 disminuye la secreción o lixiviación de las fosfatasas en el medio de cultivo.

Oba y Uritani (1979) cultivaron tejido radical de camote en un medio semisólido que contenía sales minerales de Heller (Heller, 1953), vitaminas, 2,4-D, extracto de levadura, y sacarosa; luego hicieron una monitoría de la secreción de furano-terpenos en ese medio de cultivo. No detectaron en él producción de estos compuestos. Sin embargo, al colocar este callo en

Digitized by Google

un cultivo de suspensión líquida, ocurrió una rápida producción de furano-terpenos; la presencia del extracto de levadura y de la sacarosa fue esencial para la producción de estos compuestos. Los patrones de TLC (cromatografía en capa fina) de los furano-terpenos producidos por las suspensiones celulares fueron en esencia los mismos, cualitativamente, que los producidos por los extractos del tejido radical de almacenamiento del camote.

Nakamura et al. (1981) examinaron los efectos que los productos de degradación del ácido deshidroascórbico (DHA) ejercían en la inhibición del crecimiento de las suspensiones celulares del camote. Los cultivos de callo se iniciaron y se mantuvieron en un medio semisólido MS complementado con 2,4-D y cinetina; en este medio, los valores del peso seco celular aumentaron cinco veces en 21 días. Cuando los cultivos se inocularon con una solución de DHA, incubada a 30 °C durante 10 días, se inhibió su crecimiento; cuando se inocularon con una solución fresca de DHA, no se registró efecto alguno en su crecimiento. El ácido 2,3-dicetogulónico (DKG) también inhibió el crecimiento celular; no obstante, una solución de DKG, almacenada durante tres días a 30 °C, no produjo tal inhibición. Los autores concluyen que los productos de degradación del DHA inhiben el crecimiento celular y que el grado de inhibición es diferente según la especie tratada.

Investigaciones Futuras

Las técnicas para eliminar virus en el camote se aplican actualmente en varios centros de investigación internacionales y nacionales. La principal limitación de estas técnicas es la dificultad para evaluar con precisión la presencia de los virus más conocidos del camote y la falta de conocimiento sobre esos mismos virus. El desarrollo de un programa internacional para caracterizar los virus del camote facilitaría su identificación y, en consecuencia, la distribución y el intercambio de germoplasma del camote. El perfeccionamiento de las técnicas con ácidos nucleicos (Owens y Diener, 1981) junto con los ensayos inmunológicos con anticuerpos monoclonales deberían ayudar en la identificación de los virus y fomentar la investigación adicional sobre nuevos métodos para eliminarlos. Al respecto, parece que vale la pena investigar la utilización de compuestos antivirales in vitro.

La capacidad de estimular la embriogénesis somática en los tejidos del camote abre nuevas áreas a la investigación. Por ejemplo, los embriones somáticos pueden encapsularse y sembrarse como semilla (Kitto y Janick, 1985) asegurando así la obtención de colecciones uniformes y libres de

Digitized by Google

virus. También se pueden emplear los embriones somáticos, deshidratados o criopreservados, para la conservación de germoplasma. Las suspensiones celulares embriogénicas ofrecerían una herramienta muy útil para el estudio in vitro de las técnicas de selección que intentan lograr la resistencia al estrés ambiental y a las enfermedades en las plantas.

El desarrollo de protocolos para la regeneración de plantas enteras a partir de protoplastos aislados suministrará una valiosa herramienta para aquéllos que trabajan en el mejoramiento de cultivos. La microinyección y las trasformaciones obtenidas por intermedio de *Agrobacterium* se utilizan hoy exitosamente en varios cultivos agronómicos y podrían emplearse en el mejoramiento del camote.

El mejoramiento genético in vitro del camote puede lograrse también como resultado de una variación genética, natural o inducida, que se haya desencadenado durante el proceso del cultivo de tejidos. Las mutaciones somáticas ocurridas en ese proceso también han desempeñado un papel significativo en el desarrollo de variedades de camote (Hernández et al., 1956). La regeneración de las plántulas por medio de la organogénesis puede producir una proporción importante de tipos anormales de los cuales pueden seleccionarse luego aquellos que presenten características deseables. Los variantes somaclonales (Larkin y Scowcroft, 1981) se buscan entre las diferentes especies cultivadas que se hayan regenerado a partir del cultivo de tejidos. Una característica deseable de estos variantes es que, generalmente, los cambios en el genoma son pequeños (Brettell et al., 1986).

Respecto al desarrollo de las técnicas in vitro para la regeneración de plantas a partir de células aisladas y de tejidos, el camote se encuentra muy atrasado en comparación con cultivos menos importantes. Se espera que esta situación cambie en un futuro cercano. Todavía queda mucho por hacer y las posibilidades expresadas anteriormente son sólo unas pocas de las muchas que existen.

Protocolos para el Cultivo de Tejidos de Camote

En esta sección se describen los procedimientos experimentales siguientes: a) el aislamiento de meristemas, la regeneración y la propagación de plántulas (Love et al., 1986; Carswell y Locy, 1984); b) la organogénesis partiendo de raíces formadas de novo (Jarret et al., 1984); y c) la embriogénesis somática partiendo de explantes vegetativos (Liu y Cantliffe, 1984).

Digitized by Google

A. Cultivo de meristemas

1) Coseche las puntas de los brotes (1-2 cm de longitud) de las raíces de almacenamiento retoñadas o de los brotes establecidos. Es esencial contar con material limpio para la siembra. Las plantas patrón deberán mantenerse en el invernadero o en la cámara de crecimiento y se someterán periódicamente a medidas de control de plagas.

2) Coloque las puntas de brotes cortadas sobre papel filtro humedecido o sobre toallas de papel, para evitar su deshidratación.

3) Quite todas las hojas de las puntas a excepción de las más pequeñas (las menores de 1 cm).

4) Esterilice superficialmente las puntas de brotes mediante inmersión en una solución que contenga 10% (v/v) de blanqueador comercial (aproximadamente 0.525% de hipoclorito de sodio) y 2 gotas/ 100 ml de Tween-20, durante 10-15 minutos.

5) En ambiente aséptico, enjuague las puntas de los brotes tres veces en agua destilada estéril.

6) Traslade las puntas de los brotes a una caja Petri forrada con papel filtro humedecido.

7) En una campana de flujo laminar o en otro ambiente estéril y adecuado, y con ayuda de un microscopio de disección, recorte las hojas jóvenes restantes doblándolas hacia atrás y alejándolas del tallo. Durante este paso del procedimiento de aislamiento del explante, el ápice del brote se toma con un par de pinzas de punta fina mientras que las hojas se cortan con un bisturí (con cuchilla no. 11).

8) Remueva cuidadosamente el primordio foliar así: bordee la cúpula meristemática mientras lo raspa con el lado cortante del bisturí, hasta que sólo quede la cúpula meristemática (0.1 mm de longitud).

9) Con un segundo bisturí, reservado para la remoción del meristema, corte hasta la mitad trasversalmente por debajo de la cúpula apical. Dé vuelta al tallo y haga un corte similar en el lado opuesto. También da buenos resultados, en la remoción del meristema, un microbisturí que se prepara afianzando un pedazo de cuchilla en un mango delgado de madera.

10) Utilizando el bisturí, levante el meristema separándolo de los tejidos subyacentes y colóquelo inmediatamente en el medio de cultivo.

Digitized by Google

Medio de cultivo. La fórmula de sales minerales de Murashige y Skoog (1962) da buenos resultados en cultivos de tejido de camote (Kuo et al., 1985; Love et al., 1986). Por ello los cultivos de meristemas se inician en un medio basal que contenga sales MS y las siguientes sustancias, en mg/litro: tiamina-HCl, 1.0; i-inositol, 100; sacarosa, 70,000; agar, 7000; y que esté suplementado además con ANA (0.03 mg/litro) y BA (0.3 mg/litro). Love et al. recomiendan agregar Na_2EDTA (37.3 mg/litro) al medio. En vez de colocar los meristemas cortados en un medio semisólido, pueden hacerse flotar directamente en la superficie del medio líquido. Una vez se perciba visualmente el desarrollo del brote, éste se cultiva de nuevo en el medio basal, desprovisto esta vez de hormonas para acelerar el desarrollo de la plántula.

Los cultivos pueden incubarse en diversidad de condiciones ambientales. Las temperaturas de 22 a 34 °C pueden considerarse como los extremos aceptables, con un punto óptimo entre 26 y 28 °C. La iluminación fluorescente (1500 a 6000 lux) es satisfactoria; sin embargo, mayores intensidades de luz estimulan una regeneración más rápida. La iluminación incandescente complementaria puede estimular también el desarrollo de las plántulas, una vez que éste se ha iniciado; no ocurre así en cultivos mantenidos solamente con luz fluorescente. El tiempo que se requiere para la regeneración de una plántula depende del genotipo y puede oscilar de 1 a 4 meses.

Después de la regeneración de la plántula, los cultivos pueden o bien mantenerse, o propagarse mediante la excisión y cultivo individual de los nudos que contengan una yema axilar, en un medio basal semisólido. Normalmente, el desarrollo radical es posterior al desarrollo del brote, en presencia o ausencia de reguladores del crecimiento (Love et al., 1986).

El cultivo de meristemas requiere tiempo. Es esencial por tanto tomar todas las precauciones posibles para evitar la contaminación o la muerte del explante. Los siguientes puntos deberán recibir atención especial (Love et al., 1986):

- Esterilice adecuadamente todos los instrumentos al pasar de un meristema a otro.
- Mantenga el material progenitor tan limpio como sea posible mediante medidas programadas de control de plagas.
- Evite que el meristema sufra daño físico durante el procedimiento de excisión.
- Evite que el explante se deshidrate trasladándolo directamente al medio de cultivo, inmediatamente después de la excisión.

Digitized by Google

B. Organogénesis

Varias publicaciones presentan protocolos detallados para estimular la formación de órganos adventicios partiendo de explantes cultivados de camote. El siguiente procedimiento se ha tomado de Carswell y Locy (1984) quienes fueron los primeros en estimular la formación de raíces adventicias partiendo de diferentes tipos de explantes, y en observar después la formación de brotes partiendo de esas raíces.

1) Coseche las primeras tres hojas totalmente expandidas y los segmentos internodales de tallo, desde el ápice del brote hasta el cuarto internudo. Utilice solamente material vegetal sano.

2) Esterilice superficialmente hojas enteras y segmentos de tallo mediante su inmersión en una solución de 1.23% de hipoclorito de sodio (aproximadamente 20% de blanqueador comercial) durante 15 minutos.

3) Enjuague todos los tejidos en agua destilada estéril tres veces.

4) Prepare los explantes tomando, con un taladro para corcho, discos de tejido foliar (incluyendo las venas) de 6 mm de diámetro, y secciones de segmentos de tallo internodal de 2 a 3 mm de espesor.

5) Coloque estos explantes primarios en el medio de cultivo, en tubos o en cajas Petri.

6) Cuando se observe la formación de las raíces adventicias, las raíces individuales pueden cortarse y cultivarse de nuevo en un medio de cultivo fresco o dejarse unidas al explante original. Sin embargo, Carswell y Locy (1984) observaron que la capacidad de estas raíces para formar brotes disminuye si se separan del explante primario.

7) Los brotes adventicios que se desarrollen de estas raíces pueden cortarse y establecerse en un medio basal carente de hormonas.

Medio de cultivo. Los explantes foliares y los de segmentos de tallo se cultivan en un medio basal que contenga sales MS y las siguientes sustancias (en mg/litro): i-inositol (100), ácido nicotínico (0.5), piridoxina-HCl (0.5), glicina (2.0), tiamina-HCl (0.4), sacarosa (30,000), y agar (7000); además, que esté suplementado con ANA (1.0) y BA (0.1). Los cultivos se incuban a 25-30 °C en la oscuridad o con luz débil (1000-3000 lux). Sin embargo, la formación de yemas no ocurre en ausencia de iluminación.

Se observa, generalmente, la formación de raíces adventicias partiendo de estos tejidos a los 30-40 días después de iniciado el cultivo. La formación

Digitized by Google

de brotes, que ocurren en las puntas de las ramificaciones de la raíces laterales, puede tomar más tiempo (hasta 65 días más). Debe recordarse que una respuesta vigorosa depende del genotipo y de la concentración de hormonas. Se aconseja experimentar con varios cultivares, dentro de un rango de tratamientos hormonales, con el fin de optimizar el medio de cultivo. Carswell y Locy (1984) utilizaron el cultivar Jewel en sus estudios.

C. Embriogénesis somática

Los cultivos de callo embriogénico pueden iniciarse partiendo de diversos explantes de tejidos del camote, como las anteras (Tsai y Tseng, 1979), las puntas de brote (Jarret et al., 1984), y los explantes de raíz y de pecíolo (Liu y Cantliffe, 1984). La propagación del camote en grandes cantidades, mediante la embriogénesis somática, puede facilitar el desarrollo de técnicas mecánicas (Kitto y Janick, 1985) que permitirían la siembra directa de este cultivo a diferencia de la propagación vegetativa convencional. El protocolo que aparece a continuación se ha tomado de Jarret et al. (1984) y de Liu y Cantliffe (1984).

1) Empiece los cultivos de las puntas de brote, como se describió en la sección A (**Cultivo de meristemas**), con un explante más grande (2-5 primordios foliares). Incube estos cultivos a 26-28 °C, bajo una iluminación de 1000 lux, con un fotoperíodo de 16 horas. Dos a cuatro semanas después de la inoculación, las hojas bien expandidas (10-15 mm de longitud) y las puntas de los brotes se cosechan como explantes primarios.

   Alternativamente, explantes de puntas de brote y de segmentos de tallo se obtienen de plantas en buen estado fitosanitario que se hayan conservado en el invernadero o en la cámara de crecimiento. Se cosecha tanto la parte de los tallos basales de los ápices de los brotes (10-15 cm de longitud) como las yemas apicales y axilares. Se esterilizan superficialmente con hipoclorito de sodio (0.5%) o con blanqueador comercial al 10% durante 10-15 minutos, y se enjuagan tres veces en agua destilada estéril.

2) Corte las hojas perpendicularmente a la nervadura central, en listas de 2 mm de ancho. Deje el margen foliar intacto. Coloque cortes individuales en el medio de inducción del callo, con la superficie adaxial en contacto con el medio.

3) Utilice un microscopio de disección para recortar los explantes de las puntas de brote hasta una longitud de 2-3 mm, y trasládelos al medio de inducción del callo.

Digitized by Google

4) Recorte y descarte los extremos de los segmentos internodales de tallo para remover el tejido dañado por el procedimiento de esterilización. Corte el resto en segmentos de 5 mm. Trasládelos al medio de cultivo.

5) Cuando sea evidente la formación de embriones globulares y acorazonados, trasfiera el callo con los embriones al medio basal desprovisto de hormonas para que continúe su desarrollo y germine.

6) Al llegar a su madurez, los embriones individuales pueden retirarse del callo y cultivarse de nuevo en un medio basal fresco para promover su crecimiento adicional.

Medio de cultivo. El callo embriogénico se inicia en un medio basal modificado MS que contiene los compuestos inorgánicos MS y los siguientes (en mg/litro): i-inositol (100), tiamina-HCl (0.4), sacarosa (60,000), y agar (7000); está complementado además con 2,4-D (0.5-3.0 mg/litro) y su pH es de 5.8. Los cultivos se incuban a 25-28 °C, en un fotoperíodo de 16 horas y con una iluminación de 1000 lux.

En el período de 2 a 4 semanas después de iniciado el cultivo, dos tipos de callo serán evidentes. El primero es de un color amarillo mate, friable, que no es embriogénico. El segundo tiene un color que va de pálido a amarillo brillante, es muy compacto y liso; este callo producirá embriones somáticos bajo un régimen hormonal apropiado. La iniciación del callo embriogénico es altamente dependiente de la concentración de 2,4-D, del genotipo, y de la fuente del tejido.

El desarrollo del embrión somático cesa en la etapa denominada corazón-torpedo, en presencia de 2,4-D. Por tanto, a medida que los embriones en desarrollo se vuelven evidentes, el callo y los embriones somáticos deberán trasferirse al medio basal sin 2,4-D y mantenerse en las mismas condiciones de luz y temperatura establecidas en los cultivos de callo.

Referencias

Alconero, R.; Santiago, A. G.; Morales F. y Rodríguez, F. 1975. Meristem tip culture and virus indexing of sweet potatoes. Phytopathology 65:769-773.

Antoni, H. J. y Folquer, F. 1975. Cultivo *in vitro* de tejidos de batata *Ipomoea batatas* (L.) Lam. para la producción de nuevos cultivares. Rev. Agrom. N.O. Argent. 12:176-178.

Digitized by Google

Austin, D. F. 1978. The *Ipomoea batatas* complex; I: Taxonomy. Bull. Torrey Bot. Club. 105:114-129.

Bidney, D. L. y Shepard, J. F. 1980. Colony development from sweet potato petiole protoplasts and mesophyll cells. Plant Sci. Lett. 18:335-342.

Blayde, D. F. 1966. Interaction of kinetin and various inhibitors in the growth of soybean tissue. Physiol. Plant. 19:748-753.

Bouwkamp, J. C. (ed.). 1985. Sweet potato products: A natural resource for the tropics. CRC Press, Boca Ratón, Florida, E.U.

Brettell, R. I. S.; Dennis, E. S.; Scowcroft, W. R. y Peacock, W. J. 1986. Molecular analysis of a somaclonal mutant of maize alcohol dehydrogenase. Mol. Gen. Genet. 202:235-239.

Carswell, G. y Locy, R. D. 1984. Root and shoot initiation by leaf, stem and storage root explants of sweet potato. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 3:229-236.

Edmond, J. B. 1971. Sweet potatoes: Production, processing, marketing. En: Bassett, M. J. (ed.). Breeding vegetable crops. AVI Publ., Westport, CT, E.U.

Eilers, R. J.; Sullivan, J. G.; Skirvin, R. M. y Smith, M. A. L. 1986. Growth regulator and media component interactions in sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.) protoplast culture. HortScience 21:850. (Resumen.)

Elliot, R. F. 1969. Growth of excised meristem tips of kumura, *Ipomoea batatas* (L.) Poir., in axenic culture. N. Z. J. Bot. 7:158-166.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 1984. FAO production yearbook for 1983. Roma, Italia.

Gunckel, J. E.; Sharp, W. R.; Williams, B. W.; West, W. C. y Drinkwater, W. O. 1972. Root and shoot initiation in sweet potato explants as related to polarity and nutrient media variation. Bot. Gaz. 133:254-262.

Heller, R. 1953. Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés in vitro. Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Veg. (París) 14:1-223.

Henderson, J. H. M.; Phillips, B. R. y Wheatley, B. T. 1984. Sweet potato. En: Sharp, W. R.; Evans, D. A.; Ammirato, P. V. y Yamada, Y. (eds.). Handbook of plant cell culture. MacMillan Publishing, Nueva York. v. 2, p. 303-326.

Hernández, T. P.; Mikell, J. J.; Hernández, T. y Fontenot, J. F. 1956. Mutations, a means of improving sweet potato varieties. Proc. Assoc. South. Agric. Work. 53:175.

Hildebrand, E. M. 1957. Freeing sweet potato varieties by propagation with tip cuttings. Phytopathology 47:452. (Resumen.)

Digitized by Google

———. 1964. Heat treatment for eliminating internal cork viruses from sweet potato plants. Plant Dis. Rep. 48:356-358.

——— y Brierley, P. 1960. Heat treatment eliminates yellow dwarf virus from sweet potatoes. Plant Dis. Rep. 44:707-709.

Holmes, F. O. 1956. Elimination of foliage spotting from sweet potatoes. Phytopathology 46:502-504.

Hwang, L. S.; Skirvin, R. M.; Casyao, J. y Bouwkamp, J. 1983. Adventitious shoot formation from sections of sweet potato grown in vitro. Scient. Hortic. 20:119-129.

Jarret, R. L.; Salazar, S. y Fernández Z., R. 1984. Somatic embryogenesis in sweet potato. HortScience 19:397-398.

Jones, A. 1965. Cytological observations and fertility measurements of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.]. Proc. Am. Soc. Hort. Sci. 86:527-537.

———. 1968. Chromosome numbers in *Ipomoea* and related genera. J. Hered. 59:99-102.

———. 1980. Sweet potato. En: Fehr, W. R. y Hadley, H. (eds.). Hybridization of crop plants. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, E.U. p. 645-653.

———; Dukes, P. D. y Schalk, J. M. 1986. Sweet potato breeding. En: Bassett, M. J. (ed.). Breeding vegetable crops. AVI Publ., Westport, CT, E.U. p. 1-35.

Kitto, S. L. y Janick, J. 1985. Production of synthetic seeds by encapsulating asexual embryos of carrot. J. Am. Soc. Hort. Sci. 110:277-282.

Kobayashi, M. y Shikata, S. 1975. Anther culture and development of plantlets in sweet potato. Bull. Chugoku Agric. Exp. Stn., Serie A 24:109-124.

Kuo, C. G.; Shen, B. J.; Shen, M. J.; Green, S. K. y Lee, D. R. 1985. Virus-free sweet potato storage roots derived from meristem-tip and leaf cuttings. Sci. Hortic. 26:231-240.

Larkin, P. J. y Scowcroft, W. R. 1981. Somaclonal variation: A novel source of variability from cell cultures for plant improvement. Theor. Appl. Genet. 60:197-214.

Liao, C. -H. y Chung, M. -L. 1979. Shoot tip culture and virus indexing in sweet potato. J. Agric. Res. China. 28:139-144.

Litz, R. E. y Conover, R. A. 1978. In vitro propagation of sweet potato. HortScience 13:659-660.

Liu, J. R. y Cantliffe, R. D. 1984. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in tissue cultures of sweet potato (*Ipomoea batatas* Poir.). Plant Cell Reports 3:112-115.

Digitized by Google

Love, S. L.; Rhodes, B. B. y Moyer, J. W. 1986. Meristem culture and virus indexing of sweet potatoes: A manual of techniques. International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR), Roma.

Mori, K. 1971. Production of virus-free plants by means of meristem culture. Jap. Agric. Res. Quart. 6:1-7.

Moyer, J. W. y Collins, W. W. 1983. 'Scarlet' sweet potato. HortScience 18:111-112.

Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15:473-497.

Nakamura, Y.; Ikeda, Y.; Ebihara, N. y Tabuchi, K. 1981. Inhibition of growth of callus cells by degradation products of dehydroascorbic acid. Agric. Biol. Chem. 45:759-760.

Nielsen, L. W. 1960. Elimination of the internal cork virus by culturing apical meristems of infected sweetpotatoes. Phytopathology 50(11):840-841.

Nishiyama, I.; Miyazaki, T. y Sakamoto, S. 1975. Evolutionary autoploidy in the sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] and its progenitors. Euphytica 24:197-208.

Oba, K. y Uritani, I. 1979. Biosynthesis of furano-terpenes by sweet potato cell cultures. Plant Cell Physiol. 20:819-826.

Over de Linden, A. J. y Elliot, R. E. 1971. Virus infection in *Ipomoea batatas* and a method for its elimination. N. Z. J. Agr. Res. 14:720-724.

Owens, R. A. y Diener, T. O. 1981. Sensitive and rapid diagnosis of potato spindle tuber viroid disease by nucleic acid hybridization. Science 213:670-672.

Sasaki, T.; Takodoro, K. y Suzuki, S. 1972. The distribution of glucose phosphate isomerase isoenzymes in sweet potato and its tissue culture. Biochem. J. 129:789-791.

Seghal, C. B. 1975. Hormonal control of differentiation in leaf cultures of *Ipomoea batatas* Poir. Beitr. Biol. Pflanzen. 51:47-52.

———. 1978. Regeneration of plants from anther cultures of sweet potato (*Ipomoea batatas* Poir). Z. Pflanzenphysiol. 88:349-352.

Templeton-Somers, K. M. y Collins, W. W. 1986. Heritability of regeneration in tissue cultures of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). Theor. Appl. Genet. 71:835-841.

Tsai, H. S. y Lin, C. I. 1973a. The growth of callus induced from in vitro cultures of sweet potato anther. J. Agr. Assoc. China. 81:12-19.

Digitized by Google

——— y ———. 1973b. Effects of the composition of culture media and cultural conditions on growth of callus of sweet potato anther. J. Agr. Assoc. China. 82:30-41.

——— y Tseng, M. -T. 1979. Embryoid formation and plantlet regeneration from anther callus of sweet potato. Bot. Bull. Acad. Sin. 20:117-122.

Veliky, I. A.; Rose, D. y Zink, M. W. 1976. Uptake of magnesium by suspension cultures of plant cells (*Ipomoea* spp.). Can. J. Bot. 55:1143-1147.

White, P. R. 1963. The cultivation of animal and plant cells. 2nd. ed. Ronald Press, Nueva York. 228 p.

Wu, Y. W. y Ma, T. P. 1979. Isolation, culture and callus formation from *Ipomoea batatas* protoplasts. Acta Bot. Sin. 21:334-338.

Yamaguchi, T. y Nakajima, T. 1972. Effect of abscissic acid on adventitious bud formation from cultured tissues of sweet potato. Crop. Sci. Soc. Jpn. Proc. 41:531-532.

——— y ———. 1974. Hormonal regulation of organ formation in cultured tissue derived from root tuber of sweet potato. En: Proceedings of the Eigth International Congress on Plant Growth Substances. p. 1121-1127.

Yoshida, F.; Kawaka, K. y Takaka, K. 1970. Functions of calcium and magnesium on ion absorption by cultured free cells of tobacco and sweet potato. Bull. Fac. Agric. Tamagawa Univ. 10:13-27.

Zink, M. W. 1980. Acid phosphatases of *Ipomoea* sp. cultured in vitro; 2: Influence of gibberellic acid on the formation of phosphatases. Can. J. Bot. 58: 2171-2180.

——— y Veliky, I. A. 1977. Nitrogen assimilation and regulation of nitrate and nitrite reductase in cultured *Ipomoea* cells. Can. J. Bot. 55:1557-1568.

——— y ———. 1979. Phosphatases of *Ipomoea* sp. cultured in vitro; 1: Influence of pH and inorganic phosphate on the formation of phosphatases. Can. J. Bot. 57:739-763.

Digitized by Google

Capítulo 19

Cultivo de tejidos para la producción de semilla básica de papa

L. Lago Castro*

* Instituto de Biotecnología de Plantas, CIGB, La Habana, Cuba.

Digitized by Google

Introducción

La papa, introducida de América en Europa en 1580, y posteriormente diseminada por el mundo, constituye uno de los cultivos de mayor importancia mundial. Ocupa el cuarto lugar en el mundo entre los 10 principales cultivos, y su producción anual asciende a más de 200 millones de toneladas.

La papa ha recibido intensamente la influencia de los avances científicos y técnicos, y ha sido mejorada en aspectos como el rendimiento y la calidad, la mecanización del cultivo, la resistencia a plagas y enfermedades, y la conservación e industrialización. Es uno de los cultivos cuyo paquete tecnológico favorece mucho la producción de alimentos.

Seleccionada y mejorada por los países desarrollados, la papa regresa a su lugar de origen; como producto mejorado, condiciona a muchos países a importar material de siembra y depender así de los mercados desarrollados.

A pesar de la investigación que se hace en el cultivo de la papa, la producción de su 'semilla' es una actividad que debe evolucionar hacia técnicas más eficientes. El objetivo fundamental es producir un material de siembra con alto grado de pureza varietal y de calidad fitosanitaria. La papa es uno de los cultivos con más requerimientos tecnológicos para la producción de semilla porque está expuesto al ataque de organismos patógenos como hongos, bacterias y virus. Algunos de estos patógenos habitan en el suelo y afectan los rendimientos del cultivo; otros son trasportados por el aire o por otros medios y causan epifitotias que deben controlarse aplicando productos de control químico. De esos organismos, los más importantes son los causantes de enfermedades virales porque se perpetúan en la descendencia clonal.

El esquema de la Figura 19.1 es un ordenamiento de la producción de semilla en clases o categorías que se refieren a los niveles permisibles de enfermedades o plagas; éstas causan la degeneración del material y su rechazo como semilla para la siembra.

El tubérculo de la papa se considera como la semilla unitaria tradicional, y su calidad refleja las condiciones en que se ha desarrollado el cultivo incluyendo su estado fitosanitario.

A cada categoría del esquema se asigna un porcentaje permisible de hongos, bacterias y virus. La categoría de semilla básica (SB) es el eslabón

Digitized by Google

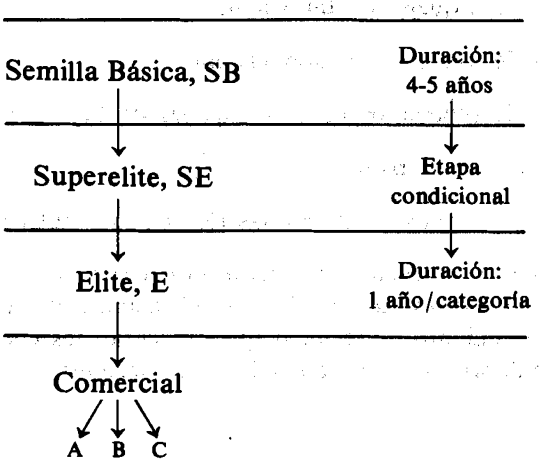


Figura 19.1. Categorías en que se ordena la producción de 'semilla' de papa en Cuba.

inicial de todo el esquema y, por tanto, debe producirse libre de enfermedades que afecten o limiten las ulteriores multiplicaciones del material de siembra.

En muchos países, la imposibilidad de producir semilla básica de modo estable ha incrementado la importación de ésta en cantidades significativas. En posteriores multiplicaciones, esos países han alcanzado niveles de producción estables y adecuados. La importación y la manipulación de grandes volúmenes de semilla trae consigo la introducción y el establecimiento de plagas y enfermedades. Es necesario pues desarrollar métodos avanzados de producción de semilla en aquellos países donde, además de importar esa semilla, haya focos de infección viral todo el año y tengan esquemas de producción de semilla de hasta 10 años.

Multiplicación de Material Libre de Virus

La necesidad de aumentar las tasas de multiplicación de semilla o de incrementar simplemente el número de tubérculos ha motivado la creación de sistemas de multiplicación de la papa, como los siguientes:

- Corte de tubérculos.
- Producción de esquejes de brotes de tubérculos.

Digitized by Google

- Producción de esquejes de tallo adulto.
- Producción de esquejes de tallo juvenil.
- Producción de tubérculos usando esquejes de hoja-yema.
- Doble cosecha de la papa.
- Multiplicación in vitro mediante las técnicas del cultivo de tejidos.

El desarrollo de estas técnicas ha traído el uso frecuente de la expresión 'multiplicación rápida o acelerada'. La multiplicación acelerada de la papa se refiere a un conjunto de técnicas que aumentan los coeficientes de multiplicación de semilla básica a niveles no alcanzados por los métodos tradicionales.

Saneamiento de variedades

A diferencia de las enfermedades causadas por hongos, aquellas causadas por virus no pueden ser controladas químicamente, ya que los virus y viroides utilizan el metabolismo de la planta para su reproducción. Una vez que una planta adquiere la enfermedad viral, ésta se trasmite de una generación vegetativa a otra.

Los métodos terapéuticos (termoterapia o quimioterapia) contribuyen al saneamiento de las plantas cuando se utilizan asociados con el cultivo de tejidos in vitro. El éxito de estas metodologías depende del virus que se desee eliminar y de la variedad de papa. El concepto de plantas 'libres de virus' es válido solamente cuando se especifica el virus, o la enfermedad viral, que haya sido detectado usando técnicas virológicas efectivas; por este motivo, el concepto de plantas 'probadas para virus' es más apropiado.

Cultivo de Meristemas de Papa

Ha sido demostrado que los puntos de crecimiento de brotes y raíces de plantas infectadas con algún virus están libres de él o lo llevan solamente en concentraciones muy bajas (Kassanis, 1957).

Morel fue el primero en demostrar que podían obtenerse, mediante el cultivo de meristemas, plantas de papa libres de virus a partir de plantas infectadas. En la planta, porciones de tejido con capacidad embrionaria persisten durante toda su vida; estos tejidos perpetuamente jóvenes son los meristemas.

Digitized by Google

El cultivo de meristemas in vitro puede usarse para producir plantas libres de patógenos a partir de una planta que esté sistémicamente infectada ya sea por micoplasmas (Jacoli, 1978; Fedotina y Krilova, 1976), hongos, o bacterias. Diversos autores han publicado trabajos sobre este tema relacionados con la papa (Kassanis, 1957; Lizárraga et al., 1983). Esta técnica se trata más detalladamente en el Capítulo 2.

El resultado final del trabajo de saneamiento debe comprobarse mediante técnicas precisas de diagnóstico para virus y otros patógenos. De esta manera, el proceso de saneamiento incluye cuatro pasos importantes:

- Identificación del virus.
- Aplicación de las técnicas de eliminación.
- Pruebas de las plantas regeneradas.
- Propagación de las plantas sanas.

Pruebas para la Detección de Patógenos

Durante muchos años, la selección de plantas aparentemente sanas para la producción de semillas estuvo basada en la simple observación de las enfermedades en el campo y, en algunos casos, en técnicas de diagnóstico poco sensibles.

La introducción de la técnica ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) ha mejorado considerablemente la detección y el diagnóstico de enfermedades virales de la papa en los últimos 5 años. En consecuencia, los métodos de detección de virus como el A_6, el Igel-Lange o las pruebas serológicas básicas (aglutinación, microprecipitación, difusión radial, o procedimientos de látex) han sido remplazados por la técnica ELISA. Detalles de esta técnica han sido descritos por diversos autores (Clark y Adams, 1977; Gugerli, 1979; 1980; Salazar, 1982) y se presentan en los Capítulos 10 y 36.

La técnica ELISA ha revolucionado la solución de los problemas prácticos del diagnóstico de enfermedades virales en el cultivo de la papa, por su precisión y por el grado de automatización con que se puede realizar. Su eficiencia se basa en la alta especificidad de la preparación de los anticuerpos requeridos. La introducción de anticuerpos monoclonales altamente específicos para el virus de la papa (PVY) (Gugerli y Fries, 1981; 1983) mejoró considerablemente la sensibilidad de ELISA. Igualmente, la automatización del proceso ha permitido probar hasta 10,000 muestras de

Digitized by Google

tubérculos por día, usando equipos especiales combinados con un elevador automático de placas, con dispensadores y con espectrofotómetros. Con las computadoras, finalmente, se obtendrá un máximo beneficio de esta técnica.

La observación cuidadosa de las plantas de papa en el campo y en los invernaderos, así como la verificación regular de su estado sanitario mediante la microscopía electrónica, seguirán complementando cualquier tecnología nueva. Los métodos más sensibles, como ELISA, pueden usarse dentro de esquemas de micropropagación in vitro.

Algunos laboratorios determinan el estado fitosanitario de sus líneas de cultivo in vitro dejando, al momento de micropropagar, los dos microesquejes basales para observación en el microscopio electrónico. Esta operación se realiza durante tres ciclos de micropropagación. Sin embargo, el orden lógico de aplicación de las pruebas de detección de virus asociadas a la micropropagación podría ser:

1) Microscopio electrónico.

2) ELISA.

3) Electroforesis o técnicas de hibridación de ácidos nucleicos; p. ej., para el viroide del tubérculo ahusado de la papa (PSTV), si estuviera presente.

4) Plantas indicadoras.

En algunos casos, el material obtenido in vitro no será suficiente; deberá pues sembrarse en macetas para multiplicarlo y realizar todas las pruebas necesarias, aumentando así la certeza del estado sanitario de las variedades de papa.

Colección de Semilla Básica de Papa Libre de Enfermedades

Casi todas las colecciones de papa se conservan con métodos tradicionales, es decir, se siembran en áreas en las cuales se corre el riesgo de que contraigan reinfecciones. La mayor parte de estos materiales pueden contaminarse con uno o más virus, ya que es prácticamente imposible mantener en el campo un cultivo en condiciones óptimas de sanidad.

El cultivo de tejidos ofrece una alternativa para el mantenimiento de variedades de papa libres de enfermedades. Aplicando estas técnicas de

Digitized by Google

cultivo, el Centro Internacional de la Papa (CIP) en Lima, Perú, ha reunido una colección in vitro de alrededor de 500 clones.

De las varias metodologías que pueden aplicarse para el mantenimiento in vitro de la papa, se pueden citar:

- Criopreservación.
- Método de callos secados.
- Métodos de crecimiento limitado.

Los Capítulos 31 y 32 tratan sobre los métodos de conservación de germoplasma in vitro. El método de congelación rápida ha sido aplicado a la papa por Bajaj (1981) con yemas axilares y 10% de DMSO (dimetilsulfóxido) como crioprotector; la técnica de los callos secados fue usada por Nitzsche (1983) en una línea de papa.

Roca et al. (1978) han señalado que el mantenimiento in vitro en condiciones de crecimiento normal es una labor intensiva, ya que las 'microestacas' deben ser trasferidas a un medio fresco y regeneradas como planta nueva cada 2 ó 3 meses. Por tal razón se han propuesto diferentes formas de reducir la frecuencia de trasferencia de los cultivos (Westcott et al., 1977; Schilde-Rentschler, 1979). Estrada et al. (1983) informan que la colección de clones de papa del CIP ha estado almacenada in vitro, sin ninguna trasferencia, durante un año, a 22-25 °C, con 3000 lux de iluminación y con 16 h de fotoperíodo, en un medio que contenía 4% de manitol y 0.5% de sacarosa. Roca (1981) ha señalado que un cuarto dedicado a banco de germoplasma con temperatura controlada, iluminación, estantes apropiados, y con dimensiones de 5 x 6 x 2.5 m, tiene una capacidad para el almacenamiento de 20,000 tubos de ensayo con cultivos de meristemas de yuca (*Manihot esculenta*).

Semilla Básica de Papa y Cultivo de Tejidos

Después del éxito de Morel (1965) en la multiplicación de orquídeas in vitro, se ha incrementado el interés por las técnicas de cultivo de tejidos como alternativa para la propagación asexual de plantas de importancia económica.

Las partes de la planta empleadas por esta técnica son tan pequeñas, que han propiciado el uso del término micropropagación. Esta técnica tiene las siguientes ventajas:

Digitized by Google

- Producción de millones de plantas en un año.
- Intercambio internacional de material, reduciendo o eliminando los riesgos de diseminación de patógenos.
- Aplicación de la técnica en cualquier época del año.

Organizar la producción de semilla básica de papa empleando el cultivo de tejidos exige ponderar la importancia de los siguientes aspectos: la producción a nivel regional o nacional; los recursos económicos existentes; los recursos técnicos de que se disponga; el nivel mínimo de conocimientos y de destreza en esas técnicas de cultivo. No se trata simplemente de introducir la tecnología, sino más bien de adecuarla a las condiciones concretas de la institución, la región o el país.

Varios países (Francia, Viet Nam, Hungría, Unión de Repúblicas Socialistas Soviéticas, Cuba, Perú) han incorporado una etapa de cultivo de tejidos a los esquemas de producción de semilla básica de papa. Viet Nam (desde 1984) y la Unión de Repúblicas Socialistas Soviéticas (desde 1976) utilizan la micropropagación in vitro en ese proceso (Cuadros 19.1 y 19.2).

Hay cuatro fases importantes en la producción de semilla básica de papa mediante la técnica del cultivo de tejidos, cada una de las cuales se explicará detalladamente:

Fase I	Multiplicación de material libre de patógenos usando técnicas in vitro.
Fase II	Multiplicación intermedia en recipientes de mayor capacidad.
Fase III	Multiplicación en suelo enriquecido.
Fase IV	Producción de tubérculos pequeños en suelo tratado.

Fase I: **Multiplicación del material in vitro**

En esta fase, las plantas, colocadas en tubos de ensayo u otros recipientes, se subcultivan por medio de segmentos de nudos a una tasa de multiplicación muy alta.

Materiales

Para la micropropagación de la papa pueden usarse, como material inicial, las plántulas obtenidas por cultivo de meristemas o las yemas de los tubérculos que han demostrado estar libres de enfermedades virales.

Digitized by Google

Cuadro 19.1. Proceso de multiplicación rápida de la papa utilizado por los agricultores de Dalat, Viet Nam.

Etapa	Tasa de multiplicación	Resultado	Descripción
1	1/1	Una plántula	Desarrollada en tubo de ensayo; proviene de la estación experimental; multiplicada dos veces en un período de 2 meses produjo 5 esquejes por tubo.
2	25/1	Plántulas	Desarrolladas en tubos de ensayo; período de crecimiento: 1 mes.
3	100/1	Esquejes de tallo juvenil	Provienen de las plántulas ya enraizadas; plantados en una mezcla de suelo y abono, en almácigos, con una densidad de 2500/m² (4 esquejes/tubo); recolectados semanalmente durante 2 meses.
4	1000/1	Esquejes de yema apical	Enraizan en sustrato de suelo con abono plantados en almácigos, con una densidad de 2500/m²
5	10,000/1	Esquejes de yema apical	Enraizan en macetas de hoja de plátano; trasplantados al campo después de 15 ó 20 días para producción comercial.
6		Tubérculos	Los de mayor tamaño se utilizan para consumo, los de tamaño pequeño, como semilla para continuar la multiplicación.

FUENTE: Nguyen Van Uyen, 1984.

Cuadro 19.2. Proceso para la producción de semilla básica de papa en la Unión de Repúblicas Socialistas Soviéticas.

Año	Descripción de la etapa
1	Laboratorio de saneamiento Después del trabajo de saneamiento y micropropagación, sembrar en invernaderos 10,000 plantas libres de virus para producir 60,000 tubérculos.
2	Estación de multiplicación En condiciones de aislamiento, sembrar 60,000 tubérculos, para cosechar y guardar en bolsas 40,000 clones.
3	Empresas especializadas Parcelas de ensayo de primer año (40,000 en 10 ha).
4	Producción de semilla básica Parcelas de ensayo de clones de segundo año (24,000 clones en 30 ha; se cosechan 300 t de papa).

FUENTE: Trofimez, 1976.

Digitized by Google

Yemas de tubérculos. El material seleccionado debe desinfestarse pasándolo por alcohol de 70% y colocándolo luego en una solución de hipoclorito de calcio al 0.5% durante 5 a 10 minutos, según su tamaño. Se enjuaga luego tres veces con agua destilada estéril en un área a prueba de contaminaciones.

Las yemas de tubérculos dan origen a tallos vigorosos y a hojas relativamente grandes, en algunos casos compuestas; ambas estructuras son similares a las de las plantas adultas. Después de varias multiplicaciones (una por mes) las plantas desarrollan un tallo con hojas simples de tamaño variable. Este proceso puede experimentar modificaciones según la variedad de papa y el estado de incubación de los tubérculos. Por ejemplo, en las variedades Bintje y BF-15, el estado juvenil se presenta entre la segunda y la cuarta multiplicación, cuando se parte de tubérculos almacenados a 20 °C durante 30 a 90 días desde la cosecha. Así pues, partiendo de una yema de una planta adulta sembrada in vitro, y después de varias multiplicaciones en las condiciones mencionadas, ocurre un proceso de rejuvenecimiento del material.

Algunas formas de tallos juveniles encontradas in vitro poseen pequeños tubérculos que resultan del trauma producido cuando se cortan los esquejes de plántulas en edad fisiológica avanzada.

Plántulas derivadas de meristemas. La disección de meristemas necesita de un microscopio estereoscópico; en la medida en que se usen prácticas sanitarias estrictas en la ejecución de las operaciones aquí descritas, el éxito estará garantizado. Las cabinas de flujo laminar ayudan a prevenir contaminaciones, pero el alto costo de ese equipo puede limitar el desarrollo del trabajo. En Viet Nam se observó que los propios agricultores construían cámaras de trasferencia para aplicar en sus casas las técnicas de micropropagación por segmentos de tallo (nudos). Estos resultados abren nuevas posibilidades a los productores.

Las condiciones para el cultivo de meristemas son: temperatura de 20 ± 1 °C, fotoperíodo de 16 horas, e iluminación de 12,000 a 13,000 lux.

El estado juvenil de las plántulas micropropagadas depende, en cierta medida, de las condiciones del cultivo. Alteraciones de estos parámetros han causado la pérdida del estado juvenil, expresada en la aparición de hojas compuestas o en la formación de tuberculillos.

Medios de cultivo. Se conocen diversos medios de cultivo; sin embargo, el medio de Murashige y Skoog (1962), con algunas modificaciones, es uno de los más exitosamente usados (Cuadro 19.3).

Digitized by Google

Cuadro 19.3. Algunas modificaciones hechas a los componentes del medio de Murashige-Skoog (MS) utilizado para el cultivo in vitro de meristemas y de microesquejes de papa.

Componentes	MS estándar	Modificación[a] para: Meristemas	Modificación[a] para: Microesquejes	Medio de White
Macroelementos (mg/litro)				
NH_4NO_3	1650	1650	1250	—
KNO_3	1900	1900	1100	80
$CaCl_2.2H_2O$	440	400	—	—
$Ca(NO_3)_2$	—	—	307	200
$MgSO_4.7H_2O$	370	370	770	739
KCl	—	—	—	65
KH_2PO_4	170	170	970	—
NaH_2PO_4	—	—	—	200
Na_2EDTA	37.3	37.8	37.8	—
$FeSO_4.7H_2O$	27.8	—	—	—
$Fe_2(SO_4)_3.6H_2O$	—	50.8	50.8	2.5
Microelementos (mg/litro)				
H_3BO_3	6.2	6.2	6.2	1.5
$MnSO_4.4H_2O$	22.3	22.3	22.3	4.5
$ZnSO_4.4H_2O$	8.6	8.6	8.6	1.5
KI	0.83	0.83	0.83	0.75
$CuSO_4.5H_2O$	0.025	0.025	0.025	—
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25	0.25	0.25	—
$CoCl_2.6H_2O$	0.025	0.025	0.025	—
Vitaminas (mg/litro)				
Mesoinositol	100	—	—	—
Acido nicotínico	0.5	—	—	0.5
Piridoxina	0.5	1.0	1.0	0.1
Tiamina	0.1	1.6	0.1	0.1
Acido ascórbico	—	3.0	3.0	—
Sacarosa	30,000	20,000	10,000	20,000
Hidrolizado de caseína	1000	—	—	—
Glicina	—	—	—	3.0
Reguladores del crecimiento (mg/litro)				
GA_3	1.0	2.0	3.0	—
Kinetina	0.01	0.5	0.25	—
AIA	2.0	—	—	—
Adenina	—	0.5	0.25	—
8-Dihidroxiquinona	—	—	—	—
Acido clorogénico	—	—	0.1	—
Agar	10,000	7000	7000	7000

a. Modificación del medio MS hecha por el Instituto de la Papa de Ucrania, URSS.

FUENTE: Trofimez, 1976.

Digitized by Google

Otro medio utilizado es el de Knop en el cual se han desarrollado variedades de papa como Desiree, Baraka y Mariella. La composición de los medios se modifica dependiendo del tejido que se cultiva (Cuadro 19.3).

En el Programa Cubano de Semilla de Papa se ha utilizado de modo general, para la micropropagación de papa, el medio A derivado del medio de Knop. Sus componentes son los siguientes:

Macroelementos: se toman de la solución base para el medio Knop diluida a la mitad, pero empleando cinco veces más potasio.

Microelementos: se toman de la solución base para el medio Berthelot.

Producción de tubérculos in vitro

Esta técnica, así como la formación acelerada de yemas axilares, es de capital importancia en la micropropagación de la papa. La tuberización in vitro ofrece las siguientes ventajas:

- Se obtienen tubérculos en cualquier estación del año.
- Es posible almacenarlos en pequeño espacio.
- Sirven de material de partida para programas que carecen de infraestructura adecuada, y de experiencia en cultivo de tejidos.
- Sirven para siembras tempranas en campo, permitiendo así un escalonamiento de la producción.
- Se pueden trasportar más fácilmente que las plántulas en tubos de ensayo.

El CIP ha desarrollado investigaciones para inducir tubérculos in vitro en un rango amplio de genotipos de papa. Pudo constatarse que se indujo la formación de tubérculos en todos los genotipos probados. En promedio, una de 10 yemas axilares de plántulas cultivadas in vitro desarrolló estolones con pequeños tubérculos en sus extremos. Cada tubérculo pesaba entre 3 y 38 mg, tenía dos o más ojos y expresaba, aun siendo de tamaño pequeño, caracteres como el color y la forma.

Protocolos para la multiplicación in vitro

1. *Producción de tubérculos in vitro*

   a) Coloque brotes axilares 'cosechados in vitro' en un medio MS con 22.0 a 44.0 µM de BA y 0.23 M de sacarosa, en un Erlenmeyer de 300 a 500 ml.

Digitized by Google

b) Incube, a una temperatura de 18 a 20 °C, con un fotoperíodo de 8 horas, y con 100 a 500 lux de intensidad lumínica.

c) En un lapso de 4 meses se obtienen de 30 a 50 tubérculos en miniatura de cada Erlenmeyer (Hu y Wang, 1983).

2. *Multiplicación por medio de nudos*

a) Estructure su programa de multiplicación partiendo de plantas obtenidas in vitro, ya sea de yemas de tubérculos libres de virus o de plántulas procedentes de meristemas.

b) Corte, de la planta obtenida in vitro, varias estacas de manera que cada una posea una hoja y una yema axilar.

c) Plante las estacas en un medio MS o Knop (diluido a la mitad y con 5 veces más KNO_3 por litro) y en condiciones de cultivo como las ya descritas.

d) Al cabo de un mes, repita sucesivamente los pasos b) y c).

e) Se obtiene, en estas condiciones, un ritmo de multiplicación de 5 a 7 estacas por mes.

3. *Formación acelerada de yemas axilares*

a) Trasfiera plántulas regeneradas a la superficie del medio sólido MS + 0.005 M de ANA, en un Erlenmeyer de 250 ml.

b) Observe que dos o tres brotes axilares, con raíces adventicias, se desarrollan en 20 días.

c) Manipule los nuevos brotes axilares desarrollados para que adopten una posición horizontal en la superficie del agar.

d) Repita el paso c) con un intervalo de 20 días, hasta obtener como resultado una masa de brotes axilares.

e) Coseche las yemas axilares con la ayuda de pinzas, y haga el subcultivo en un medio fresco.

f) Repita el paso e) con 20 días de intervalo, obteniendo el doble o el triple de proliferaciones por frasco (Hu y Wang, 1983).

Digitized by Google

Fase II: **Multiplicación intermedia en semiesterilidad**

La multiplicación in vitro de cualquier material ocurre en progresión geométrica. El ritmo de multiplicación in vitro de la papa puede ocurrir indefinidamente; sin embargo, factores de orden práctico limitan esta posibilidad. Además, las condiciones ambientales de las cámaras de cultivo posibilitan la ocurrencia del 'estado juvenil'. El paso de una planta desde un cultivo in vitro al campo requiere una etapa de transición o intermedia. "Los esquejes dejan de cultivarse en condiciones asépticas, lo que facilita las operaciones, conservando algunas ventajas del cultivo estéril en tubos, en particular, la protección contra las infecciones virales y la conservación en la fase juvenil" (Rossignol-Bancilhon y Nozeran, 1979).

Es posible desarrollar este sistema o fase intermedia en cajas de vidrio orgánico trasparentes (40 x 25 x 25 cm) que llevan arena hasta una altura de 5 a 7 cm. Las cajas están protegidas con una película de polietileno trasparente para evitar la deshidratación del material sembrado. Estas cajas se colocan en estantes iluminados, semejantes a los que se utilizan para colocar las gradillas con los tubos de ensayo empleados en la micropropagación in vitro. El sustrato que sirve de soporte para plantar esquejes de plántulas tiene importancia en el éxito del trasplante (Cuadro 19.4).

Cuando no hay arena apropiada, pueden ensayarse distintas combinaciones de arena y materia orgánica. Otro aspecto importante es la densidad de la población: la distancia de 'siembra' más utilizada es de 2.5 x 2.5 cm. Variaciones en la densidad de siembra pueden influir en la calidad del material obtenido (Cuadro 19.5). El tamaño de las cajas puede variar según el objetivo del trabajo.

Cuadro 19.4. Influencia del sustrato en el crecimiento de plántulas de papa en cajas de vidrio.

Sustrato	Plantas sembradas (no.)	Aspecto de las plántulas[a]	Altura de las plántulas (mm)	Plántulas logradas (no.)	Enraizamiento[a]
Arena de cantera	209	B	41.6	200	MB
Arena de río	209	R	47.3	90	B

a. B = bueno; R = regular; MB = muy bueno. Los valores indicados son promedios del total de plantas sembradas en cada sustrato.

Digitized by Google

Cuadro 19.5. Influencia de la densidad de población en el desarrollo de plántulas de papa en cajas de vidrio.

Plantas ensayadas (no.)	Aspecto de las plántulas[a]	Altura (mm)	Entrenudos (no.)	Distancia entre los nudos (mm)	Plántulas logradas (no.)
209 plantas	R	27.5	4	11.0	195
80 plantas	B	24.4	3	10.0	80

a. R = regular; B = bueno. Los valores indicados son promedios.

Debe tenerse en cuenta que, en la fase intermedia, es posible la micropropagación de las plántulas. Inicialmente se creyó que la población de 209 plantas por caja era la ideal; más tarde, la práctica demostró que debía emplearse una densidad intermedia entre las dos ensayadas.

Para agilizar el procedimiento de 'siembra', se ha usado una plancha de material plástico cuyas dimensiones son menores, en 2.5 cm, que las del fondo de la caja, y lleva perforaciones separadas una de otra por una distancia igual a aquélla a que se plantan los esquejes. En los orificios se colocan tornillos pequeños que dan la profundidad de siembra requerida. Con este simple aditamento es posible hacer orificios de siembra uniformes, ahorrando tiempo y mano de obra, y asegurando la población prefijada.

En esta fase intermedia, las cajas requieren de riegos frecuentes con la solución de Knop (Cuadro 19.6). Aun cuando esta fase no exige la asepsia del cultivo in vitro, algunas medidas de limpieza (esterilización del sustrato, eliminación de las plántulas muertas) deben tomarse para garantizar el óptimo estado del material de siembra.

Fase III: **Multiplicación en suelo enriquecido o tratado**

Las plántulas obtenidas en la fase intermedia son frágiles y pequeñas, condición que limita su trasplante directo al campo. Se crea así la necesidad de otra fase que consiste[1] en el traslado de las plántulas a pequeños cubos de tierra comprimida y enriquecida (una mezcla de tierra, turba, arena y fertilizante), colocados en invernaderos húmedos, con temperaturas de 19 a 20 °C, y con una iluminación muy alta durante 18 horas.

1. Nozeran, L. N. Comunicación personal.

Digitized by Google

Cuadro 19.6. Influencia de la concentración de la solución nutritiva Knop en el agua de riego de plántulas de papa mantenidas en cajas de vidrio.[a]

Tratamiento de riego	Aspecto de las plántulas	Altura (mm)	Entrenudos (no.)	Distancia entre nudos (mm)
Agua sola; 10 días después regar con SK de conc. 1/5	R	21.6	2	8.6
Agua sola; 10 días después regar con SK de conc. 1/5	B	42.7	4	10.9
Regar durante todo el ciclo con SK de conc. 1/5	B	40.2	3	11.5
Regar durante todo el ciclo con SK de conc. 1/10	MB	37.0	4	10.3

a. R = regular; B = bueno; MB = muy bueno. SK = solución Knop; conc. = concentración. Los valores indicados son promedios.

De esta manera, gracias a la nutrición mineral suministrada en riegos frecuentes con la solución de Hoagland y a la iluminación alta, los pequeños esquejes se convierten rápidamente en plantas robustas, de hojas compuestas.

Como se ha explicado, el estado juvenil de las plántulas de papa permite utilizar más frecuentemente el material vegetal para la micropropagación; por otra parte, este estado puede extenderse o acortarse con las condiciones del cultivo in vitro. Ahora bien, una vez trasladadas las plántulas de la fase intermedia a la fase de suelo enriquecido, comienza a producirse la pérdida paulatina del estado juvenil que ha sido aprovechado hasta ahora.

El fotoperíodo largo (18 horas) a que se someten las plántulas retarda el proceso de tuberización. No debe olvidarse que, al final del proceso, serán llevadas al campo para que produzcan tubérculos.

Los vietnamitas han hallado una solución práctica para el paso de las plántulas a esta tercera fase. Con pedazos (10 x 5 cm) de una lámina de polietileno se elaboran pequeños cilindros que se rellenan con una mezcla de suelo (tierra:turba:arena:fertilizante) para que sirvan de soporte a los esquejes. Una vez sembradas las plantas en el campo, los cilindros de polietileno pueden reutilizarse. Otras soluciones, como la hoja de plátano enrollada, son factibles pero dependen en gran medida de las posibilidades económicas.

Digitized by Google

Hay máquinas de uso frecuente en horticultura que fabrican de 12 a 13 mil bloquecitos de tierra por hora; si se emplearan para plantar los esquejes, permitirían desarrollar más rápidamente la Fase III. El sistema completo consta de una mezcladora de suelo para alimentar la máquina, la máquina de producir bloquecitos, y las sembradoras de bloquecitos.

Otro aspecto que debe considerarse es la manipulación de los bloquecitos antes y después de la siembra. En Francia se producen y colocan en el suelo del invernadero; en Holanda hay máquinas autopropulsadas que producen los bloquecitos y los colocan directamente en el suelo, reduciendo así su manipulación.

Fase IV: **Producción de tubérculos**

La producción de semilla básica de papa requiere condiciones fitosanitarias estrictas. En ocasiones, es difícil encontrar lugares con una baja incidencia de áfidos o pulgones (vectores de enfermedades); por ello, la selección del lugar adecuado se hace crítica.

En el proyecto cubano se utilizó inicialmente la tecnología francesa que consiste en trasladar las plántulas al campo en los bloquecitos de suelo enriquecido, para obtener la cosecha de tubérculos. Dificultades prácticas se presentaron al manipular y trasportar el material vegetal hacia las áreas de siembra; esta operación, la siembra de plántulas, solía hacerse a mano. Asimismo, algunos aspectos agrotécnicos debían tenerse en cuenta, como la distancia de siembra, el tipo de siembra (surco o cantero), la aplicación de herbicidas selectivos, y otras labores culturales que serán diferentes para esquejes plantados en surcos o en camas (canteros). Estas consideraciones condujeron a una tecnología modificada.

Una alternativa que no debe descartarse es la producción de tubérculos pequeños en lugares más concentrados; una vez cosechados, esos tubérculos servirán como punto de partida para la producción de semilla básica. En Viet Nam, para evitar el trasporte de las plántulas hacia los agricultores, se puso en práctica la producción de tubérculos pequeños. En un suelo con poca fertilización y densamente sembrado, las plántulas forman pequeños tubérculos de un peso entre 30 y 60 g.

Con informaciones de Viet Nam, de Francia y del CIP se desarrolló la siguiente tecnología, basada en las condiciones reales de Cuba. Dentro de túneles de estructura metálica cubiertos con una malla contra pulgones, se construyen camas de 1 m de ancho x 30 m de largo, que contienen la mezcla de tierra descrita anteriormente. Las plántulas, densamente plantadas en

Digitized by Google

las camas (10 x 10 cm), pierden paulatinamente su estado juvenil; por ello es posible hacer propagaciones antes de que aparezcan las hojas compuestas y comience, por tanto, el proceso irreversible de la tuberización. Cuando su altura está cercana a los 10 cm, las plántulas se decapitan para estimular la formación de esquejes axilares que sirven, así como el ápice cortado, para obtener nuevas plantas. Este corte de esqueje puede realizarse a intervalos de unos 10 días, durante 10 semanas; de esta manera se eleva considerablemente la población de plántulas. Este material puede sembrarse en bloquecitos de suelo enriquecido que se trasladan al campo para su siembra.

Después de cada corte se aplica a las plántulas de las camas una pequeña dosis de fertilizante nitrogenado, para que se eleven los coeficientes de multiplicación. Finalizado el corte de esquejes en esas plántulas, se comienza el aporque con suelo enriquecido (de dos a tres veces) para conformar la cama donde se producirán los pequeños tubérculos. Se obtienen así hasta mil tubérculos pequeños por metro cuadrado.

El Cuadro 19.7 presenta un esquema para la producción de semilla básica de papa, empleando el cultivo de tejidos.

Organización de Centros de Micropropagación

Los métodos actuales del cultivo de tejidos pueden resolver los problemas de micropropagación de la papa y elevar sus coeficientes de multiplicación a niveles que no alcanzarían otras técnicas. Este hecho hace posibles los siguientes resultados: la obtención de millones de individuos para la producción de semilla de papa; el saneamiento de variedades contaminadas por enfermedades virales; el mantenimiento de un banco de variedades libres de enfermedades que servirían de punto de partida para el esquema de micropropagación.

El objetivo actual es la organización de centros especializados en estas técnicas de micropropagación. Países como Hungría, Viet Nam, Cuba, Unión de Repúblicas Socialistas Soviéticas, Francia y Perú emplean el cultivo de tejidos como una ayuda valiosa para la obtención de semilla básica de papa.

Digitized by Google

Cuadro 19.7. Esquema integral de producción de semilla básica de papa empleando el cultivo de tejidos.

Tasa de multiplicación	Descripción	Tiempo requerido (días)
Fase I	Multiplicación in vitro	
5	Tubos de ensayo	0
25	Tubos de ensayo	30
125	Tubos de ensayo	60
625	Tubos de ensayo	90
3125	Tubos de ensayo	120
Fase II	Fase intermedia	
2888	Tubos de ensayo	
x 3 =		
8664	Esquejes (120 cajas, 7 m²)	150
x 3 =		
25,992	Esquejes (361 cajas, 25 m²)	180
Fase III	Multiplicación en suelo enriquecido	
26,000	Esquejes en cajas	
x 3 =		
78,000	Esquejes	210
x 4 =		
312,000	Plántulas	240
Fase IV	Producción de tubérculos pequeños	
312,000	Plántulas sembradas	270
x 4 =		
1,250,000	Tubérculos[a]	80-90
1,250,000	Tubérculos conservados	
Siembra		
300 toneladas	Tubérculos	360

a. 4 tubérculos/planta.

El Cuadro 19.8 presenta el análisis económico de un esquema propuesto para producir esa semilla, fundado en la experiencia soviética. En él se comparan el sistema tradicional y un sistema que aplica el cultivo de tejidos, para producir 7.5 t de semilla básica.

Digitized by Google

Cuadro 19.8. Recursos de mano de obra y costo de la producción de 7500 t de semilla básica de papa en la URSS, en 1978.

Fases	Cantidad de material (miles)	Cantidad de material (miles t)	Empleo de Area (ha)	Empleo de Trabajo (hombres-día)	Costo Rublos (miles)	Costo US$ (miles)
Esquema tradicional						
Clones para selección	300		—	1.85	6.7	4.46
Clones de primer año	300		75	18.75	225.0	149.63
Clones de segundo año	150		300	75.00	900.0	598.50
Semilla básica		7.50	750	75.00	1125.0	748.13
Total			1125	170.60	2256.7	1500.72
Con cultivo de tejidos						
Clones meristemáticos, obtención	—		—	10.08	277.0	184.20
Clones de primer año	50		8	2.00	24.0	16.00
Multiplicación preliminar de clones		0.16	40	4.00	60.0	40.00
Multiplicación de clones en áreas especializadas		0.80	200	20.00	300.0	200.00
Semilla básica		7.50	750	75.00	1125.0	748.13
Total			998	111.08	1786.0	1188.33

Referencias

Bajaj, Y. P. S. 1981. Regeneration of plants from potato meristems, freeze-preserved for 24 months. Euphytica 30:141-145.

CIP (Centro Internacional de la Papa). 1982. World potato facts. Lima, Perú.

Clark, M. F. y Adams, A. N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 34:475-483.

Estrada, R.; Schilde-Rentschler, L. y Espinosa, N. 1983. *In vitro* storage of potato germplasm. En: International Congress Research for the Potato in the Year 2000. Memorias. Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú. p. 80-81.

Digitized by Google

Fedotina, V. L. y Krilova, N. V. 1976. Ridding tobacco of the mycoplasmic infection big bud by the method of tissue culturing. Dokl. Bot. Sci. 228:49-51.

Gugerli, P. 1979. Le test immuno-enzymatique (ELISA) et son application pour le diagnostic rapide des viroses de la pomme de terre. Revue Suisse Agric. 11:253-260.

———. 1980. Potato leafroll virus concentration in the vascular region of potato tubers examined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Potato Res. 23:137-141.

——— y Fries, P. 1981. Utilization d'anticorps monoclonaux pour le diagnostic de viroses chez les plantes. Rev. Suisse Vitic. Arboric. Hortic. 13:323.

——— y ———. 1983. Characterization of monoclonal antibodies to Potato Virus Y and their use for virus detection. J. Gen. Virol. 64:2471-2477.

Hu, C. Y. y Wang, P. J. 1983. Meristem, shoot tip, and bud cultures. En: Evans, D. A. (ed.). Handbook of plant cell culture. v. 1, p. 177-227.

Jacoli, G. G. 1978. Sequential degeneration of mycoplasma-like bodies in plant tissue culture infected with aster yellows. Can. J. Bot. 56:133-140.

Kassanis, B. 1957. The use of tissue culture to produce virus-free clones from infected potato varieties. Ann. Appl. Biol. 45:422-427.

Lizárraga, R. E.; Salazar, L. F. y Schilde-Rentschler, L. 1983. Effect of meristem size on eradication of potato spindle tuber viroid. En: International Congress Research for the Potato in the Year 2000. Memorias. Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú. p. 199.

Mix, G. 1981. Abstracts of conference papers. En: eighth triennial conference of the European Association for Potato Research. p. 176-177.

Morel, G. M. 1965. Clonal propagation of orchids by meristem culture. Cymbidium Soc. News 20:3-11.

Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.

Nguyen Van Uyen. 1984. Nueva aplicación del cultivo de tejidos y de la multiplicación rápida: Producción de papa por agricultores vietnamitas. CIP Circular. v. 11, no. 1, p. 7-10.

Nitzsche, W. 1983. Germplasm preservation. En: Evans, D. A. (ed.). Handbook of plant cell culture. v. 1, 1970 p.

Quak, F. 1977. Meristem cultures and virus-free plants. En: Reinert, J. y Bajaj, Y. P. S. (eds.). Applied fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture. Springer-Verlag, Nueva York.

Digitized by Google

Raatz, W. y Standke, K. C. 1978. Untersuchungen zum Minimalwachstum von Kartoffeln *in vitro*. Landbauforschung (Volkenrode) 28:75-78.

Roca, W. M. 1981. Genetic Resources Unit: Tissue culture section. En: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Annual report 1980. Cali, Colombia. 21 p. (Mecanografiado.)

———; Espinoza, N. O.; Roca, M. R. y Bryan, J. E. 1978. A tissue culture method for the rapid propagation of potatoes. American Potato Journal 55:691-701.

Rossignol-Bancilhon, L. y Nozeran, R. 1979. La multiplication végétative 'conforme' de la pomme de terre: Aspects fondamentaux et utilization agronomique. En: Séminaire International de la Pomme de Terre. Argelia.

Salazar, L. F. 1982. Manual de enfermedades virosas de la papa. Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú. 111 p.

Schilde-Rentschler, L. 1979. Report of the planning conference on the exploration taxonomy and maintenance of potato germplasm; III. Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú. p. 181-193.

——— y Roca, W. M. 1983. Virus elimination in potato and cassava. En: Proceedings of a global workshop on root and tuber propagation. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. p. 89-95.

Trofimez, L. N. 1976. Metodología para el saneamiento y reproducción acelerada de la papa. Academia de Ciencias Agrícolas Lenin, URSS. 30 p. (En ruso.)

Westcott, R. J.; Henshaw, G. G.; Grout, B. W. W. y Roca W. M. 1977. Tissue culture methods and germplasm storage in potato; 2. Acta Horticulturae 78:45-49.

Digitized by Google

Capítulo 20

Micropropagación de aráceas comestibles

S. Salazar S.*

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el convenio CATIE/GTZ (Agencia Alemana de Cooperación Técnica). Mi más sincero agradecimiento a Adriana Durán y a Xinia Durán por su apoyo en la elaboración de este manuscrito y por su colaboración en la mecanografía del texto.

* Department of Plant Biology, University of Birmingham, Inglaterra.

Digitized by Google

Introducción

La micropropagación por cultivo de tejidos se ha convertido en una herramienta de gran ayuda para la producción rápida de plantas de interés económico para el hombre, así como para limpiar de patógenos, especialmente de tipo viroide, los tejidos vegetales (Salazar, 1985a; 1985b). Por ello, esta técnica ha favorecido el intercambio internacional de germoplasma, al cual se han impuesto restricciones en los países receptores para evitar la diseminación de plagas y enfermedades en las regiones agrícolas. Además, el almacenamiento en condiciones de crecimiento limitado y la criopreservación de tejidos vegetales han comenzado a tomar auge porque evitan la pérdida causada por los patógenos y las plagas de aquellas especies vegetales que, hasta el momento, se han propagado vegetativamente.

Las aráceas comestibles se cuentan entre esas especies; cultivadas por sus cormos almidonosos, las hojas jóvenes y los pecíolos de algunas de ellas se comen en ensaladas (Pluckneet, 1976). Las raíces comestibles del tiquisque blanco y morado [*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott, *X. violaceum* Schott, *X. brasiliense* Engl.], de la malanga o taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta* y *C. esculenta* var. *antiquorum*) y del ñame elefante (*Amorphophallus rivieri* Durieu) son importantes fuentes de carbohidratos en regiones tropicales y subtropicales. En general, las aráceas citadas se propagan vegetativamente plantando secciones del cormo en que se encuentren yemas apicales. Este método de propagación no es efectivo para mantener genotipos libres de enfermedades; por ello, la diseminación de éstas ha sido considerable.

Por otra parte, el mantenimiento de las colecciones de campo es costosa y los ataques de patógenos, especialmente de viroides, resultan en la pérdida de genotipos. Así, por ejemplo, el Dasheen Mosaic Virus (DMV) detectado en la colección de campo de las aráceas comestibles del CATIE (Ramírez, 1983) ha sido el responsable de la pérdida de más del 50% de los cultivares de *Xanthosoma* y *Colocasia* (Salazar, 1985a).

Plantas de aráceas limpias de virus pueden obtenerse propagándolas por semilla (Hartman, 1974; Volin et al., 1976), mediante el cultivo de ápices (Abo El-Nil et al., 1976; Arditti et al., 1979; Hartman, 1974), o por el cultivo in vitro de meristemas como ocurre con *X. brasiliense* Engl. (Staritsky, 1974). Mediante la termoterapia y el cultivo de meristemas se han obtenido plantas de *X. sagittifolium* (L.) Schott y de *X. violaceum* Schott que no presentan síntomas de DMV aun en su fase madura de crecimiento (Figura 20.1). En estas plantas el DMV tampoco ha sido detectado por ensayos serológicos (Salazar et al., 1985; Salazar, 1985b).

Digitized by Google

Tiempo (semanas)	4	8	12	16	20	24	28
Etapas de la micropropagación de tejidos vegetales	Tratamiento de termoterapia	**Cultivo de meristemas** (medio A)	**Desarrollo de yemas axilares** (medio B)	**Regeneración de plantas completas** (medio C)	**Crecimiento, desarrollo** (invernadero)		Campo

Figura 20.1. Cronograma aproximado para el cultivo de meristemas, la micropropagación in vitro, el desarrollo de plantas completas, y el establecimiento en el suelo de 24 genotipos de *Xanthosoma* spp.

Digitized by Google

En este capítulo se describe una metodología sencilla para la micropropagación de aráceas comestibles mediante el cultivo de tejidos; fue desarrollada en este laboratorio con *X. sagittifolium* (L.) Schott, *X. violaceum* Schott y *C. esculenta*. Además, se añade una breve revisión de la literatura sobre procedimientos para la propagación in vitro de otras aráceas comestibles.

Xanthosoma sagittifolium (L.) Schott y *X. violaceum* Schott

Desinfección del material de campo

Los cormos de tiquisque blanco y morado se despojan de las partes dañadas por insectos, hongos o bacterias. Luego se cortan en trozos de aproximadamente 250 g cada uno y se sumergen en una solución fungicida (benomil 0.1%) durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo se dejan secar durante 45 minutos sobre un papel absorbente.

Termoterapia

En potes de 85 x 12 mm se coloca tierra previamente esterilizada con bromuro de metilo. Los cormos se siembran en los potes y se colocan en una cámara de termoterapia donde reciben una corriente de aire caliente de 38 a 39 °C durante el día y la noche. La intensidad lumínica debe ser de 3.5 klux al nivel de los cormos, y el fotoperíodo de 16 h, suministrado éste por lámparas fluorescentes de luz blanca. El riego debe ser diario y la humedad relativa debe oscilar entre el 60% y el 80%. Después de 5 ó 6 semanas de termoterapia, uno o dos pecíolos alcanzan unos 20 cm de longitud; en este momento se hace la disección de los ápices.

Desinfección de los ápices

Los cormos con uno o dos pecíolos de 20 cm de longitud se decapitan en la región donde se encuentra el ápice. Esta operación provocará la emisión de más yemas que, al cabo de 5 ó 6 semanas, serán la fuente de nuevo material.

Los ápices mencionados se cortan con un cuchillo pequeño, eliminando el exceso de follaje y de tejido subapical hasta que tengan aproximadamente 1 cm de longitud por 1 cm de ancho. En seguida se desinfectan en

Digitized by Google

una solución de hipoclorito de calcio comercial al 10% (v/v) a la que se agregan 2 gotas del humectante Tween-80 por cada 100 ml de solución. Los ápices se sumergen en esta solución y se mantienen en agitación constante durante 10 ó 15 minutos.

Disección de los meristemas

En una cámara de flujo laminar, los ápices se lavan tres veces con agua destilada estéril. Con la ayuda de un estereoscopio y con pinzas de punta fina, se elimina el exceso de hojas inmaduras. Se hacen cortes alrededor del ápice, de afuera hacia adentro, en la zona que separa el tejido subapical y las hojas. Se repite esta operación hasta que se observe el meristema con 2 ó 4 primordios foliares. En estos ensayos se ha empleado MS como medio de cultivo básico (Cuadro 20.1) con algunas modificaciones. Haciendo uso de la microcuchilla, se eliminan los primordios foliares, se extrae el meristema y se lo coloca en los tubos que contienen 10 ml del medio de iniciación (medio A, Cuadro 20.2). Este medio puede ser líquido, y entonces el meristema flotará, o puede ser semisólido. En ambos casos el meristema debe colocarse con la parte proximal en contacto con el medio. Los cultivos se incuban en una cámara de crecimiento con una temperatura de 28 y 26 °C, diurna y nocturna respectivamente. La intensidad lumínica es de 3 a 4 klux y la suministran lámparas fluorescentes de luz blanca. El fotoperíodo es de 14 horas. Después de 5 ó 6 semanas en el medio de iniciación, se observa un crecimiento alrededor y hacia arriba del meristema, que corresponde al desarrollo de las primeras hojas de color verde. En la zona subapical se observa el crecimiento de un tejido de color blanco y de textura similar al tejido que almacena almidón en los cormos maduros.

Desarrollo de yemas axilares

A los explantes provenientes del medio A se les hacen, en condiciones asépticas, varios cortes en cruz con un escalpelo en el tallo. Inmediatamente se trasfieren a frascos de vidrio que contienen 20 ml del medio B o medio de desarrollo de yemas (Cuadro 20.2). Las condiciones de incubación son iguales a las descritas para los meristemas. Mediante los cortes trasversales del tallo se decapita el meristema y se elimina la dominancia apical; esta operación provoca la emisión de un mayor número de yemas, favorecida aún más con la formulación del medio B (Cuadro 20.2). Por lo menos 60 yemas/tallo han sido contadas en este medio (Salazar et al., 1985). Después de 3 ó 4 semanas se puede realizar la misma operación cortando pequeños trozos en que se vean yemas y colocándolos en el medio B; así se estimulará la brotación de nuevas yemas.

Digitized by Google

Cuadro 20.1. Medios de cultivo en la micropropagación de aráceas comestibles.

Constituyentes	Concentración final (mg/litro) MS[a]	AZ[b]
NH_4NO_3	1650	
KNO_3	1900	2350
$MgSO_4.7H_2O$	370	369.75
KH_2PO_4	170	
$NH_4H_2PO_4$		345.00
H_3BO_3	6.2	6.20
$MnSO_4.4H_2O$	22.3	11.20
$ZnSO_4.7H_2O$	8.6	4.30
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25	0.25
$CuSO_4.5H_2O$	0.025	0.025
$CoCl_2.6H_2O$	0.025	0.025
KI	0.83	0.83
$CaCl_2.2H_2O$	440	220.50
Na_2EDTA	37.3	37.35
$FeSO_4.7H_2O$	27.8	27.85
m-Inositol	100	1000
Tiamina-HCl	0.4	5.0
Piridoxina-HCl		0.5
Niacina		5.0
Glicina		2.0
ANA	(0.2 - 2.0)	(2.0)
Cinetina (KIN)	(2.0)	0.007
Sacarosa	30,000.00	20,000.00
Agar	7,000.00	6,000.00
pH	5.7 ± 0.1	5.7 ± 0.1

a. Modificado de Murashige y Skoog, 1962.
b. Abo El-Nil y Zettler, 1976.

Desarrollo de plantas completas

Para el desarrollo de plantas completas se utilizan explantes provenientes del medio B que presenten yemas incipientes. Estos explantes se trasfieren al medio C o medio de crecimiento y desarrollo (Cuadro 20.2). En este medio, después de 4 ó 5 semanas, se obtendrán plantas con muchas hojas de color verde intenso y un sistema radical bien desarrollado de color blanco (Figura 20.1).

Digitized by Google

Cuadro 20.2. Constituyentes de los medios para el cultivo de meristemas, el desarrollo de yemas axilares, y la regeneración de plantas completas de 24 genotipos de *Xanthosoma*.

Constituyentes del medio[a]	Concentración (mg/litro) del medio: A, iniciación de meristemas[b]	B, desarrollo de yemas axilares[c]	C, regeneración de plantas completas[c]
Sales inorgánicas	MS	MS	MS
m-Inositol	100	100	100
Tiamina-HCl	0.1	0.1	0.1
Piridoxina-HCl	0.5	0.5	0.5
Acido nicotínico	0.5	0.5	0.5
Glicina	2.0	2.0	2.0
Sacarosa	30,000	30,000	30,000
Agar	0.0	7,000	7,000
BAP	0.1	3.00	0.0

a. Todos los medios nutritivos se esterilizan en una autoclave a 15 psi (121 °C).
b. Tubos de 25 x 95 mm con tapa de rosca; un explante por tubo de cultivo. MS = Murashige y Skoog, 1962.
c. Frascos comerciales usados para envasar alimentos para niños (60 x 100 mm); las tapas son del tipo 'B-caps' (Magenta, Chicago, E.U.); 4-6 tallos por frasco de cultivo.

FUENTE: Salazar S. et al., 1985.

Cultivo de ápices

Los procedimientos para la desinfección de los cormelos, para la termoterapia y para la desinfección de los ápices son iguales a los descritos anteriormente. La disección de los ápices se hace en las mismas condiciones descritas para los meristemas. Una vez descartada la abundancia de hojas, queda visible la zona donde se localiza el meristema apical. Se debe procurar que el meristema esté rodeado por unos 4 ó 6 primordios foliares; en seguida se hace un corte trasversal a unos 3 mm por debajo de la zona subapical. El explante (1.8 mm de largo) se coloca en la punta de la microcuchilla y se trasfiere al medio de cultivo B (Cuadro 20.2). La incubación de los cultivos en la cámara de crecimiento ocurre con temperatura y fotoperíodo iguales a aquéllos aplicados a los meristemas, pero con 2 ó 2.5 klux de intensidad lumínica. Después de 4 ó 5 semanas se realiza el mismo procedimiento indicado para la inducción de yemas axilares y para el desarrollo de plantas completas, cuando se emplean meristemas.

Digitized by Google

Establecimiento de las plantas en el suelo

Las plantas con hojas y raíces bien desarrolladas se sacan de los frascos y se lavan con agua corriente para eliminar cualquier resto de agar. Luego se plantan en bolsas plásticas de 1 kg que contienen tierra ya esterilizada con bromuro de metilo. Para evitar la pérdida de humedad en las plantas, éstas son trasferidas a una cámara de plástico donde se mantienen a una humedad relativa del 80% o más. En estas condiciones permanecen durante un período de 3 ó 5 días. Es recomendable que la cámara de plástico no se exponga a la luz directa del sol pues ésta ocasionaría altas temperaturas (45 °C o más) dentro de la cámara que matarían las plantas (Salazar et al., 1985). La cámara de plástico debe colocarse en un invernadero cubierto con malla fina en las paredes y con un techo trasparente (Salazar et al., 1985). En estas condiciones se logra un 100% de sobrevivencia de las plantas. Después de 3 ó 5 días la cámara de plástico se retira y las plantas se dejan en condiciones de invernadero durante 13 semanas, regándolas cada dos días.

El traslado de las plantas a la luz solar en campo abierto puede hacerse cuatro semanas después de haberse quitado la cámara de plástico. En este estado las plantas se dejan el tiempo necesario para que alcancen la uniformidad deseada en cuanto a tamaño y número de hojas antes de trasladarlas a las condiciones del campo. Desde el tratamiento de termoterapia hasta el establecimiento de las plantas en el invernadero trascurren aproximadamente 24 semanas.

Formación de callos y organogénesis

Los pasos que deben darse desde la desinfección de los cormelos hasta la disección de los meristemas son los mismos descritos anteriormente. Los pasos siguientes se llevan a cabo siguiendo el procedimiento descrito por Gupta (1985). Los meristemas con 2 a 4 primordios foliares se colocan en el medio AZ (Cuadro 20.1) con 2 mg/litro de ANA. Después de seis semanas en la oscuridad a 26 °C, se observa la formación de callos. Para inducir la organogénesis, trozos de unos 2.5 mm^3 de los callos son trasferidos a un medio MS (Cuadro 20.1) que contenga 2 mg/litro de KIN y de 0.2 a 2 mg/litro de ANA. Los cultivos se incuban a 26±1 °C; la luz es suministrada por lámparas fluorescentes (cerca de 15 $\mu E/m^2$ por sg) con un fotoperíodo de 16 h. Después de 3 ó 4 semanas de incubación, los callos se tornan de textura dura y de color verde, con zonas oscuras y con protuberancias por toda su superficie; muchas de estas protuberancias producirán pequeñas agrupaciones de hojas y después presentarán tallos y raíces. Para la regeneración de plantas de *X. sagittifolium* se requiere una baja concentración de

Digitized by Google

ANA (0.2 mg/litro) y de KIN (2.0 mg/litro), en tanto que para las de *X. violaceum* la mejor respuesta se obtiene con 2.0 mg/litro de ANA y 2 mg/litro de KIN. En *X. violaceum*, además, se puede inducir la organogénesis en un solo paso: los meristemas con 2 ó 4 primordios foliares se colocan en un medio MS (Cuadro 20.1) que contenga 5.0 mg/litro de ANA, 100 ml/litro de AC y 2.0 mg/litro de KIN. El callo obtenido, de color verde, es de estructura compacta y nodular. La consiguiente formación de yemas, tallos y raíces hasta la formación de plantas bien desarrolladas tarda unas ocho semanas.

Colocasia esculenta

El procedimiento de cultivo de meristemas y ápices descrito para las dos especies de *Xanthosoma*, desde la desinfección de los cormos hasta el establecimiento de las plantas en el suelo, es aplicable a dos variedades de *Colocasia esculenta*: *C. esculenta* var. *esculenta* y *C. esculenta* var. *antiquorum*. La inducción de yemas axilares ocurre de manera similar a la del género *Xanthosoma*.

Xanthosoma brasiliense **Engl.**

La desinfección del material de campo, la termoterapia, la desinfección de los ápices, y la disección de los meristemas se llevan a cabo según el procedimiento descrito para *X. sagittifolium* (L.) Schott y *X. violaceum* Schott.

Los meristemas o yemas se cultivan en un medio MS suplementado con los siguientes compuestos (en mg/litro): aneurina, 1.0; L-cisteína-HCl, 10; adenina, 1.0; meso-inositol, 100; CH, 100; Sacarosa, 30,000; y agar (Oxoid 1) 6000. Como reguladores del crecimiento se emplean AIB (1.0 mg/litro) y BA (5.0 mg/litro) (Staritsky, 1974).

El traslado de tallos individuales a medios frescos promueve el desarrollo de racimos de plantas, cuyo número varía con el tamaño del frasco de cultivo (Staritsky, 1974); por ejemplo, en tubos de 160 x 22 mm, un tallo de *X. brasiliense* produce un racimo con cerca de 30 plantas en dos meses (Staritsky, 1974). El desarrollo de plantas completas se logra en un medio MS semisólido sin reguladores del crecimiento o bien cuando aquéllas son trasplantadas al suelo (Staritsky, 1974). El procedimiento descrito aquí puede adaptarse al de *X. sagittifolium* (L.) Schott.

Digitized by Google

Xanthosoma caracu

Aunque no se ha informado acerca del empleo de la termoterapia en *X. caracu*, su similitud morfológica con *X. sagittifolium* (L.) Schott hace factible ese tratamiento con ella, el cual se aplicaría tal como se ha descrito para *X. sagittifolium*.

La desinfección de los explantes, así como la disección de los ápices con 4 ó 6 primordios foliares, se hace en condiciones similares a las empleadas con las otras aráceas.

El medio de cultivo para los ápices está constituido por las sales MS (Cuadro 20.1) y 100 mg/litro de ácido ascórbico; este medio es líquido, y se coloca en frascos Erlenmeyer de 250 ml. Los cultivos se colocan en un agitador orbital a 20 rpm. La intensidad lumínica es de 1.4 klux, el fotoperíodo es de 16 h, y la temperatura diurna y nocturna es de 22±2 °C (Asokan et al., 1984b).

El alargamiento de los ápices se nota a los dos días de cultivo y de los 12 a los 15 días se observa el despliegue de la primera hoja. Después de 3 ó 4 semanas de cultivo el brote de 3 a 5 hojas se hace evidente. La rizogénesis comienza aproximadamente a las cinco semanas de incubación (Asokan et al., 1984b). Trascurridos de 7 a 10 días después de la aparición de las primeras raíces, todos los ápices se trasfieren al medio de propagación rápida para promover la elongación de los tallos. Este medio está constituido por las sales MS (Cuadro 20.1), suplementado con los siguientes compuestos (en mg/litro): NaH_2PO_4, 250; sulfato de adenina, 30; tiamina-HCl, 0.4; agar, 8000; y AIA, 0.5 (esterilizado por filtración). De este medio semisólido se colocan 100 ml en frascos Enlermeyer de 250 ml (Asokan et al., 1984b). Los cultivos quedan expuestos a un fotoperíodo de 16 h, a una intensidad lumínica de 1.4 klux, y a una temperatura de 24 °C día y noche. Al cabo de 4 semanas se observa el brote de las yemas y es posible contar entre 45 y 70 plantas por frasco (Asokan et al., 1984b). La trasferencia de las plantas a tierra estéril puede hacerse bajo las mismas condiciones mencionadas para las otras aráceas.

Amorphophallus rivieri **Durieu**

Los cormos se desinfectan en una solución de 1.05% de hipoclorito de sodio durante 10 minutos. Se remueve la epidermis del cormo junto con 2 cm de la corteza externa. El tejido restante se corta en cubos de 1 a 1.3 g; éstos se trasfieren a tubos de cultivo de 15 x 24 cm que contienen 10 ml del

Digitized by Google

medio MS (Cuadro 20.1), con sus sales mayores diluidas a la mitad, con 200 mg/litro de NH_4NO_3, y con 8 g/litro de agar. Los cultivos se mantienen en la oscuridad a 24 °C durante 5 semanas; luego se exponen a un fotoperíodo de 16 h con 6.4 W/m² de luz (Asokan et al., 1984a).

Los primeros signos de la diferenciación de tallos adventicios ocurren conjuntamente con protuberancias globulares de color blanco agrupadas en un callo compacto. Estas estructuras, similares a meristemoides, aparecen luego de 8 a 9 semanas de cultivo en presencia de 2.0 mg/litro de BA y de 0.1 a 0.3 mg/litro de ANA. Para acelerar la diferenciación de tallos, se practican varios cultivos en un medio MS (Cuadro 20.1) líquido con 3 mg/litro de ZEA, 0.01 mg/litro de AG, y 0.3 mg/litro de ANA; con este medio no sólo se logra incrementar el número de tallos sino también su longitud. El enraizamiento de estos tallos se consigue 10 días después de trasferidos a un medio MS (Cuadro 20.1) que contenga 1.0 mg/litro de ANA. En condiciones de invernadero, se logra que el 100% de las plantas obtenidas se establezcan en tierra (Asokan et al., 1984a).

Referencias

Abo El-Nil, M. M. y Zettler, F. W. 1976. Callus initiation and organ differentiation from shoot tip cultures of *Colocasia esculenta*. Plant Sci. Lett. 6:401-408.

Arditti, J. y Strauss, M. S. 1979. Taro tissue culture manual. Developmental and Cell Biology, University of California, Irvine, California, E.U. 59 p.

Asokan, M. P.; O'Hair, S. K. y Litz, R. E. 1984a. *In vitro* plant regeneration from corm callus of *Amorphophallus rivieri* Durieu. Scientia Hortic. 24:251-256.

———; ——— y ———. 1984b. Rapid multiplication of *Xanthosoma caracu* by *in vitro* shoot tip culture. HortScience 19(6):884-885.

Gupta, P. P. 1985. Plant regeneration and variabilities from tissue cultures of cocoyams (*Xanthosoma sagittifolium* and *X. violaceum*). Plant Cell Rep. 4:88-91.

Hartman, R. D. 1974. Dasheen mosaic virus eliminated from caladium, taro and cocoyam by culture of shoot tips. Phytopathol. 64:237-240.

Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.

Pluckneet, D. L. 1976. Edible aroids. En: Simmons, N. W. (ed.). Evolution of crop plants. Longman Group, Londres. p. 10-12.

Digitized by Google

Ramírez, P. 1983. Aroids virus research in Costa Rica. Center for Tropical Agriculture International Programs, IFAS, University of Florida in Hawaii, E.U. p. 22-23.

Salazar, S. 1985a. Cultivo de meristemas en cormos, raíces y tubérculos tropicales. En: Sistemas de producción basados en raíces y tubérculos tropicales. Taller regional, marzo 1985. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba, Costa Rica.

———. 1985b. Tissue culture at the Plant Genetic Resources Unit at CATIE. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba, Costa Rica.

———; Fernández, R. y Jarret, R. L. 1985. Virus-free plants obtained by thermotherapy and meristem culture of white (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott) and purple (*X. violaceum* Schott) cocoyams. En: Seventh Symposium of the International Society for Tropical Root Crops, Guadalupe, 1985.

Staritsky, G. 1974. *Xanthosoma brasiliense* Engl. propagated virus-free *in vitro*. Trop. Root Tuber Crops Newsl. 7:38-39.

———. 1977. *In vitro* storage of aroids germplasm. Plant Genet. Res. Newsl. 42:25-27.

Volin, R. B. y Zettler, F. W. 1976. Seed propagation of cocoyam, *Xanthosoma caracu* Koch and Bouché. HortScience 11:459-460.

Digitized by Google

Capítulo 21

Cultivo de tejidos y material de propagación libre de enfermedades en el ñame

S. H. Mantell*
S. Q. Hague**
F. L Chandler***

Agradecimientos

Las etapas de registro y desarrollo del plan descrito sobre propagación del ñame recibieron un generoso apoyo del Overseas Development Administration (Proyectos de investigación R2672, R3232 y R3218). Recibieron también apoyo, en el área de virología, del Scottish Crop Research Institute, Escocia, Reino Unido, y del European Development Fund. Regional Programme for the Caribbean Development Assistance to the Caribbean Development Bank, Proyecto No. 4100-033-97-46; este proyecto convirtió en realidad el primer esquema de certificación del ñame.

* Department of Horticulture, Wye College, London University, Inglaterra.
** Department of Plant Biology, University of Birmingham, Inglaterra.
*** Caribbean Agricultural Research and Development Institute, Cave Hill Campus, Barbados, Indias Occidentales.

Digitized by Google

Introducción

El ñame pertenece al género *Dioscorea*. Sus tubérculos se utilizan como fuente ya sea de carbohidratos o ya de compuestos medicinales del grupo de los esteroides. El ñame se cultiva en la región del Caribe como una fuente de carbohidratos. Las principales especies cultivadas son: *Dioscorea alata*, *D. rotundata*, *D. cayenensis*, *D. esculenta*, *D. bulbifera* y *D. trifida*. Cada especie posee sus propios atributos que se expresan en las características de producción del tubérculo, y en su textura y sabor en la cocción. *D. alata*, uno de los ñames más populares del Caribe, se propaga vegetativamente mediante partes del tubérculo; por ello, ciertos cultivares han sido seleccionados y conservados a través de los años por los agricultores de la región. Algunos de los más comunes son: White Lisbon, Oriental, Harper, Ashmore, St. Vincent Red, Smooth Statia, Renta, y Coconut Lisbon. Esta nomenclatura ha sido adoptada tanto por los agricultores como por los investigadores.

Una decisión política importante en los países del Caribe ha sido la sustitución de alimentos que tradicionalmente se importaban por productos básicos cultivados localmente. Algunos países como Guyana cuentan ya con una legislación que prohibe la importación de cultivos como la papa irlandesa (*Solanum tuberosum*). Las características favorables de cocción y sabor de algunos cultivares de ñame lo han convertido en el sustituto local más apropiado de la papa.

El ñame se ha exportado del Caribe al Reino Unido y a América del Norte, una vez atendido el consumo local; desde los años 60 es un componente importante del comercio de exportación agrícola. Sin embargo, varias enfermedades del cultivo, principalmente la mancha parda interna, impidió una expansión adicional de las exportaciones de ese producto. En 1965, cerca del 50% de las exportaciones de ñame procedentes de Barbados se perdió a causa de dicha enfermedad.

El ñame ha desempeñado un papel muy significativo en la agricultura regional ya que es un ejemplo de una tecnología de procesamiento de alimentos desarrollada con éxito. Se ha establecido una planta piloto de procesamiento en Barbados, y el producto empacado (ñame instantáneo) ha encontrado aceptación tanto a nivel local como en los países de clima templado. Si aumentara la inversión, esta industria generaría ingresos para la región por empacar un alimento rico en carbohidratos que carecería de algunas desventajas inherentes al producto fresco, como su disponibilidad restringida a 4 ó 6 meses del año y los inconvenientes de pelar y preparar el producto para su consumo. La posición del ñame en la agricultura regional reclama, en fin, una mejor tecnología de producción.

Digitized by Google

Enfermedades del Ñame

Dejando de lado las dificultades económicas, se considera que la producción de ñame de alto rendimiento y buena calidad en la región caribeña se encuentra en peligro por la presencia de varias enfermedades.

Enfermedades causadas por virus

Tres tipos de virus infectan el ñame en la región: los virus en forma de bastoncito, los flexible-baciliformes, y los esféricos. La presencia de estos virus en las plantas de ñame está asociada con dos síntomas foliares diferenciados —moteado y formación de bandas en las nervaduras, y aclaramiento en las nervaduras— y con síntomas en los tubérculos, como la mancha parda interna antes mencionada.

Estas enfermedades causan pérdidas sustanciales en el rendimiento y en la calidad del tubérculo. Material genético de la variedad White Lisbon afectado por el moteado y la formación de bandas en las nervaduras dio un rendimiento de tubérculos significativamente menor en comparación con las plantas libres de esa enfermedad. Las encuestas hechas durante 1975 señalaron que las enfermedades virales se encontraban presentes en cultivos de las seis especies de ñame comestible cultivadas en el Caribe. Todos los materiales de ñame de la región pueden ser atacados por los virus puesto que, por tradición, el ñame se ha propagado vegetativamente y esos agentes infecciosos se trasmiten, año tras año, mediante partes vegetales de propagación. Los virus se han acumulado en los materiales genéticos hasta llegar a niveles que van en detrimento de la producción del tubérculo.

Enfermedades causadas por nematodos

En la Mancomunidad del Caribe hay enfermedades causadas por nematodos que afectan sobremanera el rendimiento y la calidad del ñame. La más importante es la pudrición seca, causada principalmente por el nematodo *Pratylenchus coffeae*. La pudrición extensa del tubérculo es una consecuencia de infecciones bacterianas y micóticas. En Jamaica y otros países, los nematodos están ampliamente diseminados y en algunas localidades no se consiguen materiales de propagación libres de ellos.

Los tubérculos del ñame afectados por la pudrición seca contienen nematodos vivos; la siembra de este material, por tanto, sólo sirve para diseminar más la enfermedad. Una medida útil para reducir las poblaciones de nematodos en los tubérculos de progenie y en el suelo asociado

Digitized by Google

consiste en sumergir en soluciones de nematicida, antes de la siembra, las partes afectadas de los tubérculos. Sin embargo, todavía no ha sido posible eliminar los nematodos de los elementos vegetativos de propagación. El método más exitoso empleado hasta el momento es la propagación por medio de enredaderas porque éstas no están infestadas por el nematodo causante de la pudrición seca.

Enfermedades causadas por hongos y bacterias

Estas enfermedades tienen particular importancia durante el almacenamiento de los tubérculos de ñame; los patógenos los infectan generalmente a través de los tejidos lesionados o golpeados. Después de la infección, se presenta una pudrición extensiva de los tejidos centrales del tubérculo. Estas enfermedades pueden evitarse o controlarse de manera efectiva aplicando productos químicos y empleando materiales sanos para propagar el cultivo.

Las enfermedades del ñame, especialmente las trasmitidas por el tubérculo, imponen una severa limitación a la producción de este tubérculo. En consecuencia, es necesario hacer esfuerzos para erradicar del material de propagación las enfermedades mencionadas anteriormente. Cuando se produzcan esquejes de tubérculo libres de enfermedades, se propagarán para distribuirlos más tarde a los agricultores de ñame de la región. Actualmente se han desarrollado técnicas especializadas de propagación del ñame para lograr ese objetivo en un tiempo corto.

Cultivo de Tejidos y Micropropagación del Ñame

La erradicación de los virus que afectan el ñame y la rápida propagación de material libre de enfermedades se basa en dos métodos de cultivo de tejidos, asociados con tratamientos de termoterapia.

Método de cultivo de la punta meristémica

Las puntas (de 0.2 a 0.5 mm de longitud) constan de un meristema apical y de uno o dos primordios foliares. Provienen de plantas madre cultivadas durante un máximo de 14 días a 36±1 ^{0}C. La termoterapia además de disminuir la concentración del virus en las plantas, acelera la multiplicación de las células de la punta meristémica y, como resultado, los virus tienden a quedarse en la planta madre cuando se corta el ápice de

Digitized by Google

ésta. El corte se hace bajo un microscopio de disección. El meristema apical de cada punta se expone separando cuidadosamente las vainas foliares que lo recubren y removiéndolas con un bisturí.

Se recomienda utilizar las enredaderas del ñame que se encuentran en las fases vegetativas de crecimiento, es decir, aquéllas de 16 a 28 semanas de edad, como fuente de meristemas, y cortar solamente los meristemas apicales para su cultivo. Martin y Delphin (1969) han encontrado que las yemas axilares presentan una marcada variabilidad etaria según su posición relativa en la enredadera. Cuando se seleccionen las plantas madre, deben preferirse las variedades que son aceptables para el agricultor y para el mercado al cual se destinan. Aunque la diferenciación porcentual de los ápices en las plántulas es relativamente baja (19%), el método cumple con su objetivo ya que produce plántulas que, examinadas en el microscopio electrónico, han mostrado estar libres de virus.

Cuando los meristemas se derivan de plantas madre sometidas a tratamiento térmico, se ha encontrado que es mayor el porcentaje de puntas meristémicas que se diferencian hasta plántulas normales. Las plántulas producidas por este método se multiplican rápidamente por medio de la técnica de micropropagación que se describe a continuación.

Método de los segmentos nodales

Una técnica de micropropagación para las principales especies de ñame comestible del Caribe fue desarrollada en Barbados y ha sido descrita por Mantell et al. (1978). Esta técnica se emplea para propagar rápidamente las plántulas que se producen mediante el cultivo de meristemas apicales. Aproximadamente 250 días después de la excisión de las puntas meristémicas, las plántulas ramificadas producidas se cortan en segmentos nodales y cada segmento se trasfiere a un medio fresco. El proceso puede repetirse en un lapso de 30 días hasta que se obtenga el número deseado de plantas.

Técnicas de cultivo de tejidos

Esta sección contiene un resumen de los procedimientos, seguido de una descripción detallada. Las técnicas de trabajo están bien documentadas en dos boletines técnicos del CARDI (Mantell et al., 1977; Mantell y Haque, 1978).

Preparación del medio. El medio utilizado para el cultivo de tejidos del ñame (*D. alata*) es el de Murashige y Skoog (1962), con ingredientes

Digitized by Google

adicionales. El medio estándar (sales fundamentales) se encuentra en el comercio pero también puede prepararse en el laboratorio. Para un cultivo especial de meristemas, ese medio se complementa con 1.0 mg/litro de ácido naftalenacético (ANA) y 0.2 mg/litro de 6-benciladenina (BA). Si no se añaden estos reguladores del crecimiento, los meristemas se decoloran y dejan de crecer 60 días después de la excisión (Mantell et al., 1980).

Un medio sólido, obtenido por adición de agar, se ha utilizado para el cultivo de tejidos del ñame. La calidad del agar es un poco variable; por ello, en el cultivo de meristemas apicales se aconseja utilizar la calidad bacteriológica; sin embargo, para reducir los costos, la calidad comercial puede aceptarse para el cultivo de segmentos nodales a una concentración de 8 g/litro.

El uso de químicos puros, como Analar o grados similares, es deseable pero no esencial. Para la micropropagación de esquejes nodales, la calidad del azúcar blanca refinada es adecuada.

Disección de cultivos de segmentos nodales. Se ha desarrollado un sistema altamente productivo de micropropagación mediante dos operaciones: la subdivisión de plántulas multiramificadas que se producen en cultivos de meristemas apicales cada 20 ó 30 días, y el trasplante a un medio fresco de los nudos cortados para hacer una multiplicación adicional hasta obtener el número deseado de plantas. El procedimiento consta de los siguientes pasos:

1) Prepare un plato para esterilizar agua destilada.

2) Retire las plántulas que tengan un mes de edad de las botellas Universal utilizando una espátula esterilizada, y colóquelas en agua destilada estéril. (En algunos cultivos de tejidos de ñame aparece un color marrón muy intenso si se disectan en ausencia de humedad.)

3) Corte el rebrote de las plántulas en segmentos sencillos que contengan un nudo foliar, utilizando una aguja de disección y un escalpelo esterilizados.

4) Inocule un medio de cultivo fresco con los nudos disectados, utilizando una aguja de disección o una pinza, ambas esterilizadas.

5) Rotule las botellas de cultivo con el nombre de la variedad de ñame y con la fecha, y colóquelas bajo bancos de luz.

Condiciones de cultivo. Las condiciones que se consideran más adecuadas para el desarrollo de cultivos de tejidos de ñame son: luz del día durante 16 horas, 8 horas de oscuridad, y una temperatura diurna y

Digitized by Google

nocturna de 27±2 °C. La temperatura se mantiene con un equipo de aire acondicionado al cual se acopla un termostato. La temperatura y la humedad se controlan de manera rutinaria y los resultados se registran mediante un termohigrógrafo.

Los cultivos se colocan en bancos de luz construidos sobre marcos Dexion con estantes de madera, que cuentan con luz fluorescente (diurna tropical) y bombillas incandescentes de 40 watios; ambas producirán, al nivel en que está la planta, una intensidad de luz de 1200 a 1400 lux.

La luz solar durante 16 horas fomenta el crecimiento vegetativo continuo, no así la producción de tubérculos, para que la multiplicación de plántulas, mediante el método de micropropagación, pueda realizarse durante todo el año.

Establecimiento de las plántulas en el suelo. Las plántulas de ñame obtenidas por medio del cultivo de tejidos se establecen en suelo contenido en potes en el invernadero, donde producirán tubérculos, los cuales, más tarde, serán evaluados en el campo. Entonces se pondrán a disposición de los cultivadores, como parte de un esquema de certificación de material genético de ñame (Figura 21.1).

Los tubos que contienen los cultivos se colocan lateralmente y las plántulas se sacan de ellos con sumo cuidado mediante una espátula. Todas las partículas del medio que se adhieran a las raíces se remueven con agua destilada y las plántulas se trasplantan a macetas plásticas negras de 8 x 8 x 13 cm que contengan una mezcla de suelo, arena y turba en una proporción de 4:2:3. Si no se encuentra turba, se utiliza cualquier complemento orgánico finamente molido. La mezcla en que se siembran las plántulas se esteriliza con calor. Las macetas se colocan en recipientes de arena situados dentro de un invernadero a prueba de insectos.

En esta etapa de su desarrollo, es importante que las plántulas no estén sometidas a ningún estrés, y que no se sequen. Una precaución que se toma —por lo menos, de 3 a 4 semanas después del trasplante— para asegurarse de que la humedad se mantiene en un alto nivel y evitar que los frágiles tejidos de las plántulas se sequen, es cubrir las macetas individuales con campanas plásticas trasparentes. Vasos plásticos trasparentes con orificios en la base cumplen esa función. La aplicación de un fertilizante foliar apropiado como Welgro, en preparaciones de 5 g por 250 ml de agua destilada, mejora la tasa de crecimiento de las plántulas.

Tan pronto como las plántulas han emitido tres o cuatro nuevas hojas y se ven fuertes, se les retira la campana plástica para que se desarrollen

Digitized by Google

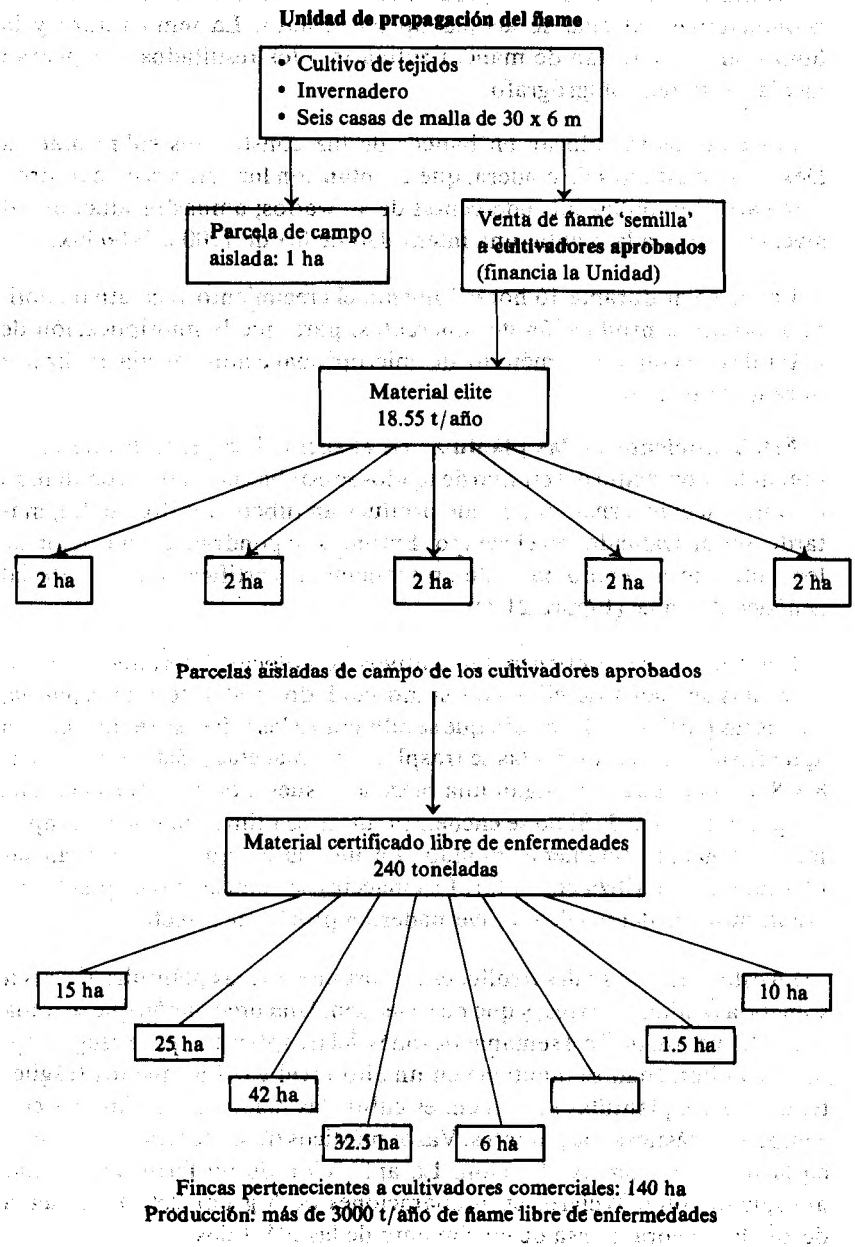


Figura 21.1. Un plan esquemático de propagación del ñame en Indias Occidentales, región del Caribe.

Digitized by Google

como plantas de tamaño normal. Las plántulas (o microplantas) permanecen en el invernadero con 16 horas de luz diurna durante un tiempo mínimo de 3 meses, antes de ser trasferidas al área de malla del campo, donde permanecerán durante parte de la estación normal de siembra del ñame.

Producción de pequeños tubérculos por microplantas sembradas en macetas. Las microplantas sembradas en macetas se trasplantan a un espacio encerrado con malla a prueba de áfidos (casa de malla), cuyo suelo ha sido previamente tratado contra los nematodos, y que estará, respecto a la siembra más cercana de ñame, a 1 km por lo menos, si ésta se halla contra el viento, y a no menos de 2 km, si se halla a favor del viento. Esta precaución reduce la posibilidad de que algunos insectos, especialmente áfidos y saltahojas, ocasionen una reinfección viral. Además, se introduce en el suelo una capa gruesa de plástico, hasta una profundidad de 1 m, alrededor de la casa de malla, para crear una barrera contra el movimiento lateral de los nematodos. Precauciones adicionales son la esterilización del área con bromuro de metilo y la aplicación de carbofuran (Furadán) en los huecos de la siembra. Los sistemas de riego por goteo se emplean para hacer más disponible el agua a las plantas jóvenes.

En la casa de malla, las plantas se hacen trepar por una espaldera para obtener rendimientos máximos de los tubérculos. Los minitubérculos producidos en la casa de malla (peso fresco promedio de 500 g) se evalúan, antes de ser liberados, en ensayos de campo y en una selección secundaria que se practica respecto a infecciones virales; la presencia de cualquier síntoma foliar obvio como moteado, aclaramiento de la nervadura, o formación de bandas en la nervadura, delataría esas infecciones.

Tasas de Multiplicación del Cultivo de Tejidos

El método de propagación en el cultivo de tejidos de ñame depende del crecimiento consistente del rebrote emitido por los segmentos nodales cortados. Se ha encontrado que, una vez establecido el cultivo de los segmentos nodales, es posible obtener aproximadamente 65,000 nuevas plántulas partiendo del cultivo de un solo segmento nodal, en un período de 6 meses. La tasa de propagación de los métodos tradicionales puede compararse con el sistema rápido (Cuadro 21.1) que parte de un solo tubérculo de 100 g.

En la Mancomunidad del Caribe, las enfermedades causadas por virus y nematodos son las principales limitantes de la producción de *D. alata* y *D.*

Digitized by Google

Cuadro 21.1. Producción de tubérculos, partiendo de un tubérculo de 100 g mediante métodos de propagación tanto tradicionales como de cultivo de tejidos, durante dos estaciones de siembra.

Epoca de siembra	Método tradicional	Por cultivo de tejidos
1	Tubérculo de 100 g	Tubérculo de 100 g
	↓	↓
	Una planta madre	Una planta preacondicionada después de tres meses
	↓	↓
		10 cultivos nodales
	↓	↓
	Tubérculos de 1600 g	Micropropagación
		650,000 microplantas
		↓
2	16 plantas madre	617,500 plantas[a]
	↓	↓
		Minitubérculos de 500 g
	↓	↓
	16 tubérculos x 1600 g =	617,500 minitubérculos x 500 g =
	= 25.6 kg	= 308,750 kg

a. Pérdidas del 5% en el establecimiento de las plántulas en el suelo.

rotundata. Ambos tipos de enfermedades se diseminan rápidamente porque se usa material de propagación infectado. Mediante el método del cultivo de tejidos, los patrones de los tubérculos de ñame empleados como 'semilla', que deben estar libres de virus y de nematodos, pueden producirse rápidamente partiendo de pocas plantas madre seleccionadas y libres de patógenos.

Producción de material de siembra sano para los agricultores

Se requieren relativamente grandes cantidades de tubérculos para satisfacer las necesidades de los cultivadores de ñame en cada isla del Caribe. Actualmente, pueden producirse más tubérculos en las condiciones de una casa de malla para obtener así suficiente material del tubérculo adecuado. Esta producción masiva se lleva a cabo en sitios aislados donde las plantas

Digitized by Google

no tienen la protección de la casa de malla. En esos sitios, el suelo debe estar libre de los nematodos que atacan el ñame. Pruebas rutinarias de suelos que estimen la incidencia de los nematodos permitirán determinar si un sitio es apropiado para la producción masiva de ñame libre de enfermedades.

Se harán también inspecciones frecuentes de los materiales de ñame ya propagados para detectar el desarrollo de síntomas de alguna enfermedad viral en el follaje. Si surge la sospecha de que algunas plantas están reinfestadas, deberán removerse (descontaminación) y destruirse para eliminar la fuente de infección dentro de los materiales propagados. Si se cumplen estas medidas fitosanitarias en la Mancomunidad del Caribe, unos agricultores podrán producir 'semilla' de ñame para otros dentro de un plan de propagación de material libre de enfermedades.

Proyecto de propagación del ñame en la Mancomunidad del Caribe

Las nuevas generaciones de ñame de calidad superior y libre de enfermedades suministran valiosos materiales madre. Actualmente se produce y distribuye el material de propagación del ñame en forma metódica y bajo estrecha supervisión, para evitar que se desperdicie o se extravíe.

Se ha iniciado un plan organizado de propagación siguiendo el esquema descrito en la Figura 21.1. A causa de la naturaleza altamente técnica de las etapas iniciales del esquema, es decir, la producción de cultivos de tejidos de materiales básicos probados contra patógenos y la producción masiva de minitubérculos en casas de malla, esas etapas se realizan en una unidad especial de propagación del ñame establecida en Barbados, un lugar central en la región. Esta unidad es mantenida por personal científico y técnico que utiliza la experiencia de los institutos agrícolas regionales como el CARDI. Los tubérculos producidos se conocen como material elite; más tarde, éstos se siembran nuevamente en los terrenos de los agricultores quienes, ya registrados, se denominan **cultivadores aprobados**. Los tubérculos que se producen, siempre y cuando permanezcan libres de las enfermedades descritas del ñame, se certifican como material **libre de enfermedades**, y tienen un precio superior (60%-70% más) al precio corriente del ñame en el mercado.

Los clones de ñame, según este esquema, se conservan convenientemente para retener sus características agronómicas deseables. Se espera que continúe la demanda de ñame libre de enfermedades; por tanto, las etapas de propagación cumplirán un calendario anual. Los materiales

Digitized by Google

libres de enfermedades pueden infectarse nuevamente con virus después de pasar largos períodos en el campo; en consecuencia, los agricultores requerirán periódicamente suministros frescos de material certificado libre de enfermedades. Sin embargo, todavía no se conoce la tasa de reinfección viral, bajo condiciones de campo, de los materiales de ñame libres de enfermedades. En el CARDI continúa la investigación sobre este fenómeno. Los indicios actuales sugieren que la diseminación de enfermedades moteadas es relativamente lenta; por ejemplo, los materiales de White Lisbon, libres del moteado, dieron un rendimiento mayor que los materiales de estos cultivares sembrados por los agricultores en condiciones de campo expuesto, durante las estaciones de siembra de 1976, 1977 y 1978 (Cuadro 21.2).

Cuadro 21.2. Rendimiento de tubérculos seleccionados (libres de enfermedades) y no seleccionados (enfermos) de ñame White Lisbon sembrado durante 1976, 1977 y 1978 en tres sitios de Barbados.

Sitio[a]	Año	Rendimiento[b] (tubérculos/ha)		Diferencia (%)
		Líneas sanas	Líneas enfermas	
PT	1976	20.39	14.45	29
PR	1976	26.61	17.23	35
PT	1977	24.70	14.55	41
PR	1977	26.13	17.23	34
PH	1978	21.06	14.55	29
Promedio		23.78	15.60	34

a. PT = Plantación Thicket, St. Philip; PR = Plantación Redland, St. George; PH = Plantación Hothersal, St. John.
b. Promedios de rendimiento; 9880 plantas/ha como densidad de siembra.

Mantenimiento del Ñame Libre de Enfermedades

Como se indicó anteriormente, el material genético básico de clones madre libres de enfermedades se mantiene fácilmente como cultivo de tejidos. En esta forma, las plantas no se exponen a una nueva infección y gran número de clones se mantienen en un espacio relativamente pequeño sin necesidad de hacer operaciones anuales costosas para recolectar ñame en el campo. Las ventajas adicionales de la propagación mediante el cultivo de tejidos son las siguientes: a) se puede producir un gran número de plantas en un tiempo relativamente corto para satisfacer la demanda de un plan de propagación que producirá material de siembra; b) el material de siembra,

Digitized by Google

probado contra patógenos y desarrollado en un medio artificial como un cultivo estéril, proporciona material de propagación cuya trasferencia por vía aérea de un país a otro es muy económica.

Los cultivadores aprobados pueden multiplicar las líneas elite durante varias estaciones de siembra si cumplen estrictamente las medidas fitosanitarias, como la depuración y las inspecciones frecuentes, y si adoptan el esquema organizado de certificación del material genético. Los efectos de las enfermedades causadas por virus, hongos y nematodos deterioran la calidad del tubérculo del ñame. Cuando estas limitantes desaparecen, se obtiene un efecto benéfico e inmediato, tanto directo como indirecto, en la producción, el almacenamiento y el mercadeo del ñame. Las líneas de tubérculos limpios y libres de lesiones, que ya se producen con regularidad, exigen precios altos en los mercados regionales y en los de exportación. En 1984, el 80% del ñame *D. alata* producido por Barbados se probó respecto a patógenos, y del 60% al 70% del cultivo cumplía con la calidad del producto de exportación.

Los resultados de la investigación han demostrado que las enfermedades virales del ñame causan también reducciones sustanciales en los rendimientos del tubérculo del ñame. Por ejemplo, los resultados de ensayos repetidos en que se cultivaron líneas seleccionadas y libres de enfermedades de *D. alata* cv. White Lisbon, frente a líneas infectadas no seleccionadas, indicaron que los rendimientos de las primeras fueron consistentemente superiores en 29%-41% a los de las últimas (Cuadro 21.2). Por consiguiente, el material de siembra de ñame libre de enfermedades rinde beneficios inmediatos a los agricultores.

Conclusiones

En la Mancomunidad del Caribe se ha logrado establecer un plan autofinanciado de propagación del ñame. El esquema de propagación descrito en este documento (Figura 21.1) se propone como un modelo básico para los esquemas del futuro. El material de propagación libre de enfermedades proporciona beneficios tanto para el agricultor como para el consumidor. El agricultor es capaz de aumentar la producción de los tubérculos de ñame en el área actualmente dedicada al cultivo y de producir un tipo de ñame uniforme y de alta calidad, lo que resulta en mayores retornos del cultivo. A su vez, el consumidor se beneficia con estándares más altos en la calidad del tubérculo porque hay menor desperdicio y daño de los tubérculos durante el almacenamiento, la preparación y la cocción del ñame. Estos logros estimulan al consumidor a preferir el ñame y, en consecuencia,

Digitized by Google

reducen las presiones del consumo local sobre la importación de hortalizas, tubérculos, y raíces alimenticias.

Algunos beneficios adicionales recibe el sector de procesamiento del ñame, que estimulan la máxima utilización de las tierras agrícolas disponibles. La producción de ñame libre de enfermedades ofrece menos dificultades para las fábricas de 'ñame instantáneo' que la compra de materia prima adecuada para el procesamiento. Actualmente, la relación de conversión estimada, es decir, el peso total de las hojuelas de ñame (producto procesado) respecto al peso total de los tubérculos de ñame (materia prima), es aproximadamente de 1:8. Esta baja relación de conversión se debe a los altos niveles de enfermedad del tubérculo y a desperdicios en las operaciones de pelado. Una mayor consistencia en la forma y la calidad del tubérculo de ñame libre de enfermedades dará como resultado un menor desperdicio de la materia prima y, por tanto, mayores tasas de conversión. A su vez, éstas harán que la industria de procesamiento de ñame sea comercialmente más viable en los países tropicales.

Referencias

Mantell, S. H.; Haque, S. Q. y Whitehall, A. P. 1980. Apical meristem tip culture for eradication of flexuous rod viruses in yams (*Dioscorea alata*). Tropical Pest Management 26(2):170-179.

———; ——— y ———. 1978. Clonal multiplication of *Dioscorea alata* L. and *Dioscorea rotundata* Poir. yams by tissue culture. J. Hort. Sci. 53(2):95-98.

——— y Haque, S. Q. 1978. Incidence of internal brown spot disease in White Lisbon Yams (*Dioscorea alata* L.) during storage. Exp. Agric. 14(2):167-172.

———; Mohamed, N. A.; Haque, S. Q. y Phelps, R. H. 1977. Virus diseases of yams in the Commonwealth Caribbean. Technical report no. 3. Caribbean Agricultural Research and Development Institute (CARDI), Trinidad. 46 p.

Martin, F. W. y Delphin, H. 1969. Techniques and problems in the propagation of sapogenin-bearing yams from stem cuttings. Journal of Agriculture (University of Puerto Rico) 53:191-198.

Digitized by Google

Capítulo 22

Micropropagación de plátanos y bananos

A. Angarita*
M. Perea**

Agradecimientos

Es un honor para los autores presentar un sincero agradecimiento al Dr. A. D. Krikorian por su permanente ayuda en el desarrollo de estos trabajos y por el suministro de los clones Saba y Pelipita. Colciencias participó en la financiación de la fase inicial de este estudio. La Federación Nacional de Cafeteros y el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) suministraron el material vegetal con que se inició la colección del germoplasma in vitro.

* Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
** Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

Digitized by Google

Conceptos Básicos

Dentro de la familia de las Musáceas, el género *Musa* ha adquirido importancia en la alimentación humana a nivel mundial; de él derivan dos tipos específicos: los plátanos de cocción ('cooking bananas') y los bananos que se consumen crudos ('dessert bananas').

Las teorías sobre el origen indomalayo de esos cultivares se remontan a los estudios de Kurt en 1865, y hoy ha sido ampliamente demostrado que todos los bananos y plátanos comestibles se derivan de dos especies silvestres: *Musa acuminata* Colla (*M. cavendishii* Lamb ex. Paxt.) y *Musa balbisiana* Colla.

Actualmente, los sistemas de clasificación generalmente aceptados se basan en los trabajos de Simmonds y Shephard (1956) quienes establecieron calificaciones para identificar los aportes genómicos provenientes de las especies *M. acuminata* (genoma A) y *M. balbisiana* (genoma B).

Clones

En este capítulo se discuten esencialmente los clones triploides, mucho más numerosos que los diploides y tetraploides, y se designarán con los siguientes códigos: AAA, para bananos con muy bajo contenido de almidones y mayor contenido de azúcares; AAB, para plátanos de cocción del tipo hartón con dominancia 'acuminata'; y ABB, para plátanos con dominancia 'balbisiana', llamados también 'cuatro filos' en algunos países de América tropical, con alto contenido de almidones y bajo contenido de azúcares.

Los plátanos con dominancia balbisiana han demostrado tolerancia a la sigatoka negra (p.ej. los clones Saba y Pelipita) puesto que, según Krikorian y Cronauer (1983), el genoma B (de balbisiano) trasfiere resistencia o tolerancia a esta enfermedad.

El trabajo descrito en este capítulo está relacionado con micropropagación y se basa primordialmente en algunos clones de interés para Colombia, como Saba (ABB), Pelipita (ABB), 'Grand Naine' o Gran Enano (AAA), Hartón (AAB), y un mutante de éste, el Hartón Enano (AAB). Se mencionan además algunos diploides de acuminata (genoma A) como el Bocadillo (AA) que presentan interés en zonas afectadas por el gusano tornillo (*Castniomera humboldti*).

El clon Saba, miembro del grupo ABB, es notable por su alto grado de tolerancia a una enfermedad temible, la sigatoka negra, causada por el

Digitized by Google

hongo *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis* (Stover, 1977). Este patógeno, de extrema agresividad, fue detectado en Urabá, Colombia, en diciembre de 1981. El clon Saba posee también alto grado de tolerancia a la sigatoka amarilla (causada por *Mycosphaerella musicola*) y al moko (causado por la bacteria *Pseudomonas solanacearum*). Los caracteres organolépticos del clon son similares a los del plátano Hartón (*Musa* sp., AAB) aunque Saba tiene mayor contenido de almidones por la dominancia del genoma B.

El clon Gran Enano (AAA), principal cultivar de banano de exportación en la actualidad, tiene las siguientes características: su contenido de almidones es bajo; es resistente a las razas 1, 2 y 3 del mal de Panamá, causado por el hongo *Fusarium oxysporum* L. sp. *cubense*; es susceptible a la sigatoka amarilla, al moko, a la sigatoka negra, y a la raza 4 del mal de Panamá (Perea y Angarita, 1984).

Mejoramiento

La mayor parte de los esfuerzos de investigación en el género *Musa* han procurado mejorar la calidad de la fruta, la condición de enanismo de la planta para contrarrestar su volcamiento, y la resistencia del germoplasma a las enfermedades ya mencionadas cuyo control exige hoy al investigador soluciones inmediatas. No las hubo en el pasado cuando el mal de Panamá, p.ej., devastó los cultivares de exportación del grupo Gros Michel, anteriormente cultivados en la zona bananera del Magdalena y en Urabá, en Colombia. En la actualidad, tales soluciones inmediatas son necesarias para controlar el moko del plátano, para reducir la alta incidencia que tiene la sigatoka común en el plátano de la zona cafetera, y para combatir la sigatoka negra que afecta tanto al banano como al plátano.[1]

---

1. La sigatoka negra se manifiesta como manchitas de color marrón sobre las hojas. La esporulación del hongo tarda de 18 a 30 días. Los primeros síntomas visibles son rayas: inicialmente aparece un punto marrón indistinguible, luego una estría que se alarga en el sentido de la venación secundaria, y se hace gradualmente más oscura; finalmente la mancha toma una forma más elíptica. Estos cambios se suceden rápidamente.

   Los síntomas en el plátano Hartón (grupo AAB) por ejemplo, son la defoliación total, el racimo colgante, el sabor ácido de la fruta que prácticamente la inutiliza, y los hijuelos que no prosperan. En condiciones favorables, es decir, con temperaturas superiores a los 21-22 °C y con humedad saturante, el hongo se desarrolla rápidamente.

   La sigatoka negra es altamente patogénica en América tropical (Stover, 1972). Se conoce en áreas bajas, donde ataca tanto a cultivares de plátano como de banano. Se desconoce cómo actúa a más de 1000 msnm, zona donde la sigatoka común (*Mycosphaerella musicola*) se convierte en un patógeno muy agresivo; esta enfermedad, descrita en Java en 1902, tiene semejanzas morfológicas muy acentuadas con la sigatoka negra. (Continúa)

Digitized by Google

Los costos de la aplicación de fungicidas para el control de estas enfermedades en vastas extensiones de cultivo —considerando la agresividad que desarrolla la sigatoka negra en los cultivares tradicionales de plátano y previendo su posible dispersión a las regiones andinas colombianas— hacen necesario el estudio del potencial de regeneración de los brotes para anticiparse al remplazo total de aquellos cultivares por variedades tolerantes o resistentes.

El plátano y el banano son algunos de los cultivos conspicuamente más estériles por su condición de triploides; sus frutos son partenocárpicos y su semilla sexual es estéril. Por consiguiente, los mecanismos convencionales de mejoramiento no son aplicables a estas especies, a excepción de los cruces entre diploides y tetraploides que sí son fértiles. Así pues, la propagación de clones comestibles debe hacerse únicamente por vía vegetativa (Krikorian y Cronauer, 1984a).

En la propagación vegetativa tradicional se utilizan los siguientes materiales: yemas que surgen alrededor de la corona del cormo, brotes jóvenes llamados 'puyones', colinos o hijuelos que salen de la base del 'tronco' principal, y porciones del cormo. Los colinos ('sword suckers') se usan más comúnmente ya que fructifican con mayor rapidez que los otros propágulos (Simmonds, 1973).

Todos los propágulos permiten la trasmisión de patógenos sistémicos y vasculares; por otro lado, a menudo hay escasez de material para siembra que además debe someterse a períodos cuarentenarios (Stover, 1977). Por tanto, se han desarrollado varios sistemas de multiplicación como el de Barker (1959) quien intentó incrementar la formación de brotes laterales removiendo las vainas foliares viejas del seudotallo: así se desarrollaron yemas que en condiciones normales de campo no lo hubieran hecho. Se ha informado sobre otros mecanismos para estimular el desarrollo de las yemas (Krikorian y Cronauer, 1983a); de todos ellos, el método Barker ha tenido mayor éxito (Simmonds, 1973).

Producir clones resistentes o tolerantes a la sigatoka negra (o a otras enfermedades de estos cultivos) mediante la hibridación convencional ha

---

El hongo causante de la sigatoka negra, *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*, presenta conidióforos sencillos en grupos de 4 a 20, abundantes en la cara foliar inferior. Las conidias tienen formas ovaladas, rectas o curvas; el desprendimiento de una conidia deja una cicatriz. El viento causa la disociación de las ascosporas; la espora penetra por los estomas y germina en dos días.

En las plantaciones, la enfermedad se ha combatido aplicando fungicidas protectores (orgánicos o inorgánicos, como los compuestos cúpricos), sistémicos y fungistáticos. Aplicaciones altas de compuestos cúpricos han llegado a inhabilitar los suelos en algunas regiones de América Central que han acumulado hasta 1000 ppm de cobre (Jaramillo, 1982).

Digitized by Google

sido una investigación de muchos años, ya que la resistencia debe buscarse en las fuentes diploides silvestres con el fin de producir, partiendo de éstas, un triploide comercial (Krikorian y Cronauer, 1984). En los cruzamientos se utiliza polen de clones masculinos fértiles y flores de clones masculinos estériles y fértiles, procurando obtener clones triploides. La progenie tetraploide, resultado de la fusión de una célula embrionaria triploide femenina y del gameto masculino triploide, es poco numerosa porque las semillas producidas son escasas (Rowe, 1981). No son éstas, sin embargo, las únicas estrategias de los fitomejoradores de banano.

Cultivo de tejidos

Es necesario implementar otras técnicas dirigidas al mejoramiento genético y sanitario y a la multiplicación masiva de clones con características deseables. Con la técnica de la micropropagación partiendo de meristemas se prevé actualmente la obtención potencial hasta de 15,000,000 de plántulas por meristema al año (Angarita y Perea, 1984). La técnica del cultivo aséptico in vitro, aunque presenta algún peligro de reinfección en el campo, permite producir material libre de patógenos, establecer cultivos con plantas sanas, y evitar así la diseminación de enfermedades.

Se ha observado que las tasas de proliferación de estos tejidos cultivados no son uniformes y dependen de factores como el tamaño del brote empleado como explante, el número de brotes subcultivados, el tipo de corte que se emplee (trasversal o longitudinal, es decir, de arriba a abajo del ápice), la consistencia del medio de cultivo (líquido o sólido), y el estado fisiológico del tejido. Según Krikorian y Cronauer (1983a) y Hwang et al. (1984), la inducción, el control del crecimiento, y la morfogénesis están determinados por las relaciones hormonales suministradas en el medio de cultivo.

Existe el riesgo de que se introduzcan nuevos patógenos no detectados en América tropical como el virus del mosaico del abacá (AMV) y el 'Bunchy Top', ambos provenientes del sureste asiático donde existe la mayor variabilidad en el germoplasma del género *Musa* (Stover, 1972).

Técnicas

Los principios de la proliferación de brotes múltiples de Musáceas se basan en el desarrollo de las yemas axilares localizadas en la base del rizoma, en la inserción de las hojas del seudotallo.

Digitized by Google

Uno de los mayores riesgos de la micropropagación in vitro es la posibilidad de propagar enfermedades de tipo vascular o sistémico (mal de Panamá, moko y virus) si el propágulo inicial está contaminado. Para evitarlo, es necesaria una termoterapia previa al aislamiento del meristema, según los resultados de los trabajos de Berg y Bustamante (1974). El éxito de los cultivos iniciales reside pues en el rigor aséptico del aislamiento del meristema inicial y en la selección sanitaria de los brotes que de éste se derivan.

Otra dificultad práctica de la propagación in vitro de las Musáceas es la oxidación de polifenoles, especialmente en algunos cultivares; se ha observado que cultivares como Gran Enano (AAA) y Saba (ABB) no ofrecen grandes dificultades; sin embargo, otras especies como *Musa textilis* y cultivares como Maqueño (AAB) y Resplandor (AAB) presentan elevadas tasas de oxidación de polifenoles. El control más efectivo de esta oxidación son los subcultivos frecuentes y la eliminación de tejidos senescentes de la base de los brotes.

Por último, hay una respuesta diferencial de los cultivares respecto a la capacidad de producción de brotes, y se considera que en esta área debe continuar la investigación para mejorar las técnicas de micropropagación. En la Figura 22.1 se ilustra la respuesta diferencial de los clones Saba y Pelipita respecto al potencial de regeneración de los brotes cultivados bajo condiciones idénticas.

En la Figura 22.2 se describe el protocolo empleado para la multiplicación, selección sanitaria, y evaluación agronómica de los clones de la colección de germoplasma del género *Musa* recolectada en Colombia.

Métodos de Evaluación Sanitaria

Muchos patógenos sistémicos atacan el género *Musa* y por ello es alto el riesgo de distribuir material contaminado a regiones sanas; sólo una estricta selección sanitaria respecto a virus y otros patógenos de difícil detección podrá evitarlo.

El Virus del Mosaico del Cocombro (CMV) es el único que ha sido detectado en las musáceas de América; ha sido también el más estudiado especialmente en lo relacionado con los métodos de detección. Los virus 'Bunchy Top' y el mosaico del abacá (AMV) están restringidos únicamente a los continentes asiático y africano; además, los trabajos sobre su caracterización son escasos. Las técnicas de detección del CMV deben ser extremadamente sensibles porque, además de la raza común del virus, existen

Digitized by Google

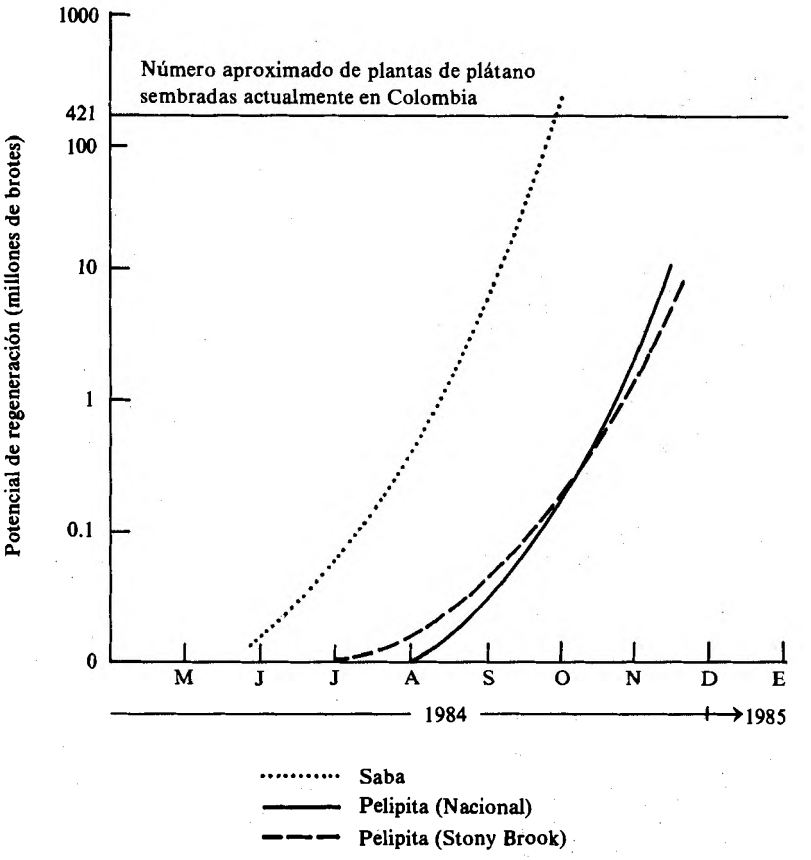


Figura 22.1. Potencial de regeneración de los brotes obtenidos partiendo de un meristema en las variedades Saba y Pelipita.

aproximadamente tres razas más (Kaper y Waterworth, 1981) que, si se hallaran en Colombia, podrían infectar no sólo al género *Musa* sino a otras plantas cultivadas.

Detección del CMV con plantas indicadoras

Una de las mayores dificultades para detectar el CMV en el tejido foliar del género *Musa* reside en la abundancia de taninos de estas plantas: los taninos tienen la propiedad de precipitar los alcaloides y las proteínas. Es posible entonces que estos compuestos, liberados en el momento de la maceración del tejido, se combinen con las proteínas de la cápside del virus

Digitized by Google

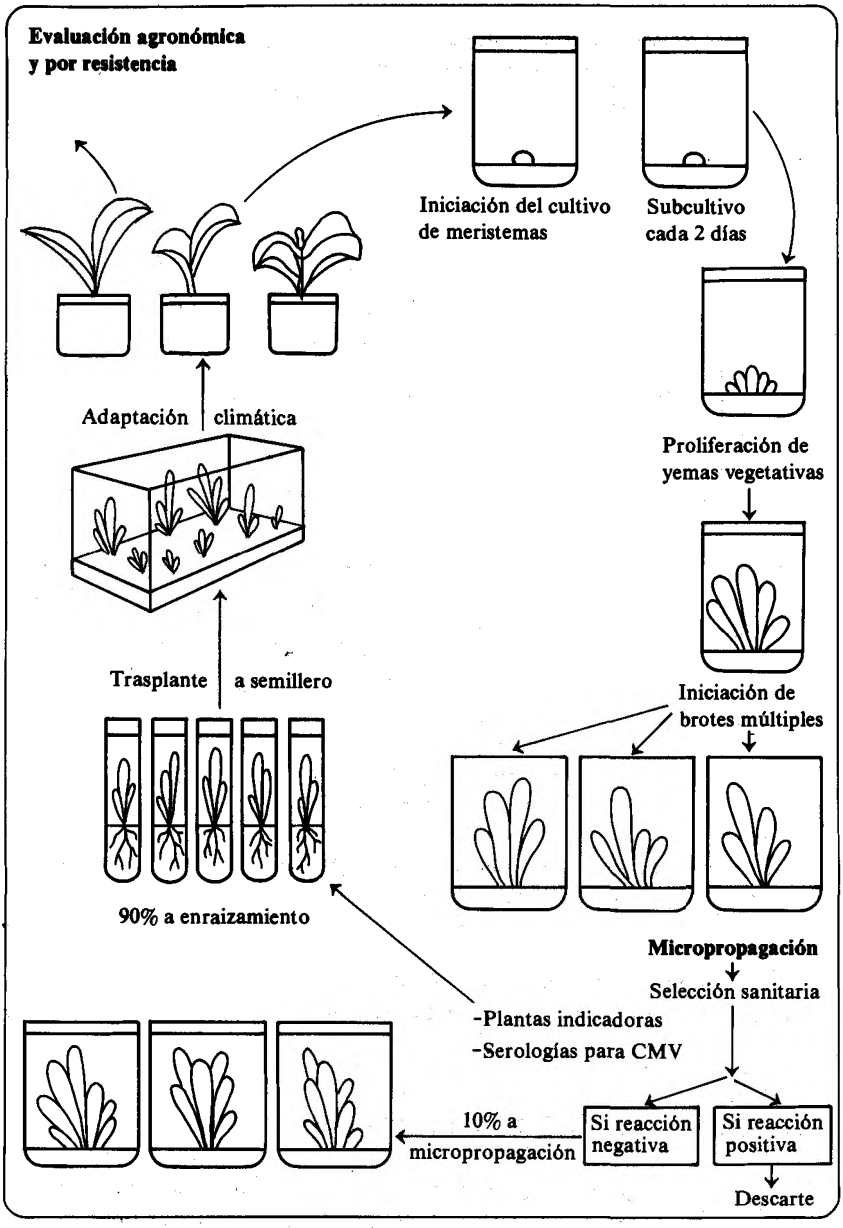


Figura 22.2. Propagación clonal del plátano para su evaluación, tanto agronómica como de resistencia o tolerancia a la sigatoka negra, y para su distribución masiva a los agricultores.

Digitized by Google

imposibilitando la infección de la planta indicadora. La adición de una proteína externa como la polivinil-pirrolidona, la albúmina de suero bovino o la albúmina de huevo aumentan el poder infeccioso del CMV cuando el inóculo contiene extracto foliar de plantas del género *Musa*. Por consiguiente, en las inoculaciones hechas con extractos de banano o plátano se ha utilizado un bófer de extracción compuesto por ácido cítrico 0.1 M y fosfato disódico 0.2 M (AcPh), de pH 6.4 (Documenta Geigy, 1965), al cual se adicionó albúmina de huevo al 0.5%.

Todo el material utilizado para la extracción se preenfrió a 4 °C durante 1 hora y se maceró con las muestras en morteros mantenidos en un baño de hielo. La relación (tejido fresco):(bófer de extracción) fue de 1:20 (p/v) según la recomendación de Peña-Iglesias et al. (1979). La fuente de inóculo fueron plantas de Saba y Pelipita mantenidas en invernadero y provenientes de cultivos in vitro; se tomó tejido fresco de la parte apical de las hojas en desarrollo.

Para detectar la presencia del CMV en *Musa* se han probado las siguientes plantas indicadoras: *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, *Nicotiana longiflora*, *N. rustica*, *N. glutinosa* y *N. tabacum*. En las inoculaciones se utilizó carborundum como abrasivo, en condiciones de temperatura moderada y bajo iluminación. Las hojas inoculadas se lavaron con agua destilada tres minutos después de realizada la inoculación. Con inóculo de Saba y Pelipita no se observaron síntomas visibles de la presencia del virus, porque las plantas indicadoras reaccionaron de manera localizada o sistémica al CMV.

Detección del CMV por serología de doble difusión

Una detección más confiable de la infección con el CMV se logra adaptando la técnica de la doble difusión. Se parte del material vegetal conservado por deshidratación en $CaCl_2$ y de un suero anti-CMV. Luego de una serie de ensayos de medios de difusión, se escogió uno compuesto por agarosa en bófer de Veronal 0.075 M + EDTA 0.025 M, pH 8.6.

Para la extracción del virus se siguió la metodología descrita por Devergne et al. (1978): se maceraron 0.2 g de la muestra en la solución de extracción (citrato de sodio 0.5 M + EDTA 0.07 M + 2-mercaptoetanol 0.1%, con albúmina de huevo al 0.5% o sin ella) de concentración 1.0 ó 2.0 M. Cuando el material se conservó deshidratado, se tomaron 0.01 g de tejido por 2.0 ml de la solución de extracción, teniendo como base el 5% de materia seca en hojas frescas (Bos, 1977). Esta operación se realizó en frío, con todo el material preenfriado durante una hora a 4 °C.

Digitized by Google

El macerado se mezcló con cloroformo frío (v/v) inmediatamente después de la maceración o en el momento previo a la centrifugación. Esta mezcla se agitó vigorosamente y se sometió a centrifugación a 4 °C a aproximadamente 2800g durante 10 minutos. La fase acuosa se recuperó y se utilizó para la reacción serológica. La dilución más conveniente del antisuero fué la de 1:4 porque permitía observar las reacciones más claramente.

La detección directa del CMV no se ha logrado empleando tejidos de plantas del género *Musa*; tampoco han sido detectadas las razas CMV-6 y CMV-CFS aun cuando se inocularon con ellas plantas indicadoras.

Evaluación Agronómica

Una de las mayores fuentes de dispersión de plagas y enfermedades en los cultivos es justamente la distribución de colinos o rizomas; por ello, la micropropagación de material sano es una valiosa herramienta de control preventivo, que permite además el intercambio de germoplasma dentro de un mismo país y entre diferentes países, así como su evaluación agronómica.

En Colombia se han tomado como caracteres principales de evaluación agronómica en cultivares de *Musa* sp. los siguientes: el número de manos; el número de dedos por mano; el diámetro y la altura del seudotallo (que son un factor de resistencia al volcamiento); la resistencia, tolerancia o suceptibilidad a patógenos como sigatoka común, sigatoka negra, y moko; y algunas características organolépticas. Dos de los clones más promisorios de plátano, Saba y Pelipita, fueron suministrados por A. D. Krikorian de la Universidad del Estado de Nueva York en Stony Brook. Saba presenta alta tolerancia a la sigatoka negra en condiciones de fuerte presión del patógeno en la zona de Urabá, al noroeste colombiano, y es también tolerante al moko en aquellas regiones del Tolima de donde desapareció el cultivar Cachaco (ABB) por su extrema susceptibilidad a esta enfermedad. Pelipita ofrece también una alternativa promisoria para remplazar al Cachaco porque es tolerante al moko y posee cualidades organolépticas muy similares.

Digitized by Google

Descripción de Técnicas

A. Colección de material inicial

1) Obtenga rizomas de colinos jóvenes preferiblemente en pleno estado de desarrollo.

2) Elimine el seudotallo a una altura aproximada de 10 cm por encima de la inserción de las hojas en el cormo basal.

3) Elimine las raíces del rizoma hasta que se observen los tejidos blancos internos.

4) Si el material proviene de zonas con problemas sanitarios como sigatoka amarilla, sigatoka negra o nematodos, es necesario aplicarle tratamientos de control superficial.

5) Trasporte el material hasta el laboratorio en condiciones de buena ventilación.

B. Aislamiento y cultivo de meristemas

1) Remueva la base externa de las hojas del seudotallo y los tejidos blancos de la base del cormo, hasta obtener aproximadamente un cono de 1 cm de longitud que preserve el meristema central. Conserve cerca de 1 cm^3 del tejido del rizoma.

2) Lave el cono superficialmente con agua destilada estéril que contenga 1/1000 de Teepol o Tween-20.

3) Enjuáguelo tres veces, como mínimo, con agua destilada estéril.

4) Con la ayuda de un estereoscopio y en condiciones de absoluta asepsia (cámara de flujo laminar) elimine los primordios foliares hasta obtener un cono de 1-2 mm de longitud. Conserve siempre un mínimo del tejido del rizoma para poder manipular fácilmente el meristema.

5) Desinfecte el cono superficialmente con hipoclorito de sodio al 0.5% adicionado de Tween-20 al 1/1000, durante 10 minutos.

Digitized by Google

6) Enjuáguelo cuatro veces con agua destilada estéril.

7) Proceda a eliminar los primordios adyacentes hasta que aparezca el meristema central.

8) Disecte el meristema junto con uno o dos primordios iniciales.

9) Trasfiéralo a un medio líquido (10 ml de medio de cultivo por frasco) en frascos de aproximadamente 50 ml.

Medio de cultivo (Krikorian y Cronauer, 1984b):
Sales de Murashige y Skoog (1962)
Sacarosa, 40 g/litro
BAP, 5 mg/litro
Inositol, 100 mg/litro
Tiamina-HCl, 1 mg/litro
pH 5.8
Esterilización: 121 °C durante 20 minutos.

10) Cultívelo en las siguientes condiciones: 16 horas de fotoperíodo, agitación a 100 rpm, y 30 °C de temperatura.

11) Haga subcultivos en las mismas condiciones cada dos días durante tres semanas.

12) Si la yema se conserva blanca, trasfiera el cultivo al mismo medio inicial suplementado con 0.7% de agar.

C. Propagación masiva de brotes

1) Cuando aparezcan brotes múltiples en el cultivo, separe asépticamente los brotes y subcultívelos individualmente en el mismo medio (Figura 22.3, A,B).

2) Elimine los tejidos necróticos externos y las hojas desarrolladas; conserve el brote de aproximadamente 1 cm de longitud.

3) Haga un corte longitudinal en el brote a través del ápice y subcultive separadamente.

Digitized by Google

4) Los subcultivos pueden mantenerse indefinidamente si se trasfieren a un medio fresco cada semana.

5) Los brotes externos más desarrollados pueden utilizarse para enraizamiento y los internos más pequeños para continuar la multiplicación (Figura 22.3, C).

D. Desarrollo de brotes y enraizamiento

1) Aísle brotes individuales bien desarrollados de 1-2 cm de longitud.

2) Trasfiéralos a un medio de cultivo MS suplementado con 1 mg/litro de AIA, en tubo de ensayo (Figura 22.3, D).

3) Incube durante dos semanas a 30 °C y con 16 horas de luz por día.

4) Cuando la plántula haya alcanzado 6-7 cm de longitud y las raíces parezcan bien desarrolladas, trasfiéralos a las condiciones del exterior (Figura 22.3, E).

E. Adaptación a condiciones del exterior

1) Retire cuidadosamente la plántula del tubo de ensayo.

2) Lave las raíces con agua tibia (35 °C) hasta eliminar completamente los residuos de agar.

3) Siembre en semilleros que contengan vermiculita, escoria de coke o suelo orgánico.

4) Empape el cultivo con una solución de Benlate (400 ppm)

5) Conserve en condiciones de alta humedad relativa (mínimo 90%) durante una semana (Figura 22.3, F).

6) Fertilice haciendo aplicaciones foliares con una solución completa de Hoagland o con cualquier fertilizante foliar completo.

Digitized by Google

7) Las plántulas son susceptibles al ataque de ácaros; obsérvelas periódicamente y si es necesario haga una aplicación de Plictran (cihexatin).

8) Después del sexto día disminuya la humedad relativa progresivamente; trasfiera las plántulas a bolsas individuales en condiciones de invernadero.

9) Mantenga las plantas a la sombra.

10) Haga riegos abundantes o frecuentes durante los dos primeros meses y practique un óptimo control de malezas.

La Figura 22.3 resume los pasos principales que siguen la micropropagación, el enraizamiento, y la adaptación de plántulas de banano y plátano.

Aplicaciones de la Micropropagación

El cultivo de tejidos es una herramienta invaluable para resolver los problemas sanitarios que trae consigo la propagación y el mejoramiento genético de bananos y plátanos en el mundo.

Por fortuna, el género *Musa* puede multiplicarse rápidamente mediante las técnicas de micropropagación. El cultivo de meristemas hace posible la erradicación de agentes patógenos y permite no sólo los intercambios de germoplasma sano sino la multiplicación comercial de bananos. En Taiwan, por ejemplo, ha facilitado el control de la raza 4 de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* que ataca a los bananos del grupo Cavendish. El cultivo de embriones sexuales, adaptado por Cox et al. (1960) para propagación sexual de diploides de *Musa balbisiana*, ha sido una contribución muy útil para la germinación in vitro de semillas de los híbridos obtenidos en los programas de mejoramiento.

La micropropagación in vitro ha permitido también propagar rápidamente y evaluar mutantes espontáneos con características agronómicas interesantes, como los mutantes enanos de la variedad Hartón (AAB).

Los trabajos de Guzmán (1975; 1976), De Langhe (1969), Menéndez (1973), Broertjes y van Harten (1978) han demostrado los beneficios de las técnicas de mutagénesis inducida —mediante radiaciones y compuestos químicos que producen variaciones genómicas— en el mejoramiento genético del género *Musa*.

Digitized by Google

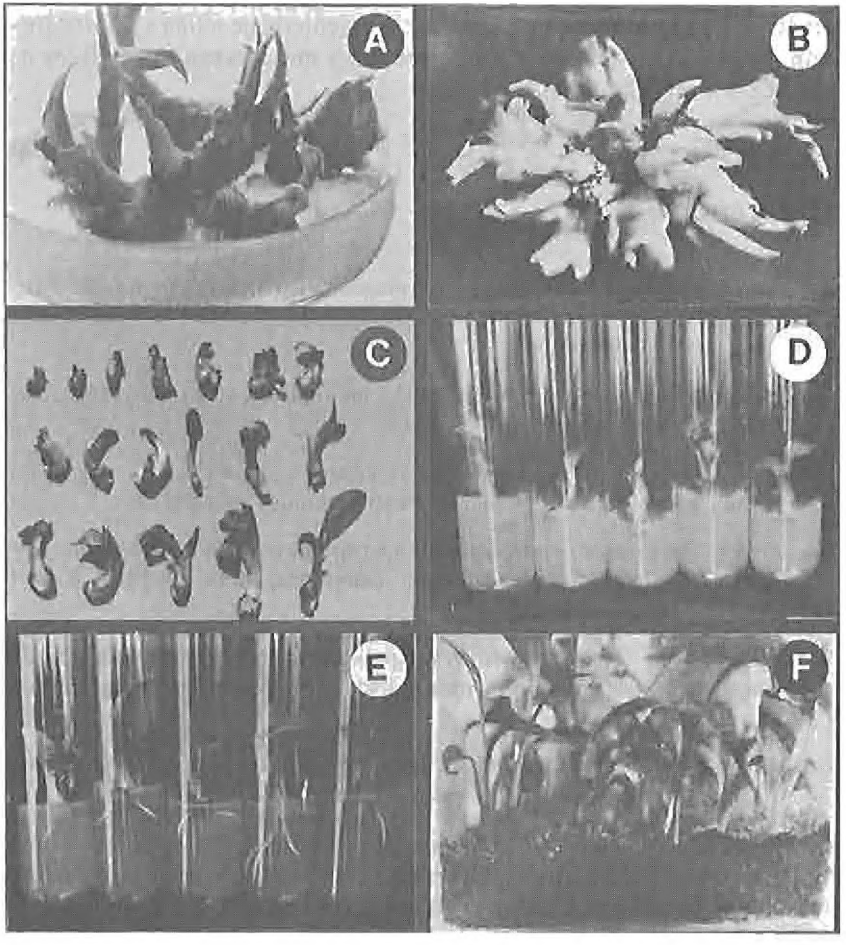


Figura 22.3. Fases de la micropropagación en *Musa* sp. A) Proliferación de brotes in vitro. B) Tipos de brotes obtenidos. C) Separación de los brotes: los más desarrollados se utilizan para enraizamiento; los más pequeños deben micropropagarse nuevamente. D) Fase inicial del enraizamiento, en tubo de ensayo. E) Plántulas enraizadas listas para ser trasferidas a semilleros. F) Plántulas en el semillero en codiciones de alta humedad relativa.

Otra aplicación reciente, documentada en los trabajos pioneros de Krikorian y Cronauer (1983b), son las técnicas de cultivo de células y de selección de líneas celulares resistentes a los patógenos. La embriogénesis somática y el aislamiento, cultivo y regeneración de plántulas a partir de

Digitized by Google

protoplastos abren una perspectiva revolucionaria en el mejoramiento genético. Es posible finalmente aplicar la ingeniería genética a la introducción de genes de resistencia a enfermedades que afectan los cultivos de Musáceas a nivel mundial.[2]

Referencias

Angarita, A. y Perea M. 1984. Avances del proyecto 'Estudios orientados al control de la Sigatoka Negra en plátano y banano'. Segundo informe Colciencias. [Ref. 10000-4-36-83]. 60 p.

Barker, W. G. 1959. A system of maximum multiplication of the banana plant. Trop. Agric. (Trinidad) 36:275-284.

Berg, L. N. y Bustamante, M. 1974. Heat treatment and meristem culture for the production of virus free bananas. Phytopathology 64:320-322.

Bos, L. 1977. Persistence of infectivity of three viruses in plant material dried over $CaCl_2$ and stored under different conditions. Neth. J. Plant Pathol. 83:217-220.

Broertjes, C. y van Harten, A. M. 1978. Application of mutation breeding in the improvement of vegetatively propagated crops. Elsevier Sci. Pub., Amsterdam, Holanda.

Cox, E. A.; Stotzky, G. y Goos, R. D. 1960. In vitro culture of *Musa balbisiana* Colla embryos. Nature 185:403-404.

De Langhe, E. 1969. Bananas, *Musa* spp. En: Ferwerda, F. P. y Wit, F. (eds.). Outlines of perennial crop breeding in the tropics. Miscellaneous papers no. 4. Landbownligeschool, Wageningen, Holanda. p. 53-78.

Devergne, J. C.; Cardin, L. y Quiot, J. B. 1978. Detection et identification serologiques des infections naturelles par le virus de la mosaique du cocombre. Ann. Phytopathol. 10(2):233-246.

2. N. del E: Como se sugiere en este capítulo, los cultivos de ápices y aun de meristemas son adecuados para la multiplicación rápida de germoplasma seleccionado del género *Musa*. Recientemente se ha demostrado que tanto las yemas como los ejes de las inflorescencias (porción masculina) pueden cultivarse y presentan desarrollo vegetativo (ver Cronauer, S. y Krikorian, A.D., 1986, en: Vasil, I. K., Cell culture and somatic cell genetics, v. 3, Academic Press, p. 179-186). Sin embargo, falta demostrar fehacientemente que las plantas propagadas por métodos asépticos de naturaleza adventicia son clonalmente estables o, por el contrario, presentan diferentes grados de variabilidad. En cualquier caso, es importante asegurarse de que el material multiplicado esté libre de patógenos antes de su distribución para la evaluación de campo. Por otra parte, no se debe asumir la estabilidad de ningún clon a menos que ésta pueda apoyarse en documentos respaldados por pruebas específicas.

Digitized by Google

Documenta Geigy. 1965. Tablas científicas. 6a. ed. J. R. Geigy S. A., Basilea, Suiza. p. 320-321.

Guzmán, E. V. de. 1975. Project of production of mutants by irradiation of *in vitro* cultured tissues of coconut and bananas and their mass propagation by the tissue culture technique. En: Improvement of vegetatively propagated plants and tree crops through induced mutations. Technical document 173. International Atomic Energy Agency (IAEA), Viena.

———; Ubalde, E. M. y del Rosario, A. G. 1976. Banana and coconut *in vitro* cultures for induced mutation studies. En: Improvement of vegetatively propagated plants and tree crops through induced mutations. Technical document 194. International Atomic Energy Agency (IAEA), Viena. p. 33-54.

Hwang. S. C. et al. 1984. Cultivation of banana using plantlets from meristem culture, at the TBRI. HortScience 19(2):231-233.

Jaramillo, R. 1982. Generalidades sobre el patógeno y control de la enfermedad Sigatoka Negra. En: Memorias del primer foro sobre sigatoka negra en plátano y banano. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

Kaper, J. M. y Waterworth, H. E. 1981. Cucumoviruses. En: Kurstrate, E. (ed.). Handbook of plant virus infections and comparative diagnosis. Elsevier, North-Holland Biochemical Press, Amsterdam, Holanda. p. 257-332.

Krikorian, A. D. y Cronauer, S. 1983a. Técnicas de cultivo aséptico para el mejoramiento del banano y del plátano. Informe mensual no. 55. Unión de Países Exportadores de Banano, Panamá. p. 42-47.

——— y ———. 1983b. Somatic embryos from cultured tissues of triploid plantains (*Musa* ABB). Plant Cell Rep. 2:289-291.

——— y ———. 1984a. Bananas. En: Evans, D. A. et al. (eds.). Handbook of plant cell culture. McMillan Publishing, Nueva York. v. 2, p. 327-348.

——— y ———. 1984b. Rapid multiplication of bananas and plantains by *in vitro* shoot tip culture. HortScience 19(2):234-235.

——— y ———. 1984c. Multiplication of *Musa* sp. from excised stem tips. Ann. Bot. 53:321-328.

Menéndez, T. 1973. Application of mutation methods to banana breeding. En: Induced mutations in vegetatively propagated plants: Panel on mutation breeding. Memorias. International Atomic Energy Agency (IAEA), Viena. p. 75-83.

Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tocacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.

Digitized by Google

Peña-Iglesias, A.; Fisac, R.; Romero, J.; Fresno, J. y Carazo, G. 1979. El mosaico de la platanera canaria; I: Caracterización biológica, serológica, molecular, y ultraestructural de una estirpe (serotipo To) del virus del mosaico del pepino. Serie protección vegetal. An. INIA (México) 12:155-179.

Perea, M. y Angarita, A. 1984. Proyecto para la creación del Centro Internacional de Cultivo de Tejidos Vegetales (CICT). Segunda Expedición Botánica, Bogotá, Colombia. 169 p.

Rowe, P. 1981. Breeding an 'intracotable' crop bananas. En: Rachie, K. y Lyman, I.(eds.). Genetic engineering for crop improvement. Rockefeller Foundation, Nueva York. p. 66-83.

Simmonds, N. W. 1973. Los plátanos. Blume, Barcelona, España. 539 p.

——— y Shephard, K. 1956. The taxonomy and origins of cultivated bananas. J. Linn. Soc. Lond. Bot. 55:302-312.

Stover, R. H. 1972. Banana, plantain and abaca diseases. Commonwealth Mycological Institute, Ken, Surrey, Inglaterra.

———. 1977. Banana (*Musa* spp.) En: Wewitt, W. B. y Chiarappa, L. (eds.). Plant health and quarantine in international transfer of genetic resources. CRC Press, Cleveland, Ohio, E.U. p. 71-79.

Digitized by Google

Capítulo 23

Frutales libres de virus partiendo de ápices meristemáticos cultivados in vitro

L. C. Mosella Ch.*
L. Ascui M.**

* Dirección de Extensión Académica, Universidad de Talca, Chile.
** Escuela de Agronomía, Universidad Católica de Valparaíso, Chile.

Digitized by Google

Introducción

La regeneración de plantas sanas partiendo del cultivo in vitro de ápices meristemáticos de ciertos vegetales leñosos exige la búsqueda de técnicas complejas y su empleo acertado. Esas técnicas deben permitir al explante sortear frecuentes dificultades como la oxidación, la heterogeneidad de respuestas, la reversión al estado juvenil, la presencia de inhibidores de enraizamiento y, sobre todo, la sobrevivencia al trasplante en condiciones autótrofas.

El éxito obtenido en la regeneración de plantas libres de virus partiendo de los trabajos de Morel et al. (1952), que en la actualidad han producido comercialmente un centenar de especies herbáceas, no ha sido posible más que en contadas especies de frutales y forestales. Entre las especies rebeldes, más recientemente llamadas 'recalcitrantes', están el duraznero (*Prunus persica* (L.) Batsch) y numerosos cítricos.

Buscando una mejor respuesta del ápice meristemático de algunos cítricos, Murashige et al. (1972) y Navarro et al. (1975) plantearon la posibilidad del microinjerto in vitro de ápices sobre plántulas provenientes de semillas, logrando así el desarrollo de plantas libres de numerosos virus (Navarro y Juárez, 1977; Roistacher, 1977).

El microinjerto in vitro fue aplicado más tarde al manzano (Alskief y Villemur, 1978), al damasco (Martínez et al., 1979) y a las vides (Engelbrecht y Schwerdtfeger, 1979) en las que se obtuvieron ejemplares libres de virus.

Introduciendo algunas modificaciones a las técnicas disponibles, fue posible regenerar plantas de duraznero libres de virus como Sharka o Plum Pox y algunas cepas del Necrotic Ringspot Virus (NRSV), cuando se microinjertaron in vitro ápices del cultivar GF 305 (Mosella, 1979). Por otra parte, Navarro et al. (1982) informaron acerca de la eliminación de virus como el Prunus Dwarf Virus (PDV) y el Chlorotic Leaf Spot Virus (CLSV) empleando el microinjerto de distintas variedades de duraznero.

Otra técnica, denominada 'microinjerto in vivo' de ápices meristemáticos pretratados in vitro, fue propuesta por Mosella et al. (1980b) e ilustrada por Jonard et al. (1983). Con esta técnica se obtuvieron también plantas sanas de *Prunus persica* (L.) Batsch y con menos complicaciones que con la técnica original in vitro. En 1983, Ascui aplicó estos nuevos procedimientos a diversos cítricos y obtuvo resultados promisorios que esperan los indizajes virológicos correspondientes.

Ha sido posible también, en el curso de estas investigaciones, regenerar plantas a partir del cultivo directo del ápice in vitro, tanto de duraznero

Digitized by Google

(Mosella et al., 1979b) como de limonero (Mosella et al., 1984); sin embargo, los resultados obtenidos no permiten su empleo como técnicas rutinarias para la producción de material vegetal sano de estas especies.

El presente trabajo describe en detalle las diferentes técnicas mencionadas, presenta algunos resultados obtenidos, y propone expectativas de aplicación de estas manipulaciones in vitro. Fue realizado en los Laboratorios de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Escuela de Agronomía de la Universidad Católica de Valparaíso, Chile, en los de Histofisiología y Radiología de la Universidad de Ciencias y Técnicas de Languedoc, Montpellier, Francia, y en la cátedra de Biología y Patología Vegetal de la Escuela Nacional Superior de Montpellier.

Procedimientos

Microinjerto in vitro

PROTOCOLO CLASICO. Describe, como metodología de rutina, los pasos diagramados en la Figura 23.1 (Murashige et al., 1972; Navarro et al., 1977; Alskief, 1978).

1. **Preparación del portainjerto.** Se describe la obtención de plántulas de dos especies que se usarán como portainjertos.

Duraznero. Las semillas desprovistas del endocarpo se esterilizan con alcohol de 95º durante 2 min y luego se tratan con hipoclorito de calcio (9%-12%) más 0.1% de Tween-20 durante 30 a 60 min. Luego se enjuagan tres o más veces con agua destilada estéril.

Las semillas se siembran así asépticamente en 40 ml de medio nutritivo gelificado (Knop-Heller)[1] contenidos en tubos de vidrio de 170 x 30 mm que se tapan con algodón hidrófobo y papel de aluminio. El medio de cultivo contiene agar (8-9 g/litro), sacarosa (40-60 g/litro), y su pH se regula entre 5.5 y 5.6.

En todos estos ensayos los medios fueron esterilizados en autoclave a 105 ºC dos veces: la primera durante 15 min, y 24 horas después durante 5 min.

La estratificación durante un lapso de 60 a 90 días a 4 ºC en la oscuridad favorece la ruptura de la dormencia de *Prunus persica* cv. GF 305.

1. Ver Apéndice F.

Digitized by Google

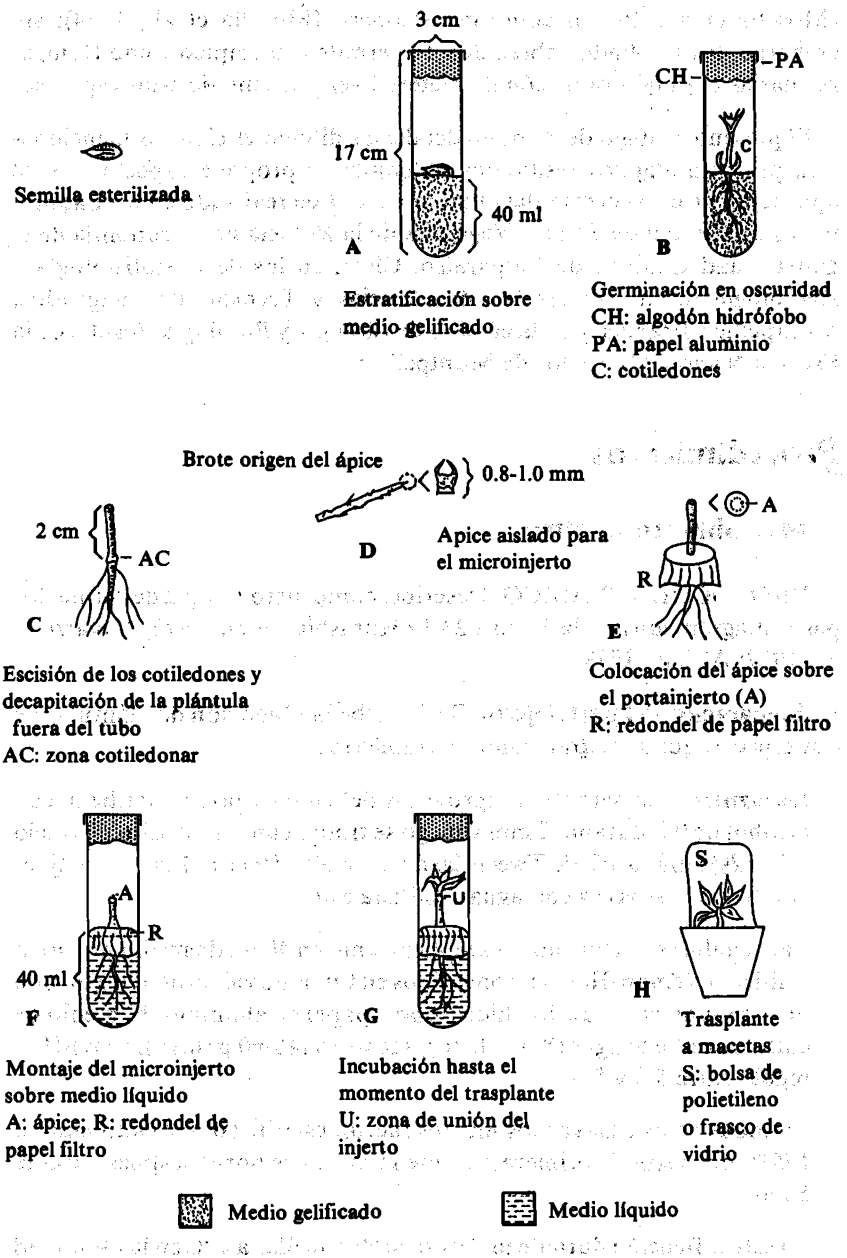


Figura 23.1. Técnica clásica del microinjerto de ápices in vitro, en el duraznero (*Prunus persica* Batsch.).

FUENTE: Alskief, 1978.

Digitized by Google

Luego de este plazo, y en un tiempo de 4 a 9 días a 27 °C en la oscuridad, se obtienen las plántulas que servirán de portainjerto.

Cítricos. Semillas del 'citrange' Troyer, cuyas cubiertas seminales han sido removidas, se esterilizan superficialmente con NaOCl (0.5%) al que se añaden algunas gotas de Tween-20 como agente humectante. Luego se enjuagan tres o más veces con agua destilada estéril. Se siembran las semillas así tratadas en 40 ml de medio nutritivo (Murashige et al., 1962) gelificado (1%), con 20 g/litro de sacarosa, a un pH de 5.6, en tubos de vidrio de 170 x 30 mm y se colocan a 24 °C en la oscuridad; se logra así la germinación y el crecimiento de las plántulas unos 15 días después. En un lapso de 3 a 4 semanas, el epicótilo mide más o menos 6 cm de longitud y las plantas están ya listas para el microinjerto.

2. **Obtención del ápice meristemático.** El ápice meristemático mide de 0.2 a 0.4 mm en cítricos [(*Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Thomson y *Citrus limon* (L.) Burm. f. cvs. Génova, Eureka y Lisboa)] y de 0.6 a 1 mm en el duraznero (*P. persica* cv. GF 305); comprende el meristema propiamente dicho y uno o dos primordios foliares. El meristema se obtiene de los brotes terminales de plantas mantenidas en el invernadero o de plantas cultivadas de 2 a 3 años en el campo, si se trata de cítricos. Los brotes se esterilizan superficialmente con etanol 80% (v/v) durante 2 a 3 min y luego durante 10 a 15 min con hipoclorito de calcio (6%-9%) que contenga 0.1% de Tween-20.

Luego los brotes se lavan con agua destilada estéril tres o más veces. La operación se realiza con la ayuda de un binocular de 20 aumentos en una cámara de flujo laminar.

3. **Microinjerto.** Los portainjertos desarrollados en condiciones estériles se extraen del tubo de germinación en la cámara de flujo; se les secciona el epicótilo a 2 cm del cuello, y se eliminan los cotiledones lo mismo que las yemas laterales si se trata de cítricos. La operación se realiza sobre una caja Petri estéril.

El ápice 'injerto' se coloca sobre la superficie decapitada y en contacto con la zona vascular, en el duraznero. En los cítricos, en cambio, se hace una escisión en la corteza del epicótilo en forma de t invertida (Figura 23.2).

La plántula injertada se coloca en un redondel de papel filtro perforado en su centro que le servirá de soporte en el tubo de vidrio, de manera que el sistema radical quede en contacto con un medio nutritivo líquido. Para los

Digitized by Google

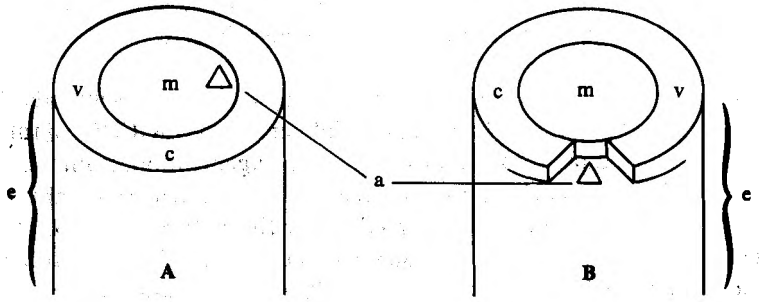


Figura 23.2. Posición de los ápices en el microinjerto in vitro. A) duraznero; B) cítrico; a: ápice, e: epicótilo, v: región vascular, m: región medular, c: región cortical.

durazneros, este medio contiene macroelementos de Knop, microelementos de Heller, y vitaminas de Miller[2] junto con 60 g/litro de sacarosa, a un pH de 5.6. En los cítricos se utiliza el medio clásico de Murashige et al. (1962), al cual se adicionan tiamina-HCl (0.2 mg/litro), piridoxina-HCl (1.0 mg/litro), ácido nicotínico (1.0 mg/litro), mioinositol (100 mg/litro), y sacarosa (75 g/litro); pH = 5.6.

4. **Incubación.** Los microinjertos se incuban en una cámara de ambiente controlado a 24±2 °C, con una intensidad lumínica que varía de 600 lux (durazneros) a 1400-1600 lux (cítricos), y con 16 horas de luz por día. El período de incubación es de 20 a 60 días en durazneros y de 30 a 40 días en cítricos, momento en que las plantas se trasplantan a macetas.

5. **Trasplante a macetas.** Logrado el desarrollo del injerto, las plántulas se extraen de los tubos y sus raíces se lavan profusamente con agua a fin de eliminar los restos del medio de cultivo. Luego se llevan a macetas que contienen un sustrato arena/turba (50%-50%) para los cítricos, y turba, tierra de hoja y arena (en ciertas proporciones) para los durazneros. Estas mezclas se esterilizan previamente en autoclave a 130 °C durante 30 min, o directamente mediante la aplicación de vapor durante una hora.

Las plántulas se cubren en las macetas con una bolsa de polietileno o con un frasco de vidrio para reducir los efectos de la deshidratación. Las plantas se colocan más tarde en zonas sombreadas del invernadero, donde

2. Ver Apéndice G.

Digitized by Google

se adaptan a las condiciones normales del cultivo porque se abren paulatinamente las bolsas y aumenta gradualmente la intensidad lumínica. Posteriormente se realizan los 'indizajes' virológicos.

PROTOCOLO MODIFICADO. Con el fin de mejorar ciertas condiciones de trabajo y obtener mejores resultados en los durazneros, se introdujeron varias modificaciones a la técnica clásica antes descrita (Mosella et al., 1979a) que se detallan a continuación (Figura 23.3).

1. **Preparación del portainjerto.** Las condiciones de esterilización y de estratificación de las semillas que proporcionarán los portainjertos son las mismas del protocolo clásico. Luego de la estratificación a 4 °C (60 a 90 días), las semillas se resiembran en tubos de vidrio idénticos a los anteriores que contengan 5 g de vermiculita embebida en 12 a 20 ml de solución nutritiva; ésta contiene macroelementos de Knop, microelementos de Heller y las vitaminas de Miller además de 40 a 60 g/litro de sacarosa, a un pH de 5.5-5.6. En estas condiciones, y a 27 °C en la oscuridad, se produce la germinación y se desarrollan las plántulas que en 4 a 6 días alcanzan la altura adecuada para el microinjerto (6 a 8 cm).

Según esta técnica la escisión de los cotiledones y la decapitación de la plántula se realizan in situ, es decir, sin remover la plántula del tubo. Un par de tijeras curvas y una pinza 'guillotina' provista de trozos de hojas de afeitar y de fácil construcción facilitan la ejecución rápida de estas operaciones.

Después de los cortes, y mediante una jeringa provista de un filtro Millipore (0.45 nm), se tratan las zonas heridas con gotas de dietilditiocarbamato de sodio ('Dieca', 1.5 g/litro) y de una solución de zeatina (0.01 a 1 mg/litro); queda así el portainjerto en condiciones de recibir el ápice.

2. **Preparación del ápice 'injerto'.** Los ápices se obtienen de brotes esterilizados superficialmente y luego tratados con gotas de Dieca (1.5 g/litro) como antioxidante. Se someten luego a un pretratamiento, siempre en condiciones asépticas, con ZEA (0.01 a 0.1 mg/litro) sobre papel filtro embebido en medio nutritivo, ya sea en tubos de hemólisis o en una caja Petri durante un tiempo que varía entre 4 y 48 horas. El medio basal es el MI116[3].

3. **Microinjerto.** El ápice pretratado se coloca sobre la superficie decapitada de la plántula, siempre en contacto con los vasos conductores del

3. Ver Apéndice F.

Digitized by Google

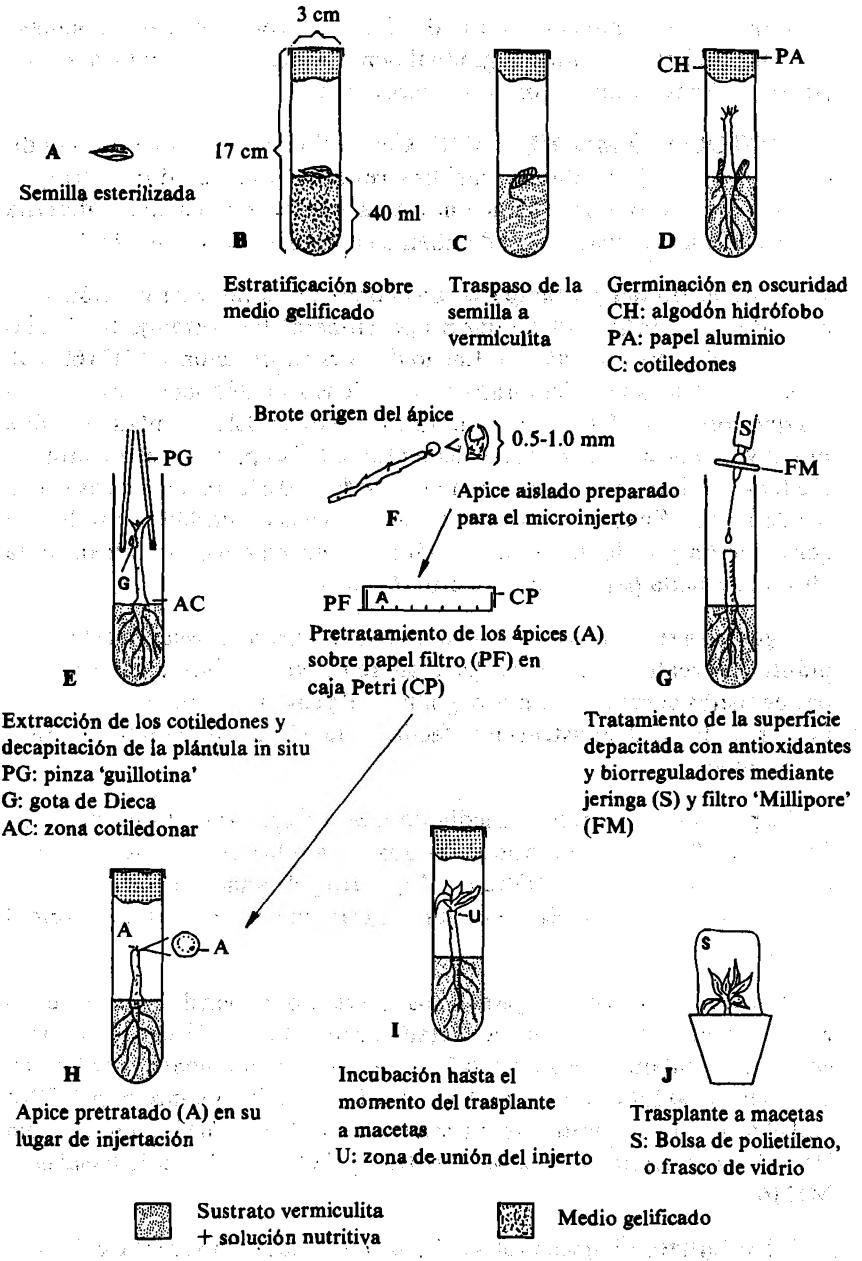


Figura 23.3. Técnica modificada de microinjerto de ápices in vitro, en el duraznero (*Prunus persica* Batsch.).

FUENTE: Mosella et al., 1979.

Digitized by Google

portainjerto. El tubo se sella de nuevo y se coloca sucesivamente en las condiciones de incubación y trasplante que se describieron para el protocolo clásico. Posteriormente se llevan a cabo las pruebas virológicas.

Microinjerto in vivo

Recibido el pretratamiento in vitro, los ápices meristemáticos pueden, al cabo de algunos días, microinjertarse sobre plántulas provenientes de semilla, en condiciones normales de invernadero (Mosella et al., 1980b). Esta metodología se describe en el diagrama de la Figura 23.4.

1. **Preparación del portainjerto.** Se describen los portainjertos del duraznero y de los cítricos.

Duraznero. Aunque los portainjertos se desarrollarán en macetas y en condiciones de invernadero, la estratificación se hace con las máximas medidas de asepsia para asegurar la calidad fitosanitaria de las plantas. Las semillas desprovistas del endosperma se esterilizan, como en los casos anteriores, con alcohol de 95º durante 2 min y luego con hipoclorito de calcio (9%-12%) durante 30 a 60 min agregando Tween-20 (0.1%). Luego se enjuagan una vez con HCl 0.01 N y tres veces más con agua estéril. Enseguida se siembran asépticamente en tubos, como se describió anteriormente, o en cajas Petri entre dos capas de papel filtro humedecidas con agua estéril. Permanecerán así a 4 ºC en la oscuridad durante un período de 60 a 90 días para romper la latencia. Se lavan entonces con agua estéril y se siembran en macetas de 2 litros que contengan una mezcla, en proporciones iguales, de turba, tierra de hoja y arena, esterilizada durante una hora con vapor; luego se colocan las macetas en el invernadero donde permanecerán entre 80 y 120 días hasta alcanzar la altura de injerto (de 30 a 40 cm).

Cítricos. Semillas de *Citrus jambhiri* Lusch (limón rugoso) servirán como portainjerto a *Citrus limon* (L.) Burm. f. cvs. Lisboa, Eureka y Génova. Las semillas se esterilizan como se explicó en el protocolo clásico para la microinjertación in vitro y se siembran en bandejas de germinación (almácigos). Se trasplantan luego las plántulas a recipientes de polietileno negro de 15 x 40 cm con una mezcla estéril de arena y suelo (50%-50% v/v) donde permanecerán en condiciones de invernadero durante 4 a 6 meses; finalmente, estas planticas serán microinjertadas.

2. **Preparación del ápice 'injerto'.** Los ápices meristemáticos que servirán de injerto en esta técnica in vivo, se extraen de los brotes terminales de las plantas madre, se esterilizan según el protocolo clásico, y luego se someten

Digitized by Google

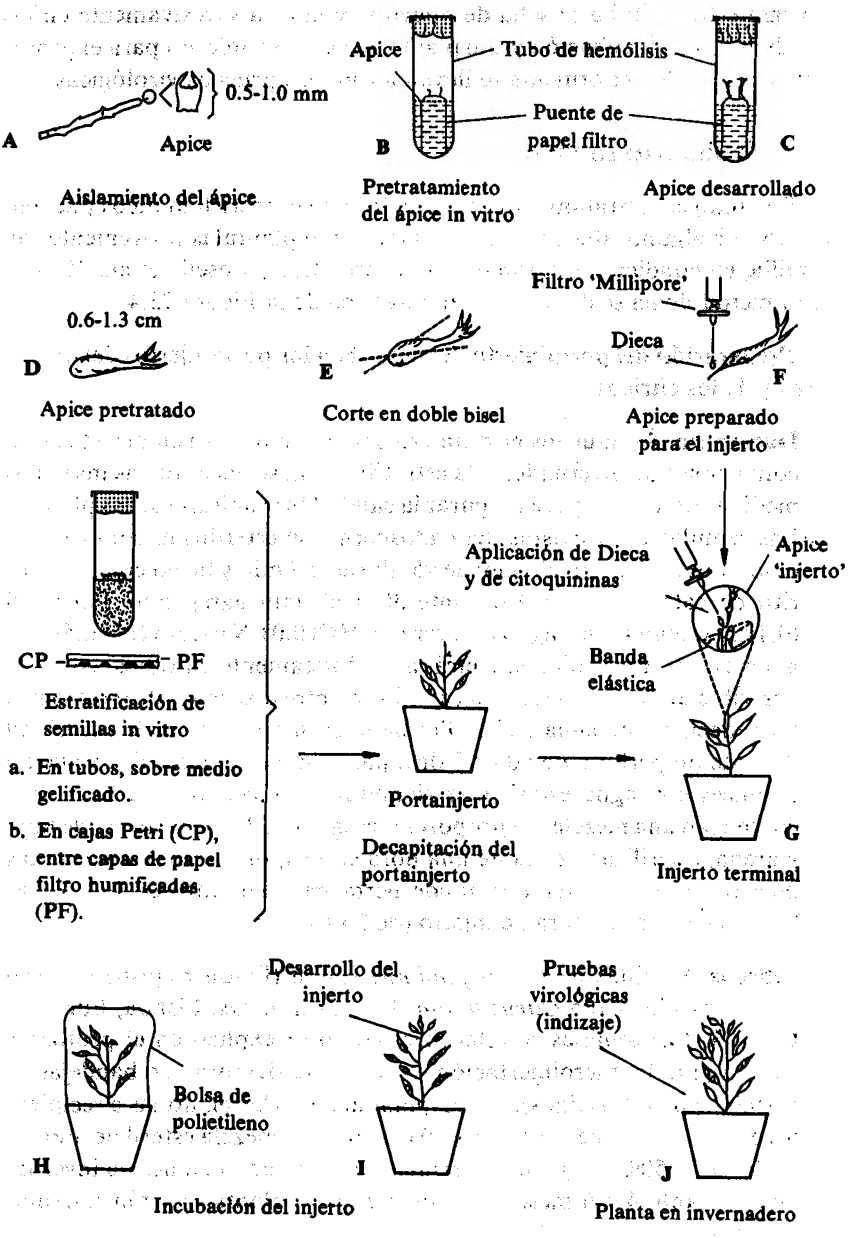


Figura 23.4. Técnica de microinjerto de ápices in vivo en el duraznero (*Prunus persica* Batsch.).

Digitized by Google

a un pretratamiento in vitro para favorecer su crecimiento. Este tratamiento se hace en tubos de hemólisis de 65 x 11 mm sobre un puente de papel filtro, en una solución nutritiva líquida.

El medio —MI116 al que se adicionan 30 g/litro de sacarosa, 0.02 mg/litro de 2,4-D y 1 mg/litro de AG— sirve de base a diferentes tratamientos con citocininas como BAP (0.01 mg/litro) o ZEA (0.01 mg/litro); se combina con un compuesto fenólico, la floridzina (470 mg/litro) en el caso del duraznero, y con BAP (0.1 mg/litro) solamente en el caso de los cítricos (*Citrus limon* (L.) Burm. f.).

Los ápices sembrados se someten a incubación en una cámara de ambiente controlado, con temperaturas de 24±2 °C, y con una intensidad lumínica de 1000 a 1600 lux, 16 horas por día. Después de 15 a 30 días, los ápices pretratados alcanzan un tamaño cercano a 1 cm que permitirá manipularlos fácilmente como 'injertos'. Los ápices se extraen entonces del tubo de cultivo, se lavan con agua destilada y luego con una solución de 1.5 g/litro de Dieca; se hace un corte en doble bisel en la base del ápice desarrollado in vitro, que debe coincidir con el corte que se hará en el tallo decapitado del portainjerto. En las heridas de los cortes se aplica nuevamente Dieca como antioxidante con una jeringa provista de un filtro Millipore (0.45 mm).

3. **Microinjerto.** El portainjerto desarrollado en el invernadero se decapita a 15 ó 30 cm de su base; se practica luego un pequeño corte longitudinal descendente de aproximadamente 0.5 a 0.7 cm donde se inserta el ápice 'injerto' preparado como se indicó antes. Una banda elástica en la unión y la aplicación de Dieca (1.5 g/litro) y de ZEA (1 mg/litro) con jeringa y filtro Millipore en la zona del injerto durante los 2 ó 3 días siguientes, facilitarán el prendimiento. El conjunto se cubre con una bolsa de polietileno y se mantiene en el invernadero, teniendo cuidado de evitar la deshidratación. La bolsa se recorta paulatinamente cuando empieza a evidenciarse el crecimiento de los injertos (15 a 30 días).

Cultivo directo de ápices

Apices de duraznero (cv. GF 305) y de limonero, cultivados in vitro durante 15 a 30 días en las condiciones descritas en la sección sobre preparación del ápice para microinjerto in vitro, se repican a medios de inducción de raíces consistentes en el medio básico MI116 gelificado (0.8%), al cual se adicionan sacarosa (30 g/litro), auxinas solas o auxinas con compuestos fenólicos (rutina o quercetina), y carbón activado. La inducción e iniciación radical se realizan a 24±2 °C, en la oscuridad para el duraznero o en la luz (1600 lux, 16 h por día) para los cítricos.

Digitized by Google

La elongación radical y el crecimiento de la planta regenerada requerirán de un tercer repique a un medio simple (MI116 diluido a la mitad), sin hormonas, con bajo tenor de azúcar (10 g/litro), y con fuerte iluminación (4000 a 6000 lux, 16 h por día).

El trasplante de los ápices enraizados a macetas se realiza en las mismas condiciones descritas en el protocolo clásico para microinjertos in vitro.

Indizaje virológico

En el duraznero, tanto las plantas madre infectadas con Sharka (raza Marcus) o con NRSV (raza G) o con ambos virus, como las plantas regeneradas mediante las diferentes técnicas descritas, pasaron por diversas y sucesivas pruebas de indización virológica para comprobar la presencia o ausencia de partículas virales en los tejidos; esas pruebas son las siguientes:

- Utilización de plantas indicadoras polivalentes: *P. persica* cv. GF 305 (Bernhard et al., 1969) y herbáceas como *Nicotiana develandii*, *N. glutinosa*, *Chenopodium foetidum*, *Ch. amaranticolor*, *Pisum sativum*, *Cucumis sativus* (Fulton, 1970; Marenaud y Mazy, 1977).
- Uso de microscopía electrónica con la técnica llamada 'Leaf-dip' (Hitchborne y Hills, 1965).
- Uso de técnicas serológicas como ELISA (Clark et al., 1976).

Resultados y Discusión

Microinjerto in vitro

Con el protocolo clásico antes descrito (Figura 23.1) se ha podido obtener entre 9% y 20% de plantas regeneradas (microinjertos prendidos) en el duraznero GF 305, y un 20% a 30% de regeneración de naranjo Thompson sobre citrange Troyer, resultados que concuerdan con los obtenidos por Alskief (1978) en *P. persica* Batsch y por Navarro et al. (1977) en diversos cítricos. Estos últimos responden muy bien al trasplante en macetas: hay 90% de sobrevivencia en esta operación; en cambio, con los durazneros no se supera el 20% porque la mortalidad de las plantas por necrosis del portainjerto es grande.

Navarro et al. (1982) logran un 45% a 70% de microinjertos prendidos en variedades de durazneros, como Cardinal y Dixired, microinjertadas

Digitized by Google

sobre plántulas de Nemaguard que superan la etapa de trasplante en un 60% a 70%. Nemaguard es un portainjerto menos susceptible a la anoxia radicular que el extremadamente sensible GF 305 (Leroux et al., 1976). Sin embargo, en esta técnica se pueden señalar algunas dificultades que la hacen lenta y complicada: las numerosas manipulaciones que sufre el portainjerto durante su preparación, el estrés causado a la plántula, y la mayor posibilidad de contaminación y oxidación. Todas redundan en un escaso prendimiento de los injertos, en un fracaso en el trasplante, y en un alto costo de la operación, resultados que no se publican muy a menudo. La operación total de un microinjerto se demora 10 mín.

A pesar de todo, por este método y luego de la aplicación de diversas pruebas virológicas, se logró obtener un 65% de plantas de duraznero libres del virus Sharka y un 65% libres del NRSV que portaban las plantas madre. Otros virus del tipo ILAR (Prune Dwarf Virus, Cherry Rugose Mosaic Virus) y el Chlorotic Leaf Spot Virus han sido eliminados en las plantas que Navarro et al. (1982) regeneraron con estos métodos.

Las modificaciones introducidas en estas técnicas clásicas por Mosella et al. (1979b) han permitido aumentar considerablemente la tasa de éxito de los injertos prendidos utilizando el sustrato vermiculita, el antioxidante (Dieca), y un pretratamiento de los ápices con ZEA. El uso de Dieca (1.5 g/litro) en las zonas heridas, y un tratamiento de los ápices —previo al injerto— con ZEA (0.1 mg/litro) y de la zona decapitada in situ con citocinina (0.1 mg/litro) logran hasta un 84% de éxito en los microinjertos en ciertas épocas del año; el promedio de toda la temporada es de 64%.

Cuando se hacen todas las manipulaciones dentro del tubo que contiene el portainjerto, disminuyen notablemente el estrés de la plántula, las posibilidades de contaminación, y los riesgos de oxidación. La técnica aporta una mejora importante al desarrollo radical de la plántula, que aumenta a 32% el éxito del trasplante a macetas; proporciona también una gran rapidez en la manipulación del microinjerto porque logra hasta cinco y seis microinjertos cada 10 minutos, y disminuye considerablemente los volúmenes del medio nutritivo empleado. Finalmente, los porcentajes de plantas libres de virus obtenidos por esta técnica modificada permanecen invariables, y las plantas no presentan alteraciones fisiológicas ni morfológicas, luego del trasplante y de su desarrollo, que las alejen de sus tipos parentales.

Microinjerto in vivo

La rápida elongación axial de los ápices —tanto de duraznero como de diversas variedades de limonero (Génova, Eureka y Lisboa)— obtenida al

Digitized by Google

cultivarlos sobre el medio líquido MI116 al que se han adicionado diversos biorreguladores y 30 g/litro de sacarosa, permite la obtención de explantes de tamaño adecuado para hacer injertos sobre plantas cuyas semillas se sembraron en el invernadero.

Suplementando el medio básico con 0.02 mg/litro de 2,4-D, 1 mg/litro de AG_3 0.01 mg/litro de BAP o zeatina, y 470 mg/litro de floridzina, se lograron crecimientos promedio de 8 y 9 mm en ápices de duraznero en un lapso de 15 días. La misma combinación de biorreguladores, esta vez sin la presencia de floridzina pero con 0.1 mg/litro de BAP, permitió a los ápices de limonero alcanzar tamaños, en promedio, de 7 mm en 30 días (Ascui, 1983).

Al injertar estos ápices pretratados in vitro sobre plantas desarrolladas en el invernadero (Figura 23.4) se obtuvo un 77% de prendimiento y desarrollo en el cultivar GF 305 de duraznero con respecto al mismo cultivar de 80 a 120 días de edad, y un 30% de éxito en el injerto de *Citrus limon* respecto a plántulas de *Citrus jambhiri* Lusch de 4 a 6 semanas de edad; el prendimiento e inicio del desarrollo de los microinjertos se hizo evidente de los 15 a los 21 días de permanencia en el invernadero. Se estima que este porcentaje de prendimiento puede mejorar en ambas especies, si se estudian algunas variables como la edad de los portainjertos, la aplicación de biorreguladores en la zona del injerto, el método de injerto aplicado, y el portainjerto utilizado.

Empleando esta técnica, se obtuvo un 72% de plantas de duraznero libres del virus Sharka y un 57% libres del NRSV, a pesar de que las plantas madre portaban esos virus.

Diversos aspectos ventajosos destacan en el protocolo propuesto. En primer lugar, hay una disminución considerable en las delicadas manipulaciones requeridas en el microinjerto in vitro, que economizan tiempo, mano de obra especializada y materiales; además, el rendimiento real de las plantas obtenidas es mayor; y principalmente, se supera el problema del trasplante al contar, en el momento del injerto, con plantas portainjerto desarrolladas normalmente.

Cultivo directo de ápices

Tanto en *Citrus limon* cv. Génova como en *Prunus persica* cv. GF 305, se logró la regeneración de plantas bien enraizadas partiendo del cultivo directo de ápices in vitro. En el duraznero, los ápices, después de 20 a 30 días de cultivo in vitro sobre medios que favorecen su elongación, fueron

Digitized by Google

especialmente repicados a medios gelificados (0.8%) a los que se adicionaron auxinas (ANA o AIA, 0.5 mg/litro) y compuestos fenólicos como la rutina o la quercetina (10^{-3} M); de esos ápices, 24% produjeron primordios radiculares en la oscuridad a 24 °C, en un lapso de 2 a 3 semanas. Un nuevo cambio a un medio gelificado simple y sin hormonas (Knop más 10 g/litro de sacarosa) y a un régimen de 6000 lux estimuló la elongación radicular y el desarrollo de la parte aérea de las plantas y determinó porcentajes de plantas libres de virus similares a los obtenidos con las técnicas anteriores.

El trasplante a macetas continúa como la limitante de este tipo de regeneración pues el éxito de esta operación no supera el 20%. En el limonero, por su parte, un 10% de los ápices cultivados sobre el medio de elongación y repicados al medio MI116 gelificado que contenga 2 mg/litro de ANA y 25% de carbón activado emitieron raíces.

Conclusiones

Las técnicas resumidas en la Figura 23.5 permiten regenerar plantas de difícil respuesta al cultivo in vitro partiendo de ápices meristemáticos cuya longitud no sea superior a 1 mm; brindan además la posibilidad de obtener material vegetal libre de ciertos virus que afectan las plantas madre de frutales como el duraznero, sin recurrir a tratamientos termoterapéuticos.

Estos protocolos son aplicables también a especies de cítricos como el limonero y el naranjo, y se consideran una importante herramienta para resolver problemas de limpieza de virus en otras especies leñosas frutales o forestales; se pueden aplicar además a ápices de origen diverso como los de plantas infectadas por patógenos sistémicos, los de callos organogénicos, los de embriones somáticos, los de embriones inmaduros, y otros.

Refuerzos como la termoterapia la quimioterapia, o ambas, podrían utilizarse incluso durante los períodos de cultivo in vitro o de pretratamiento de los ápices; éstos podrán cultivarse luego directamente o microinjertarse in vitro o in vivo, aumentando así las posibilidades de eliminación de patógenos sistémicos.

El porcentaje de plantas libres de virus, regeneradas mediante alguno de estos métodos, podría aumentar considerablemente si se cuenta además con técnicas de propagación masiva o de micropropagación para multiplicar las plantas (o la planta) obtenidas de los ápices (Figura 23.6) mediante microestacas, por ejemplo (Mosella et al., 1980a).

Digitized by Google

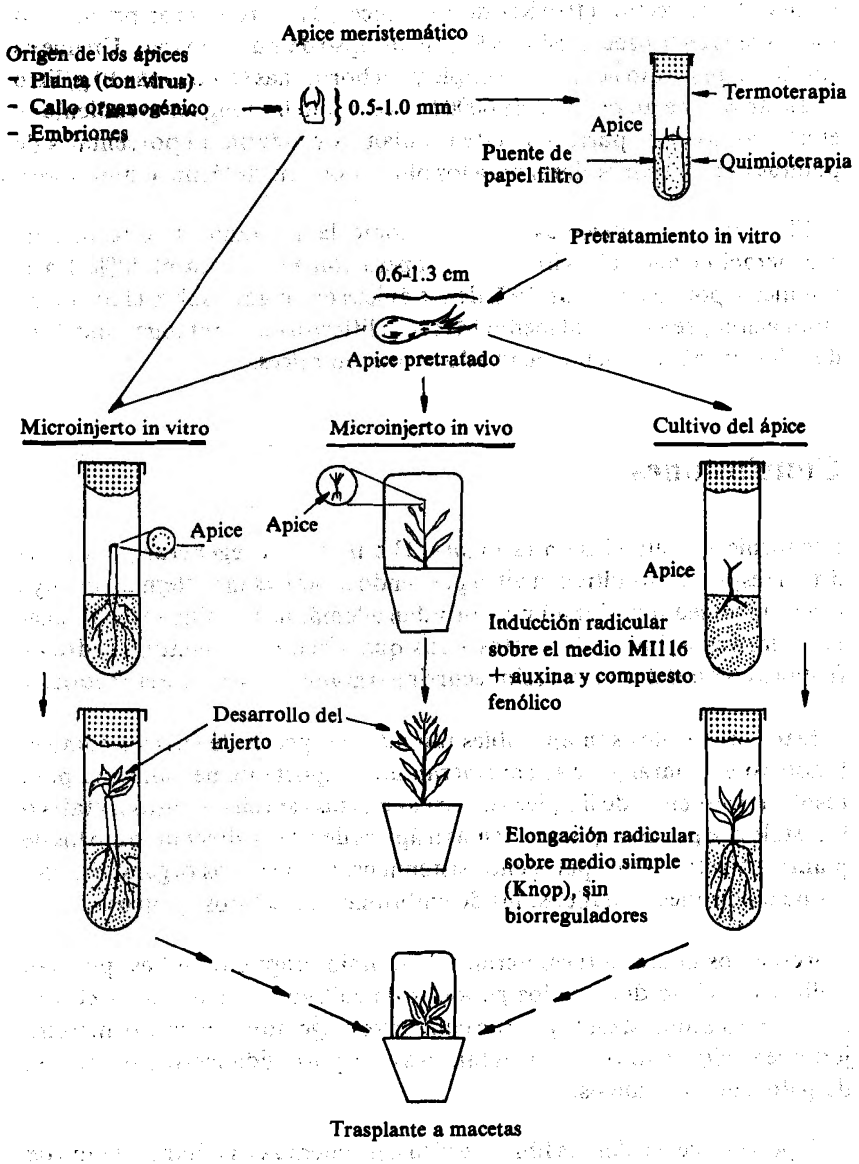


Figura 23.5. Esquema de las posibles aplicaciones del cultivo de ápices in vitro.

Digitized by Google

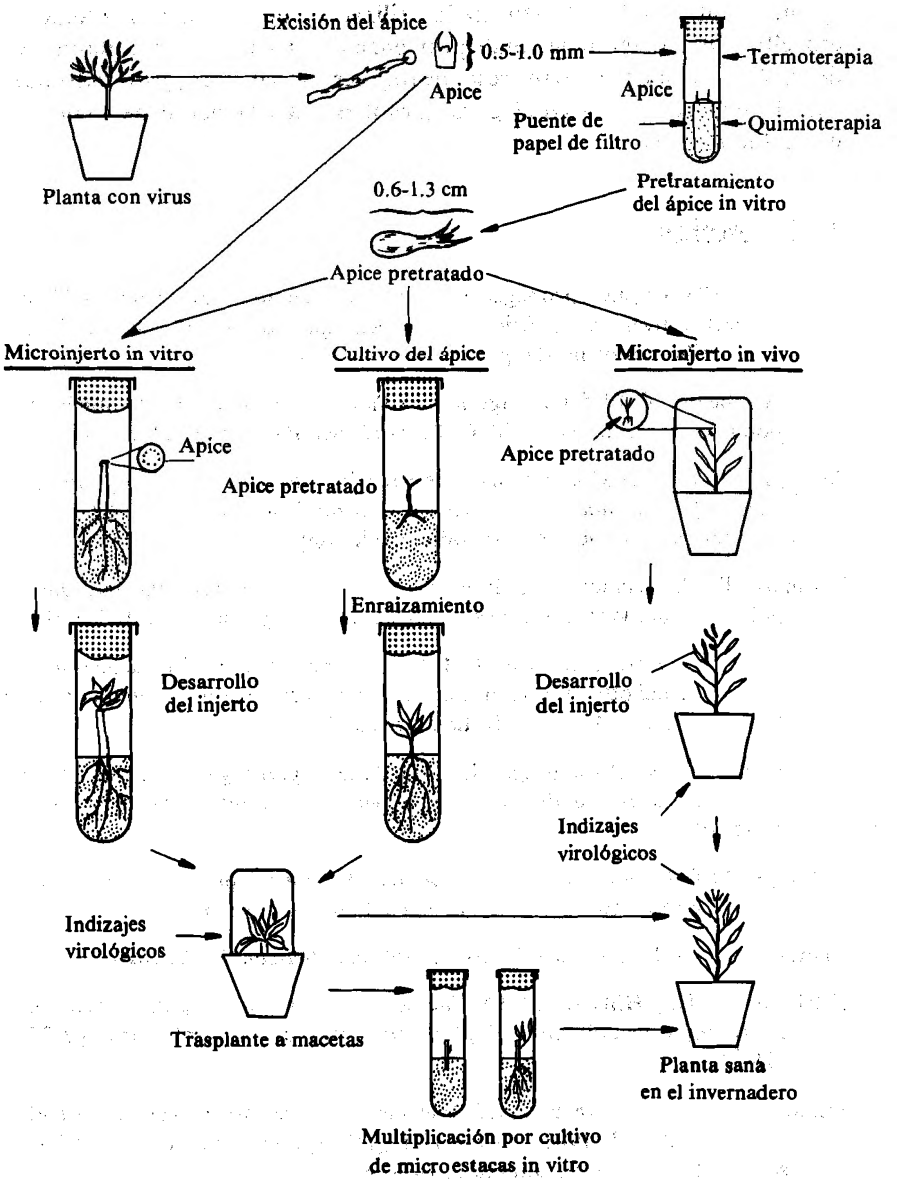


Figura 23.6. Diversas opciones de uso del ápice caulinar de los frutales como medio de eliminación de virus. Cuando se desea desarrollar solamente ápices in vitro, el ápice se obtiene ya sea de una planta (con virus o sana) o ya de callo organogénico o de un embrión.

Digitized by Google

Finalmente, es útil insistir en la utilización de indizajes virológicos específicos del material de donde provienen los ápices u otros explantes, y de aquél que resulte de los procesos de regeneración in vitro; estos indizajes son de imperiosa necesidad para garantizar la obtención de material vegetal libre de virus.

Referencias

Alskief, J. 1978. La micropropagation *in vitro* de quelques arbres fruitiers. Tesis (Doct.) Université de Sciences et Techniques du Languedoc (USTL), Montpellier, Francia. 136 p.

——— y Villemur, P. 1978. Greffage *in vitro* d'apex sur des plantules décapitées de pommier *Malus pumila* Mill. C. R. Acad. Sci. Paris D 282:1115-1118.

Ascui, L. 1983. Utilización del ápice meristemático en la micropropagación de cítricos [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck y *Citrus limon* (L.) Burm. f.]. Tesis. Universidad Católica de Valparaíso, Chile. 109 p.

Bernhard, R.; Marenaud, C. y Sutic, D. 1969. Le pêcher GF 305, indicateur polyvalent des virus des espèces a noyau. Ann. Phytopathol. 1(4):603-617.

Clark, M. F.; Adams, A. N.; Thresh, J. M. y Casper, R. 1976. The detection of Plum Pox and other viruses in woody plants by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Acta Horticulturae 67:51-57.

Engelbrecht, D.J. y Schwerdtfeger, U. 1979. *In vitro* grafting of grapevine shoot apices as an aid to the recovery of virus-free clones. Phytophylactica 11:183-185.

Fulton, R. 1970. Prunus necrotic ringspot virus. CMI description of plant viruses no. 5. Culross and Son, Coupar Angus, Perthshire, Escocia.

Gautheret, R. 1959. La culture des tissus végétaux. Masson, París. 862 p.

Hitchborne, J.H. y Hills, C.J. 1965. The use of negative staining in the electron microscopic examination of plant virus in crude extract. Virology 27: 528-540.

Jonard, R.; Hugard, J.; Macheix, J. J; Martínez, J.; Mosella-Chancel, L.; Poessel, J.L. y Villemur, P. 1983. *In vitro* micrografting and its applications to fruit science. Scientia Horticulturae 20:147-159.

Leroux, P.; Juste, C. y Salesse, G. 1976. Influence de l'anoxie sur la teneur en acides organiques des racines de pêcher GF 305. C. R. Acad. Agric. France 62(11):824-830.

Marenaud, C. y Mazy, K. 1977. Les maladies a virus des arbres fruitiers a noyau; IV: *Prunus* ringspot. Phytoma:13-16.

Digitized by Google

Martínez, J.; Hugard, J. y Jonard, R. 1979. Sur les différentes combinaisons de greffages d'apex réalisés *in vitro* entre pêcher (*Prunus persica* Batsch), abricotier (*Prunus armeni* L.) et myrobolan (*Prunus cerasifera* Ehrh.). C. R. Acad. Sci. Paris D 288:759-762.

Miller, C. 1967. Cytokinins in *Zea mays*. Ann. N.Y. Acad. Sci. 144:250-257.

Morel, G. y Martin, C. 1952. Guerison de dahlias atteintes d'une maladie a virus. C. R. Acad. Sci. Paris D 235:1324-1325.

Mosella, L. 1979. L'utilization de l'apex caulinaire comme moyen d'élimination de deux types de virions chez le pêcher (*Prunus persica* Batsch). Tesis (Doct.). Université de Sciences et Techniques du Languedoc (USTL), Montpellier, Francia. 215 p.

———; Riedel, M.; Jonard, R. y Signoret, P. 1979a. Sur les améliorations apportées aux techniques de microgreffage des apex *in vitro* chez les arbres fruitiers: Cas du pêcher (*Prunus persica* Batsch). C. R. Acad. Sci. Paris D:505-508.

———; ———; ——— y ———. 1979b. Développement in vitro d'apex de pêcher (*Prunus persica* Batsch): Possibilités d'application. C. R. Acad. Sci. Paris D:1335-1338.

———; Macheix, J.J. y Jonard, R. 1980a. Les conditions du microbouturage *in vitro* du pêcher (*Prunus persica* Batsch): Influences combinées des substances de croissance et de divers composés phenoliques. Physiol. Veg. 18(4):597-608.

———; Signoret, P. y Jonard, R. 1980b. Sur la mise au point de techniques de microgreffage d'apex en vue de l'élimination de deux types de particules virales chez le pêcher (*Prunus persica* Batsch). C. R. Acad. Sci. Paris D:287-290.

——— y Ascui, L. 1985. El cultivo in vitro como herramienta en la investigación y multiplicación de plantas; I: Utilización de ápices meristemáticos en la micropropagación de cítricos. Simiente (Chile) 54.

Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.

———; Bitters, W.; Rangan, T.; Naver, E.; Roistacher, C. y Holliday, L. 1972. A technique of shoot apex grafting and its utilization towards recovering virus-free citrus clones. HortScience 7(20):118-120.

Navarro, L.; Roistacher, C.N. y Murashige, T. 1975. Improvement of shoot-tip grafting *in vitro* for virus-free citrus. Amer. Soc. Hort. Sci. 100(5):471-479.

——— y Juárez, J. 1977. Elimination of citrus pathogens in propagative budwood; II: *In vitro* propagation. Proc. Int. Soc. Citriculture 3:973-978.

Digitized by Google

———; Llager, G.; Cambra, M.; Arregui, J.M. y Juárez, J. 1982. Shoot-tip grafting *in vitro* for elimination of viruses in peach plants (*Prunus persica* Batsch). Acta Horticulturae.

Roistacher, C.N. 1977. Elimination of citrus pathogens in propagative budwood; I: Budwood selection, indexing and thermoterapy. Proc. Int. Soc. Citriculture 3:965-972.

Digitized by Google

Capítulo 24

Cultivo de anteras de arroz

F. J. Zapata*
L. B. Torrizo*
R. O. Romero*
S. T. Mercy*

* International Rice Research Institute (IRRI), Manila, Filipinas.

Digitized by Google

Introducción

Los últimos avances en el cultivo de anteras ofrecen nuevas posibilidades para la aplicación de esta técnica en los programas de fitomejoramiento. Mediante el cultivo de anteras se han regenerado plantas haploides de especies de los géneros *Solanum* (Irikura, 1975), *Petunia* (Sangwan y Norreel, 1975), *Hordeum* (Foroughi-Wehr et al., 1976), *Nicotiana* (Nakamura e Itagaki, 1973) y *Triticum* (Wei, 1982), entre otras.

En general, los cereales se caracterizan por una baja eficiencia en cuanto a la producción de callos y a la regeneración de plantas verdes; el arroz constituye un buen ejemplo de este hecho (Niizeki et al., 1968; Guha-Mukherjee, 1973; Chaleff et al., 1981). Hay varios factores que afectan el cultivo de anteras y entre ellos se pueden mencionar: a) el estado de desarrollo de los granos de polen; b) los tratamientos físicos; y c) el medio de cultivo.

El estado de desarrollo del polen en el momento de la inoculación es crítico para la inducción de la androgénesis. En el arroz, la formación de embriones es posible si las anteras se cultivan cuando sus granos de polen están en el estado uninucleado (temprano, medio o tardío), pero ello no ocurre cuando se cultivan granos binucleados; además, en este último caso la mayoría de las plantas regeneradas son albinas (Chen, 1977; Sun, 1978).

Para mejorar la producción de callos y la regeneración de plantas se han utilizado tratamientos físicos tales como el estrés con frío (Nitsch, 1974; Sunderland et al., 1979). Se ha estudiado el efecto del enfriamiento de las panículas antes del cultivo de anteras, sometiéndolas a diferentes temperaturas, y se ha obtenido una máxima inducción de callos con 10 a 14 días a 13 °C (Genovesi et al., 1979). En anteras de arroz mantenidas a 10 °C durante 4 a 8 días, la inducción de callos fue del 10%, mientras que las anteras no tratadas sólo tuvieron un 2% de callos (Hu et al., 1978).

La composición del medio de cultivo es otro factor importante en la producción de callos y plantas de arroz a partir de granos de polen; al omitir el agar en el medio de cultivo se obtuvo un aumento en la producción de plantas (Chu, 1978; Zapata et al., 1982). Con las anteras de *Nicotiana* también se han encontrado diferencias en la respuesta al medio líquido o semisólido (Wernichke y Kohlenback, 1976).

En el presente capítulo se discutirán los resultados que el IRRI ha obtenido últimamente en relación con diferentes factores que inciden en la capacidad formadora de callos y en la regeneración de plantas verdes a

Digitized by Google

partir de anteras de arroz. Se emplearon dos variedades de arroz japónica: Taipei 309 y Giza 170.

Estudios Adelantados

Estado de desarrollo del polen

En el campo se recolectaron panículas jóvenes de la variedad Taipei 309 y se esterilizaron superficialmente con una solución al 19% (v/v) de blanqueador comercial (NaClO) durante 20 minutos; posteriormente las panículas, o partes de ellas, se colocaron en cajas Petri (9 cm de diámetro) con agar al 1.5% (v/v).

Se tomaron dos flores, una de la parte superior de la panícula y otra de la parte inferior, y se fijaron durante 24 horas en ácido acético glacial y etanol 95% en una proporción 1:3, más 0.5% de cloruro férrico; luego las anteras fijadas se colorearon con 2.0% de acetocarmín (2.0 g de carmín en 100 ml de ácido acético al 45%), con el objeto de determinar en el microscopio el estado de desarrollo del polen. Las anteras que contenían granos de polen en estado uninucleado medio a tardío, o binucleado temprano a medio, se sembraron en los medios líquidos E-10 y G-4, a una densidad de 6 anteras por ml del medio.[1]

Tanto las anteras que contenían polen uninucleado como las que tenían polen binucleado produjeron callos, pero la producción de callos fue menor en este último estado (Cuadro 24.1); las anteras de la variedad

Cuadro 24.1. Eficiencia en la producción de callos en la variedad Taipei 309 a partir de anteras con granos de polen uninucleados o binucleados, en dos medios de cultivo.

Estado del polen	Medio usado[a]	Anteras sembradas (no.)	Callos producidos (no.)
Uninucleado	E-10	700	6819
	G-4	975	6136
Binucleado	E-10	775	2639
	G-4	325	1106

a. Ver Apéndice F.

1. Ver Apéndice F.

Digitized by Google

Taipei 309 que contenían polen uninucleado produjeron dos o tres veces más callos que aquellas en las cuales el polen se encontraba en la etapa de desarrollo binucleado.

Cuando las cajas Petri se mantenían estacionarias, las anteras se dividían longitudinalmente y formaban los proembriones; los callos formados a partir de los proembriones individuales se sumergían en el medio de cultivo. Estos resultados concuerdan con los de Chen (1977), quien encontró en *Oryza sativa* var. Taiwan 5 un máximo de producción de callos y regeneración de plantas verdes cuando el polen se encontraba en la etapa uninucleada tardía.

Tratamiento con frío

Se colocaron anteras en un medio líquido o semisólido y se sometieron a un tratamiento de frío, a 8 °C durante 0 a 8 días. Posteriormente se incubaron en cajas Petri bajo luz tenue a 25 ± 1 °C.

La mayor inducción de callos se obtuvo de las anteras sometidas al tratamiento con frío durante 8 días (Cuadro 24.2), cuando se logró un aumento en la producción de callo de casi el 100% sobre el testigo. También se obtuvo una alta eficiencia con las anteras tratadas durante 14 días, pero en este caso aumentó el número de plantas albinas que regeneraron.

El aumento en la producción de callos mediante el tratamiento con frío de las anteras de arroz también ha sido demostrado por otros investigadores (Chaleff et al., 1975; Genovesi et al., 1979; y Chaleff et al., 1981).

Cuadro 24.2. Efecto del tratamiento con frío (8 °C) en las anteras de la variedad Taipei 309 sembradas en el medio semisólido J-19.

Duración del tratamiento (días)	Anteras sembradas (no.)	Anteras productoras de callo (no.)	Eficiencia (%)
0	377	20	5.3
2	345	18	5.2
4	346	14	4.0
8	348	36	10.3
12	325	16	4.9
14	337	30	8.9
16	325	17	5.2
18	329	25	7.6

Digitized by Google

Probablemente, el frío retrasa la senescencia de los tejidos somáticos de las anteras, lo que da como resultado un mayor porcentaje de granos viables de polen y desencadena la inducción de proembriones.

Medios para la inducción de callos

En este estudio se usaron anteras de la variedad Taipei 309 que tenían polen en la etapa uninucleada tardía, empleando dos medios para la inducción de callos: a) el medio J-19 que contiene los macronutrimentos, los micronutrimentos y las vitaminas del medio B-5 (Gamborg et al., 1968), 160 mg/litro de mioinositol, 1 mg/litro de ANA, 1 mg/litro de KIN, y 20 g/litro de sacarosa, con pH ajustado a 5.6; b) el medio E-24 que tiene los macronutrimentos, los micronutrimentos y las vitaminas del medio B-5, con 160 mg/litro de mioinositol, 1 mg/litro de 2,4-D, 0.5 mg/litro de AIA, 0.5 mg/litro de BAP, 20 g/litro de sacarosa, 5 g/litro de glucosa, y el pH ajustado a 5.6.

Los medios se usaron tanto en forma líquida como semisólida, y para solidificarlos se les añadió 0.8% de agar; luego se esterilizaron en el autoclave a 1.2 kg/cm^2, durante 5 minutos. La densidad del cultivo fue de 6 anteras por mililitro.

La producción de callos resultó más eficiente en los medios líquidos que en los semisólidos, tanto en el caso del E-24 como en el del J-19 (Cuadro 24.3); el aumento porcentual en el medio E-24 fue de 24 veces más en el medio líquido respecto al semisólido, y de 15 veces más en el J-19. Aunque la producción de callos de las anteras sembradas en los medios semisólidos fue alta (Chen, 1977; Chaleff et al., 1981), el número de granos de polen activados para seguir la vía de la androgénesis fue mínimo, debido tal vez a la competencia entre los granos de polen.

Cuadro 24.3. Producción de callos de anteras de Taipei 309 en medio semisólido y en medio líquido.

Medio de cultivo	Anteras sembradas (no.)	Anteras productoras de callo (no.)	Anteras productoras de callo (%)	Producción de callo (no.)
J-19				
líquido	507	—	—	1644
semilíquido	515	127	24.7	—
E-24				
líquido	177	—	—	1201
semisólido	384	87	22.7	—

Digitized by Google

Mediante el uso de un medio líquido es posible reducir al mínimo la competencia entre los granos de polen en desarrollo, y se permite que el callo formado dentro de la antera se sumerja en el medio de cultivo. El medio líquido tiene además otras ventajas, como la de permitir una dispersión más rápida de cualquier compuesto nocivo que produzcan los granos de polen muertos, disminuyendo su efecto, y la de facilitar la entrada de los nutrimentos (Wernicke y Kohlenback, 1976). Por otra parte, el agar comercial contiene contaminantes que pueden impedir el desarrollo del polen (Chaleff et al., 1981).

Medios para la regeneración de plantas

Se escogieron aleatoriamente callos de 1 mm de diámetro de las variedades Taipei 309 y Giza 170 y se colocaron individualmente sobre papel filtro Whatman no. 1 dispuesto en forma de M (en puente de papel); luego se insertaron en tubos de ensayo que contenían medio líquido de Murashige y Skoog (1962) con 30 g/litro de sacarosa, 1 mg/litro de ANA y 1 mg/litro de KIN; el pH era 5.8 (medio N-19).[2] Los callos sembrados se colocaron durante 4 semanas a 800 lux, 8 horas/día.

La regeneración de plantas se observó en el sistema del puente de papel, o cuando los callos se trasfirieron al mismo medio (N-19) solidificado con 0.8% (v/v) de agar durante 4 semanas. En la variedad Taipei 309, los callos derivados de las anteras que se habían cultivado en el medio líquido E-24, produjeron plantas verdes al sembrarlos en medio N-19 en un 46.7% de los casos; los callos de anteras cultivadas en medio líquido J-19 regeneraron plantas en un 31.0%.

La mayor eficiencia de regeneración de plantas de los callos inducidos con el medio E-24 se puede deber a la presencia de 2,4-D, el cual acelera la producción de brotes en el arroz al aumentar la síntesis de citocininas (Inoue et al., 1979; Yao et al., 1981). Esta condición puede producir una relación óptima auxina-citocinina, relación que es necesaria para la inducción de los brotes. Podría suceder que, en granos de polen seleccionados por su capacidad para producir callos altamente embriogénicos, el 2,4-D desencadenara esa producción. Esto apoya la observación de que en el arroz los callos inducidos de anteras que se han cultivado en un medio con 2,4-D, y posteriormente se han sembrado en un medio sin reguladores del crecimiento, tienen la capacidad para regenerar plantas (Woo y Su, 1975).

2. Ver Apéndice F.

Digitized by Google

En otro experimento de regeneración de plantas se cultivaron en el medio líquido E-24 los callos derivados de anteras de las variedades Taipei 309 y Giza 170; después se subcultivaron en el medio semisólido N-19. Se observó que la respuesta de los genotipos es diferente; el número de plantas regeneradas con la variedad Giza 170 fue casi el doble que con la variedad Taipei 309 (Cuadro 24.4). Un estudio de Guha-Mukherjee (1973) hizo hincapié en las diferencias que existen entre los genotipos de arroz con respecto a su capacidad para producir callos o plantas; al utilizar el cultivo de anteras se regeneraron 1000 plantas verdes de la variedad Taipei 309 y 600 de la variedad Giza 170; las plantas se originaron de partes individuales del callo. En la mayoría de los casos, un callo produce más de un brote, lo que aumenta el número total de plantas verdes producidas.

Cuadro 24.4. Producción de callos y regeneración de plantas verdes de las variedades de arroz Taipei 309 y Giza 170.

Variedad	Anteras sembradas (no.)	Callos producidos (no.)	Callos sembrados para regeneración (no.)	Callos con puntos verdes (no.)	Callos con puntos verdes (%)[a]	Plantas verdes producidas (no.)	Plantas verdes producidas (%)[a]
Taipei 309	415	729	31	11	36	38	122
Giza 170	316	874	38	26	68	70	184

a. Con relación al número de callos sembrados para la regeneración de plantas (columna 4).

Obtención de Diploides Homocigóticos

Determinación de niveles de ploidía

De las plantas regeneradas en el experimento descrito anteriormente se tomaron muestras al azar y se recolectaron panículas jóvenes (cuando la distancia de la aurícula estaba entre 0 y 1 cm); las panículas se fijaron, entre las 10 a.m. y las 12 p.m., en una mezcla (3:1) de etanol:ácido acético, con 0.5% (v/v) de cloruro férrico, y se conservaron en etanol al 70%. El número cromosómico de las células madre del polen se determinó mediante el frotis fresco de anteras coloreadas con 2% de acetocarmín.

En la variedad Taipei 309, de 33 plantas regeneradas que se seleccionaron aleatoriamente 24 eran haploides, 8 diploides y 1 hipotetraploide; en la variedad Giza 170, una muestra de 24 plantas presentaba 18 haploides, 5 diploides y 1 triploide.

Digitized by Google

Tratamiento con colchicina

Es deseable obtener plantas diploides homocigóticas. Las plantas haploides de arroz son completamente estériles, tienen espiguillas más pequeñas y hojas más estrechas, y producen más macollas que las plantas diploides.

Con el fin de obtener diploides homocigóticos a partir de las plantas haploides generadas en los trabajos anteriores, se cortaron tallos y raíces de 15 y 5 cm respectivamente, a partir de la corona. Luego se sumergieron en una solución de colchicina preparada así: se disolvió 0.1 g de colchicina en 2 ml de dimetilsulfóxido (DMSO), se añadieron 4 gotas de Tween-20, y se completó el volumen hasta 100 ml, con agua destilada.

Este tratamiento produjo duplicación de cromosomas en el 35% de las plantas haploides. Actualmente las plantas regeneradas se están cultivando y seleccionando de acuerdo con las variaciones en las características agronómicas que puedan presentar en el campo.

Referencias

Blaydes, D. F. 1966. Interaction of kinetin and various inhibitors in the growth of soybean tissue. Physiol. Plant. 19:748-753.

Chaleff, R. S.; Hill, S. R. y Dunwell, J. M. 1981. Rice anther culture. En: John Innes Institute. Annual report. p. 64-66.

Chen, C. C. 1977. In vitro development of plants from microspores of rice. In vitro 13:484-489.

Chu, C. C. 1978. The N6 medium and its applications to anther culture of cereal crops. En: Proceedings of a symposium on plant tissue culture. Science Press, Pekín, China. p. 43-50.

Foroughi-Wehr, B.; Mix, G.; Gaul, H. y Wilson, H. M. 1976. Plant production from cultured anthers of *Hordeum vulgare* L. Z. Pflanzenzücht 77:198-204.

Gamborg, O. L.; Miller, R. A. y Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research 50:151-158.

Genovesi, A. D. y Magill, C. W. 1979. Improved rate of callus and green plant production from rice anther culture following cold shock. Crop. Sci. 19:662-664.

Digitized by Google

Guha-Mukherjee, S. 1973. Genotypic differences in the in vitro formation of embryoids from rice pollen. J. Exp. Bot. 24:139-144.

Hu, C.; Huang, S. C.; Ho, C. P.; Liang, H. C.; Huang, C. C. y Peng, L. P. 1978. On the inductive conditions of rice pollen plantlets in anther culture. En: Proceedings of a symposium on plant tissue culture. Science Press, Pekín, China. p. 87-95.

Inoue, M.; Maeda, E.; Yoshida, R. y Oritani, T. 1979. On the occurrence of a high content of cytokinins in rice callus tissues. Plant and Cell Physiol. 20:917-924.

Irikura, Y. 1975. Induction of haploid plants by anther culture in tuberbearing species and interspecific hybrids of *Solanum*. Potato Res. 18:133-140.

Keller, W. A. y Arms Strong, K. C. 1978. High frequency production of microspore-derived plants from *Brassica napus* anther cultures. Z. Pflanzenzücht. 80:100-108.

Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.

Nakamura, A. y Itagaki, R. 1973. Anther culture in *Nicotiana* and the characteristics of the haploid plants. Japan J. Breed. 23:71-78.

Niizeki, H. y Oono, K. 1968. Induction of haploid rice plant from anther culture. Proc. Jap. Acad. 44:554-557.

Nitsch, C. 1974. Pollen culture: A new technique for mass production of haploid and monozygous plants. En: Kasha, K. J. (ed.). Haploids in higher plants: Advances and potential. University of Guelph, Guelph, Ontario, Canadá. p. 123-135.

Sangwan, R. S. y Norreel, B. 1975. Induction of plants from pollen grains of *Petunia* cultured in vitro. Nature 257:222-224.

Stolarz, A. 1981. Factors influencing the frequency of callus formation among cultured rice (*Oryza sativa*) anthers. Physiol. Plant. 51:201-206.

Sun, C. S. 1978. Androgenesis of cereal crops. En: Proceedings of a symposium on plant tissue culture. Science Press, Pekín, China. p. 117-123.

Sunderland, N. y Roberts, M. 1979. Cold-pretreatment of excised flower buds in float culture of tobacco anthers. Ann. Bot. 43:405-414.

Wei, Z. M. 1982. Pollen callus culture in *Triticum aestivum*. Theor. Appl.Genet. 63:71-73.

Wernicke, W. C. y Kohlenback, H. W. 1976. Investigations on liquid medium as a means of anther culture in *Nicotiana*. Z. Pflanzenphysiol. 79:189-198.

Digitized by Google

Woo, S. C. y Su, H. Y. 1975. Double haploid rice from indica and japonica hybrids through anther culture. Bot. Bull. Academia Sinica 16:19-24.

Yao, D. Y. y Krikorian, A. D. 1981. Multiplication of rice (*Oryza sativa* L) from aseptically cultured nodes. Ann. Bot. 48:255-259.

Zapata, F. J.; Torrizo, L. B.; Romero, R. O. y Alejar, M. S. 1982. Androgenesis in *Oryza sativa*. En: Fujiwara, A. (ed). Proceedings of the Fifth International Congress on Plant Tissue and Cell Culture. Tokio, Japón. p. 531-532.

Digitized by Google

Capítulo 25

Cultivo de tejidos en la caña de azúcar

J. Pérez Ponce*

* Universidad Central de las Villas (UCLV), Las Villas, Cuba.

Digitized by Google

Introducción

La caña de azúcar pertenece al género *Saccharum*, tribu *Andropogoneae*, familia Gramineae. El género *Saccharum* tiene solo cinco especies: cuatro silvestres y una cultivada, *Saccharum officinarum* L., 2n = 80. Las especie silvestres son:

- *Saccharum barber* (Jerw.). 2n = 40, 82, 92, 107, 116 y 124; especies relativamente resistentes a las bajas temperaturas de las áreas subtropicales.

- *Saccharum spontaneum* L. Especie muy polimorfa desde el punto de vista citológico, sistemático y ecológico; 2n = 48, 56, 64, 76, 80, 96, 112 y 128. Tiene buena resistencia a muchas enfermedades y ha donado este carácter a muchas variedades comerciales.

- *Saccharum sinense* Roxb. y Jeswiet. Ocurre en estado silvestre y también como especie cultivable en áreas limitadas de China. Es muy estable genéticamente (2n = 106 a 120) y es típica de esta región.

- *Saccharum robustum* (Brand y Jerw.). Es la especie ancestral de *Saccharum officinarum* L. Citológicamente es muy heterogénea (2n = 60, 70, 80, 82, 84, 90, 100, 118, 140, 144 y 148). Esta especie, *S. officinarum* y *S. spontaneum* han dado origen, por cruzamiento, a las variedades comerciales.

El número básico de cromosomas del género *Saccharum* es 2n = 8 a 10, y por poliploidía se han formado las especies anteriormente descritas. La mayoría de las variedades comerciales tienen 2n = 80 y 2n = 120.

La alta poliploidía de las especies implicadas en el mejoramiento, la inestabilidad de los cromosomas debida a las aneuploidía (Price, 1962) y al mosaico cromosómico que se presenta en este cultivo hacen muy difíciles los estudios genéticos básicos, así como los trabajos de mejoramiento clásico; por ello se trabaja con grandes poblaciones segregantes, de modo que la eficiencia de muchos programas de cruzamiento, básicamente empíricos, es baja.

Hay un considerable número de variedades y clones, producto del trabajo de mejoramiento que se ha hecho en la caña de azúcar; aunque su comportamiento agrícola e industrial es bueno, tienen limitaciones como la susceptibilidad a algunas enfermedades, un alto porcentaje de floración, y la susceptibilidad a la salinidad y a la sequía. Un ejemplo es la alta floración que presentan en Cuba las variedades CP 52-43 y B 43-62; ésta

Digitized by Google

tuvo altos porcentajes en la producción pero debió ser eliminada por su alta susceptibilidad a la roya (*Puccinia melanocephala*); asimismo, por la susceptibilidad al carbón (*Ustilago scitaminea* Syd.) se han eliminado de la producción las variedades comerciales My 5450 y My 5715.

En estas variedades, la eliminación de los defectos que presentan por medio de las técnicas del cultivo in vitro se hace en forma más rápida y menos costosa que los métodos tradicionales de cruzamiento. La contribución del cultivo de tejidos y de células al mejoramiento genético de la caña de azúcar aparece en el Cuadro 25.1.

Cuadro 25.1. Resultados obtenidos en la caña de azúcar por las técnicas del cultivo in vitro.

Resultados	Fase en que se evaluó[a]	Referencia
Resistencia a enfermedades		
Enfermedad de Fiji	3	Krishnamurthi, 1974
	3	Krishnamurthi y Tlaskal, 1974
Sclerospora sacchari M.	3	Krishnamurthi, 1974
	3	Chen et al., 1979
Helminthosporium sacchari	2, 3[b]	Heinz et al., 1977
	2, 3	Larkin y Scowcroft, 1981
	1, 3	Maribona et al., 1986
Ustilago scitaminea	3	Chen et al., 1978
	3	Piro y Chaguardieft, 1983
Puccinia melanocephala	3[b]	Pérez Ponce et al., 1987[c]
Virus del mosaico de la caña	3	Coleman, 1970
Características deseables		
Rendimiento alto	3[b]	Balasundaran, 1981
	3	Liu y Chen 1978; 1979
	3	Liu, 1981
	3	Liu et al., 1983
	3	Liu y Hsieh, 1986
	3	Muller, 1985
Contenido de azúcar alto	3	Liu y Chen,
	3	Liu et al., 1983
	3	Liu y Hsieh, 1986
	3[b]	Balasundaran, 1981
Floración ausente	3	Liu y Hsieh, 1986
	3	Pérez Ponce et al., 1987[c]

a. 1 = callos; 2 = suspensiones; 3 = somaclones.
b. Empleo de mutagénicos.
c. Centro Agrícola, 1987, números 2 y 3. Algunas referencias no aparecen al final.

Digitized by Google

Variabilidad Somaclonal e Inducción de Mutaciones

La variabilidad somaclonal es el tema más discutido cuando se emplean las técnicas del cultivo in vitro en el mejoramiento genético. Esta variabilidad se encuentra en los tejidos somáticos o se produce en el propio cultivo in vitro. La primera está muy relacionada con los genotipos, y en la segunda se consideran dos causas: los componentes del medio y la edad de los cultivos in vitro. De los componentes del medio, el 2,4-D es el principal responsable de la variabilidad ya que él mismo se emplea en la caña como mutagénico convencional; esta auxina afecta el DNA, provoca mitosis irregular, proliferación de células y deformaciones, e incrementa el RNA ribosómico (Leopold, 1963).

En pocos trabajos realizados con cultivos in vitro se ha estudiado el origen de las mutaciones, es decir, si ocurren en el núcleo y cumplen las reglas mendelianas, o si se presentan en el citoplasma. Schutze (1984) hizo una revisión de 20 estudios: en 12 de ellos, la mutación ocurrió en el núcleo, en 5 en el citoplasma, y en los 3 restantes parecía ocurrir en el núcleo.

La variabilidad somaclonal (VS) puede aprovecharse solamente con las técnicas del cultivo in vitro. Se sabe además que la VS no puede explicar toda la variabilidad que se ha registrado en los cultivos in vitro.

En varias especies vegetales

Se han estudiado las causas de variación de los cultivos in vitro. Aholoowalia (1983), trabajando con *Lolium* spp. en estudios citológicos, encontró traslocaciones recíprocas, deleciones, inversiones, fragmentación de cromosomas, eliminación de cromosomas, y poliploidía. Concluyó este autor que las variaciones halladas no se podrían producir por el mejoramiento convencional y que se debieron a la inestabilidad cromosómica ocurrida en los repetidos subcultivos.

Se ha encontrado que el nivel de ploidía de los cultivos de células y tejidos es inestable. Autores como Gamborg y Shyluk (1981) informan que la inestabilidad cromosómica se presentó al inicio del cultivo y después se estabilizó, aunque el número final de cromosomas era distinto al de las plantas donantes.

En muchos cultivos de células y tejidos se han encontrado variaciones en el número de cromosomas. Un amplio estudio sobre este aspecto lo realizó Bayliss (1980); en siete especies (de las 53 estudiadas) no aparecieron

Digitized by Google

variaciones en poliploidía, aneuploidía, cambios estructurales o aberraciones mitóticas. En este mismo análisis los cultivos in vitro de 11 especies no produjeron variaciones cromosómicas.

Hay discrepancias entre los investigadores sobre la estabilidad cromosómica. En 20 trabajos hechos con tabaco, uno de ellos con suspensiones de 5 años y medio, no se informó sobre mutaciones. Hay también informes de la influencia del medio de cultivo empleado. Trabajos hechos en *Vicia faba* (Bayliss, 1980) muestran que al inicio del cultivo se forman líneas con distinto número n y que, según el medio, se estabilizan determinadas líneas. En *Pisum* se halló una gran influencia de las hormonas pues las citocininas estimularon la endomitosis en esa especie. En otros cultivos, el 2,4-D es responsable de los cambios cromosómicos, y hay trabajos en que han sido sólo las hormonas las responsables de los cambios. Yeoman y Forche (1980) trabajaron con guisantes en un medio que contenía 2,4-D y extracto de levadura, y encontraron células 2n, 4n y 8n, mientras que en un medio con sólo 2,4-D, todas las células fueron 2n. El efecto de la levadura se duplicó con cinetina. La alta variabilidad, agregan, es efecto del 2,4-D más la cinetina.

En este laboratorio, donde se trabaja con el medio de Heinz (1969) que contiene 2,4-D y cinetina, se halló variabilidad fundamentalmente en los cambios clorofílicos (mutaciones puntuales). Los trabajos sobre medios hechos por Concepción et al. (1985) indicaron que el medio de Payan y Tarcon (1977) es superior para la formación de callos y la regeneración de plantas; este medio no tiene cinetina, y se ha observado que en él los cambios clorofílicos no se presentan o lo hacen con una frecuencia muy baja.

En caña de azúcar

En la caña de azúcar se han realizado trabajos de mejoramiento genético mediante cultivo in vitro y se considera que esta especie es ideal para ese objetivo. En 1986, Cruz halló que, a medida que aumentaban los subcultivos, se perdían cromosomas los cuales, de 82, en promedio, en la R_0 descendían a 30 en la R_8; se recomendó la R_2 (segunda generación) como la mejor para la regeneración. En este laboratorio, callos de 1 a 7 meses de ciertas variedades no presentaron diferencias en la variabilidad, la cual se determinó por los cambios clorofílicos y morfológicos.

Los estudios en los cuales se evalúa la variabilidad producida por los cultivos in vitro son aún más contradictorios. Feldemann (1984) analizó de 10 a 16 sistemas enzimáticos en plantas obtenidas de callos de 13 variedades y concluyó que la caña de azúcar es una planta estable en los cultivos in

Digitized by Google

vitro y que los cambios producidos se deben al rejuvenecimiento y a la sanidad de las plantas regeneradas. Iguales conclusiones extraen Kresovich et al. (1986) del estudio de 5000 plantas obtenidas de dos clones, es decir, los cambios producidos por el cultivo de tejidos no son frecuentes y se pueden confundir con alteraciones temporales o con las quimeras formadas en el proceso de diferenciación.

Por otra parte, Nagai y Schnell compararon en 1986 una población obtenida por cultivo de tejido con un híbrido F_2 de *Saccharum erianthus* respecto a sus caracteres agronómicos, y concluyeron que, para algunos caracteres, el cultivo de tejidos produjo tanta variabilidad como el cruzamiento.

Esta contradicción se debería a los genotipos que emplearon los investigadores, pues se ha encontrado que la estabilidad de los cultivos in vitro está influenciada por los genotipos y las auxinas. Wersuhn y Fritze (1985) señalan que deben seleccionarse los genotipos que se sometan a cultivo in vitro según la estabilidad de su cariotipo. Los procesos primarios responsables de la inestabilidad de los cariotipos son aún desconocidos.

Como en la primera generación obtenida por cruzamiento, las plantas muestran un comportamiento diferente al de la generación clonal; por tanto, las evaluaciones de la variabilidad de las plántulas dan valores sobreestimados.

Empleando la variabilidad producida por el cultivo in vitro, se han obtenido subclones interesantes de caña de azúcar, como se aprecia en el Cuadro 25.1. No obstante, los conocimientos adquiridos sobre los factores que influyen en la variabilidad —o sea, el medio de cultivo adecuado, la elección de órganos que produzcan variabilidad, el manejo de los cultivos in vitro y, por último, la calidad del genotipo para producir la variabilidad—indican que se debe emplear mutagénesis conjuntamente con el cultivo in vitro.

Se han empleado radiaciones gamma de modo muy limitado. Liu (1983) informó sobre tratamientos de 0 a 20 kr en callos en crecimiento y en la regeneración, pero no definió la influencia que tuvieron en la variabilidad. Se ha informado también del empleo de colchicina en suspensiones celulares, en dosis de 0.25 mg, para aumentar el número de cromosomas de 198 a 309 (Liu, 1983). Heinz y Mee (1970) obtuvieron también, con un procedimiento similar, 46 plantas variantes de las cuales 22 eran poliploides, 2 mixoploides y 22 diploides.

Los resultados obtenidos con el empleo de mutagénicos físicos y químicos se exponen a continuación. Cuando se irradiaron con dosis de 1000,

Digitized by Google

3000 y 5000 r de radiación gamma los callos en crecimiento de la variedad CP 52-43, se registró un aumento tanto de los cambios clorofílicos en las plantas in vitro, como de los caracteres morfológicos de las plantas que crecían en el campo y de algunos caracteres cuantitativos (Cuadro 25.2, Figura 25.1).

Cuadro 25.2. Influencia de las dosis de radiación sobre los cambios clorofílicos.

Tratamiento	Resultado (%)[a]	Significancia (ANOVA)
1000	56.7	**
3000	42.6	*
5000	57.1	**
Testigo	29.8	—

a. Cambios ocurridos por 100 plantas.

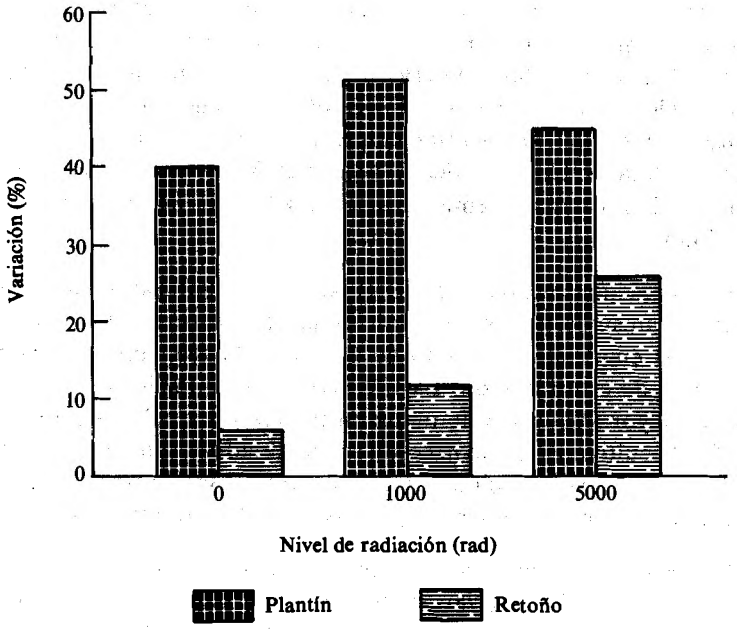


Figura 25.1. Variación morfológica total de una población irradiada (rayos gamma) de plantines derivados de cultivo de tejidos y de estacas de caña de azúcar; 0 rad= tejido testigo.

Digitized by Google

Se demostró que en el medio Payan y Tarcon (1977) los tratamientos mutagénicos aumentaron la varibilidad, y que ésta se mantuvo de generación en generación. En estos tratamientos se seleccionaron además subclones de floración reducida de buenas características agroindustriales, los cuales se encuentran en fase de extensión en la producción.

Otro aspecto importante es el momento en que se debe aplicar el tratamiento mutagénico. Se recomienda, para la caña, hacer el tratamiento en la fase de regeneración, es decir, en punto verde. Para estudiar este aspecto, se trataron callos de la variedad My-5450, en fase de crecimiento y de regeneración, con dosis de 3000 r. Los callos tenían 1, 3 y 7 meses de edad. En la Figura 25.2 aparecen los resultados obtenidos: hay diferentes grados de radiosensibilidad en las plantas regeneradas, según la fase y la edad en que se encontraban los callos; además, la edad de los callos aumentó los cambios clorofílicos relacionados sobre todo con el albinismo, defecto éste que se presenta por alteraciones de los cloroplastos. Con respecto a los cambios en los caracteres morfológicos y cuantitativos, el tratamiento mutagénico incrementó la variabilidad cuando se irradiaron los callos en su fase de regeneración (Cuadros 25.3 y 25.4).

Como se esperaba, aumentó bastante el porcentaje de plantas quiméricas cuando se aplicó el tratamiento en la fase de regeneración. En general, es difícil seleccionar las quimeras, a diferencia de caracteres como la roya que se seleccionan eficientemente evaluándolos en el tallo de la caña. Los mutagénicos químicos han sido empleados también en callos y en suspensiones celulares. Como indica la Figura 25.3, la NaN_3 aplicada antes de realizar el explante aumenta la variabilidad en los cambios clorofílicos y morfológicos.

La radiación ultravioleta (UV) se había empleado solamente en microorganismos, pero ya se ha informado que se usó con éxito en plantas. Las dosis empleadas han sido de 1000 a 8000 erg/mm^2, con lámparas normales de esterilización. La UV activa los aminoácidos y causa, por tanto, mayor frecuencia de mutaciones puntuales; además, no afecta el medio de cultivo y éste no necesita ser cambiado. Un inconveniente de la UV es su poca penetración (1 mm) por lo cual se usa principalmente en suspensiones de células y protoplastos (Zelitch y Berlyn, 1982).

Las técnicas de separación electroforética de isoenzimas se han usado para identificar clones y variedades de caña, y determinar la variabilidad de los cultivos in vitro; se emplearán también como marcadores para seleccionar y como técnica de identificación de genotipos. Thom y Maretzki (1970) estudiaron isoenzimas peroxidasas y esterasas y demostraron que su diferente interrelación en la caña es de magnitud suficiente

Digitized by Google

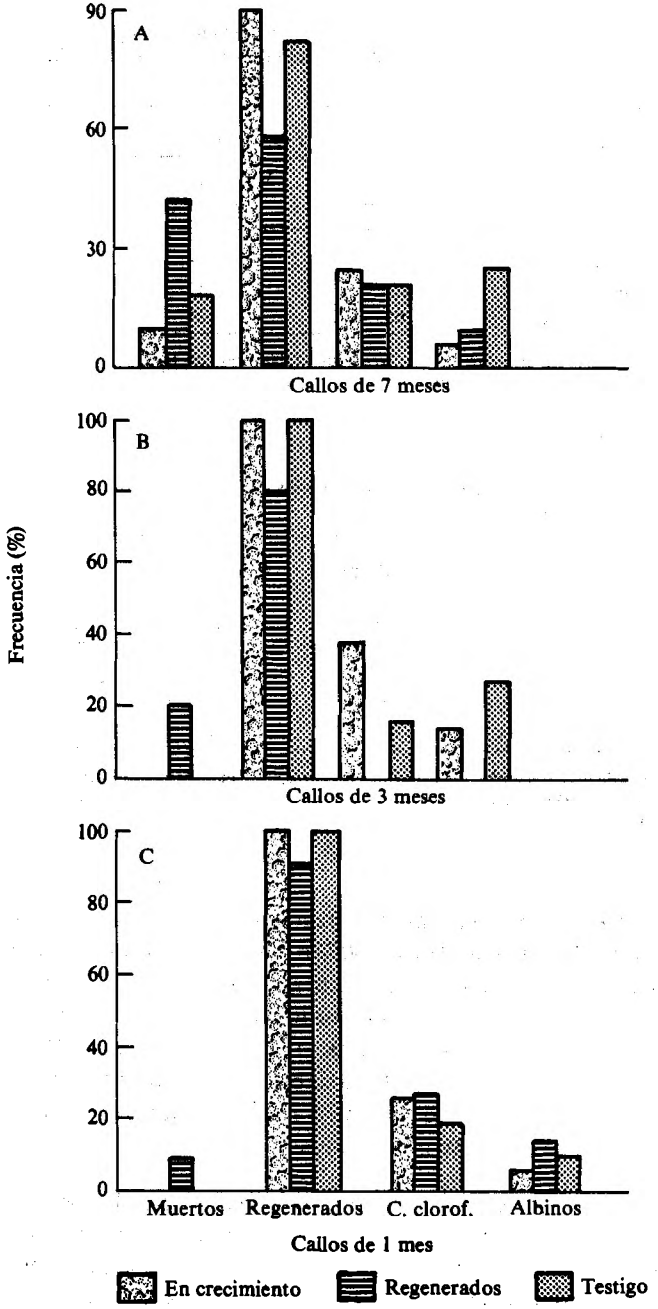


Figura 25.2. Influencia de la radiación gamma y de la edad de los callos en la regeneración y en la variabilidad de éstos; C. clorof. = cambios clorofílicos.

Digitized by Google

Cuadro 25.3. Frecuencia de las mutaciones causadas por diferentes tratamientos de radiación en la variedad de caña de azúcar My-5450.

Tratamiento[a]	Frecuencias		
	Mutantes por 100 plantas	Mutaciones por 100 plantas	Quimeras (%)
Callos NI	8	8	0.6
Callos IFC	27	35	1.2
Callos IFR	65	124	8.6

a. NI = sin irradiar; IFC = irradiados (3000 rad) en fase de crecimiento; IFR = irradiados (3000 rad) en fase de regeneración.

Cuadro 25.4. Efecto de la radiación gamma en los caracteres cuantitativos[a] de la variedad My-5450.

Tratamiento[b]	Plantas evaluadas (no.)	Altura (cm)	Diámetro del tallo (mm)	Ancho de la hoja (mm)	Brix (%)
Callos NI	173	159 (16)	28 (13)	45 (16)	17 (7)
Callos IFC	173	137 (16)	25 (16)	39 (19)	16 (2)
Callos IFR	163	135 (20)	23 (17)	33 (20)	18 (8)

a. Los valores de los caracteres son promedios; las cifras entre paréntesis son coeficientes de variación.
b. NI = sin irradiar; IFC = irradiados (3000 rad) en fase de crecimiento; IFR = irradiados (3000 rad) en fase de regeneración.

para que cada clon pueda caracterizarse por la variabilidad estudiada. Heinz y Mee (1971) encontraron 30% a 81% de variabilidad mediante las isoenzimas, y mucho mayor en los caracteres botánicos que en los agronómicos; estos autores consideran que los cambios se deben a mutaciones. Iguales resultados obtuvieron Frías et al. (1975), Liu (1981) y Ortiz y Quesada (1982) con respecto a la variabilidad producida por el cultivo in vitro. Feldemann (1984) no encontró ningún cambio enzimático en las plantas obtenidas del cultivo de tejidos.

En el laboratorio del autor se trataron 236 subclones de CP 52-43, y sólo hubo cambios en las peroxidasas de los subclones obtenidos de callos tratados con 1000 y 5000 r de radiación gamma. En las variedades B-4362 y My-5450 se encontraron cambios en las peroxidasas de plantas obtenidas mediante cultivo de tejidos. En estos trabajos no se encontró una relación bien definida entre los cambios isoenzimáticos y los caracteres que se

Digitized by Google

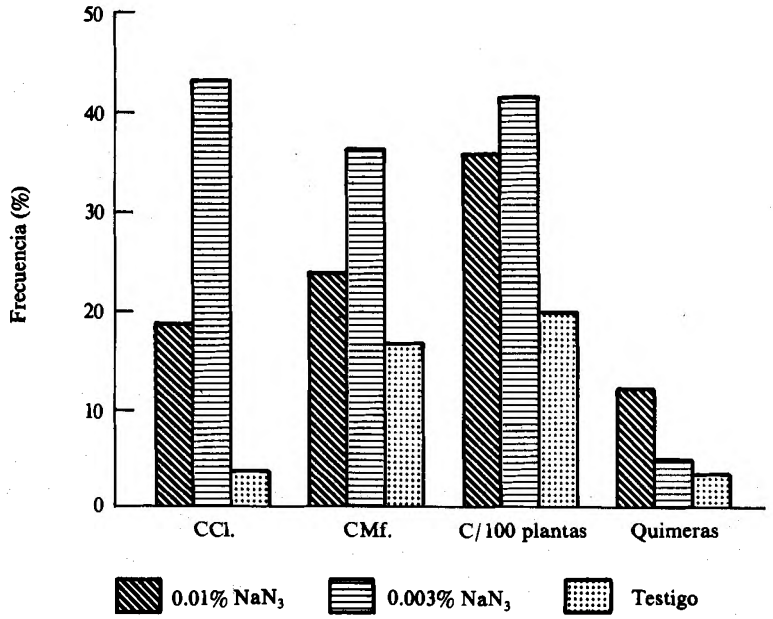


Figura 25.3. Efecto de la NaN_3 en los callos, expresado como cambio clorofílico (CCl.) o morfológico (CMf.); C = cambios.

deseaba mejorar, como floración y resistencia a la roya y al carbón. En un extenso trabajo, Ruiz et al. (1986) encontraron una forma de isoperoxidasa asociada con la variación somaclonal de tolerancia al NaCl.

Micropropagación in Vitro

El coeficiente de multiplicación de la caña de azúcar es bajo y por ello la micropropagación in vitro de este cultivo es útil. Esta técnica se aplica en los bancos de germoplasma, en el intercambio de material genético, en la producción de plántulas para seleccionar, en la producción comercial de semillas, y en el saneamiento de clones para eliminar *Ustilago* sp., el mosaico, y la enfermedad del retoño achaparrado (Lee, 1986).

En la micropropagación se emplean meristemas apicales y axilares, aunque se prefieren los primeros porque están libres de contaminación y presentan menos problemas con la fenolización. En 1985, Screenivasan y Screenivasan colocaron explantes de meristemas apicales de 0.5 cm de

Digitized by Google

longitud, esterilizados con alcohol al 70% y con hipoclorito de calcio al 10%, en medio de White (1963) líquido; éste se suplementó con 2 mg/litro de glicina, 0.5 mg/litro de ácido giberélico, 1.0 mg/litro de ácido indolbutírico, 1.07 mg/litro de cinetina, 100 mg/litro de mioinositol, 10% de agua de coco, y 20 g/litro de sacarosa. Los meristemas se colocaron sobre papel filtro, y diariamente, o cada dos días, se movían para eliminar los fenoles acumulados alrededor de ellos. Después del crecimiento, los meristemas se pasaron al medio sólido MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 2×10^{-3} mg/litro de ácido indolbutírico (Pérez Ponce y Jiménez, 1986). Los meristemas apicales fueron extraídos asépticamente e implantados de modo invertido en el medio.

A las 3 ó 4 semanas, los meristemas pasaron a otro medio para la inducción del ahijamiento: ésta requiere mayores niveles de citocininas en el medio de cultivo. Sauvaire y Galzy (1983) encontraron que añadiendo 6-bencil-aminopurina (6-BAP) en el medio de cultivo a una concentración de 0.10 mg/litro, o una combinación de ácido naftalenacético, ANA (0.025 mg/litro) y 6-BAP (0.624 mg/litro) se obtenía el mayor número de hijos. Hubo también una fuerte inhibición de la rizogénesis en presencia de 6-BAP y de ANA.

Los resultados obtenidos indican que se pueden obtener 10,000 individuos en un año a partir de un solo meristema. Mendre et al. (1983) consideran la posibilidad de obtener 200,000 plantas en 6 meses con un solo meristema.

En el laboratorio de la Universidad Central de Las Villas (UCLV) se estudió el efecto de las citocininas en el ahijamiento in vitro, y se obtuvieron los mejores resultados con la combinación de la cinetina y el 6-BAP, como se aprecia en el Cuadro 25.5.

Cuadro 25.5. Influencia de los medios de cultivo en el ahijamiento de la caña de azúcar in vitro.

Composición del medio[1]	Hijos por planta[2]
1. MS + KIN	6.4 c
2. MS + 6-BAP (0.075 mg/litro) + KIN	9.64 b
3. MS + 6-BAP (0.10 mg/litro) + KIN	8.18 b
4. MS + 6-BAP (0.30 mg/litro) + KIN	10.94 a
5. MS + 6-BAP (0.10 mg/litro)	6.88 c

1. En el medio 5 no se añade cinetina (KIN).
2. Ahijamiento a las cuatro semanas. Las letras iguales no difieren significativamente para $P<0.05$.

Digitized by Google

Según los resultados obtenidos se recomienda el medio MS, añadiéndole 6-BAP en las más altas concentraciones, si se quiere obtener plantas para continuar micropropagando in vitro. En el pase anterior al de ahijamiento, debe emplearse la dosis más baja de 6-BAP porque si el ahijamiento es muy elevado, las plantas son muy pequeñas y tienen dificultades para el enraizamiento y el pase a suelo.

Las plantas micropropagadas presentan dificultades para el enraizamiento debido al efecto inhibitorio de las citocininas; se requiere por tanto un medio que estimule en ellas un sistema radicular bastante fuerte que asegure un alto porcentaje de supervivencia en el suelo.

Cultivo de Células

Para el cultivo de células de la caña de azúcar se emplea cualquier parte de la planta: el meristema subapical, desde el primero al octavo internudo (Artschwager, 1925), las hojas jóvenes aún enrolladas, la inflorescencia antes de emerger, los meristemas apicales del tallo y de la raíz, y el parénquima medular (Liu, 1981). Se ha investigado la parte de la planta que más convendría emplear; para Liu (1981) la inflorescencia sin emerger es la mejor, por su alta capacidad de regeneración, pero no la recomienda en mejoramiento por su baja variabilidad; Kresovich (1985) comparó las hojas jóvenes y la inflorescencia y no encontró diferencias, pero recomienda las hojas jóvenes.

En la práctica, se recomiendan más las hojas jóvenes tomadas de tallos jóvenes que tengan un rápido y vigoroso crecimiento, y se toman 10 explantes por tallo de 0.5 a 1.0 cm de largo. Los meristemas subapicales no son recomendables porque se contaminan mucho y porque sufren fenolización. La manera de tomar un explante se ilustra en la Figura 25.4.

Se desinfectan los tallos jóvenes con cualquiera de los desinfectantes recomendados, aunque todos son poco eficientes para eliminar la contaminación que se encuentra entre las capas de hojas; por eso, lo más práctico es tomar la zona libre de contaminación. En 1983, González y Ballester encontraron que en los explantes de la hoja + 1 (según nomenclatura de Kwiper) la contaminación fue de un 45%, en los de la hoja 0 de 20%, y en los de la hoja -1 de 13%. Explantes de la hoja -1 extraídos asépticamente son los más adecuados para un rápido crecimiento de los callos.

Digitized by Google

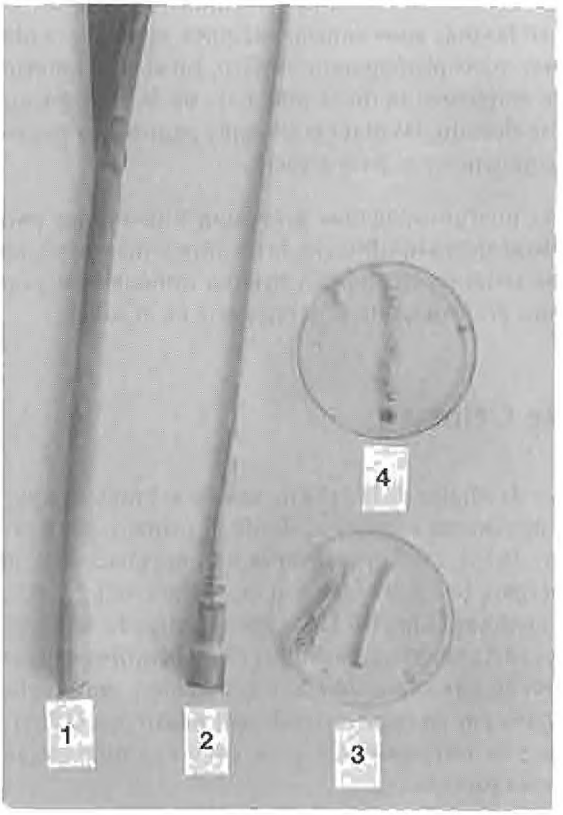


Figura 25.4. Modo de tomar un explante de hojas jóvenes en tallo joven de caña de azúcar: 1) Tallo joven en crecimiento activo. 2) Eliminar tejidos hasta la hoja +1. 3) Después de desinfectar el corte, eliminar las hojas 0 y -1. 4) Eliminar el último entrenudo, y tomar 10 explantes de 2 a 5 mm cada uno. Las hojas se identifican según Kwiper.

Medio de cultivo

La formación de callos en la caña de azúcar es relativamente fácil. Se han empleado los siguientes medios de cultivo con buenos resultados: Heinz y Mee (1969), Murashige y Skoog (1962), White (1963), Heinz et al. (1977), y Liu (1983). Para determinar los mejores medios, el autor comparó el medio de Heinz y Mee (1969), el propuesto por la Hawaian Sugar Planters Association (1977), y un medio recomendado para la micropropagación por Payan y Tarcon (1977). La composición de los tres medios aparece en el Cuadro 25.6.

Digitized by Google

Cuadro 25.6. Composición de los medios de cultivo ensayados en caña de azúcar.[a]

Componentes	Medio 1 (Heinz y Mee, 1969)		Medio 2 (Payan y Tarcon, 1977)		Medio 3 (H.S.P.A.)	
	Para callo	Para DT	Para callo	Para DT	Para callo	Para DT
Macroelementos	MS	MS	MS	MS	MS	MS
Microelementos	MS	MS	MS	MS	MS	MS
Sacarosa (g/litro)	20	20	20	20	20	20
Mioinositol (mg/litro)	100	100	100	100	100	100
Acido nicotínico (mg/litro)	0.5	0.5				0.5
Glicina (mg/litro)	2.0	2.0				2.0
Tiamina (mg/litro)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Piridoxina (mg/litro)	0.5	0.5				0.5
AIA (mg/litro)	1.3	1.3				5.0
Cinetina (mg/litro)	0.84	0.84				2.0
2,4-D (mg/litro)	3.0		3.0	3.0		
Agua de coco (%)	10	10	18	18	10	10

a. H.S.P.A = de la Hawaiian Sugar Planters Association empleado desde 1977; DT = diferenciación de tejidos.

La diferente composición de los medios suscitó grandes deferencias en el comportamiento de los callos, como se aprecia en el Cuadro 25.7. Los resultados obtenidos señalan claramente la superioridad del medio de Payan y Tarcon (1977). Otra ventaja de este medio es que en él no se forman fenoles, característica ésta que depende también de la variedad que se cultiva.

En el medio de Heinz y Mee (1969), hasta un 100% de los explantes de determinadas variedades han producido fenoles; en cambio, en el medio de Payan y Tarcon (1977) ninguna variedad ha presentado problemas con los fenoles.

Cuadro 25.7. Comparación del efecto de tres medios de cultivo en la formación y crecimiento de callos de caña de azúcar.

Medio[1]	Explantes con callos (%)[2]	Crecimiento del callo[3]	Cultivos con fenoles (%)
Medio 1	100.0 a	2.17±0.09 a	0
Medio 2	81.8 b	1.87±0.12 b	8
Medio 3	73.3 c	1.27±0.07 c	50

1. Ver Cuadro 25.6.
2. Letras iguales no difieren significativamente para P = 0.05 según Duncan.
3. Evaluado según la escala de Santana (1982).

Digitized by Google

Para la formación del callo, el 2,4-D es el único ingrediente que debe manejarse en el medio de Payan y Tarcon según la variedad, y la dosis administrada oscila entre 2 y 5 mg/litro (Cuadro 25.6). Respecto a la diferenciación de tejidos en plántulas, el medio de Payan y Tarcon resultó también superior, como indica la Figura 25.5. En síntesis, el medio de Payan y Tarcon (1977) se recomienda más porque estimula un mayor desarrollo de los callos, no favorece la presencia de fenoles en el medio, aumenta el número de plantas obtenidas, y su composición es más simple.

Inducción de enraizamiento

El escaso enraizamiento de las plántulas ha sido señalado por diversos autores, y muchos han propuesto diversos métodos para mejorarlo como los tratamientos con bajas temperaturas, la poda de las hojas, el burbujeo constante en los medios líquidos. El método más eficiente y práctico es, no obstante, el uso de medios de cultivo capaces de asegurar el enraizamiento.

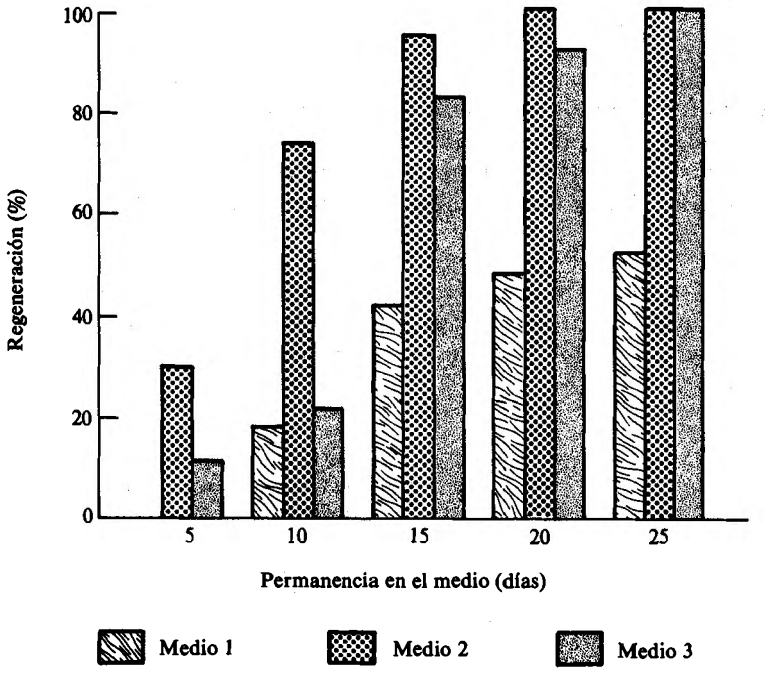


Figura 25.5. Influencia de distintos medios en la regeneración de plántulas de caña de azúcar. Medio 1 = Heinz y Mee; Medio 2 = Payan y Tarcon; Medio 3 = H.S.P.A. (ver Cuadro 25.6).

Digitized by Google

En el laboratorio del autor, el escaso enraizamiento es más frecuente en las plantas provenientes de la micropropagación. Se han investigado medios de cultivo que aseguren el enraizamiento y una alta supervivencia de los plantines en la fase de campo.

Para inducir el enraizamiento de las plantas provenientes del cultivo de tejidos, se ensayaron combinaciones (en diferente concentración) de sales minerales, sacarosa y carbón activado; también se ensayó la presencia o ausencia de agua de coco. Los mejores resultados se obtuvieron con los dos tratamientos siguientes:

a. El medio de regeneración de Heinz y Mee (1969) a la mitad de su concentración + carbón activado (5 g/litro) + 9% (p/v) de sacarosa.

b. Totalidad de la concentración de las sales minerales del medio MS (1962) más 4% de sacarosa (sin agua de coco).

Un alto contenido de sacarosa en los medios de cultivo provoca un bajo porcentaje de supervivencia in vitro, a causa probablemente del elevado valor osmótico de estos medios. Para la inducción del enraizamiento in vitro en plantas de 3 a 5 cm de altura se recomiendan siempre contenidos de sacarosa de 4% a 5% (p/v). Cuando no se agrega agua de coco, se obtiene un mejor desarrollo radicular y mayor longitud de las raíces de las plántulas. Maretzki y Hisaki (1980) proponen un medio que contenga de 7% a 9% de sacarosa y la mitad de la concentración de las sales de MS.

La inducción del enraizamiento en las plantas provenientes de la micropropagación es más difícil a causa de las altas concentraciones de citocinina (en especial, de 6-bencilaminopurina) que se agregan a esos medios de cultivo para provocar el ahijamiento. Antes de pasar estas plantas a un medio de enraizamiento, deben separarse bien los tallos individuales, y se les deben retirar los tejidos necrosados de consistencia dura y coloración oscura que se les acumulen alrededor del cuello durante al fase de ahijamiento.

Se ensayaron entonces medios de cultivo basados en la totalidad de la concentración de las sales minerales propuestas por Murashige y Skoog (1962) y con diferentes concentraciones y combinaciones de los siguientes componentes:

- Hormonas: ácido 3-indolacético (AIA), ácido indol-3-butírico (AIB), ácido naftalenacético (ANA), y ácido giberélico (GA_3)

- Vitaminas: ácido nicotínico, piridoxina (Vit. B6), tiamina (Vit. B1), glicina, ácido L-ascórbico y mioinositol.

Digitized by Google

- Aminoácidos: arginina.
- Sacarosa (principal fuente de carbohidratos).
- Agua de coco.

Los resultados indicaron que para inducir el enraizamiento en las plantas de caña de azúcar provenientes de la micropropagación debe emplearse uno de los siguientes medios de cultivo:

Medio A: Sales minerales de MS (concentración total) + ácido nicotínico (4 mg/litro) + piridoxina o Vit. B6 (2.5 mg/litro) + tiamina o Vit. B1 (3 mg/litro) + glicina (2.5 mg/litro) + AIA (7.4 mg/litro) + 6% (p/v) de sacarosa.

Medio B: Sales minerales de MS (concentración total) + AIA (7.4 mg/litro) + 6% (p/v) de sacarosa.

En la Figura 25.6 se aprecian las diferencias que presentan las plántulas desarrolladas en cuatro de los medios probados, 4 semanas después de ser pasadas a dichos medios. Las plantas marcadas I y III en la foto proceden de los medio A y B, respectivamente.

Figura 25.6. Influencia de cuatro medios de cultivo en el enraizamiento de plántulas de caña de azúcar obtenidas por micropropagación.

Digitized by Google

En estos dos medios de cultivo se obtuvieron plantas con raíces abundantes y de gran longitud; las plantas adquirían además gran altura y vigor, su mortalidad in vitro era nula y dieron porcentajes de supervivencia muy altos en el trasplante a tierra. Además, estos medios garantizaban de cinco a seis hijos por cada planta pasada a ellos, en un período de 4 semanas; este hecho tiene gran importancia, ya que esas plantas provenían de la micropropagación y, por ello, aumenta aún más el número de plantas aptas para ser pasadas a tierra.

Suspensiones Celulares

El primer informe de la regeneración de plantas a partir de suspensiones fue hecho por Heinz y Mee (1971). Para establecer suspensiones deben emplearse callos friables, es decir, altamente morfogénicos; Liu (1983) recomienda que sean del quinto al séptimo pase. El procedimiento es el siguiente:

1) Seleccionar callos friables de los pases 3 y 4.

2) Inocular de 1 a 3 g de callos en 50 ml del medio MS suplementado con 500 mg/litro de caseína hidrolizada, 3 mg/litro de 2,4-D, 10% de agua de coco y 20 g/litro de sacarosa, en un Erlenmeyer de 250 ml.

3) Agitar aplicando de 120 a 150 rpm.

4) Cada 3 días, decantar la parte superior (que se desecha) y añadir la misma cantidad de medio eliminado.

5) Cuando predominen las células meristemáticas aisladas, filtrar en malla de 150 a 300 µm de diámetro.

6) Centrifugar a 100*g* de 5 a 10 minutos.

7) Tomar el precipitado y emplearlo para plaquear o para hacer un nuevo subcultivo.

Hay diversos medios de cultivo para obtener la desagregación de suspensiones celulares (Liu, 1983; Wai y Vasil, 1983; Martínez et al., 1984). Los resultados obtenidos en el laboratorio de la Universidad Central de Las Villas muestran que el agua de coco y la caseína hidrolizada son importantes. Combinando ambos elementos se han podido establecer suspensiones en un tiempo de 12 a 15 días.

Las suspensiones celulares están compuestas básicamente por dos tipos de células. Las embriogénicas son pequeñas, de abundante citoplasma, se

Digitized by Google

dividen activamente, y su núcleo es prominente. Estas células se presentan aisladas o formando un núcleo meristemático de hasta 50 células; su grado de disociación depende del genotipo. Las otras células que predominan son las parenquimatosas, que son largas, vacuoladas, a menudo elongadas, y con citoplasma tenue. Al iniciarse el trabajo, aparecen también en las suspensiones las células gigantes: éstas y las parenquimatosas se eliminan por decantación, paso que se hará según las células que predominen en la suspensión. En la Figura 25.7 aparecen los tres tipos de células que se presentan en una suspensión.

Se estableció una suspensión y se subcultivó. Se encontró entonces que, en todas las variedades estudiadas, aumentaba rápidamente el número de células a partir del día 4, el día 8 alcanzaba el máximo crecimiento, y después descendía bruscamente. Estos resultados indican que los subcultivos no deben durar más de 8 días. Iguales resultados fueron hallados por Liu (1983).

Para evaluar la vitalidad de las células, el azul de Evans al 5% resultó efectivo porque penetra en las células muertas; éstas pueden llegar hasta el 20% del total de células en una suspensión. Este método empleado por Graft en 1971, fue aplicado por Thorpe (1981) y Martínez et al. (1984).

La duración de estas suspensiones llega a 2 años (Wai y Vasil, 1983) sin que pierdan su capacidad de regeneración, y se ha comunicado el mantenimiento de suspensiones durante 6 años. Martínez et al. (1984) encontraron que las células perdían rápidamente la capacidad de regenerar plantas, aunque se conocen suspensiones de caña de azúcar de 32 meses que no perdieron esa capacidad.

Más difícil que la obtención de la suspensiones es la regeneración de plantas a partir de aquéllas. En esta etapa, la composición del medio es muy importante. El medio MS suplementado con 500 mg/litro de caseína hidrolizada, 10% de agua de coco, y 1 mg/litro de 2,4-D resultó adecuado para la formación de callos friables y altamente regenerativos. Mayor información sobre la técnica de las suspensiones aparece en Thom et al. (1981), Wai y Vasil (1983), Liu (1983) y Cougall (1980).

Cultivo de Anteras

Varios investigadores han estudiado el cultivo de anteras en la caña de azúcar, pero sólo Maureen y Moore (1983) obtuvieron plantas haploides partiendo de anteras inmaduras de ocho clones y de tres híbridos, que

Digitized by Google

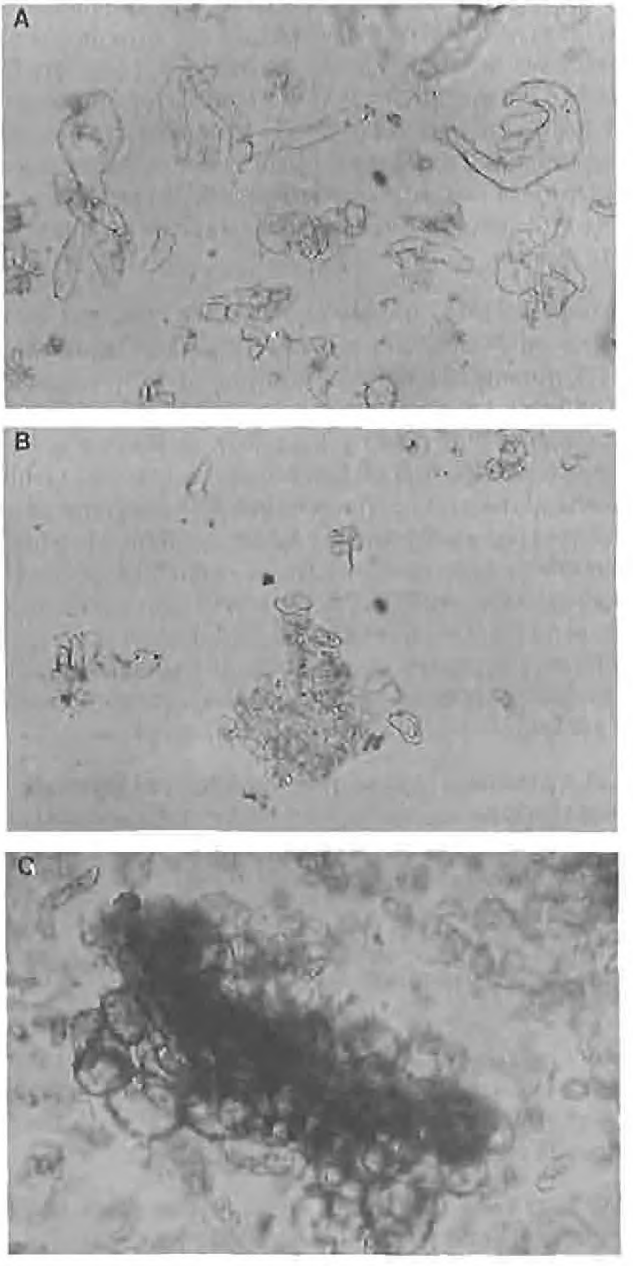


Figura 25.7. Tres tipos de células que ocurren en una suspensión celular de caña de azúcar. A) células parenquimatosas; B) células meristemáticas; C) células gigantes que aparecen, formando agregados, al inicio de la suspensión.

Digitized by Google

incubaron durante 21 días. Emplearon el medio MS variando la sacarosa de 30 a 90 g/litro con 2 mg/litro de 2,4-D y 5 mg/litro de cinetina; otro medio empleado fue MS más 30 g/litro de sacarosa, 1 mg/litro de 2,4-D, 1 mg/litro de AIA, y 1 mg/litro de BAP. La temperatura de incubación fue de 27 °C. De los 7 a los 14 días las anteras se colocaron sobre callos que tenían de 2 a 4 semanas. Para la regeneración se empleó el medio de Heinz et al. (1977). De los 11 materiales ensayados sólo dos produjeron plantas, una haploide y otra diploide. Los autores concluyeron que fue beneficioso el tratamiento térmico.

Maud y Maureen (1984) trabajaron con cinco clones de *Saccharum spontaneum*; cortaron los tallos a los pocos días de la floración y los colocaron a 4 °C durante 58 horas. Los segmentos de inflorescencia de 5 cm de largo, previamente desinfectados, se colocaron en un medio MS con 6% de sacarosa, 1 mg/litro de 2,4-D y 1 mg/litro de BAP, y se incubaron durante 3 semanas en la oscuridad. Los autores evaluaron la viabilidad de las anteras mediante diacetato de fluoresceína. En los estudios de medio de cultivo, los mejores fueron el medio N y el MS, este último con todas o con la mitad de las sales, respectivamente. Hallaron también que se incrementaban las microsporas formadoras de callo si se eliminaban las no viables y se reducían en el medio la sacarosa y el NH_4NO_3. Concluyeron que para el cultivo de anteras se requerían, durante todo el proceso, medios y condiciones ambientales distintas, así como manipulaciones apropiadas. De los cinco clones ensayados, sólo tres produjeron microsporas.

Los resultados obtenidos indican que en el cultivo de anteras de caña de azúcar se deben controlar muchos factores, como el genotipo de las plantas donantes, pero que esta técnica podrá emplearse pronto en el mejoramiento genético de la caña.

Cultivo de Protoplastos

Los protoplastos tendrán, en la caña y en otros cultivos, gran importancia en el futuro por las ventajas que ofrecen. Rysenka y Bauer (1984) informaron que de 1 g de hojas se pueden obtener alrededor de 1 millón de protoplastos que se cultivan en 2 a 5 ml de medio de cultivo.

La floración de la caña de azúcar es un inconveniente para su producción; ahora bien, la fusión de protoplastos de genotipos que no florecen, y cuyo número de cromosomas sea compatible, es una alternativa para la obtención de genotipos que posean buenas características y que además no florezcan.

Digitized by Google

Liu (1983) describe ampliamente las técnicas empleadas para la obtención de protoplastos de caña, tanto de hojas como de suspensiones celulares. Como en otros cultivos, esas técnicas son fáciles, y el problema principal es la obtención de plantas a partir de los protoplastos (Vasil et al., 1986); estos autores emplearon suspensiones celulares, provenientes de callos altamente embriogénicos obtenidos de secciones de hojas jóvenes, como fuente de protoplastos.

Los protoplastos aislados de la suspensión se desarrollaron en el medio modificado de Kao y Michayluk con 2,4-D, benciladenina, caseína hidrolizada y agua de coco. Los embriones somáticos se formaron cuando las colonias se trasfirieron al medio MS que contenía 2,4-D y carbón activado. Para la germinación de los embriones emplearon el medio MS suplementado con benciladenina y fluoridone. Con este procedimiento obtuvieron plantas que se desarrollaron hasta la madurez en el suelo.

Selección en Poblaciones Obtenidas de Callos o Suspensiones

La selección hecha en las plantas originadas de los plantines no es muy segura; por ello, en esa etapa sólo se selecciona respecto a caracteres de resistencia y al grado Brix, y se eliminan las plantas que se aparten mucho del tipo original; éste debe plantarse intercalado entre la población. En la segunda generación (primera clonal) se hace una mejor evaluación de los caracteres agroindustriales; también se puede hacer en el retoño de los plantines.

Una vez seleccionados los subclones según el carácter que se desee mejorar, el paso siguiente es plantar experimentos repetidos de la variedad original para evaluar con más precisión la planta y su primer retoño.

Si se hace la selección in vitro respecto a resistencia o tolerancia a los factores ambientales o a los patógenos, se hace luego la micropropagación in vitro de las plantas seleccionadas; de este modo es más eficiente la selección desde las primeras etapas y se hace en corto tiempo. Un esquema óptimo de trabajo sería: selección in vitro en las suspensiones celulares, micropropagación de las plantas seleccionadas, evaluación y selección en las plantas micropropagadas.

Digitized by Google

Obtención de Subclones Promisorios

Una vez resuelto el problema de la variabilidad, hay que aprovechar las grandes ventajas que ofrece el cultivo in vitro haciendo en él la selección. En los últimos años se han hecho grandes esfuerzos para dominar y perfeccionar las técnicas del cultivo in vitro, y ya se conocen 50 variedades resistentes obtenidas por ese método. Los resultados obtenidos en caña de azúcar son los siguientes.

Resistencia a enfermedades

Krishnamurthi (1974) fue el primero en comunicar la obtención de plantas resistentes a las enfermedades empleando los métodos del cultivo de tejidos. Desde 1970 se evaluaron somaclones obtenidos de diferentes variedades susceptibles a la enfermedad de Fiji (un virus trasmitido por un saltahojas) y al añublo blanco ('downy mildew') causado por *Sclerospora sacchari* Miyake). Partiendo de 300 somaclones de variedades susceptibles al Fiji, cuatro fueron resistentes y uno fue intermedio, mientras que para el añublo blanco varios somaclones fueron más resistentes que la variedad original (Krishnamurthi y Tlaskal, 1974).

Larkin y Scowcroft (1981) probaron somaclones obtenidos de variedades susceptibles a la enfermedad mancha de ojo (*Helminthosporium sacchari*) y encontraron que un 8.9% de ellos presentaban alta resistencia. Chen et al. (1978) hallaron una reducción notable de la susceptibilidad al carbón de la caña causado por *Ustilago scitaminea* Syd. en un somaclón obtenido del cultivar F177, el cual es altamente susceptible a esa enfermedad.

A partir de una población inicial de 800 somaclones, obtenida de la variedad B-4362 que es altamente susceptible a la roya (*Puccinia melanocephala*), se logró un somaclón con alta resistencia a esta enfermedad derivado de callos tratados con el agente mutagénico NaN_3. Esta resistencia se ha mantenido durante tres generaciones. Por otra parte, varios somaclones de una variedad susceptible al carbón, obtenidos de callos irradiados con ^{60}Co en dosis de 3000 rad, han manifestado muy bajo índice de infección durante dos generaciones después de su inoculación por el método de inmersión.

Otra aplicación reciente de estas técnicas es la selección in vitro mediante el empleo de toxinas aisladas y purificadas hasta toxinas crudas (medios derivados) producidas por los hongos fitopatógenos.

Digitized by Google

Chen et al. (1978) cultivaron explantes de variedades resistentes y susceptibles al añublo blanco (*Sclerospora sacchari*), conjuntamente con el hongo. Al cabo de 3 semanas notaron abundante crecimiento del hongo sobre los callos formados de variedades susceptibles y resistentes, una indicación de que la resistencia a este hongo no se expresaba a este nivel.

Maribona et al. (1985) aplicaron al medio de cultivo la toxina aislada de *Helminthosporium sacchari* y encontraron que la resistencia a esta enfermedad se expresaba en todos los niveles de organización in vitro. Varios somaclones con niveles de resistencia superiores a la variedad original fueron seleccionados en condiciones de infección natural (Maribona et al. 1986).

Callos de variedades susceptibles y resistentes al carbón de la caña (*U. scitaminea* Syd.) fueron cultivados durante 4 semanas sobre el medio de Payan y Tarcon (1977) que contenía concentraciones de 50%, 65% y 80% de medios derivados y filtrados del hongo. Los resultados mostraron diferencias significativas entre las variedades resistentes y susceptibles (Cuadro 25.8) cuando los callos crecieron en el medio que contenía sustancias derivadas del medio en que se cultivó el hongo; no hubo, en cambio, significancia en el medio de Payan y Tarcon simple (Orellana y Pérez Ponce, 1987).

Sin embargo, Pérez y Chagrardiet (1983) encontraron que los cultivos asociados con *U. scitaminea* experimentaron una disminución en el peso fresco tanto en las variedades susceptibles como en las resistentes; no obstante, no parece existir una relación entre el fenómeno in vitro y la respuesta de la planta al hongo.

Tolerancia a condiciones ambientales adversas

La sequía afecta seriamente la caña de azúcar causando no sólo disminución en su rendimiento sino también en la calidad de los jugos. En Cuba, el riego tiene limitaciones como las siguientes: escasez de agua para riego por la baja calidad de ésta, costo de los sistemas de riego, altos precios de los combustibles. A ellas se unen los bajos precios del azúcar en el mercado mundial. Para contrarrestar esas limitaciones, se recomienda plantar variedades tolerantes a la sequía en regiones donde el regadío sea económicamente desfavorable.

Algunos países han seleccionado variedades de caña de azúcar tolerantes a la sequía empleando métodos variados, tanto en condiciones de campo como en condiciones controladas. En los últimos años, el cultivo in vitro se ha convertido en un método promisorio para mejorar la tolerancia

Digitized by Google

Cuadro 25.8. Peso fresco de los callos de variedades (V1 a V4) de caña de azúcar en diferentes medios de cultivo.

Variedad[a]	Peso (g) en el medio:[b]											
	T			T1			T2			T3		
	md	ma	sign.	md	ma	sign.	md	ma	sign.	md.	ma	sign.
V1	0.2174	0.1688	ns	0.2578	0.1969	ns	0.2213	0.2213	ns	0.0780	0.1365	ns
V2	0.2912	0.3436	ns	0.4332	0.5044	ns	0.6119	0.6605	ns	0.39	0.56	ns
V3	0.3207	0.3719	ns	0.0506	0.7728	++	0.0943	0.5413	++	0.1910	0.6343	++
V4	0.6448	0.6326	ns	0.4947	1.2200	+	0.6192	1.3148	+	0.8870	1.4559	+

a. V1 = My-5514 (R); V2 = B-4362 (R); V3 = B-4231 (As); V4 = My-5450 (As).
b. T = Medio normal de crecimiento de Payan y Tarcon (1977). T1 = Medio normal + 50% de sustancias derivadas (md) o de asparagina (ma). T2 = Medio normal + 65% de sustancias derivadas (md) o de asparagina (ma). T3 = Medio normal + 80% de sustancias derivadas (md) o de asparagina (ma). sign. = Significancia (ANOVA, p = 0.05).

Digitized by Google

a la sequía, aunque en varios cultivos sus resultados prácticos no han sido apreciables. El autor comprobó en su laboratorio la existencia de diferencias varietales en la caña de azúcar, a nivel de callos y plántulas, manifestadas en su respuesta a medios con altas concentraciones de manitol.

Estas investigaciones básicas orientan un programa de mejoramiento en el que se emplea el cultivo in vitro de dos maneras:

- Producción de un elevado número de plantines regenerados a partir de callos, en los cuales la variabilidad somaclonal ha sido reforzada por mutagénicos físicos, para estudiar su comportamiento en condiciones de campo y sin riego.
- Selección de callos y plántulas que crecen en medios de cultivo con concentraciones elevadas de manitol —un método de simular la sequía in vitro— y su posterior estudio en condiciones de campo.

Se ha observado en estos experimentos una notable variabilidad, tanto in vitro como en condiciones de campo, y se está corroborando ya la repetibilidad de estos resultados.

Se han publicado resultados sobre los mecanismos de tolerancia a la salinidad en callos y suspensiones, manifestados a nivel celular (Maribona et al., 1986; Kresovich et al., 1986). Hasta el presente no hay ningún resultado de interés práctico que mejore la tolerancia de la caña a condiciones ambientales adversas.

Caracteres Agroazucareros

El cultivo de tejidos ha contribuido a mejorar dos caracteres de importancia económica en la caña de azúcar: el rendimiento de caña y el de azúcar (Cuadro 25.1). Se informa de subclones, obtenidos por cultivos de tejidos, con 32% y 34% de aumento en caña y en azúcar (Liu et al., 1983).

De los componentes del rendimiento, el número de tallos ha sido el más incrementado en estos trabajos. Los resultados obtenidos en el laboratorio de la Universidad de las Villas muestran que, en los caracteres del rendimiento agrícola, se produce suficiente variabilidad para la selección; hay subclones de la variedad CP 5243, por ejemplo, en que los incrementos de rendimiento agrícola y de azúcar son 10% y 20%, respectivamente. Este comportamiento es una consecuencia de la disminución o eliminación de

Digitized by Google

la floración en esta variedad. Se han seleccionado también subclones de mayor peso de tallo, que han mantenido este carácter.

En el subclon de la variedad B-4362, resistente a la roya, aumentó la altura y el número de tallos, pero disminuyó el grosor y el contenido de azúcar.

El cultivo in vitro ha servido, en conclusión, para el mejoramiento de los caracteres agroazucareros de la caña, aunque muchas veces el incremento de los rendimientos se debe al efecto positivo producido por la eliminación de algún defecto, de la floración, o de la susceptibilidad a un factor biótico.

Conclusiones

La producción de callos, la selección a nivel de los somaclones, la selección in vitro y las suspensiones celulares: estos métodos de cultivo de tejidos permitirán obtener grandes resultados en el mejoramiento de la caña de azúcar. Las técnicas son factibles; ya se domina la suspensión celular, y se ha manifestado, a nivel celular, resistencia a importantes patógenos y tolerancia a condiciones ambientales adversas de esta especie azucarera.

En el futuro, con los protoplastos se podrá hacer directamente selección, fusión de ellos mismos, y trabajos de ingeniería genética. Se estudian, finalmente, los mutágenos, en combinación con cualquier cultivo in vitro, para aumentar la variabilidad.

El desarrollo actual de las técnicas del cultivo in vitro permite eliminar uno o dos defectos de una variedad o clon de buen comportamiento; no obstante, estas técnicas no suplementarán totalmente los métodos tradicionales del mejoramiento por cruzamiento.

Referencias

Aholoowalia, B. S. 1983. Spectrum of variation in somaclones of triploid rye. Grass Crop Science 3(6):1141-1147.

Alfonso, A. y Capote, A. 1980. Cultivo de tejidos en caña de azúcar: Obtención posterior a la regeneración de plantas in vitro. Ciencias de la Agricultura (Academia de Ciencias de Cuba) 6:29-32.

Artschwager, E. 1925. Anatomy of the vegetative organs of sugarcane. J. Agric. Res. 30:197-221.

Digitized by Google

Byliss, M. W. 1980. Cromosomal variation in plant tissue culture. En: Perspectives in plant cell and tissue culture. Academic Press. 253 p.

Coleman, R. E. 1970. New plants produced from tissue culture. Sugarcane Res. A.R.S. USDA 38.

Concepción, M.; Pérez Ponce, J. y Portal, R. 1985. Comparación de distintos medios de cultivo: Noveno Seminario Científico CENIC, Habana, Cuba. (Resumen).

Cruz Pérez, M. 1986. Conteo cromosómico en subcultivos R2, R4, R6 y R8 de la variedad C-8751 de caña de azúcar. En: Quinta Conferencia Agropecuaria y Segundo Simposio Internacional de Sanidad Vegetal, Universidad Central de Las Villas (UCLV), Cuba.

Chen, W. H.; Liu, M. C. y Chao, M. C. 1978. The growth of sugarcane Downy Mildew fungus in tissue culture. Fourth International Congress of Plant Tissue Culture, Calgary, Canadá. (Resúmenes).

Chen, Z. H.; Qian, C. F.; Qin, M.; Wang, C. H.; Sui, C. J.; Chen, F. Z. y Deng, S. I. 1979. The conduction of pollen plants of sugarcane. En: Annual report of the Institute of Genetics. Academia Sinica, Beijing, China. p. 91-93.

Cougall, D. K. 1980. Nutrition and metabolism. En: Plant tissue culture as a source of biochemicals. CRC Press, Boca Ratón, Florida, E.U. p. 21-58.

Evans, D. A.; Crocomo, D. J. y Carvalho, M. T. V. 1980. Protoplast isolation and subsequent callus regeneration in sugarcane. Z. Pflanzenphysiol. 978:335-358.

Feldemann, P. 1984. Analyse du polymorphisme enzimatique de la canne à sucre (*Saccharum* spp.): Utilization pour la recherche de variabilité après culture *in vitro*. Tesis (Doc.). Université Paris, Sud Orsay, Francia. 145 p.

Frías de Fernández, A. M.; Horacio, J. A. y de Canelada, L. 1975. Estudios sobre variabilidad genética de isoperoxidasas y caracteres morfológicos en subclones de caña de azúcar, obtenidos mediante cultivo de tejido in vitro. Rev. Agron. (Argentina) 12(1-2):97-87.

Gamborg, O. L. y Shyluk, J. P. 1981. Nutrition media and characteristics of plant cell and tissue culture. En: Plant tissue culture methods and applications in agriculture. Academic Press, Nueva York. 379 p.

Heinz, D. J. y Mee, G. W. P. 1968. Tissue callus differentiation and regeneration of plants in *Saccharum* spp. Agron. Abstr. p. 10.

——— y ———. 1969. Plant differentiation from callus tissue of *Saccharum* species. Crop. Sci 9:346-348.

——— y ———. 1971. Morphologic, cytogenetic and enzimatic variation in *Saccharum* species hybrid clones derived from callus tissue. Amer. J. Bot. 58(3):257-261.

Digitized by Google

———; Krishnamurthi, M.; Nickell, L. G. y Maretzki, A. 1977. Cell tissue and organ culture in sugarcane improvement. En: Reinert, J. y Bajaj, Y. P. S. (eds.). Applicated and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture. Springer-Verlag, Berlín. p. 3-17.

Irvine, J. E. 1984. The frequency of marker changes in sugarcane plants regenerated from callus culture. Plant Cell Tissue & Organ Culture 3(3):201-209.

Kresovich, S.; McGea, R. E. y Wadsworth, S. J. 1985. Comparison of the in vitro responsiveness of callus cultures derived from inmature inflorescence and leaf base tissue of two interspecific hybrids of sugarcane (*Saccharum* spp.). Sugarcane 6:8-10.

———; Drave, H. J. y Rivera, J. L. 1986. Variability of agronomic characters in populations of tissue culture derived and vegetatively propagated sugarcane. Proceedings of the 19th Congress of the International Society for Sugarcane Technology, Indonesia. p. 528-532.

———; Wadswoth, S. J.; Molina, J. J. y McGee, R. E. 1986. Salinity tolerance of interspecific hybrids of *Sccharum* spp.: Range and mechanisms of adaptation exhibited in cellular suspensions of commercial cultivars. En: Proceedings of the 19th Congress of the International Society for Sugarcane Technology, Indonesia. p. 245-254.

Krishnamurthi, M. 1974. Notes on disease resistence of tissue culture subclones and fusion of sugarcane protoplasts. Sugarcane Breed Newsl. (ISSCT) 35:24-24.

——— y Tlaskal, J. 1974. Fidji disease resistance of *Saccharum officinarum* var. Pinder subclones form tissue cultures. En: Proceedings of the 15th Congress of the International Society for Sugarcane Technology, Africa del Sur. p. 130-137.

Larkin, P. J. y Scowcroft, W. R. 1981. Eyespot disease of sugarcane: Heat-specific toxin induction and its interaction with leaf cells. Plant. Physiol. 67:408-414.

Lat, J. B. y Lantin, M. M. 1976. Agronomic performance of sugarcane clones derived from callus tissue. Philipp. J. Crop. Sci. 1:117-123.

Leopold, C. A. 1963. Auxins and plant growth. Colección Ciencia y Técnica. Instituto del Libro, La Habana, Cuba. 354 p.

Lee, T. S. G. 1986. Producing healthy sugarcane (*Saccharum* spp.) seedstalks by the tissue culture method. Sixth International Congress of Plant, Tissue and Cell Culture, agosto 1986. (Resúmenes). Minneápolis, Minnesota, E.U.

Liu, M. C. 1971. A new method for sugarcane breeding: Tissue culture technique. Taiwan Sugar 18(1):8-10.

———. 1981. In vitro methods applied to sugarcane improvements. En: Thorpe, T. A. (ed.). Plant tissue culture: Method and applications in agriculture. Academic Press, Nueva York. p. 299-323.

Digitized by Google

———. 1983. Sugarcane. En: Handbook of plant cell culture.

———; Yeh, H. S. y Chen, W. C. 1983. Tissue and cell culture as aids to sugarcane breeding. IV: The high-sucrose and vigorously growing cell clone 71-4829. Repl. Taiwan Sugar Research. Int. 102:1-12.

Lyrene, P. M. 1976. Tissue culture and mutations in sugarcane. Sugarcane Breed. Newsl. (ISSCT). 28:61-62.

Mendre, R. R.; Iyer, R. S. y Kotwal, M. 1983. Rapid multiplication of sugarcane. p. 5-8.

Maribona, R. H.; Korneva, S.; Ruiz, A. y González, S. 1983. Obtención de plantas de caña de azúcar mediante el cultivo de tejidos a partir de diferentes órganos de la planta. En: Proceedings of the 18th Congress of the International Society for Sugarcane Technology, Cuba. p. 55-74.

———; Ramos, L. M. y Ruiz, A. 1985. Expresión in vitro de la resistencia a la toxina de *Helminthosporium sacchari*: Noveno Seminario Científico CENIC, Ciudad de la Habana, octubre 1985. (Resumen).

———; Korneva, S.; Ramos, L. M. y Ruiz, A. 1986. In vitro selection of sugarcane. En: Proceedings of the 19th Congress of the International Society for Sugarcane Technology, Indonesia. p. 533-543.

Martínez, J. M.; Rodríguez, J. B. y Keuni, J. B. 1984. Comportamiento de la línea celular C-33 de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) en condiciones de cultivo de suspensiones y de siembra en placas: Tercera Jornada Científica, La Habana, Cuba. (Resúmenes).

Maretziki, A. y Nickell, L. G. 1973. Formation of protoplasts from sugarcane cell suspensions and the regeneration of cell culture from protoplasts. En: Protoplastes et fusion de cellules somatiques végétales. Colloq. Int. C.N.R.S. 212:51-63.

——— y Hisaki, P. 1980. Sucrose promotion of root formation on plantlets regeneration from callus of *Saccharum* spp. Int. J. Bot. 38(1):85-88.

Maud, A. W.; Hinchee, M. y Maureen, M. F. 1984. Culture of isolated micropares of *Saccharum spontaneum*. Z. Pflanzenphysiol. 113:305-314.

Maureen, M. F. y Moore, P. H. 1983. Haploid production from anther culture of *Saccharum spontaneum* L. Z. Pflanzenphysiol. 109:197-206.

Micke, A. 1981. Mejoramiento de las plantas mediante mutaciones inducidas. OIEA Boletín 23(3):50-51.

Müller, J. O. 1985. Variation in tissue culture subclones of sugarcane. Sugar Cane 1:11-16.

Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised mediun for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15:437-497.

Digitized by Google

Nasai, C. y Schnell, R. J. 1986. Comparison of F_2 population and somaclones derived from a hybrid of *Saccharum* x *Erianthus* (*Repidium*). Sixth International Congress of Plant, Tissue and Cell Culture, agosto 1986. Minneápolis, Minnesota, E.U.

Nickell, L. G. 1964. Tissue and cell culture of sugarcane: Another research tool. Hawaii Plant. Rec. 57:223-229.

——— y Maretzki, A. 1969. Growth of suspension culture of sugarcane in chemically obtained media. Physiol. Plant. 22:117-125.

Ortiz, Q. y Quesada, R. 1982. Culture de tissus somatiques chez *Saccharum:* Analyse de la variabilité enzymatique des plantes regenerées.Tesis (Doct.). Développement et amélioration des végétaux, Université Paris, Sud Orsay, Francia. 136 p.

Payan, F. C. y Tarcon, G. 1977. Técnicas para la micropropagación de la caña de azúcar mediante el cultivo de tejido y de yemas axilares. Acta Agronómica 27(1/4).

Pérez Ponce, J.; Castillo, M. A.; González, M. A. y Velazco, O. 1984. Comportamiento de poblaciones obtenidas por cultivo de tejido en caña de azúcar (*Saccharum* spp.): Primer Congreso Nacional de Genética, julio 1984, La Habana, Cuba. (Resúmenes).

——— y Jiménez, E. 1986. Micropropagación in vitro de la caña de azúcar *(Saccharum* spp.). Tesis. Universidad Central de las Villas (UCLV), Cuba. 50 p.

——— y Chagrardiet, P. 1983. Toxic effects between *Ustilago scitaminea* Syd. and sugar callus: In vitro effects of two growth factors. Agronomie 3(7):629-634.

Price, S. 1962. A modified leaf-squash technique for counting chromos in somatic cells of *Saccharum* and related grasses. En: Proceedings of the 12th Congress of the International Society for Sugarcane Technology, Puerto Rico. p. 583-585.

Ruiz, A.; Maribona, R. H.; Korneva, S.; Ramos, L. M.; Izquierdo, R. y Héctor, E. 1986. Biochemical markers for sugarcane selection. En: Proceedings of the 19th Congress of the International Society for Sugarcane Technology, Indonesia. p. 273-283.

Rysohka, V. y Baver, R. 1984. Perspektiven für die Nutzung der Cell und Protoplastenkultur in the Pflanzenzuchtung. Gaterbau 31:12-13.

Sauvaire, D. y Galzy, R. 1983. Une method de planification expérimentale appliquée aux cultures de tissus végétaux: Exemple de la canne a sucre (*Saccharum* spp.). Can. J. Bot. 58:264-269.

——— y ———. 1981. Micropropagation de la canne a sucre par bouturage in vitro: Action d'une auxine et d'une citokinine. Agronomie Tropicale 36(1): 63-69.

Digitized by Google

Thom, M. y Maretzki, A. 1970. Peroxidase and esterase isozymes in Hawaiian sugar cane. Hawaii Plant. Rec. 58:81-94.

———; Maretzki, A.; Komor, E. y Sakai, S. 1981. Nutrient uptake and accumulation by sugarcane cell cultures in relation to the growth cycle. Plant Cell Tissue & Organ Culture 1(1): 3-14.

Thorpe, T. A. (ed.). 1981. Plant tissue culture methods and applications in agriculture. Academic Press, Nueva York.

Vasil, J. K.; Srinivasan, C. y Vasil, K. 1986. Culture of protoplasts isolated from embriogenic cell suspension cultures of sugarcane and maize. Sixth International Congress of Plant, Tissue and Cell Culture, agosto 1986. Minneápolis, Minnesota, E.U. (Resúmenes).

Wai, J. H. y Vasil, I. K. 1983. Somatic embriogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.): Growth and plant regeneration from embryogenic cell suspension cultures. Ann. Bot. 51:719-726.

Wersuhn, G. y Fritze, G. 1985. A new procedure for the in vitro culture of plants. Biochem. Physiol. Pflanzen. 180(1):79-83.

White, P. R. 1963. The cultivation of animal and plant cells. The Ronald Press, Nueva York.

Yeoman, M. M. y Forsche, E. 1980. Cell proliferation and growth in callus culture. En: Perspectives in plant cell and tissue culture. Academic Press, Nueva York. 250 p.

Zelitch, A. y Berlyn, M. B. 1982. Altered glycine decarboxylation inhibition in isonicotinic acid resistant mutant callus lines and in regenerated plant and seed progeny. Plant Physiol. 69:198-204.

Digitized by Google

Capítulo 26

Multiplicación vegetativa de café, hevea y cacao

P. Dublin*

* Centre de Coopération International en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), Montpellier Cédex, Francia.

Digitized by Google

Introducción

El empleo de técnicas de cultivo in vitro de tejidos vegetales se extiende cada vez más, tanto en los establecimientos públicos como en los privados. Numerosos laboratorios, en Europa y en América, utilizan estas técnicas para multiplicar en gran cantidad plantas ornamentales y frutales (rosal, 'gerbera', claveles, manzano, melocotonero, y otros). Esta nueva tecnología ofrece además múltiples ventajas a numerosas disciplinas de investigación como la genética, la bioquímica, el fitomejoramiento y la fitopatología.

El cultivo de tejidos vegetales presenta aspectos y aplicaciones prácticas muy variadas, como ciclos de selección más cortos, multiplicación vegetativa rápida, y creación de nuevas formas. De estas formas del cultivo de tejidos, la reproducción vegetativa es, sin duda la más difundida y la que más ha contribuído al desarrollo de esa tecnología. Sin embargo, cualquiera que sea el procedimiento utilizado, la reproducción vegetativa siempre ha desempeñado un papel determinante en el mejoramiento genético de las plantas cultivadas. En realidad, es el único método que permite reproducir individuos excepcionales —obtenidos del azar de las combinaciones genéticas o de las mutaciones— cuya fiel reproducción no puede realizarse por vía sexual por diferentes razones (barreras biológicas, tiempo de depuración genética muy largo y costoso). Esto ocurre precisamente con varias especies tropicales perennes de gran interés económico como las palmeras, el cacao, el cafeto, y el caucho o hevea.

Durante muchos años las técnicas del cultivo de tejidos se habían empleado solamente en plantas de regiones templadas. Hace poco tiempo su uso se extendió a las plantas tropicales y numerosos laboratorios aplican hoy procedimientos in vitro para el mejoramiento genético de especies como el cafeto, el cacao, la caña de azúcar, las palmeras, el hevea, la yuca, el plátano, y la piña. Las técnicas de multiplicación vegetativa in vitro de estas especies ya se han perfeccionado y permitirán la conservación de esos recursos genéticos, actualmente en peligro.

El principio del cultivo de tejidos parece sencillo y la iniciación en sus diferentes técnicas parece fácil. Esta situación explica, en parte, la tendencia a generalizar indebidamente su empleo. En varios países en vías de desarrollo hay una distancia notable entre los productos de la investigación y la utilización local de dichos productos. A menudo, un mejoramiento de las condiciones del cultivo permitiría alcanzar progresos agrícolas mucho más efectivos que la difusión de un material vegetal demasiado sofisticado y no adaptado aún a la situación local de ese cultivo.

Digitized by Google

A causa de las inversiones inherentes a la producción de plantas in vitro, el precio de producción de éstas a menudo será más alto que el de una planta obtenida por la vía hortícola clásica, especialmente cuando las tasas de multiplicación sean bajas. En consecuencia, la planta producida in vitro se preferirá cuando genere, en relación con las plantas obtenidas por la vía clásica, una plusvalía real, tal como un aumento en el vigor, la resistencia a una enfermedad, mayor rendimiento, o la ausencia de algún virus.

Las circunstancias en que se empleen las plantas in vitro podrá diferir de un país a otro y de una especie a otra. En ciertos casos, esas plantas se utilizarán como complemento de procedimientos hortícolas. En el cafeto, las condiciones in vitro permiten un rápido establecimiento de almácigos de retoños; en el hevea, el cultivo in vitro produce tallos rejuvenecidos cuyo enraizamiento se hace en condiciones hortícolas.

Igualmente los requisitos de homogeneidad genética podrán variar según las circunstancias locales y la naturaleza del producto de consumo (fruto, flor, bebida). En efecto, cuando se consume un producto trasformado, como aceite, jugo de frutas, bebida, etc., en que las características individuales de la planta desaparecen en beneficio del producto comercial estándar, la uniformidad genética será menos rigurosa.

La homogeneidad genética, con sus limitaciones (suministro regular de fertilizantes, fungicidas e insecticidas) y sus peligros (generalización de ataques parasitarios a causa de una base genética demasiado estrecha) se adapta bien a una agricultura moderna y bien planificada, pero no tan bien a la de los países tropicales donde es difícil obtener un ambiente regular y homogéneo para el cultivo.

El peligro que representa, por ejemplo, la roya del cafeto para los productores latinoamericanos de café es la consecuencia directa de la base genética estrecha de los cafetos cultivados en esos países. La variedad más cultivada es la caturra, que requiere fertilizantes, es de crecimiento lento y escaso follaje, y se siembra a una alta densidad (más de 5000 plantas/ha). Por tanto, desde el punto de vista económico, está mal adaptada a una micropropagación in vitro por su bajo coeficiente de multiplicación y por el costo de producción elevado de las plantas in vitro. Una variedad de mayor tamaño, de crecimiento rápido y por ello de un coeficiente de multiplicación in vitro más alto, capaz de dar buen rendimiento con menor densidad de siembra (2000 plantas/ha) estaría mejor adaptada para el sistema in vitro porque el costo de la siembra será menor.

Igualmente, la técnica de reproducción vegetativa (embriogénesis somática) que desemboca en una relativa variabilidad genética, es decir, en una

Digitized by Google

población heterogénea pero de mayor capacidad de adaptación y resistente a los factores ambientales aleatorios, es inaceptable en el contexto agrícola de los países industrializados, pero será recomendable en el medio agrícola de algunos países tropicales.

Las investigaciones sobre la multiplicación vegetativa in vitro de plantas tropicales de interés económico son cada día más numerosas. Se han realizado simultáneamente en varios países para muchas plantas: la palma de aceite, la caña de azúcar, el cafeto, el cacao, el plátano, la piña, el hevea. Los éxitos obtenidos varían de una especie a otra.

Las dificultades que se deben solucionar son típicas de cada especie vegetal. En el hevea es difícil establecer una técnica de micropropagación: el establecimiento in vitro de los clones adultos, la obtención de un sistema radical pivotante, y el mantenimiento de los tallos producidos in vitro hasta que alcancen un crecimiento suficiente que asegure su multiplicación y evite recurrir nuevamente a la planta donante. Otro tipo de planta, el cacao, tiende a presentar una callogénesis anárquica en todos los explantes que se cultivan; esta tendencia es un serio obstáculo para el establecimiento de una técnica de micropropagación en el cacao y por ello su multiplicación vegetativa mediante técnicas hortícolas (esquejes en invernadero, injerto) da mejores resultados hasta el momento.

En las páginas siguientes se examinarán los conocimientos que se han adquirido en materia de la reproducción vegetativa in vitro de tres grupos de plantas de gran interés económico: el café, el hevea y el cacao. Estas especies pertenecen a familias diferentes y cada una presenta reacciones específicas in vitro. Las técnicas de reproducción vegetativa están bien establecidas en el cafeto, pero no en las otras especies. Estas aún representan numerosos problemas que seguramente se resolverán en los próximos años.

Café

Orientaciones modernas del mejoramiento genético

La mayor parte del café que se consume en el mundo proviene de dos especies, *Coffea arabica* y *C. canephora* cuya variedad *robusta* es la más cultivada. *C. arabica* es originaria de las regiones montañosas de Etiopía y se cultiva en las regiones de altura, principalmente en América Latina. Este cafeto alotetraploide (2n = 44), es autocompatible; por tanto, puede

Digitized by Google

reproducirse fielmente mediante semillas. Los principios de su mejoramiento, basados en la autogamia, llevaron a la creación de cultivares relativamente homogéneos (Caturra, Mundo Novo) que se diseminaron por todos los países productores de café de América Latina. Sin embargo, su base genética tan estrecha expone actualmente estas variedades al peligro de la roya (*Hemileia vastatrix*) que ya ha llegado a casi todos esos países (Cherrier, 1980).

C. canephora es diploide (2n = 22), se cultiva en zonas de menor altura (Africa, Asia y América), es autoincompatible, y es resistente a la roya. Su mejoramiento comprende dos etapas: una sexual que conduce a poblaciones heterogéneas, y una vegetativa que resulta en clones y sólo puede emplearse en una mezcla policlonal a causa de su autoincompatibilidad (Dublin, 1967; Berthaud, 1980).

La obtención de progenitores homocigóticos derivados de haploides dobles permitiría crear híbridos vigorosos y relativamente homogéneos en los cafetos (Dublin et al., 1975; Couturon et al., 1982). Tanto en Africa como en América, desde hace algunos años el mejoramiento del café ha sido orientado hacia la obtención de híbridos interespecíficos de *C. arabica* x *C. canephora* pero con objetivos muy diferentes (Louarn, 1982).

En Africa, donde el objetivo es la creación de híbridos de café adaptados a las condiciones ecológicas de *C. canephora* y que den un producto de calidad superior al de los cafetos *robusta*, la selección se ha limitado a los híbridos F_1 de *C. arabica* mejor conocidos como *arabusta* (Duceau, 1980). Estos híbridos, que son tetraploides o hexaploides, sólo pueden reproducirse por vía vegetativa (Capot, 1972; Le Pierres et al., 1980; Berthaud, 1977).

En América Latina, donde es indispensable encontrar una solución genética al problema de la roya, el objetivo es trasferir a *C. arabica* los genes de resistencia a la roya de *C. canephora* y crear híbridos estables; sus exigencias ecológicas y sus características agronómicas serán idénticas a las de *C. arabica* y serán capaces de reproducirse fielmente mediante semillas (Bettemcourt et al., 1980).

Teniendo en cuenta estas perspectivas, desde hace algunos años se emprendieron investigaciones sobre los híbridos Catimor e Icatú; éstos dieron como resultado, en Colombia, la creación de una multiraza, la variedad 'Colombia', cuyas plantas son resistentes a las diferentes razas de roya conocidas hasta el momento en ese país. La creación de estos híbridos exige un tiempo considerable; por esto y por la creciente amenaza de la

Digitized by Google

roya, el fitomejorador desearía actualmente una selección mucho más temprana como aquélla basada en las técnicas del cultivo in vitro.

Además, en el progenitor recurrente *arabica* aparece, desde la tercera generación de retrocruces, cierto número de individuos de gran desempeño en la productividad, en la calidad comercial y en la resistencia a la roya; la multiplicación de éstos, en gran cantidad y por vía vegetativa, es de sumo interés (Carvalho, 1982; Carvalho et al., 1982). En el grupo *arabica* hay plantas de resistencia incompleta a la roya cuya utilidad para la caficultura fue subrayada por Leguizamón (1983).

A veces se ha mencionado la existencia en *C. arabica* de plantas con vigor híbrido obtenido de cruzamientos intervarietales. Desafortunadamente, la reproducción masiva de tales híbridos por vía sexual es imposible a causa del sistema de reproducción de esas plantas: no tienen genes de esterilidad masculina y su producción de semillas en fecundaciones dirigidas es baja. Esa vía de mejoramiento puede obviarse, sin embargo, mediante las técnicas in vitro para sacar provecho de la heterosis de los cruzamientos entre cafetos *arabica* genéticamente alejados.

Datos recientes han demostrado que, en el marco de las investigaciones de los cafetos resistentes a la roya, es indispensable tener una producción abundante y regular de esporas de *H. vastatrix* resistentes a los parásitos; las plántulas de los cafetos desarrolladas en condiciones in vitro podían servir a este propósito (Amar, 1984; Leguizamón, 1983).

Finalmente, se puede pensar que con el progreso de la biotecnología —descrita como trasformación genética mediante el cultivo de células, el cultivo y fusión de protoplastos, y otros procedimientos— será posible crear, en un futuro cercano, nuevos cafetos con características definidas. Al principio estarán representadas por pocos ejemplares que luego se reproducirán por vía vegetativa.

Estos datos demuestran el papel general que desempeñará la multiplicación vegetativa en el mejoramiento genético de los cafetos (Mónaco et al., 1977). En particular, la propagación in vitro será esencial en la conservación de los recursos genéticos del cafeto y en la diseminación de individuos selectos obtenidos de cruzamientos intervarietales o interespecíficos. Este procedimiento debería ser la base de los cambios inevitables que, a causa de la roya, se producirán en la caficultura de América Latina durante los próximos decenios.

Digitized by Google

Técnicas de multiplicación vegetativa

En condiciones hortícolas. La reproducción vegetativa del café por procedimientos hortícolas se conoce desde hace mucho tiempo (Valleys, 1952). Esta técnica se aplica principalmente en Africa, donde es imposible, por incompatibilidad, la reproducción adecuada por vía sexual de individuos excepcionales seleccionados en la especie *canephora* y en la variedad *robusta*. Cada año se producen millones de esquejes enraizados de estos cafetos en diversos países de Africa como Costa de Marfil, Togo, Camerún. En cambio, en los cafetos *arabica* se puede obtener una reproducción adecuada por semillas, y la multiplicación vegetativa en condiciones hortícolas nunca ha preocupado a los fitomejoradores; esas técnicas nunca han salido de la etapa de experimentación en los centros de investigación.

A causa del dimorfismo vegetativo de los cafetos, la multiplicación vegetativa por vía hortícola sólo puede efectuarse con un fragmento de tallo ortótropo joven; estos tallos siempre serán escasos en un clon recién seleccionado. Los esquejes de las ramas plagiótropas producen cafetos que presentan un porte horizontal, sin interés agronómico. En consecuencia, el empleo de procedimientos hortícolas para la difusión de un nuevo clon de cafeto puede requerir una cantidad de tiempo considerable.

El esqueje comprende un nudo, un par de hojas con sus láminas reducidas a la mitad, y un fragmento de entrenudo de 4 a 5 cm de longitud. Después de aplicarle en la base un producto auxínico, el esqueje se coloca en un recipiente en el invernadero. El sustrato de establecimiento varía según las posibilidades locales (arena, aserrín de madera, cáscara de arroz). Las tasas de establecimiento, algunas veces muy elevadas (90%), varían según la posición del esqueje en el tallo (los esquejes terminales o cercanos al meristema terminal enraizan mejor), el estado fisiológico de la planta, y el tiempo en que se hace el desqueje (Dublin, 1964).

En condiciones hortícolas doce meses trascurren entre el corte del esqueje de la planta y su trasplante en el campo; el mismo tiempo se necesita para que este esqueje pueda producir unos cincuenta nuevos esquejes y, desde los 24 meses, la producción es de unos 1000 esquejes por año. El desqueje hortícola requiere la instalación de un vivero de retoños, con todos los requisitos de mantenimiento y de área de trabajo disponible para una producción masiva (Deuss y Descroix, 1982).

Además del desqueje, cabe mencionar algunas formas de injerto que sólo se habían utilizado para la reproducción y se destinaban a las colecciones. Sin embargo, se están efectuando experimentos en mayor escala del injerto de *C. arabica* sobre *C. canephora* (*robusta*) denominado *C.*

Digitized by Google

arabusta (hib.) en varios países de América Latina, para luchar contra los nematodos; las raíces de la primera especie son más sensibles a estos parásitos que las de la segunda.

Los dos procedimientos de multiplicación vegetativa, in vitro e in vivo, podrán complementarse a menudo cuando se extienda su uso en un futuro en los países en vías de desarrollo.

En condiciones in vitro. En la reproducción vegetativa, el empleo de técnicas in vitro, comparado con el de las técnicas hortícolas, presenta un coeficiente de multiplicación mucho más alto. Independientemente de los factores de estación y clima, estas técnicas in vitro pueden utilizarse durante todo el año; permiten además un crecimiento continuo y una ruptura de la latencia que causa una 'brotación' en cascada. Por otra parte, hay toda una gama de explantes (hojas, pedúnculos florales) que no son utilizables para el desqueje hortícola pero lo son en condiciones in vitro, y contribuyen a aumentar ese coeficiente de multiplicación. En el cafeto hay dos vías de multiplicación vegetativa in vitro: la embriogénesis somática y el microdesqueje.

Técnicas de embriogénesis somática

Los primeros casos conocidos de embriogénesis somática en el género *Coffea* fueron obtenidos por Staritsky (1970) con explantes de ramas ortótropas jóvenes de *Coffea canephora*. Sin embargo, la mayor parte de los trabajos se han realizado con *C. arabica*. Hermann et al. (1975) y luego Sondhal et al. (1977), obtuvieron embriones somáticos con fragmentos de hojas de *C. arabica*. Además, estos dos últimos investigadores descubrieron dos estructuras con diferente potencialidad embriogénica en este tipo de explante. Desde entonces se han desarrollado investigaciones sobre la embriogénesis somática en el género *Coffea* en diversos países (Lanaud, 1981; Pierson et al., 1983).

Las investigaciones realizadas en nuestro laboratorio, primero con *arabusta* y luego con *arabica*, dieron como resultado la implementación de técnicas de embriogénesis somática a partir de explantes de origen diverso, como fragmentos de tallos ortótropos, de ramas plagiótropas, de hojas, y de tegumentos de óvulos; esta metodología fue descrita en publicaciones anteriores (Dublin, 1980a; 1980b; 1981). Las hojas, que son abundantes y de fácil desinfección, proporcionan los mejores explantes para la embriogénesis somática en el cafeto.

Los explantes, luego de un lavado con agua corriente seguido de un paso rápido por alcohol de 70º, son desinfestados por inmersión en una solución

Digitized by Google

de hipoclorito de calcio (10 g/litro) durante 20 minutos para las hojas y 30 minutos para los fragmentos de tallo, suplementada con varias gotas de Tween-80. Después de tres enjuagues con agua estéril, se cortan los explantes en fragmentos de 1 cm de longitud, si son tallos, y de 1 cm^2 de área, si son hojas. Los fragmentos de tallo se colocan horizontalmente en el medio de cultivo, mientras que los fragmentos de hoja se extienden con la cara inferior en contacto con el medio.

El proceso de embriogénesis somática en el género *Coffea* se compone, generalmente, de dos etapas:

A) Etapa de inducción de callo, que se desarrolla en la oscuridad durante 4 a 6 semanas, en un medio que contiene los elementos minerales de Murashige et al. (1962), las vitaminas de Morel, cisteína (20-50 mg/litro), sacarosa (30 g/litro), 2,4-D (0.1-0.5 mg/litro), KIN (1-2 mg/litro), y agar (6-7 g/litro); el pH del medio se ajusta a 5.6 antes de pasarlo por el autoclave. El complejo vitamínico de Morel puede remplazarse por una simple mezcla de tiamina (4 mg/litro) y de inositol (100 mg/litro); asimismo, el 2,4-D puede sustituirse por ANA o AIB (0.5-1.0 mg/litro), aunque parece que los resultados son mejores con 2,4-D.

B) Etapa de diferenciación, que se desarrolla con luz difusa (fotoperíodo de 12 h), en un medio basal idéntico al de la etapa A excepto que el 2,4-D y la KIN se remplazan por BAP (1-3 mg/litro). La adición de extracto de malta (400-1000 mg/litro) y de adenina (40-100 mg/litro), en algunos casos, puede acrecentar la tasa de embriogénesis somática (Dublin, 1980a; 1980b; 1981).

La temperatura en las dos etapas es de 26-27 °C; sin embargo, parece que una disminución de la temperatura de 1 a 2 °C durante la etapa B es favorable para la embriogénesis. Numerosas variantes experimenta esta metodología general. Así, la embriogénesis somática puede obtenerse en el cafeto con luz continua, en oscuridad continua, o en un régimen de luz-oscuridad, en un medio sólido o líquido. La embriogénesis también puede ser inducida, y puede ocurrir en una sola etapa, en un medio único que contenga una citocinina (Dublin, 1981) o en una mezcla de citocinina y de auxina (Pierson et al., 1983). En un medio de diferenciación, generalmente, los embriones somáticos aparecen al final de los tres meses de iniciado el cultivo, en tejidos que envejecen. El embrión se desarrolla pasando por todas las etapas clásicas (globular, torpedo, cotiledones). Su color blanco nacarado contrasta fuertemente con el del explante de origen, que presenta un color marrón oscuro. Sin embargo, la embriogénesis

Digitized by Google

somática precoz en callos recién diferenciados fue observada por Pierson et al. (1983) en fragmentos de hoja de *C. canephora.*

El momento de aparición de los primeros embriones, las tasas de embriogénesis (porcentaje de explantes que producen embriones) y el número de embriones producidos por explante dependen de varios factores, entre ellos, las combinaciones de auxina/citocinina utilizadas en la etapa A, la duración de esta misma etapa, el origen del explante, y el estado fisiológico de la planta de la que se tomaron los explantes.

En *C. arabusta* (hib.) y en *C. arabica* se obtuvieron embriones somáticos partiendo de fragmentos de hojas, tanto en los callos de cicatrización como después de la formación de un callo primario no diferenciado, o indirectamente en callos secundarios de segunda generación y fuertemente embriogénicos. Estos tres niveles de la inducción de embriogénesis somática corresponden en el tiempo a períodos de 2 a 7 meses igualmente diferenciados (Dublin, 1981).

Cualquiera que sea el explante utilizado, los primeros embriones diferenciados dan origen a embriones secundarios que producen una tercera generación de embriones y así sucesivamente. Esta multiplicaciónproduce rápidamente un número impresionante de embriones, de tamaños diferentes, derivados de un solo explante.

El desfase en el desarrollo de los embriones somáticos diferenciados en medio sólido puede compararse con la diferenciación en medio líquido agitado. La autoreproducción de los embriones somáticos de los cafetos puede mantenerse y así se obtienen millares de cafetos partiendo de un simple fragmento de hoja de 1 cm^2. Esta es una ventaja considerable de la embriogénesis somática que abre perspectivas muy alentadoras para el mejoramiento genético de estas plantas.

Cualquiera que sea la naturaleza del explante de origen (tallo, hoja, óvulo), cualquiera sea el nivel de inducción de la embriogénesis somática (directa, en callo de primera generación o de segunda generación), el embrión somático tendrá, al final de su diferenciación, una zona radicular con hipocótilo, y una zona cauliforme con dos hojas cotiledonares. Según el equilibrio hormonal de los medios de diferenciación, estos embriones pueden presentar un desarrollo privilegiado de una u otra de estas dos zonas. Un medio rico en citocinina favorece el desarrollo caulinar y entonces la zona epicotiledonar se trasforma rápidamente en tallo. En cambio, un medio rico en auxina favorece el desarrollo de la región hipocotiledonar en detrimento de los cotiledones, que reducen su tamaño y, algunas veces, hasta desaparecen. Pueden presentarse bloqueos en el desarrollo como resultado de la competencia por nutrimentos.

Digitized by Google

Los embriones somáticos completamente diferenciados se trasplantan a un medio de cultivo donde desarrollan raíces y tallos, hasta que se forman plántulas de 4 a 5 pares de hojas aptas para las condiciones corrientes de cultivo (Dublin, 1980a; 1980b).

Los trasplantes individuales representan un trabajo delicado y tedioso y se prefiere 'sembrar' estos embriones en un medio fortalecido con BAP (1-5 mg/litro) que sólo favorecerá el desarrollo de su parte caulinar. Desarrollados así los tallos, se establecen, durante una segunda etapa, en un medio con agar o directamente in vivo. Esta técnica del 'cultivo en platos' presenta varias ventajas como el crecimiento más rápido de la plántula, y la eliminación por selección natural de embriones mal formados o insuficientemente desarrollados.

Las plántulas obtenidas por embriogénesis somática y suficientemente desarrolladas (3 ó 4 pares de hojas) pueden trasplantarse al vivero. Su sistema radicular se desarrolla, cada nuevo par de hojas es más grande que el anterior, la 'miniaturización' de la técnica in vitro, junto con el volumen gaseoso y la forma del recipiente desaparecen rápidamente, y se obtiene una plántula cuyo desarrollo es normal. Esta plántula es apta para su siembra en el campo a los 16 ó 18 meses después de la extracción del explante en *C. arabusta* (hib.), y a los 18 ó 24 meses en *arabica*; en esta última especie el crecimiento es más lento, particularmente en la variedad caturra.

El injerto directo, en el vivero, de embriones somáticos sobre el hipocótilo de plántulas originadas de semillas acelerará el desarrollo de las plántulas de cafeto obtenidas de sus embriones somáticos. Esta técnica presenta un interés limitado (Danchechin Dorval, 1983) debido a su escaso rendimiento (40-50 embriones injertados por hombre por día).

Las tasas de multiplicación varían según el nivel de inducción de la embriogénesis escogida. Las tasas más elevadas se obtienen en callos secundarios. Estos callos, altamente embriogénicos, permiten obtener varias centenas de embriones partiendo de un solo fragmento de hoja (Dublin, 1981).

Microesquejes

Las investigaciones sobre cultivos de esquejes de café in vitro son más recientes, y menos numerosas, que las realizadas sobre embriogénesis somática con los mismos cafetos: *C. arabica*, *C. arabusta* (hib.) y los tipos robusta (Custers, 1980; Dublin, 1980a; 1980b). Los primeros cultivos

Digitized by Google

fueron hechos por Custers (1980) partiendo de fragmentos de tallos ortótropos y plagiótropos de *C. arabica* provistos de yemas, y tomados de cafetos jóvenes de 1 a 2 años obtenidos de semillas. El establecimiento de estos microesquejes in vitro fue relativamente difícil. Por otra parte, el autor comprobó que los tallos obtenidos de yemas plagiótropas y desarrollados in vitro presentaban un porte vertical, comparable al de aquéllos obtenidos de yemas ortótropas,bajo las mismas condiciones.

Como resultado de las investigaciones hechas en nuestro laboratorio con *arabusta* y *arabica*, se desarrolló un procedimiento que comprende tres etapas: 1) la obtención in vitro de tallos ortótropos, 2) la multiplicación y establecimiento de los microesquejes, y 3) la transferencia de plántulas desde condiciones in vitro a condiciones in vivo.

En la primera etapa se obtiene un primer tallo ortótropo que posteriormente se cortará en microesquejes; cada microesqueje tendrá un par de hojas con sus láminas reducidas a la mitad y un fragmento de entrenudo. En la segunda, estos primeros microesquejes se cultivan en un medio caulógeno (BAP, 1-5 mg/litro, y sacarosa, 40 g/litro), que favorece exclusivamente el desarrollo de yemas latentes en los nuevos tallos ortótropos. De éstos se cortan nuevos microesquejes que también se colocan en el mismo medio, y así sucesivamente. Se continúa este proceso hasta que se obtenga un número suficiente de tallos de 4 a 5 pares de hojas, aptos para su establecimiento en la etapa final.

La primera etapa, donde se obtienen las ramas ortótropas en condiciones in vitro, es sumamente delicada. En efecto, durante el paso de las condiciones in vivo a las condiciones in vitro, se afrontan los problemas de contaminación (bacterias, hongos) y de oxidación fenólica, que son más acentuados en las regiones tropicales y aún más cuando los explantes se toman directamente del campo.

El explante, con sus yemas ortótropas, se toma de un tallo ortótropo joven, clorofílico. Comprende un nudo (sin hojas) prolongado por un fragmento de entrenudo de 2 a 3 cm de longitud. La desinfección de los tallos se hace mediante lavado con agua corriente seguido de un paso rápido (2 minutos) por alcohol a 70º y de la inmersión (30 minutos al vacío) en una solución de hipoclorito de calcio (10 g/litro). Después de tres enjuagues en agua estéril, los tallos se cortan en explantes que se colocan en un medio de organización de las yemas ortótropas en tallos ortótropos. Este medio contiene elementos minerales de MS o de Margara (1978), suplementados con vitaminas de Morel, cisteína (30 ng/litro), BAP (1-5 ng/litro), sacarosa (30-40 g/litro), y agar (6-7 g/litro); el pH se ajusta a 5.6 antes de la esterilización en autoclave.

Digitized by Google

Para reducir la oxidación fenólica, siempre frecuente en este material, se pueden remojar los explantes en una solución de ácido ascórbico (60-90 mg/litro) durante 10 a 15 minutos antes de colocarlos en cultivo; luego se colocan en la oscuridad durante los 8 primeros días a 25-27 °C antes de pasarlos a la luz. El subcultivo en medios frescos, cuando aparecen los primeros indicios de oxidación fenólica, reduce los daños que ocasiona este fenómeno.

Es frecuente observar, en los explantes extraídos directamente del campo y colocados en un medio de cultivo, proliferaciones bacterianas difíciles de combatir. Las yemas ortótropas están protegidas por estípulas que también mantienen las bacterias fuera del alcance de los productos desinfectantes. Sin embargo, si se toman tempranamente estas yemas que han proliferado, se pasan por una segunda desinfección leve (15 a 20 minutos en hipoclorito de calcio de 6 a 8 g/litro) y se colocan en un medio fresco, es posible que ellas se desarrollen como tallos. Este proceso es más largo que el de las yemas no escindidas del explante primario, y conduce además a tallos más débiles, a un desarrollo más lento, y a entrenudos más cortos.

Se puede cortar también el explante primario para obtener cada una de las series de yemas ortótropas opuestas; de esta manera se logra una mejor nutrición del explante (mayor superficie de contacto con el medio) y un desarrollo mucho más rápido de las yemas en tallos. Este desarrollo, después de la primera etapa, puede obtenerse en un medio sólido y también en un medio líquido. El explante se inserta entre los pliegues de un papel filtro doblado en forma de acordeón, y su base se humedece en el medio líquido que tiene la misma composición del medio de organización antes mencionado.

En general, las contaminaciones bacterianas son menos frecuentes en el medio líquido; en cambio la velocidad de crecimiento de los tallos es mayor en el medio semisólido. Por tanto, los medios líquidos se utilizarán preferiblemente como una etapa transitoria, después del desarrollo de las yemas ortótropas preexistentes en los tallos.

El primer tallo ortótropo desarrollado in vitro puede obtenerse partiendo de un ápice terminal de algunos milímetros de longitud o incluso de meristemas (Aponte de Londoño, 1981; Kartha et al., 1981; Zok, 1983). En ciertos casos, es posible obtener tallos ortótropos in vitro partiendo de yemas neoformadas. El explante, un fragmento de entrenudo de tallo ortótropo joven y clorofílico, se coloca en posición normal (la parte distal sumergida en el medio) en un medio basal de idéntica composición al del

Digitized by Google

medio de organización de las yemas en tallos, pero suplementado con adenina (50-100 mg/litro) y extracto de malta (500-1000 mg/litro).

Luego de tres semanas de cultivo, la parte apical del explante produce un callo de cicatrización que consta de algunas capas de células de origen cambial, las cuales se diferencian de los meristemas en que se desarrollan rápidamente en yemas y luego en tallos ortótropos con hojas (Dublin, 1980a; 1980b; Saleil, 1982).

Se puede obtener la neoformación de yemas (ortótropas o plagiótropas) a partir de fragmentos ortótropos o plagiótropos. Por otra parte, esta habilidad para la neoformación está vinculada con los tejidos jóvenes, y sólo los 2 ó 3 entrenudos más cercanos al meristema son capaces de producir yemas neoformadas.

La habilidad de un vegetal para producir yemas neoformadas es una característica relacionada con su genotipo; las condiciones in vitro sólo permiten la expresión de este carácter ya existente. En el género *Coffea*, la habilidad para la neoformación de yemas varía de una especie a otra; existe en *C. arabica*, en *C. canephora*, en el híbrido interespecífico de la primera generación de *C. arabusta* (hib.), e igualmente en los híbridos de esas dos especies.

Las tasas de neoformación dependen del explante (edad del explante y estado fisiológico de la planta donante) y de las condiciones físicas y químicas del cultivo. Ciertos compuestos como la sacarosa y las citocininas tienen un efecto positivo en la neoformación de yemas. Las tasas de neoformación (porcentaje de explantes con yemas neoformadas) y el número de yemas neoformadas por explante aumentan generalmente con la mayor concentración de citocininas y de sacarosa del medio de cultivo. En medios muy ricos en citocininas, el desarrollo de las yemas neoformadas puede ser bloqueado y no se forman tallos. Otros factores (frecuencia de los subcultivos, composición de los medios de cultivo, contenido de agar, temperatura, luz, volumen gaseoso, y forma de los recipientes de cultivo) modifican la velocidad de crecimiento de los tallos desarrollados in vitro. El efecto del recipiente se manifiesta en el crecimiento y en el grado de miniaturización.

Los tallos ortótropos, obtenidos de yemas preexistentes o neoformadas, se cortan en microesquejes que constan de un par de hojas y un entrenudo; éstos se subcultivan en el medio fresco caulógeno que sólo favorece su desarrollo como tallo. Si las condiciones del medio de cultivo, la temperatura, y la luz son adecuadas, cada microesqueje puede producir un tallo nuevo con cuatro a seis pares de hojas al final de las ocho semanas de

Digitized by Google

cultivo. Este tallo podrá cortarse en igual número de microesquejes, mientras que el microesqueje originario, colocado otra vez en medio fresco, producirá nuevos tallos que se cortarán, y así sucesivamente. Este proceso de corte y subcultivo periódico in vitro de los microesquejes crea verdaderas cepas de producción de microesquejes vigorosos con la misma apariencia de los que se producen in vivo en el vivero. Estas cepas pueden obtenerse mediante la utilización de microesquejes de dos nudos que se colocan horizontalmente en el medio de cultivo. Al final de dos meses, el conjunto de tallos (sin ápices) y de microesquejes de origen estarán nuevamente en posición horizontal, en un medio fresco; rápidamente se formará una cepa que producirá tallos tanto más vigorosos cuanto mayor sea el tamaño del recipiente.

Los cálculos muestran que, en las condiciones mencionadas, un solo microesqueje puede suministrar al final de un año unas 20,000 plántulas y 5^{12} plántulas después de dos años. A título de comparación, en condiciones hortícolas un esqueje sólo puede producir de 100 a 200 esquejes 24 meses después de su extracción y de su colocación en recipientes de desqueje. Los niveles de producción de los nuevos microesquejes dependen de la velocidad de crecimiento de los genotipos, muy elevada en los híbridos vigorosos del tipo *arabusta* y mucho menor para las variedades de *C. arabica* de crecimiento lento (tipo caturra).

Conviene anotar que en el café, incluso en presencia de contenidos elevados de citocinina (1-10 mg/litro de BAP), la dominancia apical no es afectada y la ruptura de la latencia de las yemas se produce en raras ocasiones.

Los esquejes in vitro que han alcanzado un desarrollo suficiente (de 5 a 6 pares de hojas) pueden establecerse muy fácilmente. La rizogénesis puede lograrse ya sea por subcultivo de los microesquejes en un medio sólido con una leve concentración de los elementos minerales (MS diluído a la mitad, suplementado con 2 mg/litro de AIB), o por inmersión de la base de los microesquejes durante 24 horas en una solución de AIB (50 mg/litro) y trasfiriendo luego éstos al medio anterior sin auxina.

En todos los casos las raíces aparecen 15 días después del tratamiento auxínico. La tasa de enraizamiento es de 90% a 100%. El trasplante al vivero, en condiciones ordinarias de cultivo, puede hacerse cuando las raíces son visibles (0.5-1.0 cm) o incluso inmediatamente después del remojo en la solución auxínica concentrada, a condición de que se mantengan los microesquejes en una atmósfera caliente saturada de humedad. En el vivero, el desarrollo de las raíces continúa y la miniaturización, caracterizada por hojas pequeñas y entrenudos cortos, desaparece con el

Digitized by Google

progresivo fortalecimiento del sistema radical. A los 8 ó 10 meses después del tratamiento auxínico, la planta exhibe un desarrollo vegetativo suficiente que permite colocarla en el campo.

Reversión de la plagiotropía in vitro

En condiciones in vitro, los tallos plagiótropos pueden obtenerse tanto partiendo de yemas plagiótropas preexistentes como de yemas plagiótropas neoformadas. Estos tallos plagiótropos se cortan en microesquejes que, colocados sobre un medio caulógeno, desarrollarán nuevos tallos plagiótropos, y así sucesivamente.

El tallo plagiótropo obtenido del microesqueje in vitro se caracteriza por un porte vertical pero con hojas cuyas láminas se enrollan. El tallo ortótropo obtenido bajo las mismas condiciones tiene un porte vertical con hojas cuyos limbos están unidos y bien extendidos en un plano horizontal. Los entrenudos de los tallos ortótropos son más largos que los de los tallos plagiótropos. En condiciones naturales, la torsión de las hojas de las ramas plagiótropas ocurre en los pecíolos, porque la exposición al sol de la cara superior de esas ramas es mayor.

Cuando se promueve un ritmo acelerado de renovación de las yemas in vitro, mediante corte y trasplante frecuentes en condiciones físicas y químicas óptimas del cultivo, se puede, partiendo de tallos plagiótropos, inducir la formación de tallos que presenten características ortótropas típicas, es decir, que sean verticales con entrenudos más largos, y cuyas hojas tengan los limbos unidos, no presenten torsión, y estén bien extendidas en un plano horizontal.

En un cafeto adulto, la casi totalidad de las ramificaciones son plagiótropas; la ramificación ortótropa se reduce a ramas basales que no se pueden utilizar directamente para el desqueje hortícola. Se sabe también que todo desqueje de tallos plagiótropos en condiciones hortícolas produce un cafeto de porte horizontal que no presenta interés práctico.

La posibilidad de obtener una reversión de la plagiotropía en ortotropía, mediante el empleo de métodos in vitro, puede ser de interés en la reproducción vegetativa de genotipos excepcionales, recientemente seleccionados, y representados aún por un número limitado de individuos. Este tipo de reversión, con cambios morfogenéticos, es sólo un ejemplo de los fenómenos de rejuvenecimiento favorecidos en condiciones in vitro, y mencionados a menudo en la literatura (Franclet, 1983).

Digitized by Google

Conclusiones

La multiplicación vegetativa, bajo todas su formas, desempeñará un papel primordial en el mejoramiento genético de los cafetos cultivados durante los próximos años. Será indispensable además para multiplicar en gran cantidad los genotipos excepcionales obtenidos ya sea de combinaciones genéticas dirigidas o de variaciones inducidas in vitro y cuya fijación por vía sexual sería demasiado larga y costosa.

En comparación con los procedimientos hortícolas de reproducción vegetativa, como el desqueje y el injerto, las técnicas in vitro presentan las siguientes ventajas: coeficiente de multiplicación mucho más elevado; material (microesquejes) de tamaño reducido que puede trasportarse a largas distancias a menor costo; material vegetal 'limpio' que no ofrece ningún riesgo de introducción de enfermedades; material, en fin, que facilita la constitución y la multiplicación de las colecciones de recursos genéticos de los cafetos, fuera de las zonas tradicionales de cultivo de estos vegetales.

Se cuenta actualmente con varios procedimientos de reproducción vegetativa in vitro de los cafetos, tanto de *C. arabica* y *C. canephora* como de los híbridos interespecíficos de estas dos especies. Los microesquejes ortótropos pueden obtenerse de diferentes fuentes: yemas ortótropas preexistentes (laterales o terminales), yemas ortótropas neoformadas, reversión de la plagiotropía, y cultivo de ápices.

Los cultivos de meristemas tradicionalmente utilizados en micropropagación poco se justifican en el cafeto. La escisión del meristema es una operación delicada, y las tasas de rebrote están muy comprometidas por las oxidaciones fenólicas. Además, a causa del predominio apical, esos meristemas no dan origen a varios tallos a la vez ('explosión' de tallos); su desarrollo in vitro es lento: se requieren varios meses para obtener un tallo de dimensiones suficientes que pueda cortarse en microesquejes. La ausencia de una enfermedad viral en los cafetos, hasta el momento, no hace necesario el cultivo de meristemas. La única ventaja de este tipo de explante podría ser el rejuvenecimiento más rápido del tallo regenerado y la adquisición de características vinculadas con este rejuvenecimiento como la facultad de enraizamiento.

En el microesqueje de cafeto, los mejores explantes son los fragmentos de los tallos ortótropos con yemas preexistentes. Las yemas neoformadas siempre se obtienen muy rápidamente (21 días) en callos de cicatrización delgados y en medios de cultivo que no contengan ninguna auxina. Estas yemas deberían producir individuos idénticos a la planta de origen.

Digitized by Google

La embriogénesis somática en los cafetos parece un fenómeno de fácil inducción. Los embriones somáticos de estas plantas pueden obtenerse de cualquier tejido somático (fragmentos de tallo ortótropo, de tallo plagiótropo y de hoja). La embriogénesis puede ser inducida en dos niveles diferentes: a) directamente sin formación de callo; b) sobre callo primario o sobre callo secundario con diferentes grados de diferenciación (3 a 7 meses). La embriogénesis puede obtenerse con combinaciones auxínicas muy diferentes y en condiciones físicas igualmente diferentes (oscuridad continua, luz continua, alternancia de luz y oscuridad). En comparación con el microdesqueje, la embriogénesis somática presenta un coeficiente de multiplicación más alto y puede proporcionar además diversos explantes; por esto es más consistente que el microdesqueje.

La embriogénesis somática diferida (en callo primario y secundario) pasa por una etapa de callo no diferenciado que puede producir variaciones genéticas, más o menos acentuadas según las condiciones del cultivo; sólo la experimentación en el campo permitirá determinar su importancia. No obstante, en el cafeto no puede considerarse este fenómeno con tanto rigor como en las especies florales o frutales de las regiones templadas; en el cafeto el producto final del consumo es una bebida que resulta de diversas trasformacioens tecnológicas y donde las cualidades de una planta individual desaparecen en beneficio de un valor promedio. Por tanto, es fundamental la diferencia entre el cafeto y otras especies cuyos productos (frutos y flores) son utilizados directamente por el consumidor; en ellas el mantenimiento de la uniformidad durante la reproducción vegetativa es indispensable.

En el cafeto —siempre y cuando las variaciones que resultarían del empleo de procedimientos in vitro no afecten sus características agronómicas primordiales (rendimiento medio por hectárea, resistencia a enfermedades) sino sus características secundarias (período de maduración, tamaño de los frutos) dentro de los límites previstos— se podrá tolerar una cierta variabilidad genética que incluso sería objeto de investigación en los próximos años. En efecto, la variabilidad genética va acompañada de flexibilidad, adaptabilidad a diferentes ecologías, y mayor resistencia a factores adversos.

En conclusión, la embriogénesis somática deberá utilizarse en la reproducción vegetativa de gran número de cafetos, como un experimento de campo que permitirá precisar la naturaleza y los límites de las variaciones inducidas tanto por los diferentes niveles de la embriogénesis somática (con o sin callo diferenciado) como por sus diferentes modalidades (con o

Digitized by Google

sin auxina). Siempre que se requiera estabilidad integral, es decir, conservación de los recursos genéticos, únicamente deberá utilizarse el microdesqueje hecho en explantes obtenidos de yemas preexistentes.

Si se emplean las técnicas in vitro en la caficultura durante los próximos decenios, es preciso hacer varias observaciones. Teniendo en cuenta los costos de producción, a veces relativamente altos, de las plantas in vitro, éstas sólo podrán producirse masivamente en la medida en que suministren una plusvalía real en relación con las plántulas obtenidas de semillas. Este sería el caso de la reproducción de los cafetos de *C. arabica* y de los híbridos de individuos de alto desempeño —o sea, con resistencia a la roya, producción abundante, y vigor híbrido— incapaces de multiplicarse por vía sexual.

En la mayor parte de los países latinoamericanos, donde la variedad caturra está ampliamente diseminada, las densidades de siembra son a menudo muy altas (5000 árboles/ha). Estas densidades difícilmente son compatibles con el empleo de plantas generadas in vitro a causa del precio de retorno de la hectárea sembrada, que sería entonces considerable. El desarrollo de la tecnología in vitro en la caficultura de esos países debería ir acompañado de un cambio en las prácticas de siembra, en el diseño de los cafetales, en el concepto en suma de la caficultura. La prioridad que se ha dado a las variedades genéticamente homogéneas posteriores al caturra, que requieren fertilizante, debería dar lugar poco a poco a cultivares heterogéneos y a los individuos heterocigóticos, resistentes a la roya y capaces de adaptarse a diferentes ecologías. La creación y la difusión masiva de la variedad colombiana 'multiraza' es el primer indicio de esa evolución de la caficultura en América Latina.

En Africa, en las plantaciones de *C. canephora* (var. *robusta* y *arabusta* hib.) la técnica in vitro debería servir como alternativa para instalar más rápidamente los viveros para los clones recién seleccionados.

Hevea

Antecedentes históricos

La especie *Hevea brasiliensis*, originaria de la cuenca amazónica, suministra un látex que es el producto básico para la fabricación del caucho. Brasil se mantuvo como el primer productor mundial de este producto hasta principios del siglo XX.

Digitized by Google

En 1876, después de una expedición a la Amazonia, Wickman recogió 70,000 semillas de hevea que se enviaron al Jardín Botánico de Kew; 2400 se enviaron al Jardín Botánico de Ceylán donde germinaron y produjeron 2000 plantas. Finalmente, 22 de las plántulas de Ceylán se enviaron al Jardín Botánico de Singapur; estos 22 árboles dieron origen a casi todas las plantaciones de hevea del Extremo Oriente. Hasta 1900 la producción de América representaba un 95% de la producción mundial; desde 1930 Asia suministra un 98% de esa producción. En 1982 la producción mundial de caucho era de 3,675,000 toneladas.

Las primeras plantaciones de hevea que se hicieron, partiendo de semillas, presentaban una gran heterogeneidad si se consideran las producciones individuales: 30% de los árboles suministraban el 70% de la producción. Se aplicaron entonces dos estrategias para reducir esta heterogeneidad, que es una consecuencia de la alogamia predominante en el hevea:

- Mejoramiento de los almácigos para seleccionar los progenitores productores de semilla (plantas de semilla).
- Mejoramiento mediante reproducción vegetativa de los individuos de alto desempeño (selección clonal).

Los primeros clones de hevea fueron seleccionados por Cramer en 1883 y se reprodujeron mediante una técnica de injerto elaborada por van Helten en 1918.

Técnicas de multiplicación vegetativa

Injerto. El injerto permite reducir la heterogeneidad y aumentar los niveles de producción; a pesar de todo, queda cierta heterogeneidad a causa de la heterocigosis de los progenitores que producen la semilla.

Varios autores (Nozeran et al., 1969; MacIndoe, 1958; Templeton et al., 1967) aclararon las diferencias entre las yemas de injerto respecto a su velocidad de proliferación, a su potencial morfológico, y a su producción en función de su posición. Así, las yemas de tipo juvenil regeneran por injerto árboles de tronco cónico, de morfología semejante a la de una plántula, mientras que las yemas de ramas producen árboles de tronco seudocilíndrico, análogos a las ramas gruesas con un abultamiento a nivel del injerto (pie de elefante).

El éxito de los injertos, en la práctica, depende de la selección del injerto y del portainjerto, y del grado de compatibilidad entre ambos. Los portainjertos vigorosos, de crecimiento rápido, favorecen el desarrollo posterior

Digitized by Google

del árbol injertado; por ello se requiere una doble selección, del injerto y del portainjerto.

Desqueje. Los primeros ensayos de desqueje hortícola del hevea se hicieron en Ceylán en 1880. Rápidamente se comprobó que las tasas de enraizamiento de los esquejes del hevea variaban en función de los pies de cría. Wiersum comprobó en 1955 que el porcentaje de enraizamiento de los esquejes disminuía con el envejecimiento del árbol madre y que los mejores resultados se obtenían de yemas tomadas en la base del tronco (material juvenil). Muzik et al. (1958) confirmaron que la aptitud para el enraizamiento estaba vinculada con la juventud del material vegetal; estos investigadores tuvieron éxito en el desqueje del material clonal después de injertarlo una sola vez en plantas jóvenes. Mediante la utilización de buenas condiciones físicas de desqueje y un material 'joven', Levandowsky (1959) obtuvo hasta un 70% de enraizamiento.

Cualquiera que fuese la juventud de los esquejes utilizados, varios autores (MacIndoe, 1958; Levandowsky, 1959) comprobaron que había variabilidad en la estructura de los sistemas radicales y, en particular, debilidad en la raíz principal. La ausencia de raíz pivotante se traduce, en la práctica, en una fuerte disminución de la resistencia al viento y a la sequía. Este punto fue confirmado por los resultados del RRIM (Rubber Research Institute of Malaysia) donde el 80% de heveas jóvenes, de cuatro años, obtenidos de desquejes fueron desarraigados por el viento.

El desqueje hortícola del hevea, aunque realizable, nunca se ha utilizado en la práctica debido a las deficiencias del sistema radical de las plantas obtenidas de esquejes.

Técnicas de multiplicación vegetativa in vitro

Los cultivos in vitro de tejidos del hevea se realizaron con los siguientes objetivos: la obtención de callo y de suspensiones celulares (Wilson et al., 1974); la obtención de plantas haploides (Satchuthananthavale et al., 1972; Paranjothy et al., 1975; Chen-Chen et al., 1978); el aislamiento de protoplastos y la hibridación somática (Cailloux et al., 1979); la reproducción vegetativa (Carron, 1982; Enjalric, 1983); y la inducción del rejuvenecimiento.

Las investigaciones más estables e importantes sobre la multiplicación vegetativa in vitro del hevea han sido realizadas desde 1979 por el equipo del IRCA (Institut de Recherches sur le Caoutchouc). Estas investigaciones se hicieron en dos direcciones:

Digitized by Google

- La micropropagación del esqueje in vitro.
- La micropropagación por embriogénesis somática.

Microdesqueje. Los primeros intentos de desqueje in vitro del hevea fueron realizados, principalmente, por Enjalric (1983) y por Lardet (1984); fueron cultivos in vitro de fragmentos de tallo con yemas preexistentes y con puntas de brotes. Las observaciones hechas en los injertos en hevea permitieron considerar algunos parámetros para la selección del explante. En efecto, la reacción de éste depende de la edad de la planta, de la época en que es extraído, de su ubicación en la planta madre, y de sus dimensiones. El microdesqueje del hevea comprende cuatro etapas:

- La fase de proliferación durante la cual se activan las yemas axilares.
- La fase de desarrollo de las yemas activadas como tallos.
- La fase de multiplicación.
- La fase de enraizamiento y de trasferencia a las condiciones corrientes del cultivo.

Los explantes están formados por fragmentos de tallo que comprenden 2 ó 3 entrenudos sin hojas. El hevea tiene un hábito de crecimiento rítmico determinado por vía endógena. Los estudios preliminares muestran que la reacción de las yemas axilares es independiente del estado de crecimiento; el explante puede tomarse en un período cualquiera del año. Después de desinfectar, enjuagar y fragmentar el explante, se somete éste a un tratamiento inductivo antes de colocarlo en el medio de cultivo. Se obtuvieron las mejores tasas de proliferación por inmersión de los explantes, durante dos horas, en una solución compuesta por elementos minerales de MS, y suplementada con BAP (44 μM) y con AIB (25 μM).

Después del pretratamiento, los explantes fueron cultivados en el medio mineral anterior desprovisto de reguladores del crecimiento, pero suplementado con carbón activado al 0.5% y con un contenido de sacarosa relativamente alto (60 g/litro).

La experiencia indica que un aumento en la duración del pretratamiento no afecta la proliferación, y que un contenido elevado de sacarosa en el medio la mejora. La adición de carbón activado al 0.5% reduce la tasa de proliferación pero favorece el alargamiento de los tallos. Una iluminación muy intensa disminuye el crecimiento de los tallos producidos por las yemas que han proliferado; de igual manera, la oscuridad, aunque no los afecta durante un período transitorio de diez días, se convierte también, más tarde, en un factor inhibidor.

Digitized by Google

La etapa de multiplicación comprende dos fases: la fragmentación en nuevos explantes del primer brote desarrollado in vitro, y los ciclos multiplicativos del explante primario. Después de un remojo durante 2 a 4 horas en una solución de inducción compuesta por BAP 44 μM + AIB 25 μM, los explantes primarios se trasplantan a un medio que contenga 60 g/litro de sacarosa. En estas condiciones se producen nuevos brotes, y el proceso puede repetirse 3 ó 4 veces.

Se ha comprobado un aumento de la miniaturización con cada nueva generación de brotes; en la tercera generación éstos están completamente bloqueados y son inutilizables. Por ello, un proceso totalmente libre de microdesqueje in vitro del hevea, es decir, sin el recurso periódico obligatorio a la planta donante, no ha podido establecerse hasta el momento.

La metodología empleada para el enraizamiento de los tallos es idéntica a la descrita para la callogénesis; comprende dos fases: una de inducción, donde el contenido de auxinas es elevado; y otra de desarrollo radical durante la cual el contenido de auxinas es reducido o nulo. En la fase de inducción, las bases de los brotes con hojas (separados del explante primario) se remojan en una solución de auxina; los mejores resultados se obtuvieron remojando durante tres días, en una solución que incluía 25 μM de AIB y 2.5 μM de ANA.

Los tallos así inducidos se trasplantan a un medio mineral sólido que contiene 40 g/litro de sacarosa. Aparentemente, una reducción del contenido de elementos minerales del medio no tiene efecto ni en la tasa de enraizamiento, ni en el desarrollo de las raíces. Además de los factores fisicoquímicos, el estado fisiológico del brote que enraiza desempeña un papel importante; así, los brotes en pleno crecimiento enraizan mejor que los que se hallan en crecimiento lento. Igualmente, hay una relación entre la facilidad de enraizamiento y la mayor o menor juventud de los tallos que están para enraizar.

El trasplante a tierra de los tallos de hevea enraizados en condiciones in vitro se hace fácilmente si se utiliza un sustrato con buen drenaje y con temperatura y luz adecuadas. Los mejores resultados se han obtenido con un sustrato compuesto de 1/3 de brezo, 1/3 de mantillo de corteza de pino, 1/3 de arena, humedad elevada, y una iluminación media. La experiencia señaló que las tasas de rebrote eran mejores cuando la trasferencia era temprana y que había una tendencia al enraizamiento de los tallos cuando se trataban con el sustrato del vivero.

El sistema radical de los esquejes de hevea está formado principalmente por raíces plagiótropas. Después de colocadas en la tierra, algunas de estas

Digitized by Google

raíces toman una orientación ortótropa y hacen el papel de seudopivote. La sensibilidad al viento y a la sequía son el mayor obstáculo para el empleo del hevea obtenido por desqueje; así se explica que, hasta el momento, las plantas de hevea obtenidas por desqueje hortícola in vitro no hayan salido del campo de la experimentación.

Toda esta información ha sido obtenida de plantas jóvenes de hevea. Los explantes obtenidos de material adulto con potencialidades agronómicas conocidas y, por consiguiente, los únicos dignos de interés, presentan inicialmente una débil reacción in vitro, y una tasa de proliferación de 30%, en lugar del 85% obtenido con material joven. Además, las yemas que han proliferado permanecen bloqueadas y no se desarrollan como tallos.

Mediante el injerto en cascada del material adulto, según la técnica de Franclet (1979), se obtiene rápidamente un nivel suficiente de rejuvenecimiento y una reacción adecuada a las condiciones in vitro. Desde la primera generación de injertos, la tasa de proliferación in vitro (30% para el material no injertado) se eleva a un 70%. La juventud del material parece tener repercusión directa sobre la producción (Chen-Chen et al., 1978). Varios procesos de rejuvenecimiento del material adulto, como el corte, el desqueje sucesivo, el injerto en cascada, y el cultivo in vitro (Libby, 1979) se experimentaron con éxito diverso.

La multiplicación vegetativa in vitro permite recuperar caracteres morfológicos y fisiológicos juveniles mediante la ruptura de las relaciones existentes entre el explante y el conjunto de la planta; la expresión de la potencialidad juvenil será tanto más acentuada cuanto menor sea el número de células diferenciadas que presente el explante de origen. El meristema, cultivado in vitro, puede revelar una autonomía potencial que hasta entonces había estado enmascarada por las condiciones de la planta entera.

El tamaño de los explantes parece también un factor esencial para su supervivencia, es decir, para la diferenciación celular, el desarrollo en brotes con hojas y el enraizamiento (Druart et al., 1982).

Los cultivos de ápices hechos por Lardet (1984) permitieron reducir las tasas de infección, generalmente altas en los fragmentos de tallo, pero sólo pudieron obtenerse callos y la formación de algunos esbozos foliares. En ningún caso fue posible que estos meristemas se desarrollaran como tallos.

Embriogénesis somática. Las investigaciones sobre la organogénesis en el hevea son más numerosas, y anteriores a las realizadas sobre el microdesqueje en esta especie. Los primeros intentos de cultivo de tejidos de

Digitized by Google

hevea fueron hechos en el IRCA y el RRIM, en 1953. Se colocaron en cultivo fragmentos de tallos que produjeron callo, pero en ningún caso se regeneraron plántulas. También Wilson et al. (1974) obtuvieron callos y suspensiones celulares partiendo de fragmentos de tallo.

En cada especie vegetal existe un órgano o fragmento de órgano que proporciona el explante óptimo para un proceso de cultivo in vitro (Murashige, 1974). Por otra parte, numerosos autores han puesto en relieve la capacidad de organogénesis que presentan todos los tejidos relacionados con la flor. En 1972, Satchuthananthavale et al. realizaron los primeros intentos de cultivo de anteras de hevea, con miras a obtener plántulas haploides. Se obtuvieron callos de estructura nodular. Tres años más tarde se obtenían los primeros embrioides mediante cultivo in vitro de anteras (Paranjothy et al., 1975). La frecuencia de inducción de estos embrioides fue baja y raramente se obtuvieron plántulas.

Los trabajos más notables fueron realizados desde 1973 por equipos de investigadores chinos del Baoting Institute of Tropical Crops y de la South China Academy of Tropical Crops, quienes obtuvieron embriones somáticos partiendo de los tejidos diploides de las paredes de las anteras y de las microsporas (Chen-Chen et al., 1978; Wang et al., 1980). Varias plántulas obtenidas de estos cultivos de anteras se sembraron en tierra.

Los objetivos de estas investigaciones fueron: primero, obtener descendencias híbridas homogéneas partiendo de progenitores homocigóticos resultantes de haploides duplicados; y segundo, recuperar la 'juvenilidad' de los tejidos por medio de la embriogénesis somática. Sin embargo, a pesar del avance en el conocimiento de las técnicas in vitro, las tasas de producción de plantas todavía permanecen muy bajas por las dificultades que presenta el ulterior desarrollo de los embrioides. Los trabajos de los investigadores chinos subrayaron el papel determinante del factor genotipo; en efecto, la mayoría de las regeneraciones se obtuvieron de un solo clon, el Haiken 2.

Las investigaciones realizadas por el IRCA sobre la inducción de callos y la regeneración en el hevea comenzaron en 1979. Los primeros estudios sobre inducción de callos se hicieron en fragmentos de tallos de heveas jóvenes obtenidos de semilla. Después de una desinfección clásica con hipoclorito de calcio al 10%, los explantes se cultivaron en cámaras controladas (fotoperíodo de 12 h, a 27 °C) en el medio de Murashige et al. (1962) suplementado con diversas combinaciones de citocininas y auxinas.

La capacidad de inducción de callos en fragmentos de tallo de una misma planta varía según la posición del explante a lo largo del tallo. Los

Digitized by Google

explantes más cercanos al punto de inserción de los cotiledones reaccionan mejor que los situados más arriba; la parte inferior del epicótilo aparece entonces como la zona más apta para la inducción de callos en las plántulas jóvenes del hevea.

El hevea tiene un crecimiento rítmico cuyas fases han sido descritas por diferentes autores (Lavarenne-Allary, 1965). El cambium, que se origina en los callos de los fragmentos de tallo, presenta también una actividad rítmica, en armonía con la del meristema apical. La inducción de callos es más rápida en los explantes cuyo cambium se encuentra en un período de reposo.

Diferentes medios se ensayaron en la inducción de callos; la combinación de nutrimentos que dio los mejores resultados fue la siguiente: el medio mineral de MS, las vitaminas de Morel, 2,4-D (4.5 μM), KIN (4.6 μM) y sacarosa (234 mM). El remplazo, en esta combinación, de la KIN por BAP, causa un cambio profundo en la estructura de los callos: BAP genera una estructura compacta con superficie granulosa, mientras que la KIN produce callos compactos con protuberancias y una fuerte tendencia a adquirir un color verde en presencia de la luz. El suministro simultáneo de 2,4-D tiene un efecto sinergístico sobre la proliferación celular; además, esta combinación permite mantener esa proliferación en un nivel alto. No obstante, todos los intentos de regeneración partiendo de los callos de fragmentos de tallo fracasaron.

Según Nozeran et al. (1969), el sistema radical inhibe la progresión de los fenómenos morfogenéticos que se manifiestan desde la germinación. Así, próximas a este sistema radical están las yemas que se desarrollan cuando se acerca un estado de actividad juvenil. La flor es también la sede de ese rejuvenecimiento fisiológico y morfológico cuya expresión más intensa se halla, sin embargo, en la semilla y en el embrión en desarrollo. Este rejuvenecimiento puede extenderse también al fruto, a ciertos componentes florales, e incluso a las estructuras vegetativas cercanas a la flor. En relación con este punto, muchos autores han hecho hincapié en la capacidad de la embriogenésis somática de los tejidos de anteras de hevea (Paranjothy et al., 1975; Wang et al., 1980). Se descubrieron asimismo tejidos con potencialidades embriogénicas en las semillas inmaduras del hevea (Carron, 1982).

En el momento de la fecundación, el óvulo del hevea mide aproximadamente 0.1 mm. Durante los primeros meses después de la fecundación, sólo los tejidos maternos (tegumento interno, tegumento externo y nucela) crecen mientras que el embrión, todavía constituído por algunas células,

Digitized by Google

permanece anclado cerca del micrópilo; más tarde reanudará su crecimiento y alcanzará su tamaño definitivo, tres meses después de la fecundación.

Se cultivaron fragmentos de tegumento, restos de nucela y semillas inmaduras en un medio mineral MS suplementado con tiamina (2 μM), inositol (550 μM), 2,4-D (4.5 μM), KIN (2.25 μM) y sacarosa (243 mM). De estos tejidos, la nucela y el tegumento interno produjeron callos; la mayor proliferación de callos se obtuvo en el cultivo de las semillas que habían alcanzado su tamaño definitivo pero que todavía eran inmaduras. Los callos producidos por la nucela son traslúcidos y esponjosos, mientras aquéllos obtenidos de los tegumentos internos son amarillentos y friables.

Después de varios subcultivos en medios de la misma composición del anterior—excepto que KIN y 2,4-D se sustituyen por ANA (9.9 μM) y BAP (9 μM)—aparecen nódulos meristemáticos y luego embrioides en los callos resultantes de los tegumentos internos. Aunque estos embrioides se cultivaron en una gama de medios diferentes, permanecieron bloqueados y no se desarrollaron como plántulas; en varios casos, desarrollaron un sistema radical pivotante fuerte, coronado sólo por hojas cotiledonares.

Las condiciones de inducción de la embriogénesis somática en el hevea están mal definidas; diferentes autores (Paranjothy et al., 1975; Chen-Chen et al., 1978) utilizan el medio MS suplementado con KIN o BAP (0.1 a 0.5 mg/litro), ANA (0.1 a 0.3 mg/litro), bromouracilo (0.3 mg/litro), agua de coco (5%-10%), y una fuerte concentración de sacarosa. Prescindiendo de las condiciones de cultivo y del tipo de explantes empleados (anteras, tegumentos ovulares) el desarrollo de los embrioides en plántulas organizadas continúa siendo muy difícil y aleatorio.

Conclusiones

El problema de la multiplicación vegetativa in vitro del hevea sigue prácticamente sin resolver. En el microdesqueje, la etapa de la obtención continua de tallos in vitro durante generaciones sucesivas que parten de una sola planta primaria, no ha podido lograrse. Los tallos de la segunda o tercera generación, obtenidos del ciclo continuo del explante primario o de los tallos de la primera generación, adquieren rápidamente una miniaturización excesiva que los vuelve inutilizables; a menudo, no van más allá de la etapa de yemas que proliferan pero que permanecen bloqueadas.

El enraizamiento no plantea mayores dificultades, aunque el sistema radical conserva una tendencia plagiótropa, aun en esquejes obtenidos de

Digitized by Google

heveas jóvenes o de clones rejuvenecidos por injerto. Un sistema radical pivotante, con anclaje potente y profundo, le confiere a la planta mayor resistencia contra el viento y la sequía, una característica indispensable para el árbol de hevea. Por embriogénesis somática se han obtenido en la China (Chen-Chen et al., 1978) pocos heveas con ese carácter; actualmente, a los cinco años de su obtención in vitro, presentan éstos un desarrollo morfogenético y un comportamiento en el campo idéntico al del hevea obtenido por reproducción sexual.

La inducción de la embriogénesis somática en el hevea y el desarrollo de embriones hasta plántulas organizadas es aún, desafortunadamente, un proceso muy aleatorio y fuertemente ligado al genotipo. Sin embargo, los explantes provenientes de los órganos florales, particularmente los de las anteras, son muy promisorios.

Cacao

Introducción y antecedentes históricos

Entre las diferentes especies del género *Theobroma*, sólo el cacao (*Theobroma cacao*) se cultiva comercialmente. Originario de los valles amazónicos, el cacao cultivado presenta una gran variabilidad en sus características: color, dimensiones y forma de las flores, de los frutos y de las semillas.

Según Cheesman (1944) el cacao cultivado se divide en dos poblaciones: criollo y forastero; el cacao forastero comprende, a su vez, dos grupos: alto amazónico y bajo amazónico. El tipo amelonado se cultiva en Africa occidental y en Brasil y pertenece al grupo forastero bajo amazónico. El grupo forastero alto amazónico tiene importancia primordial en el mejoramiento genético del cacao por su resistencia a varias enfermedades que atacan esta especie. El tipo trinitario es el resultado de cruces naturales entre forastero bajo amazónico y criollo, y constituye una tercera población muy diferente de las anteriores.

El cacao cultivado tiene numerosas características como el dimorfismo vegetativo, los tallos floridos, las flores con anteras escondidas que producen poco polen, la breve viabilidad de las flores (48 h), la autoincompatibilidad, y la escasa viabilidad de las semillas, caracteres que inciden directamente en el mejoramiento de esta especie.

El cacao produce muchas flores (de 20 a 100,000 por árbol). Por diferentes razones, algunas todavía desconocidas, menos del 5% de estas flores se

Digitized by Google

convierten en frutos. La producción individual del cacaotero varía considerablemente: bajo polinización natural, un árbol puede producir de 0 a 700 mazorcas al año.

El mejoramiento del cacao cultivado se basa esencialmente en el aprovechamiento de una heterosis de grupo que aparece en todos los cruzamientos, y que asocia un progenitor alto amazónico (UPA = 'upper amazonian') con un progenitor de uno cualquiera de los tipos de otros grupos (amelonado o trinitario), genéticamente más distantes (Braudeau, 1969). Los híbridos amazónicos obtenidos de estos cruces se caracterizan por su gran vigor, su precocidad para la producción, y una gran heterogeneidad de todos sus caracteres. Esta heterogeneidad es la consecuencia directa de la heterocigosis de los progenitores UPA, especialmente, que son autoincompatibles. El descubrimiento de los primeros haploides del cacao y la obtención de progenitores fértiles (Dublin, 1972; 1974) permitió crear híbridos amazónicos homogéneos y aprovechar mejor el fenómeno de la heterosis del cacao.

La heterogeneidad genética de las poblaciones de cacao suscitó rápidamente el interés por una selección basada en la reproducción asexual. La selección clonal del cacao se realizó por primera vez en Trinidad con el híbrido natural trinitario; luego se extendió a varios países productores de cacao. Se elaboraron diversas técnicas de desqueje bajo invernáculo partiendo de ramificaciones plagiótropas jóvenes (Pyke, 1933).

En un cacao adulto, recién seleccionado como cabeza de clon, la totalidad de sus ramificaciones con hojas son, en realidad, plagiótropas. El cacao obtenido de esquejes plagiótropos tiene porte extendido y requiere cortes frecuentes. Además, su sistema radical no es pivotante y por ello la planta es sensible a la sequía; ésta es la causa de las pérdidas que se registran en las siembras clonales iniciadas con esquejes plagiótropos. Los injertos sobre plantas nacidas de semilla, para compensar la ausencia de raíz pivotante, no han dado los resultados esperados. Por otra parte, la reproducción por desqueje plagiótropo de individuos de alto desempeño y de alta productividad y su selección, es una práctica poco confiable.

Estas dificultades llevaron progresivamente al abandono de la selección clonal en beneficio de una selección sexual basada en la heterosis, que resultó favorecida también por el descubrimiento de los haploides y el perfeccionamiento de las técnicas de su diploidización (Dublin, 1974).

La reproducción vegetativa in vitro del cacao tiene ciertas ventajas: un coeficiente elevado de multiplicación, mejor enraizamiento, y una posibilidad de reversión de la plagiotropía en ortotropía (Dublin, 1984); ellas

Digitized by Google

contribuirían a su mejoramiento genético mediante una nueva evaluación de la selección clonal. La micropropagación del cacao facilitará los intercambios de material vegetal, la creación de colecciones de plantas in vitro y la salvaguardia de los recursos genéticos de la especie, hoy amenazados por varias enfermedades criptogámicas (*Phytophthora*, moniliasis).

Los primeros intentos del cultivo de tejidos en cacao fueron hechos por Archibald (1954); se colocaron fragmentos de tallo en el medio de White (1939) desprovisto de todas las sustancias de crecimiento, y se obtuvieron callos que no regeneraron plantas. Las investigaciones más importantes sobre el cultivo in vitro de los tejidos de cacao fueron hechas durante estos últimos años por Hall et al. (1974), Orchard et al. (1979), Esan (1975), Pence et al. (1979; 1981), y Passey et al. (1983).

Hall et al. (1974) cultivaron fragmentos de tallos ortótropos de cacao joven de los tipos amelonado y alto amazónico en diferentes medios basales (White, 1939; Murashige et al., 1962) suplementados con sustancias de crecimiento simples o complejas (KIN, AC, extracto de frutos del cacao) y con diferentes combinaciones de temperatura y luz. Obtuvieron callos, pero todos los intentos de regeneración de las plantas fracasaron.

Orchard et al. (1979) realizaron cultivos de ápices en el medio de Linsmaier et al. (1965) suplementado con diversas sustancias de crecimiento (KIN, ZEA, AIB, AIA, AG). Los ápices extraídos de plantas jóvenes de cacao del grupo alto amazónico se cultivaron en un medio sólido y en un medio líquido agitado; se obtuvo una tumefacción de los meristemas cultivados, seguida en algunos casos de una elongación de las hojas.

K. Miller en Kew Gardens hizo cultivos de nudos con el propósito de obtener tallos in vitro y luego plantas enraizadas; ensayó durante cuatro años diferentes combinaciones de medios y de reguladores del crecimiento, pero sólo logró que algunas yemas proliferaran sin que se formaran tallos.

Passey et al. (1983) cultivaron ápices caulinares y nudos de 0.5-1 cm de longitud extraídos de brotes jóvenes en pleno crecimiento, y los colocaron en un medio de MS suplementado con diversas combinaciones de citocininas (BAP, ZIP, IPA) y de auxinas (AIB, ANA). Obtuvieron algunos brotes con hojas de escaso desarrollo; a pesar de las frecuentes trasferencias a un medio fresco, ninguno de estos brotes sobrevivió más de 12 meses. En un medio basal suplementado con giberelinas se logró la elongación de hojas y entrenudos, pero ni unas ni otras continuaron creciendo. Asimismo, se indujo el enraizamiento de explantes primarios y de brotes separados del explante de origen cultivándolos en un medio mineral de

Digitized by Google

concentración débil, suplementado con AIB (2.5 μM), ANA (2.5 μM), y fluoroglucenol (1 mM). Sin embargo, no pudo obtenerse ningún crecimiento regular de los brotes hasta un nivel satisfactorio de reproducción in vitro del cacao.

Maxwell et al. (1984) obtuvieron nudos de brotes jóvenes de plantas de cacao amelonado de 4 a 5 años de edad. Estos explantes se cultivaron en un medio basal simple, suplementado con reguladores del crecimiento, y produjeron una primera generación de brotes.

Esan (1975) y Pence et al. (1979) realizaron varios trabajos de aproximación, con una orientación diferente. Obtuvieron embriones somáticos de la gemación directa de los tejidos de embriones sexuales inmaduros del cacao, en un medio mineral de MS suplementado con ANA y compuestos complejos (AC, CH). Los embriones somáticos, incapaces de desarrollarse hasta plántulas, procedían ya sea directamente de los tejidos somáticos de embriones sexuales o de los callos originados en tejidos jóvenes de esos mismos embriones (Kononowicz et al., 1984).

Estos datos muestran claramente que dificultades inherentes a *T. cacao* han obstaculizado, hasta el momento, el establecimiento de procedimientos de reproducción vegetativa in vitro de esa especie.

Multiplicación in vitro: avances recientes

Los resultados obtenidos por el CIRAD (Dufour et al., 1985) brindan nuevas orientaciones a la investigación sobre la multiplicación vegetativa in vitro del cacao. Algunos de estos resultados se discutirán a continuación junto con la metodología empleada para llegar a ellos.

El cultivo in vitro de un órgano o de un fragmento de órgano, con miras a su reproducción vegetativa, se desarrolla siguiendo una estrategia clásica que comprende tres etapas esenciales:

- La instalación del cultivo en condiciones in vitro.
- La multiplicación activa de las estructuras capaces de desarrollarse como individuos idénticos a la planta donante.
- El paso de la heterotrofia a la autotrofia, y la adaptación de las plántulas obtenidas a las condiciones ordinarias de cultivo.

La primera etapa es a menudo delicada, particularmente en las plantas leñosas; en ella se presentan infecciones y oxidaciones fenólicas. Los explantes primarios utilizados durante nuestras investigaciones estaban

Digitized by Google

formados por fragmentos de tallos jóvenes ortótropos, de 4 a 5 cm de longitud, que contaban con 1 ó 2 nudos. Estos explantes se extrajeron de plantas jóvenes de cacao amelonado de 8 a 10 meses, se lavaron con agua corriente suplementada con un agente humectante, se remojaron rápidamente con alcohol de 70°, y se enjuagaron con agua destilada.

Se utilizaron dos productos desinfectantes, hipoclorito de calcio y peróxido de hidrógeno (10% en volumen), con un tiempo de remojo diferente (20 a 60 minutos), y en atmósfera normal o con vacío parcial. La mejor desinfección se obtuvo remojando los explantes durante 45 minutos al vacío, en una solución de hipoclorito de calcio al 10% seguida de tres enjuagues con agua destilada estéril. Las tasas de infección (25%) se mantuvieron elevadas a causa de infecciones bacterianas, posiblemente debidas a bacterias endógenas, que aparecieron en los subcultivos sucesivos.

El medio basal que se utilizó con más frecuencia estaba compuesto por elementos minerales del medio de MS suplementado con vitaminas de Morel. Se ensayaron varias sustancias de crecimiento (citocininas, auxinas, giberelinas) así como varias concentraciones de sacarosa, en medio sólido (Bacto Agar Difco a 7 g/litro) y en medio líquido no agitado. El pH de los medios se ajustó a 5.6 antes de colocarlos en el autoclave, donde estos medios se esterilizaron a 120 °C durante 20 minutos. Los cultivos se colocaron en cámara termoregulada (25 y 27 °C) con una iluminación reducida (80 $\mu E/m^2$ por sg) y un fotoperíodo de 12 horas. Cuando se estudió el efecto de los factores físicos se empleó un medio que contenía los elementos minerales de MS suplementados con 2.5 μM de BAP. Para discutir mejor los resultados obtenidos, se los ha agrupado en los siguientes temas.

Intercambio gaseoso. Los desarrollos espontáneos de callo en los explantes de cacao cultivados in vitro en medios no inductores de callos se deben, tal vez, a factores endógenos o a un equilibrio gaseoso inadecuado en los explantes. Para mejorar ese intercambio gaseoso, se ensayaron dos tipos de tapones (algodón y policarbonato) y tres recipientes de forma y volumen diferentes. Se registró (Figura 26.1) una mejoría en las tasas de proliferación celular con los tapones de algodón cuya capacidad de intercambio gaseoso es mejor que la de los capuchones de policarbonato; para un contenido de BAP de 2.5 µM en medio sólido, las tasas de proliferación fueron 9% con los capuchones de policarbonato y 39% con los tapones de algodón. También se ensayaron tres tipos de recipientes: tubos de ensayo de 70 cc y de 110 cc (con tapones de algodón) y potes de vidrio de 250 cc con cierre de aluminio; se encontró que el mayor volumen de los recipientes de cultivo tenía un efecto positivo en la tasa de proliferación.

Digitized by Google

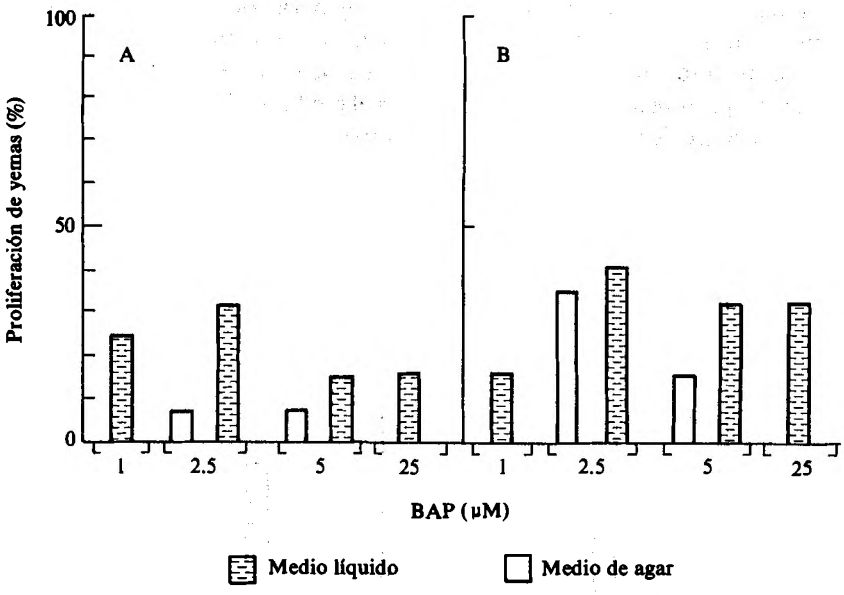


Figura 26.1. Influencia de la naturaleza física del medio y del tipo de tapón del recipiente en el porcentaje de proliferación de las yemas axilares del cacao (*T. cacao*). A) Capuchones de policarbonato; B) tapones de algodón.

Estructura de los medios. Se compararon dos medios de cultivo, uno sólido con 7 g/litro de Bacto Agar Difco, y otro líquido; en este último, las bases de los explantes se colocaron entre los pliegues de un papel filtro doblado en forma de acordeón y sumergido hasta la mitad en el medio líquido. Se comprobó (Figura 26.1) mayor proliferación y menor callogénesis en el medio líquido.

Carbón activado. Los efectos del carbón activado en el cultivo in vitro son muchos, y a veces opuestos; se ha utilizado, por ejemplo, para intensificar la rizogénesis o para obtener la elongación de los tallos. Los fragmentos de tallos de cacao cultivados en un medio suplementado con carbón activado (0.5 g/litro) presentan una reducción de la callogenésis junto con un mejoramiento de las tasas de proliferación; sin embargo, el medio recibió una dosis doble de BAP (5 μM en vez de 2.5 μM).

Macroelementos. El medio normal de MS, utilizado para el estudio de los factores físicos, puede considerarse como un medio rico con tendencia a la inducción de callos. Para aminorar esta formación de callo no controlada y favorecer el desarrollo de las yemas axilares hasta que se conviertan

Digitized by Google

en tallos capaces de producir una segunda generación de microesquejes (repitiendo el ciclo sucesivamente), se ensayaron varias concentraciones de macroelementos, de sacarosa, y de auxinas. Se comprobó (Figura 26.2) que los mejores resultados se obtenían con el medio MS diluído a la mitad y con un contenido de sacarosa de 20 g/litro.

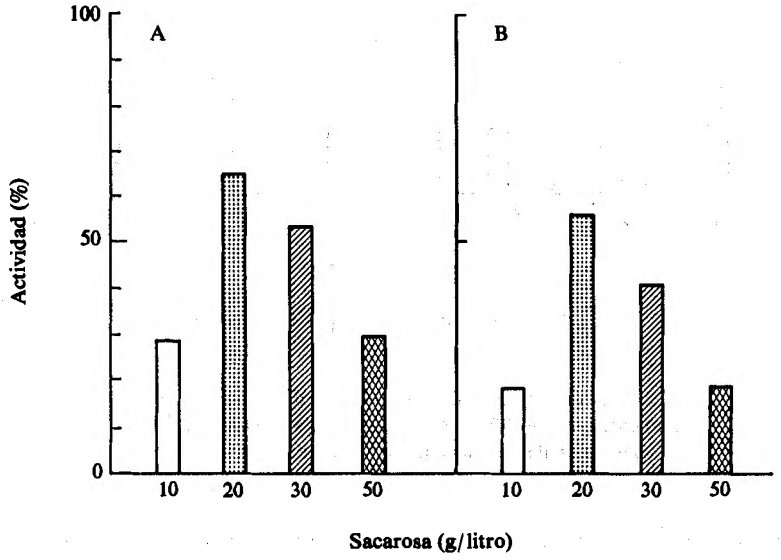


Figura 26.2. Influencia de la concentración de sacarosa en la expansión (A) y proliferación (B) de las yemas axilares del cacao.

Citocininas. Se emplearon tres citocininas: BAP, KIN y N-6- isopentenilaminopurina (IPA), en concentraciones variables. Se comprobó (Figura 26.3) que las mejores tasas de proliferación se obtuvieron con BAP en una concentración de 2.5 µM. Cualquiera sea la dosis de citocinina de los medios, siempre se presentan formaciones de callo que invaden los explantes e inhiben el crecimiento de las yemas que proliferan.

Auxinas. Se ensayó una sola auxina, AIB, conjuntamente con BAP. La adición de la auxina al medio de cultivo favorece la proliferación de las yemas axilares y el vigor de los tallos. La combinación AIB (24.6 µM) y BAP (2.22 µM) permite obtener brotes vigorosos con entrenudos largos.

Digitized by Google

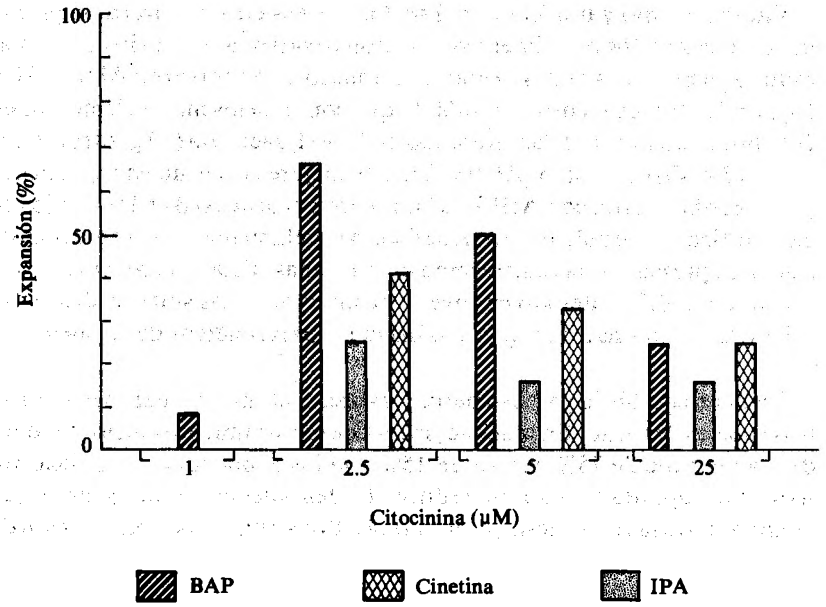


Figura 26.3. Tasa de expansión de las yemas del cacao respecto a la concentración de tres citocininas, después de dos meses de cultivo.

Giberelina. Se ensayó el AG en dos modalidades: adicionado al medio de cultivo —y esterilizando éste en autoclave— o colocado en condiciones estériles directamente sobre las yemas latentes. En cada caso se emplearon dos concentraciones, 10 μM y 1 μM. No se observó ninguna mejoría en las proliferaciones ni en el desarrollo de las yemas hasta tallos. En algunos casos se observó una elongación de las hojas de lámina estrecha o de los tallos, aunque éstos siempre permanecían endebles.

La experiencia enseña que tanto la velocidad como la tasa de proliferación dependen de la posición de los explantes en su tallo de origen. Las yemas cercanas a la extremidad del tallo se desarrollan más rápidamente que las que están más alejadas del meristema terminal. La reactivación de estas últimas es a veces difícil de lograr. Con el fin de apresurar la ruptura de la latencia de estas yemas, se pretrataron los explantes con diversas combinaciones de AIB y BAP, remojándolas durante lapsos variables. Los mejores resultados se obtuvieron con un remojo de dos horas en una solución que contenía 44 μM de BAP y 25 μM de AIB. Los explantes pretratados se cultivaron en un medio desprovisto de reguladores del crecimiento.

Digitized by Google

Enraizamiento y trasferencia al suelo. Los ensayos de enraizamiento se hicieron con tallos de primera generación desarrollados in vitro, ya separados o ya provistos de sus explantes primarios. Se ensayaron AIA y AIB a 10, 30 y 50 µM, en medio basal sólido que contenía los macroelementos de MS diluídos a la mitad, las vitaminas de Morel, sacarosa (30 g/litro), Agar Difco (7 g/litro), y cuyo pH era 5.6. Las mejores tasas de enraizamiento (50%) se obtuvieron con AIB 30 µM. La presencia de AIB en los medios de cultivo tiene un doble efecto benéfico: paralelamente a la formación de raíces, se presenta una reactivación de las yemas. Esta se debe, sin duda, a un aumento del contenido endógeno de las citocininas sintetizadas en las raíces, las cuales habrían migrado hacia las partes aéreas del esqueje.

Un buen equilibrio gaseoso parece favorecer el enraizamiento in vitro de los esquejes de cacao. En realidad, la tasa de enraizamiento con los tapones de algodón fue de 75% contra un 15% con los capuchones de policarbonato. Los tapones de algodón reducen los fenómenos de callogénesis que compiten con la rizogénesis (Figura 26.4). Por su parte, la comparación de

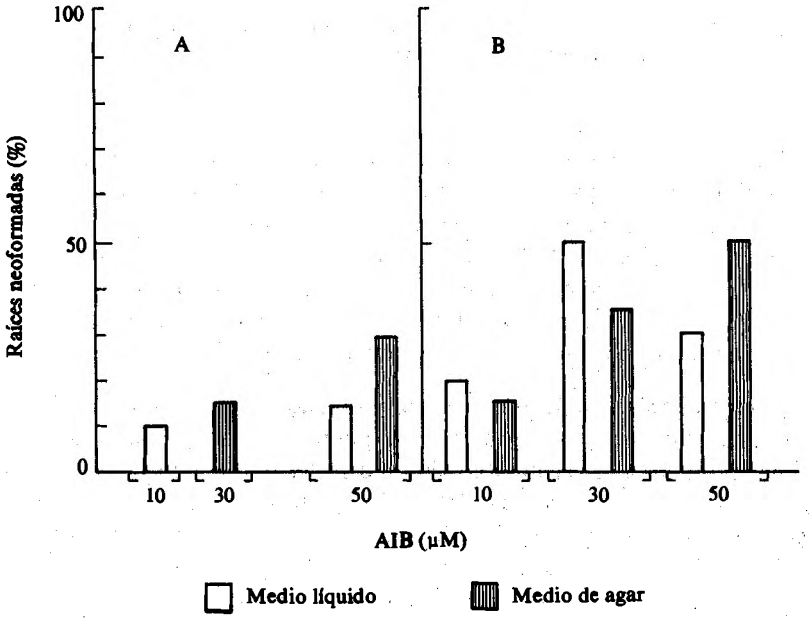


Figura 26.4. Porcentaje de raíces neoformadas de cacao en función de la naturaleza del medio de cultivo, de la concentración de AIB, y del tipo de tapón del recipiente. A) Capuchones de policarbonato; B) tapones de algodón.

Digitized by Google

dos medios de enraizamiento de la misma composición pero de estructura diferente, uno líquido y el otro solidificado con 6 g/litro de Bacto Agar Difco, indica que las tasas de enraizamiento son mejores en los medios sólidos.

Se ha recomendado con frecuencia reducir la concentración de los elementos minerales de los medios que se emplean en la inducción de la rizogenésis. Se ensayaron tres soluciones de macroelementos: MS, MS a la mitad, y MS a la cuarta parte, combinadas con tres dosis de AIB. Se comprobó que una dilución de la solución de macroelementos es favorable para el enraizamiento in vitro de los esquejes de cacao, con tal que esa dilución no sea muy importante.

Cumplido el proceso de enraizamiento, las necesidades de sacarosa varían en proporción notable según el tipo de planta. Una disminución del contenido de sacarosa de los medios de enraizamiento es a menudo favorable, aunque se han señalado ejemplos de un mejoramiento de la rizogénesis cuando aumenta la dosis de sacarosa. Se ensayaron pues cinco contenidos de sacarosa (5, 10, 30, 50, y 70 g/litro) combinados con tres dosis de AIB (10, 30, 50 µM), en medios líquidos y sólidos. Se comprobó que cualquiera sea la estructura de los medios, los mejores enraizamientos se obtienen con 30 g/litro de sacarosa.

Passey y Jones (1983) obtuvieron hasta un 80% de esquejes de cacao enraizados in vitro, en un medio que contenía AIB 2.5 µM, ANA 2.5 µM y fluoroglucinol 1 mM . La adición de una cantidad equivalente de fluoroglucinol a un medio que contenía AIB 5 µM no mejoró de manera significativa el enraizamiento in vitro de los esquejes de cacao. La combinación de ANA + AIB, más activa que el AIB solo, podría explicar los resultados obtenidos por Passey y Jones.

Los microesquejes enraizados que se obtuvieron durante las experiencias anteriores se trasplantaron al sustrato del vivero y se colocaron en un recinto controlado (27 °C) con una humedad de 100%. La tasa de recuperación fue del 100%. Estos esquejes produjeron hojas rápidamente y se trasformaron en plántulas de desarrollo normal. Esta última etapa de adaptación del cacao enraizado in vitro a las condiciones corrientes de cultivo no presenta ninguna dificultad.

Conclusiones

Los resultados anteriores muestran que es posible obtener, con fragmentos de tallos ortótropos de cacao cultivados in vitro, microesquejes

Digitized by Google

enraizados que después de trasferidos a las condiciones corrientes de cultivo producen plántulas bien desarrolladas, aptas para su siembra en el campo. No obstante, no se puede afirmar que la reproducción vegetativa in vitro del cacao cultivado esté ya lista; por el contrario, el problema de la micropropagación del cacao todavía está por resolverse casi en su totalidad. La etapa principal, la multiplicación in vitro de generaciones sucesivas de tallos partiendo de un mismo explante, no ha terminado aún.

Los resultados experimentales antes descritos han permitido precisar varios puntos y señalar nuevas orientaciones a la investigación que harán progresar la micropropagación del cacao.

- Los medios básicos destinados a fomentar tanto la proliferación celular como el enraizamiento in vitro deben ser poco ricos en elementos minerales (MS a la mitad). Las necesidades de sacarosa son diferentes según las etapas del microcultivo: 20 g/litro para fomentar el desarrollo del callo y 30 g/litro para inducir la rizogénesis.

- El porcentaje de yemas que han proliferado puede mejorarse de modo notable si se remojan los explantes en una solución de BAP, antes de colocarlos en cultivo.

- La tendencia a la callogénesis anárquica, típica de cualquier explante de cacao colocado in vitro, constituye un serio problema para la multiplicación vegetativa in vitro del cacao mediante el microdesqueje. Estas formaciones callosas pueden reducirse mejorando el equilibrio gaseoso, lo que se logra con una selección razonable de los recipientes de cultivo y de sus tapones. La prioridad que se da a la reducción de la callogénesis explica, en parte, ciertas orientaciones —disminución de los elementos minerales y de la sacarosa en el medio de cultivo— derivadas de los resultados de estas investigaciones.

Referencias

Amar, C., 1984. Contribution à l'étude du comportement de plantules *Coffea arabica* développés *in vitro* à l'égard de la rouille orangée *Hemileia vastatrix* Berk et Br. Tesis (D.e.A.) Université de Sciences et Techniques du Languedoc (USTL), Montpellier, Francia. 66 p.

Aponte de Londoño, M. E. 1981. Cultivo de meristemas de café. Cenicafé (Colombia) 32(3):106-111.

Archibald, J. F. 1954. Culture *in vitro* of cambial tissue of cocoa. Nature (Londres) 173:351-352.

Digitized by Google

Berthaud, J. 1977. Caractéristiques comparées des hybrides interspécifiques tétraploides et hexaploides *C. arabica* x *C. canephora*. Colloque de l'Association Scientifique International du Café (ASIC), 8ème, Abidjan. p. 197-202.

———. 1980. L'incompatibilité chez *Coffea canephora*. Méthode de test et déterminisme génétique. Colloque de l'Association Scientifique International du Café (ASIC), 9ème, Londres. p. 517-516.

Bettemcourt, A. J.; Lorpes, I. L. y Godinho, N. 1980. Genetic improvement of coffee: Transfer of factors for resistance to *Hemileia vastatrix* Berk and Br. into high yielding cultivars of *Coffea arabica* L. Colloque de l'Association Scientifique International du Café (ASIC), 9ème, Londres. p. 647-658.

Braudeau, J. 1969. Le cacaoyer. Maisonneuve et Larose, París. 304 p.

Cailloux, M. y Lleras, E. 1979. Fusão de protoplastos de *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. e *Hevea pauciflora* Muell. Arg.: Estabelecimento de técnica. Acta Amazonica 9(1):9-13.

Capot, J. 1972. L'amélioration du caféier en Côte d'Ivoire: les hybrides *Arabusta*. Café-Cacao-Thé 16(1):3-17.

Carron, M. P. 1982. L'embryogenése somatique de l'*Hevea brasiliensis* (Kunth) Muell. Arg.: Une technique de multiplication végétative au service de l'amélioration génétique. Tesis. Université de Sciences et Techniques du Languedoc (USTL), Montpellier, Francia. 167 p.

Carvalho, A. 1982. Melhoramento do cafeiro: Cruzamentos entre *C. arabica* et *C. canephora*. Colloque de l'Association Scientifique International du Café (ASIC), 10ème, Salvador, Bahía, Brasil. p. 363-368.

——— et al. 1982. Present status of research on *Icatu coffee*. Colloque de l'Association Scientifique International du Café (ASIC), 10ème, Salvador, Bahía, Brasil.

Cheesman, E. E. 1944. Notes on the nomenclature, classification and possible relationship of cacao populations. Trop. Agric. (Trinidad) 21:144-159.

Chen-Chen, H. et al. 1978. Obtaining pollen plants of *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. Proceedings of a symposium on plant tissue culture, Pekín. p. 11-12.

Cherrier, A. 1980. Conservation of the genetic resources of the genus *Coffea*. En: Colloque de l'Association Scientifique International du Café (ASIC), 9ème, Londres. p. 507-526.

———. 1982. L'amélioration génétique des cafés. La Recherche (París) 13(136): 1006-1016.

Digitized by Google

Couturon, E. y Berthaud, J. 1982. Présentation d'une méthode de récupération d'haploides spontanés et d'obtention de plantes diploides homozygotes chez les caféiers de l'espèce *C. canephora*. Colloque de l'Association Scientifique International du Café (ASIC), 10ème, Salvador, Bahía, Brasil.

Custers, J. B. M. 1980. Clonal propagation of *Coffea arabica* L. by nodal culture. Colloque de l'Association Scientifique International du Café (ASIC), 9ème, Londres. 589-591.

Danchechin Dorval, J. B. 1983. Microgreffage d'apex d'embryons somatiques chez le *C. coffea*. Tesis (D.e.A.). Université de Sciences et Techniques du Languedoc (USTL), Montpellier, Francia. 88 p.

Deuss, J. y Descroix, F. 1982. Le bouturage du caféier *Robusta* dans le programme de replantation de la caféiére du Togo. Colloque de l'Association Scientifique International du Café (ASIC), 10ème, Salvador, Bahía, Brasil. p. 483-494.

Druart, P.; Kevers, C.; Boxus, P. y Gaspart, T. 1982. *In vitro* promotion of root formation by apple shoots through darkness effect on endogenous phenols and peroxydases. Z. Pflanzenphysiol. 108(5):429-436.

Dublin, P. 1964. Le bouturage des caféiers Excelsa. Café-Cacao-Thé 8(1):3-15.

———. 1967. L'amélioration du caféier *Robusta*; Bilan de dix années de sélection clonale. Café-Cacao-Thé 11(2):101-137.

———. 1972. Polyembryony and haploidy in *Theobroma cacao*. Café-Cacao-Thé 16:295-311.

———. 1974. Haploids of *Theobroma cacao* L.: Diploidization and production of homozygous individuals. Café-Cacao-Thé 18:83-97.

———. 1980a. Induction de bourgeons néoformés et embryogénése somatique: Deux voies de multiplication végétative *in vitro* des caféiers cultivés. Café-Cacao-Thé 24(2):121-130.

———. 1980b. Multiplication végétative *in vitro* de l'*Arabusta*. Café-Cacao-Thé 24:(4):281-290.

———. 1981. Embryogénése somatique directe sur fragments de feuilles de caféier *Arabusta*. Café-Cacao-Thé 25(4):237-242.

———. 1982. Culture de tissus et amélioration genétique des caféiers cultivés. Colloque de l'Association Scientifique International du Café (ASIC), 10ème, Salvador, Bahía, Brasil. p. 433-459.

———. 1984. Cacao. En: P.V. Amirato et al. (eds). Handbook of plant cell culture. MacMillan Publishing, Londres. v. 3, p. 541-563.

——— y Parvais, N. 1975. Premiers cas d'haploidie découverts chez le *Coffea canephora*. C. R. Acad. Sci. Paris, série D (281):1157-1158.

Digitized by Google

Duçeau, P. 1980. Critères de sélection pour l'amélioration des hybrides *Arabusta* en Côte d'Ivoire. Colloque de l'Association Scientifique International du Café (ASIC), 9ème, Londres p. 606-609.

Dufour, M. y Dublin, P. 1985. Quelques données sur la multiplication végétative *in vitro* des cacaoyers cultivés (*T. cacao*). Café-Cacao-Thé.

Enjalric, F. 1983. Ètude sur le microbouturage *in vitro* de l'*Hevea brasiliensis* Muell. Arg. Tesis (D.e.A.). Université de Paris-Sud, Centre d'Orsay, Francia. 161 p.

Esan, E. B. 1975. Tissue culture studies on cacao (*Theobroma cacao* L.). En: Fifth International Conference on Cacao Research. Memorias. Ibadan, Nigeria. p. 116-124.

Franclet, A. 1979. Rajeunissement des arbres adultes en vue de leur propagation végétative. Ètudes et Recherches (AFOCEL) 12:3-18.

———. 1983. Rajeunissement: Culture *in vitro* et pratique sylvicole. Bull. Soc. Bot. no.130. Actual. Bot. 2:87-98.

Hall, T. R. H. y Collin, H. A. 1974. Initiation and growth of tissue cultures of *Theobroma cacao*. Ann. Bot. (39):555-570.

Hermann, E. B. y Haas, G. J. 1975. Clonal propagation of *C. arabica* L. from callus culture. HortScience 10:588-589.

Kartha, K. K.; Mroginski, L. A.; Pahl, K. y Leung, N. L. 1981. Germplasm preservation of coffee (*Coffee arabica* L.) by *in vitro* culture of shoot apical meristems. Plant Science Letters 22:301-307.

Kononowicz, H.; Kononowicz, A. K. y Janick, J. 1984. Asexual embryogenesis via callus of *Theobroma cacao*. Z. Pflanzenphysiol. 113:347-358.

Lanaud, C. 1981. Production de plantules de *C. canephora* par embryogénése somatique réalisée à partir de culture *in vitro* d'ovules. Café-Cacao-Thé 25(4):231-236.

Lardet, L. 1984. Problèmes et perspectives de la culture d'apex pour la micro-propagation de l'*Hevea brasiliensis* Muell. Arg. Tesis (D.e.A.). Université de Sciences et Techniques du Languedoc (USTL), Montpellier, Francia. 47 p.

Lavarenne-Allary, S. 1965. Recherches sur la croissance des bourgeons de chêne et de quelques autres espèces ligneuses. Ann. Sci. Forest. 22(1):1-203.

Leguizamón, J. 1983. Contribution a la connaissance de la résistance incomplete du caféier a *Hemileia vastatrix* Berk et Br. Tesis (D.e.A.). Université de Sciences et Techniques du Languedoc (USTL), Montpellier, Francia.

Digitized by Google

Le Pierres, D. y Anthony, F. 1980. Les hybrides interspécifiques hexaploides *C. canephora* x *C. canephora*: Influence du milieu et de la structure. Colloque de l'Association Scientifique International du Café (ASIC), 9ème, Londres. p. 568-570.

Levandowsky, D. W. 1959. Multiplication de l'*Hevea brasiliensis* par bouture. Rev. Gen. Caout. et Plast. 36(9):1132-1141.

Libby, W. J. 1979. Clonal selection of forest trees. California agriculture.

Linsmaier, E. M. y Skoog, F. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 18:100-127.

Louarn, J. 1982. Bilan des hybridations interspécifiques entre caféiers africains diploides en collection en Côte d'Ivoire. Colloque de l'Association Scientifique International du Café (ASIC), 10ème, Salvador, Bahía, Brasil. p. 375-383.

MacIndoe, K. G. 1958. The development of clonal rootstocks in *Hevea*. Q. Circ. Ceylan Rubber. Res. Inst. 34:39-57.

Margara, J. 1978. Mise au point d'une gamme de milieux minéraux pour les conditions de culture *in vitro*. C. R. Acad. Agric. 8:654-661.

Maxwell, P. y Blake, J. 1984. Plant tissue and its agricultural applications. Nottingham, Inglaterra. p. 79.

Mónaco, L. et al. 1977. Application of tissue culture in the improvement of coffee. En: Reinert, J. y Bajaj, Y. P. S. (eds.). Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture. Springer-Verlag, Nueva York. p. 109-126.

Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue culture. Ann. Rev. Plant Physiol. 25:135-166.

——— y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth on bioassays with tobacco cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.

Muzik, T. J. y Cruzado, H. J. 1958. Transmission of juvenile rooting ability from seedlings to adults of *Hevea brasiliensis*. Nature 181:1288.

Nozeran, R. y Du Plessix, J. 1969. Amélioration de productivité, multiplication végétative et morphogénése de l'*Hevea brasiliensis*: Trois aspects d'un même problème. Rev. Gen. Caout. et Plast. 46:861-867.

——— y Bancilhon, L. 1972. Les cultures *in vitro* en tant que techniques pour l'approche de problèmes posés par l'amélioration des plantes. Ann. Amélior. Plantes. 22(2):167-185.

Orchard, J. E.; Collin, H. y Hardwick, K. 1979. Culture of shoot apices of *Theobroma cacao*, Physiol. Plant. 47:207-210.

Digitized by Google

Paranjothy, K. y Ghandimathi, H. 1975. Tissue and organ culture of *Hevea*. Proceedings of the International Rubber Conference, Kuala Lumpur, Malaysia. p. 59-83.

Passey, A. J. y Jones, O. P. 1983. Shoot proliferation and rooting *in vitro* of *Theobroma cacao* L., type 'melonado'. J. Hortic. Sci. 58(4):589-592.

Pence, V. C.; Hasegawa, P. M. y Janick, J. 1979. Asexual embryogenesis in *Theobroma cacao* L. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 104:145-148.

Pierson, E. S. et al. 1983. *In vitro* development of embryoids from punched leaf disc of *Coffea canephora*. Protoplasma 115:208-216.

Pyke, E. E. 1933. The vegetative propagation of cacao; II: Softwood cuttings. En: Second annual report on cacao research, Trinidad, 1932. p. 3-9.

Saleil, V. 1982. Ètude en conditions *in vitro* de quelques facteurs d'induction de tiges néoformées et de leur enracinement chez les caféiers *Arabusta*. Tesis (D.e.A.). Université de Sciences et Techniques du Languedoc (USTL), Montpellier, Francia. 88 p.

Satchuthananthavale, R. y Irugalbangara, Z. E. 1972. Propagation of callus from *Hevea* anthers. Q. Jl. Rubber. Res. Inst. Ceylan 49:65-68.

Sondhal, M. R. y Sharp, W. R. 1977. High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica*. Z. Pflanzenphysiol. 8:395-408.

Staritsky, G. 1970. Embryoid formation in callus culture tissue of coffee. Acta. Bot. Neerl. (Leiden) 19:509-514.

Templeton, J. K. y Sheperd, R. 1967. Some technical aspects of green budding. Planter's bulletin (RRIM) 92:190-197.

Valleys, G. 1952. Le bouturage du caféier *Robusta*. Bulletin d'information de l'Institut National pour l'Ètude Agronomique au Congo (INEAC). p. 205-228.

Wang, Z. et al. 1980. Induction of rubber plantlets from anther of *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. *in vitro*. Chinese Journal of Tropical Crops 1(1):25-26.

White, P. 1939. Potentially unlimited growth of excised plant callus in an artificial nutrient. Am. J. Bot. 26:59-64.

Wilson, H. M. y Street, H. E. 1974. The growth, anatomy and morphogenetic potential of callus and cell suspension cultures of *Hevea brasiliensis*. Physiol. Plant. 36:399-402.

Zok, S. 1983. Multiplication végétative *in vitro* du caféier (*Coffea arabica*) par culture de méristemes et de sommets végétatifs. Tesis. Université de Sciences et Techniques du Languedoc (USTL), Montpellier, Francia.

Digitized by Google

Capítulo 27

Propagación in vitro del café

M. R. Sondahl*
T. Nakamura*
W. R. Sharp*

* DNA Plant Technology Corporation, Cinnaminson, Nueva Jersey, E. U.

Digitized by Google

Importancia Económica

El café es el producto agrícola más importante en el mercado internacional (US$9,000-12,000 millones anualmente). Su producción, restringida a los países tropicales, les aporta ingresos por exportaciones del grano que son su principal fuente de divisas y que les dan acceso a las tecnologías y a los servicios modernos. La producción mundial de café en el año 1981-82 fue de 96.4 millones de sacos de 60 kg. Algunos de los principales países productores de café en esa cosecha fueron: Brasil (34.2%), Colombia (14.5%), Indonesia (5.4%), Costa de Marfil (4.8%), México (3.7%), Guatemala (2.8%) y El Salvador (2.5%).

Existen dos especies de cafeto de importancia comercial: *Coffea arabica* L. y *Coffea canephora* Pierre (variedad Robusta). La bebida de calidad se obtiene de *C. arabica*, especie que se cultiva a mayor altura que otras. Esta especie representa el 70% del café comercial del mundo y un 99% de la producción cafetera de América Latina. *C. canephora* se cultiva generalmente en las áreas tropicales de menor elevación; el 80% de la producción africana es de este tipo. En escala más reducida se cultiva *C. liberica* en Liberia, Surinam y Malaysia; *C. racemosa* en Mozambique, y *C. dewevrei* en la Costa de Marfil y en Zaire. Estas especies producen granos de inferior calidad, aceptables solamente en el mercado local.

El costo de producción de un cafetal varía de país a país. En una finca cafetera típica del Brasil, con una producción media de 1500 kg/ha (25 sacos de 60 kg), los costos de fertilización y de control fitosanitario representan el 30% de los costos totales de producción. El mejoramiento de las plantas de café debería pues concentrarse tanto en estas dos áreas del costo de producción como en la calidad del producto final.

Embriogénesis Somática del Café: un Sistema Modelo

La obtención de 'embriones somáticos de alta frecuencia' de los tejidos adultos (hojas, p.ej.) de las plantas de café se ha convertido en un sistema modelo que resulta atractivo para otras especies arbóreas. Resultados similares se han obtenido con algunos árboles frutales utilizando el tejido nucelar como fuente del explante. Tanto en el café como en los árboles frutales, el grado de éxito de la embriogénesis somática varía según los genotipos cultivados. Una característica común de la embriogénesis somática de alta frecuencia (ESAF) es la presencia de un tejido embriogénico;

Digitized by Google

este tejido se diferencia a partir de células individuales, llamadas células embriogénicas madres.

Los tejidos embriogénicos pueden describirse como tejidos friables, que contienen células pequeñas y esféricas (15-20 µ de diámetro) con las siguientes características: citoplasma denso, nucléolo prominente, núcleo basófilo, y ciclo celular corto. Otra característica general de los sistemas de embriogénesis de alta frecuencia es la aproximación secuencial durante las fases iniciales del cultivo: a) alta relación auxina/citocinina durante el cultivo primario (medio de inducción), y b) baja relación auxina/citocinina o ausencia de reguladores del crecimiento durante el cultivo secundario (medio de acondicionamiento).

En el café se pueden reconocer las siguientes fases de la ESAF:

- Medio de inducción (división celular y redeterminación).
- Medio de acondicionamiento (diferenciación).
- Rescate del embrión (aislamiento).
- Germinación del embrión (crecimiento del brote y de la raíz).
- Fortalecimiento de la plántula.
- Trasferencia al suelo.

Se han identificado varios factores generales que controlan la ESAF:

a. Tejidos donantes

- Especies vegetales o variedades.
- Fuente del explante.
- Pretratamiento del explante.

b. Medio de cultivo

- Constituyentes orgánicos e inorgánicos.
- Reguladores del crecimiento (tipos y concentraciones).
- Osmolaridad total.

c. Condiciones de crecimiento

- Luz (calidad, intensidad, fotoperíodo).
- Temperatura (termoperíodo).
- Intercambio gaseoso.
- Régimen de subcultivo.
- Selección de tejidos durante los subcultivos.

Digitized by Google

El éxito de la ESAF en otras especies perennes puede mejorarse teniendo en cuenta estos parámetros. La literatura actual de la embriogénesis somática describe un medio que contiene una alta concentración de sales para el cultivo primario (75% en las dicotiledóneas y 82% en las monocotiledóneas). Durante la fase de inducción, la adición de 2,4-D y KIN (22%) o de 2,4-D solo (15%) ha prevalecido para las dicotiledóneas; en las monocotiledóneas, el 2,4-D, aplicado solo, se ha utilizado con éxito en un 68% de los medios de inducción.

La propagación vegetativa se ha logrado principalmente induciendo el desarrollo de meristemas preexistentes, ya sea apicales o axilares. Desde hace poco tiempo se han utilizado con más frecuencia los brotes adventicios (organogénesis) y los embriones somáticos de alta frecuencia como un medio de propagación vegetativa. Las plantas de café pueden propagarse exitosamente por medio de la embriogénesis somática (Figura 27.1, A-C) o mediante el desarrollo de las yemas axilares (Figura 27.1, D-F).

Cultivo de Tejidos del Café

Hojas

Las hojas maduras de ramas ortótropas o plagiótropas de plantas de invernadero se desinfectan superficialmente en una solución al 1.6% de hipoclorito de sodio (30% de un agente blanqueador comercial) durante 30 minutos, y luego se enjuagan tres veces en agua estéril doblemente destilada. Si las plantas de café crecen en el campo es más difícil lograr la desinfección de la superficie foliar. El siguiente procedimiento ha dado algún grado de éxito para el material procedente del campo: 2.6% de hipoclorito de sodio durante 30 minutos, enjuagar luego en agua estéril, incubar en cajas Petri selladas durante la noche, exponer nuevamente a 2.6% de hipoclorito de sodio durante 30 minutos, y enjuagar finalmente tres veces con agua estéril. Se ha encontrado que el etanol al 70% y las soluciones de $HgCl_2$ son tóxicas para las hojas del cafeto; en cambio, las soluciones de hipoclorito de sodio o de calcio son efectivas y no son tóxicas. Antes de sumergir las hojas en la solución desinfectante se aconseja lavarlas manualmente con una solución de detergente al 1% y enjuagarlas en agua destilada; si se dispone de agua ozonizada se recomienda una inmersión de 5 minutos. El uso de antibióticos y fungicidas sistémicos en un medio salino-azucarado durante el período de precultivo de tres días ha sido benéfico para reducir la contaminación por bacterias y hongos de los materiales de campo.

Digitized by Google

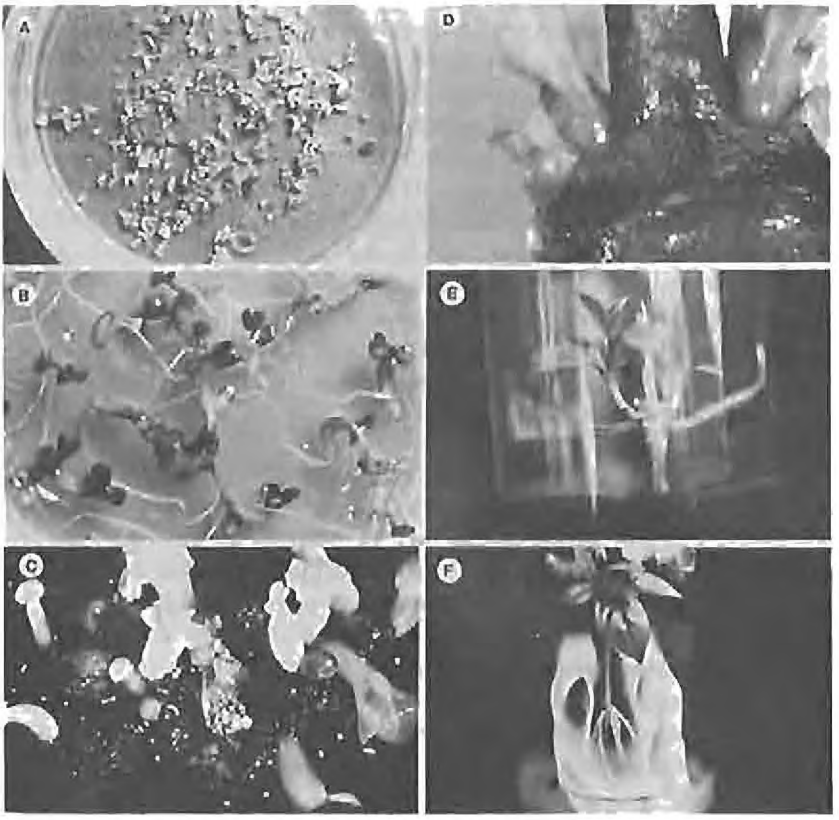


Figura 27.1. Propagación del café mediante embriogénesis somática (A-C) y por cultivo de yemas axilares (D-F). A) Embriogénesis somática de alta frecuencia (o embriogénesis indirecta) de un solo explante foliar del cafeto. Los embriones crecen en el medio basal líquido durante cinco semanas, aproximadamente, después de aislar el tejido embriogénico partiendo del cultivo secundario (1.0X). B) Germinación de embriones en un medio basal sólido (1.2X). C) Diferenciación de embriones somáticos de baja frecuencia (o embriogénesis directa) durante el cultivo secundario de un solo explante foliar del cafeto. Esta vía embriogénica suministra un número menor de embriones. Obsérvese que no todos los embriones presentan un desarrollo morfológico normal. D) Etapa temprana (cerca de tres semanas) en el desarrollo de las yemas axilares del cultivo de un nudo ortótropo. Obsérvese el desarrollo de tres yemas ortótropas de cada lado del nudo (1.0X). E) Crecimiento del brote de nudo ortótropo cultivado después de unas ocho semanas en cultivo primario (1.0X). F) Establecimiento del brote del cafeto derivado de la yema axilar mediante un cultivo sobre papel filtro (1.0X).

Digitized by Google

Se cortan explantes foliares de unos 7 mm^2 excluyendo la nervadura central, los márgenes, y las porciones apicales y basales de la lámina foliar. Al eliminar la nervadura central se excluyen los domacios y por ello disminuye el número de explantes foliares contaminados; los domacios son poros profundos (aproximadamente, de 0.18 mm de diámetro) localizados en el ángulo agudo formado por la nervadura central y las nervaduras secundarias, en el lado abaxial de la hoja del cafeto, en los cuales se acumulan microorganismos contaminantes. Las secciones foliares se cortan generalmente sobre papel filtro estéril (o en toalla de papel) que se cambia frecuentemente para evitar la contaminación cruzada. Todos los lados del explante foliar deben cortarse ya que la proliferación de callo sólo ocurre en los bordes cortados. Los estudios histológicos han demostrado que el tejido de callo se origina en las células del mesófilo del explante foliar (Sondahl et al., 1979b).

Los explantes foliares se colocan en cajas Petri de 20 x 100 mm que contienen el medio salino solidificado con agar (sales MS a la mitad de la concentración, con sacarosa 0.06 M). El período de precultivo de los explantes foliares puede cumplirse en la oscuridad o en la luz durante unas 72 horas; no se han hallado diferencias entre estas dos condiciones. El precultivo ha sido muy útil para seleccionar explantes viables y para eliminar las partes foliares contaminadas. Los explantes foliares se colocan de manera que su superficie abaxial —que se distingue claramente por una coloración verde pálida de tono mate, diferente del verde oscuro y brillante de la superficie adaxial— mire hacia arriba.

En frascos de una capacidad aproximada de 50 ml se vierten 10 ml de medio basal esterilizado en autoclave; este medio contiene sales inorgánicas MS (Murashige et al., 1962) y ha recibido además los siguientes compuestos: tiamina-HCl 30 µM, L-cisteína 210 µM, 550 µM myoinositol, sacarosa 117 mM, y 8 g/litro de Bacto Agar Difco. En el cultivo primario se utiliza un 'medio de inducción' que contiene una combinación de KIN (20 µM) y 2,4-D (5 µM), y se incuban los frascos en la oscuridad a 25 ± 1 °C durante 45-50 días. Este medio de inducción se considera ideal para la inducción de ESAF de *C. arabica* cv. Bourbon (Sondahl y Sharp, 1977).

Se establecen entonces —con un período de luz de 12 horas y a 24-28 °C— cultivos secundarios mediante el subcultivo de tejidos de 45-50 días de edad en un 'medio de acondicionamiento' que contenga los siguientes componentes: sales orgánicas MS a la mitad de la concentración (con excepción de KNO_3, cuya concentración se duplicó), sacarosa 58.4 mM, KIN 2.5 µM, y ANA 0.5 µM. Después de la trasferencia al medio de

Digitized by Google

acondicionamiento, el crecimiento de tipo parenquimatoso del callo se detuvo y los tejidos tomaron lentamente un color marrón. Se han caracterizado dos secuencias de diferenciación morfogenética en los cultivos secundarios de explantes foliares en el género *Coffea*: embrión somático de baja frecuencia (embriogénesis directa o ESBF) y embrión somático de alta frecuencia (embriogénesis indirecta o ESAF). Al adoptar el protocolo de cultivo estándar descrito para *C. arabica* cv. Bourbon, se observó el ESBF 13 a 15 semanas después del cultivo secundario y el ESAF 16 a 19 semanas después del mismo cultivo (Figura 27.1, A-C). El ESBF apareció 3 a 6 semanas antes del grupo visible de ESAF (Sondahl y Sharp, 1979; Sondahl et al., 1979a; 1979b).

La aparición de embriones somáticos aislados que se desarrollan hasta plántulas normales verdes (en números que varían entre 1 y 10 por cultivo) es típica del ESBF. En contraposición, en el ESAF se sigue una secuencia de desarrollo única: un tejido blanco friable que contiene estructuras globulares, definido como **tejido embriogénico**, se desarrolla de la masa de células marrones de callo, no proliferantes; las estructuras globulares parecen desarrollarse sincrónicamente durante un período de 4 a 6 semanas.

El tejido embriogénico origina embriones somáticos y finalmente plántulas, aunque esta última etapa de desarrollo carece del sincronismo de la primera. La cantidad producida de tejido embriogénico varía pero, en promedio, grupos de este tejido desarrollan de 100 a 200 embriones somáticos. Con el fin de acelerar este proceso y aumentar el porcentaje de plántulas totalmente desarrolladas, se aconseja aislar los tejidos embriogénicos y cultivarlos con luz a 26 °C en 5-10 ml de medio basal líquido desprovisto de reguladores del crecimiento, durante 4 a 6 semanas (etapa de aislamiento del embrión). Después de este período, los embriones somáticos en forma de torpedo y las plántulas jóvenes se colocan en cajas Petri, en un medio de cultivo sólido que contenga sacarosa 0.015 M a 0.03 M, en presencia de luz (etapa de germinación del embrión).

Las plántulas individuales que presenten una raíz primaria desarrollada se extraen del medio de cultivo, se lavan cuidadosamente, y se trasplantan inmediatamente a pequeñas macetas dentro de una cámara húmeda. Después de un período de fortalecimiento de un mes, pueden exponerse a la humedad atmosférica normal y trasferirse al invernadero. Otra manera de fortalecer las plántulas es colocarlas en un medio de cultivo sólido (aproximadamente 100 ml) sin sacarosa, en frascos Erlenmeyer de 250 ml sellados con tapones de algodón y papel. Estos frascos se exponen a la luz solar en una sección sombreada del invernadero; generalmente se los

Digitized by Google

protege con mallas de plástico que filtran de 60% a 70% de los rayos solares. Después de dos meses, aproximadamente, las plántulas exhiben un buen desarrollo foliar y radical y pueden ser trasplantadas a pequeñas macetas que contengan suelo.

Este procedimiento se ha aplicado a cuatro especies diferentes de café y a muchos cultivares de *C. arabica*. Se han obtenido recientemente embriones somáticos de los tejidos foliares de algunos mutantes morfológicos del café, con el fin de evaluar la estabilidad del genotipo obtenido mediante esta metodología; se presentó, en efecto, variabilidad en los siguientes genes mutantes únicos: *Erecta* (Er), *Purpurascens* (pr), *Angustifolia* (ag), *Nanna* (na), *San Ramón* (Sr) y *Volutifolia* (vf). Actualmente estos cultivos presentan tejidos embriogénicos y embriones somáticos en diferentes etapas de desarrollo. El análisis genético de las plantas derivadas del cultivo de explantes foliares de estos mutantes morfológicos indicará si es factible producir embriones somáticos para la propagación vegetativa de las plantas. Además, ese análisis permitirá quizás hacer una diferenciación adicional, basada en la estabilidad genética y en el origen citológico, entre la organogénesis y la embriogénesis.

En la literatura no se encuentran referencias sobre el cultivo de las hojas cotiledonares del café. Se ensayó esta fuente de explante con plántulas de tres meses de edad de *C. arabica* cv. Mundo Novo, utilizando la misma tecnología descrita para las hojas maduras, con excepción de una modificación hecha en la concentración de 2,4-D durante el cultivo primario. Después de dos meses de cultivo primario, los resultados indicaron que la contaminación entre los 550 segmentos cotiledonares cultivados fue escasa y que la concentración más baja de 2,4-D (1 µM) también indujo la diferenciación de las raíces adventicias. La concentración 5 µM del 2,4-D, la misma que se utiliza para hojas maduras, se adoptó para cultivos futuros de explantes foliares cotiledonares. Después de cuatro meses de cultivo secundario se consiguió la proliferación del tejido embrionario.

Meristema apical

El desarrollo de un protocolo para el cultivo de meristemas es un prerequisito para la futura criopreservación del germoplasma de café. Kartha et al. (1981) aislaron meristemas apicales de 0.3 mm partiendo de plántulas estériles de *C. arabica* cv. Caturra Rojo y cv. Catuai. El medio de cultivo —compuesto de sales MS y vitamina B5, y complementado con BAP o ZEA (5-10 µM) y ANA (1 µM)— indujo la producción de brotes múltiples, mientras que menores concentraciones de citocininas produjeron brotes simples. El establecimiento sólo ocurrió cuando el medio tenía,

Digitized by Google

con la mitad de la concentración, las sales MS desprovistas de sacarosa pero con AIB 1 µM.

En este laboratorio, los meristemas apicales de *C. arabica* cv. Mundo Novo, de tres meses de edad, se escindieron y sembraron en cajas Petri que contenían una solución salina con sacarosa y agar. Después de cinco días de precultivo, 192 meristemas fueron trasladados al cultivo primario luego de descartar los contaminados (32%) y los oxidados (4%). El medio de cultivo consistía en sales MS (solución 0.1X), piridoxina (15 µM), cisteína (500 µM), sacarosa (0.087 M), AIA (0.5 µM), y varias concentraciones de BAP. Después de 10 semanas de cultivo, los meristemas cultivados en el medio que contenía BAP 5 µM fueron los más vigorosos. El medio de enraizamiento adoptado estaba compuesto por sales MS a la mitad de la concentración (microelementos, 0.1X), sacarosa (0.058 M), vitaminas, AIB (5-10 µM) y ANA (5-10 µM).

En todos los casos sólo se obtuvieron raíces sencillas. Con el fin de lograr la formación de raíces secundarias y pelos radicales, se subcultivaron las plántulas en una mezcla 2:3 de arena:sustrato estéril de vermiculita. Los meristemas apicales de *C. arabica* cv. Catuai se cultivaron con el mismo protocolo descrito para cv. Mundo Novo y se obtuvieron resultados similares.

Yemas axilares

Las plantas de café tienen, en cada nudo del tallo, múltiples yemas ortótropas inactivadas y dos yemas plagiótropas. Las yemas plagiótropas se diferencian sólo después del décimo o undécimo nudo de una plántula en desarrollo, mientras que las yemas ortótropas están presentes en el primer nudo (nudo cotiledonar). La escisión del meristema apical resulta en el desarrollo de dos brotes ortótropos del nudo apical, uno en cada axila foliar. En cada axila foliar de las ramas plagiótropas hay cuatro yemas inactivadas colocadas en serie; estas yemas se diferenciarán como capullos florales bajo condiciones ambientales adecuadas. Algunas veces, las yemas más altas de la serie, a un solo lado o a ambos lados de un nudo, se desarrollarán como una yema vegetativa y no como una yema floral y darán origen a una rama plagiótropa secundaria.

Se ha explorado el uso de estas yemas inactivadas como un medio de propagación vegetativa de las plantas de café. Los explantes nodales de plantas de *C. arabica* cultivadas asépticamente se han cultivado en el medio MS suplementado con BAP (44 µM) y AIA (0.6 µM), bajo un fotoperíodo de 16 horas (2000 lux) a 25 ± 0.5 °C (Custer et al., 1980). Se

Digitized by Google

desarrollan 2.2 brotes por nudo, en promedio, después de 2 a 5 semanas de cultivo. El uso del ANA (1.1 µM) en completa oscuridad promueve un buen establecimiento de estos brotes jóvenes de café. Se recomienda emplear plantas in vitro de un mínimo de tres meses de edad para escindir de ellas las secciones nodales, y conservar sus hojas durante el cultivo. Dublin (1980) ha utilizado técnicas similares con plantas de *Arabusta*; los brotes se desarrollaron en el medio suplementado con extracto de malta (400 mg/litro) y BAP (4.4 µM).

Yemas ortótropas

Para los cultivos nodales de ramas ortótropas de cafeto, las plantas donantes se obtuvieron del invernadero (alrededor de 10 meses de edad), del vivero (de 1 a 2 años) o de parcelas de campo (de 15 a 20 años). Los brotes ortótropos verdes, con 4 a 6 nudos, fueron escindidos de las plantas. Después de lavarlos con detergente al 1% y con agua estéril, los tejidos se desinfectaron superficialmente con hipoclorito de sodio al 2.6% durante 30 minutos bajo agitación continua (150 rpm). Los brotes escindidos de las plantas del vivero o de las que crecían en el campo se incubaron en una cámara húmeda durante la noche y se sometieron a una segunda desinfección, como se describió anteriormente. En todos los brotes ortótropos se eliminaron los meristemas apicales. Al nudo más próximo al meristema apical se asignó el número 1. Cuando fue posible, se cultivaron los nudos sin escindir el par foliar insertado, que se recortó a la mitad o a una tercera parte de su tamaño original.

El medio primario era el medio B5 modificado que contenía pirodixina (15 µM), ácido nicotínico (15 µM), tiamina (30 µM), inositol (550 µM), cisteína (500 µM), sacarosa (87 mM), BAP (25-50 µM), AIA (10 µM), carbón activado (2.5 g/litro), PVP-40 (1 g/litro), y agar (7 g/litro). Se utilizaron botellas con tapa de rosca de 150 ml de capacidad, aunque se llenaron sólo con 25 ml del medio. En las botellas se colocaron nudos individuales; y luego fueron selladas con una película de PVC de 16.5 mm. Esta película presentaba las siguientes características de permeabilidad: al CO_2, 10 cm^3/cm^2 en 24 h; al O_2, 2 cm^3/cm^2 en 24 h; al N_2, 0.4 cm^3/cm^2 en 24 h; y al vapor de agua, 10 mg/cm^2 en 24 h.

Los cultivos nodales se mantuvieron en una cámara de crecimiento bajo una iluminación de 500 lux y con un fotoperíodo de 14 horas. La contaminación fue muy alta durante el cultivo primario. Los nudos más altos de las planticas presentaron un 60% de contaminación, que alcanzó en los nudos inferiores (números 4 a 6) niveles de 90 a 100%. Los datos, promedios de

Digitized by Google

824 explantes nodales de cuatro cultivares diferentes de plantas de café que crecían en el campo, presentaron frecuencias de 43% de contaminación y 42% de oxidación.

El desarrollo de las yemas ortótropas inactivas de cultivos nodales se hace visible durante la tercera semana de cultivo (Figura 27.1, D). El número de yemas desarrolladas por nudo varía de 1 a 6, y está parcialmente controlado por el nivel de citocinina. Niveles más altos de citocinina inducen el desarrollo de un mayor número de yemas, pero pueden ocasionar efectos adversos en el crecimiento posterior de los brotes derivados de ellas y pueden disminuir las frecuencias de establecimiento. En relación con la fuente de citocinina, el BAP ha demostrado ser más eficiente que KIN tanto a 25 µM (2.1 contra 1.2 yemas por nudo desarrollado) como a 50 µM (2.3 contra 1.4 yemas por nudo).

Se ensayó el efecto del AG en la elongación de los entrenudos del brote. No se obtuvieron resultados satisfactorios cuando se adicionó AG, esterilizado en autoclave o mediante filtros de membrana, a medios sólidos; en los pocos tratamientos efectivos se aplicaron 25-50 ppm de AG directamente a los brotes en desarrollo, en el momento de la escisión anterior a su establecimiento.

A lo largo de los brotes ya desarrollados aparecían tres nudos (Figura 27.1, E), aproximadamente a los 60 días de cultivo primario, que podían escindirse, separarse y establecerse. Las mejores frecuencias de establecimiento (60%) se han registrado con los brotes tratados con AIB (10 µM). Un medio de doble capa puede utilizarse para el establecimiento: el medio basal suplementado con AIB (10 µM) se extiende en la capa superior y el medio básico con carbón activado (2.5 g/litro) en la inferior. Otra técnica de establecimiento consiste en tratar los brotes no desarrollados con una solución de auxina líquida durante 10 días y luego trasferirlos a un medio basal o a un puente de papel (Figura 27.1, F). Finalmente, los brotes tratados con una preparación de talco de la auxina también han presentado altas frecuencias de establecimiento (60%) en el medio basal sólido.

Después de la escisión de los primeros brotes desarrollados, los explantes nodales se trasfieren a un medio primario fresco con el fin de recuperar el resto de las yemas ortótropas inactivas. Un explante nodal puede sobrevivir de 2 a 3 subcultivos y permite por ello recuperar la mayor parte de las yemas inactivas; en varios casos, 9 ó 10 de las yemas en desarrollo se han recuperado después de la tercera trasferencia bimensual, es decir, a los 6 meses de cultivo continuo. Las yemas desarrolladas de los explantes nodales originales se denominan yemas o brotes primarios; en cambio, las

Digitized by Google

que se han desarrollado de los nudos de los brotes primarios se denominan yemas o brotes secundarios.

En un experimento con un cultivo nodal de plantas de café (*C. arabica* cv. Mundo Novo) de un año de edad, se registraron las frecuencias de desarrollo, por nudo, de las yemas primarias y secundarias luego de seis meses de cultivo continuo con trasferencias bimensuales. Una frecuencia de 1.33 yemas por nudo desarrollado se observó después de los primeros 60 días de cultivo; al final del segundo período de cultivo (120 días) la frecuencia acumulada fue de 4.5 yemas/nudo; y al final del tercer período de cultivo (180 días) esa frecuencia fue de 7.5 yemas por nudo. Estos datos muestran el potencial de las yemas ortótropas inactivas para la propagación vegetativa de plantas superiores de café mediante la técnica del cultivo nodal (Sondahl y Nakamura, 1980; Nakamura y Sondahl, 1981). Al término de los 120 días se observó una recuperación del 45% de todas las yemas inactivas. Si se consideran ahora los datos experimentales, se puede hacer una estimación teórica de la tasa de multiplicación, de la siguiente manera:

- Primer período de crecimiento (6 meses) = 26 brotes de 3 nudos.
- Segundo período de crecimiento (3 meses) = 104 brotes de 3 nudos.
- Tercer período de crecimiento (3 meses) = 415 brotes de 3 nudos. Los nudos procedían de cultivos nodales de una rama ortótropa que contenía 6 nudos.

Este protocolo permite pues la recuperación de 415 brotes de una rama de 6 nudos después de 12 meses de cultivo continuo. Puesto que una planta de café tiene varias ramas ortótropas que pueden utilizarse para este fin, en el lapso de un año se obtiene un número mayor de plántulas mediante esta técnica. En conclusión, el número final de brotes propagados variará según el número de ramas ortótropas utilizadas de cada planta donante o según las pérdidas debidas tanto a la contaminación y oxidación de los brotes como a la eficiencia del establecimiento de los cultivos.

Aspectos Teóricos de la Embriogénesis Somática

Hipótesis de trabajo

Se ha asociado frecuentemente la embriogénesis somática in vitro con la presencia de un tejido cuya estructura organizada contiene pequeñas células periféricas (10-20 μ de diámetro) que se dividen activamente (ciclo

Digitized by Google

celular corto). Estas células tienen núcleos basófilos y nucléolos prominentes, típicos de una intensa actividad de ARN. Este tejido se expande a causa de sucesivas divisiones celulares pero más tarde, en el desarrollo, las células hijas se cimentan unas con otras y adoptan la polaridad en el curso de su diferenciación. Las estructuras globulares se vuelven visibles y anuncian las formas finales del embrión.

El tejido se reconoce en todos los casos de ESAF y se denomina tejido embriogénico (TE). La intensidad de la fase inicial de la actividad mitótica antes de la formación de las estructuras globulares, al igual que el lapso trascurrido hasta que aparece el TE, pueden variar entre las especies y entre las fuentes del explante. En cultivos foliares del género *Coffea*, el TE es muy distinto y ha sido totalmente caracterizado. Es importante subrayar que el TE debería rastrearse hasta las células embriogénicas maternas (CEM), es decir, aquéllas que se hallan en una etapa regulatoria particular del ciclo celular y que toman la vía embriogénica activadas por condiciones específicas del cultivo.

Se pueden distinguir dos patrones generales de desarrollo de la embriogénesis in vitro:

1. **Embriogénesis directa**: los embriones se originan directamente de los tejidos sin que haya proliferación de callo, como ocurre con las células epidérmicas del hipocótilo en la zanahoria silvestre y en *Ranunculus sceleratus* (Kato y Takeuchi, 1966; Konar y Nataraja, 1965).

2. **Embriogénesis indirecta**: la proliferación de callo y el TE están asociados con el desarrollo del embrión como ocurre con el floema secundario de la zanahoria doméstica, con el tejido foliar del café, con el polen del arroz y de algunas otras gramíneas, y con otros tejidos.

La embriogénesis directa procede de células proembriogénicas determinadas (CPD), mientras que la embriogénesis indirecta requiere de la redeterminación de células diferenciadas, de la proliferación de callo, y de la inducción de células embriogénicas determinadas (ICED) (Figura 27.2).

Aparentemente, las CPD requieren ya sea de la síntesis de una sustancia inductora o de la eliminación de una sustancia inhibidora para reanudar su actividad mitótica y su desarrollo embriogénico. En cambio, las células sometidas a una diferenciación del tipo ICED necesitan tener una sustancia mitogénica o estar expuestas a concentraciones específicas de reguladores del crecimiento —o cumplir ambos requisitos— para entrar de nuevo al ciclo mitótico. La inactivación puede ocurrir en cualquier paso de este proceso.

Digitized by Google

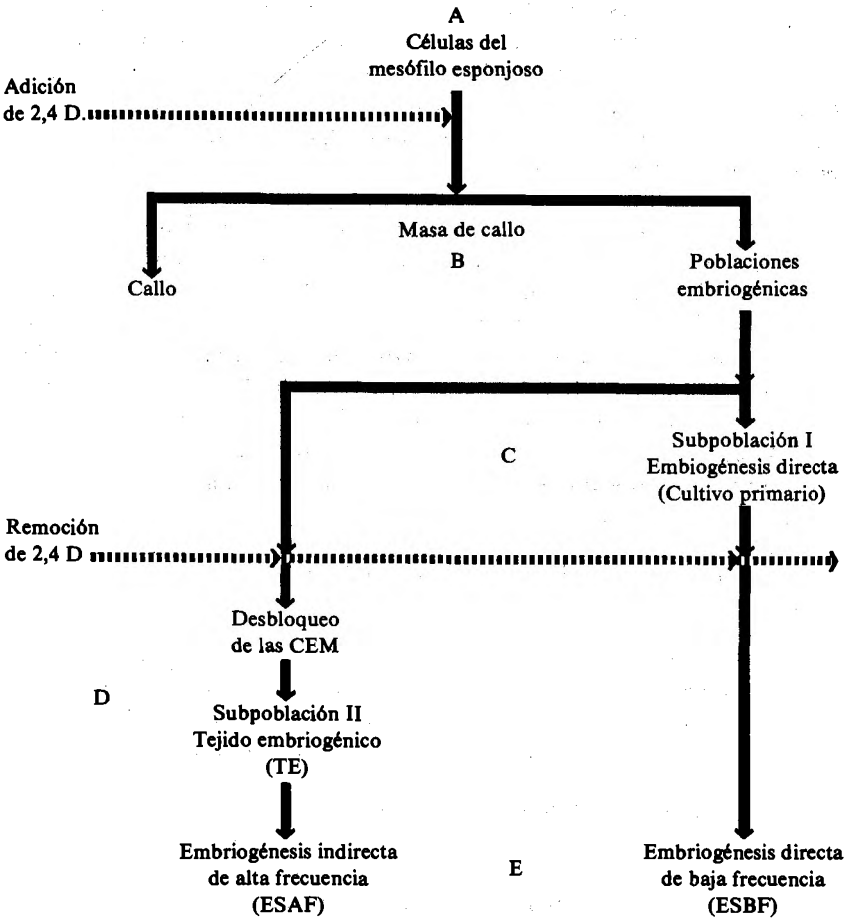


Figura 27.2. Modelo de desarrollo de la embriogénesis somática en explantes foliares de café. A) Células de mesófilo esponjoso o en fase G_0 que reingresan al ciclo celular en presencia de 2,4-D y de KIN. B) Dos poblaciones de células, por lo menos, están presentes en la masa de callo: las células de callo (largas, muy vacuoladas) y las células embriogénicas (esféricas, de citoplasma denso). C) Una subpoblación de células embriogénicas sigue el patrón de la embriogénesis directa (ESBF), todavía en cultivo primario; la germinación del embrión ocurre al hacer la trasferencia al medio secundario. D) La remoción del 2,4-D durante el cultivo secundario permite la diferenciación, como tejido embriogénico, de la segunda subpoblación de células. E) Embriones somáticos completamente diferenciados que se derivan de la subpoblación I (baja frecuencia) y de la subpoblación II (alta frecuencia). Debido al proceso de diferenciación hay una diferencia de tiempo de 1 a 2 meses entre estos dos grupos de embriones somáticos.

Digitized by Google

Cada fase del ciclo celular (G_1, S, G_2 y M) posee una maquinaria sintética específica que está bajo control. La duración de las fases S y M (síntesis del DNA y mitosis) es relativamente constante en un sistema tisular dado, mientras que la duración de G_1 y G_2 (fases de crecimiento anterior y posterior, respectivamente, a la sínteis del DNA) es variable. Los puntos principales de control del ciclo celular mitótico están situados en G_1 y G_2 (Van't Hof et al., 1972). Se ha sugerido que la decisión de proliferar y el destino de las células hijas después de la mitosis ocurren en estas etapas críticas.

Se postula en este trabajo que tanto la concentración total de reguladores del crecimiento, exógenos y específicos como la relación de las concentraciones de diferentes reguladores en el medio de cultivo tienen un doble papel en la iniciación de la embriogénesis. En primer lugar, los reguladores del crecimiento manejan o bien la iniciación de la división celular, es decir, el reingreso de las células al ciclo celular mitótico en G_0 (un estado especial no operacional del ciclo celular), o bien los puntos principales de control de Van't Hof en G_1 o en G_2. En segundo lugar, los reguladores del crecimiento desempeñan un papel directo o indirecto en el control de la síntesis de los factores citoplásmicos durante las fases G_1 y G_2. En el momento de la citocinesis, ocurriría una división mitótica cuántica que resultaría en dos células hijas fenotípicamente diferentes y comprometidas en patrones de desarrollo diferentes.

Debe comprenderse que las divisiones celulares precedentes pueden influir en la diferenciación posterior; los eventos ocurridos en los ciclos celulares pueden determinar o limitar las vías de citodiferenciación que las células puedan tomar más tarde. Un largo intervalo de tiempo puede separar una división celular reguladora de la aparición de signos visibles de citodiferenciación. Se presume que durante una división celular cuántica una de las células hijas sigue siendo meristemática, mientras que la otra está determinada para desarrollarse como célula madre diferenciada.

Importa explicar aquí el concepto de poblaciones fenotípicas múltiples en cultivos de tejidos de plantas (Webster y Davidson, 1968). Los explantes utilizados para el establecimiento de cultivos primarios consisten generalmente en una gama de poblaciones fenotípicas celulares que pueden caracterizarse según su morfología celular básica, sus características bioquímicas, y el tiempo de su ciclo celular mitótico. Estas células tienen diferentes destinos en su desarrollo, determinados por la diferente expresión de la secuencia del ADN. Además, algunas de estas poblaciones celulares se están dividiendo activamente mientras que otras se hallan en fases anteriores a la mitosis (G_0, G_1 ó G_2).

Digitized by Google

Sería ingenuo esperar que una combinación específica de reguladores del crecimiento tuviese un efecto uniforme en poblaciones de células fenotípicamente mixtas. En cambio, se esperaría que cierta proporción de reguladores del crecimiento afectase la mitosis o la redeterminación —o ambos fenómenos— de una población celular fenotípica en particular. Por tanto, se sugiere que las células embriogénicas maternas (CEM) descienden de una población de células que son receptivas a una concentración reguladora del crecimiento embriogénico-inductor crítico o a cierta proporción de las concentraciones de las sustancias reguladoras del crecimiento (auxina y citocinina). Tales células están redeterminadas respecto a sus opciones de desarrollo durante una división mitótica cuántica in vitro que resulta en dos hijas, una de las cuales es probablemente la célula embriogénica madre.

Parecería que los reguladores del crecimiento —en particular las auxinas y las citocininas— tienen dos funciones en el medio de cultivo de acondicionamiento (medio de cultivo primario): a) la determinación de las CEM y b) la sincronización de las CEM. Por consiguiente, esta población celular se encuentra probablemente en un estado de inactivación mitótica hasta que se subcultive en un medio de inducción embriogénico del cual se haya removido la auxina, que con frecuencia es 2,4-D. Este traslado libera probablemente las CEM de la inactivación mitótica y permite el ulterior desarrollo embrionario.

Las secuencias de desarrollo que conducen al TE no han sido aún totalmente explicadas. Es posible que los reguladores del crecimiento induzcan la diferenciación de una población distinta de células mediante alguno de los siguientes mecanismos:

a. La proliferación de una población fenotípica única del explante original, como un cambium o un floema secundario.

b. La prolongación de un ciclo celular mitótico de una población celular particular, causando interferencia en uno o más puntos de control y de redeterminación.

c. La determinación y la inactivación de una población celular diferenciada en el ciclo celular, con un bloqueo de G_0 o G_1 o G_2.

En la literatura científica hay muy poca información que relacione los reguladores del crecimiento con las actividades del ciclo celular. La KIN puede causar un bloqueo en la interfase G_1/S (McLeod, 1968). La KIN puede afectar la oxidación de carbohidratos porque inhibe la glicólisis; en consecuencia, aumenta la oxidación de carbohidratos en la derivación de

Digitized by Google

las pentosas, una variante del ciclo glicolítico (McLeod, 1968). Los procesos de trascripción y traslación en las diferentes poblaciones celulares que comprenden los tejidos de callo se encuentran obviamente afectados en los intervalos de fase de su ciclo celular, en diferentes medios de cultivo. Probablemente los reguladores del crecimiento que se añaden al medio de cultivo controlan la morfogénesis indirectamente, no específicamente, mediante el control de la división celular y el envejecimiento celular. Es interesante observar, según se ha informado, que el envejecimiento del callo, la omisión de la sacarosa del medio, o la irradiación gamma estimulan la embriogénesis en tejidos de óvulo no fertilizado de *Citrus sinensis* Shamouti (Kochba y Button, 1974). Existe un informe de una correlación positiva entre el aumento de la concentración de 2,4-D y el aumento del tiempo promedio de generación, en la suspensión celular de zanahoria (Bayliss, 1977). También se encontró que la duración mitótica aumentaba y el índice mitótico disminuía al elevar las concentraciones de 2,4-D de 0.5 a 70 µM (Bayliss, 1977). Estos resultados se interpretaron como un bloqueo, o una prolongación, de G_1 y G_2, y como la prolongación de la profase y la metafase en relación con la anafase y la telofase. Es interesante notar que la embriogénesis somática de la zanahoria ocurre sólo después de la remoción del 2,4-D, y que el umbral de concentración de 2,4-D para la inhibición embrionaria es de 0.1 µM.

Los picos en la actividad de la peroxidasa están asociados con la aparición de embriones somáticos en los tejidos ovulares del naranjo. Un análisis de las isoenzimas de estos tejidos revela una banda catódica que está claramente asociada con el proceso embriogénico (Kochba et al., 1977). El acortamiento de G_1 y el aumento de la actividad de la peroxidasa se han descrito también asociados con el desarrollo en forma de capucha de los primordios de cebada (Gupta y Stebbins, 1969).

El sistema del café

Es sorprendente la activación de la ESAF (hasta el 60%) y su eficacia mediante la adición de 2,4-D en combinación con KIN durante el cultivo primario. Otras fuentes de auxinas (AIB y ANA) en combinación con KIN no son muy efectivas en la inducción de la ESAF (10% a 20%). Sin embargo, ANA en combinación con la cinetina induce la ESBF hasta en 60% de los frascos cultivados. Además, la remoción del 2,4-D y la disminución de las concentraciones de ANA y de KIN, en el medio de inducción de los cultivos secundarios, se consideran esenciales para el desarrollo de los embriones somáticos de la ESAF en *Coffea* spp. El papel efectivo y preferencial del 2,4-D en la activación de las secuencias de desarrollo que

Digitized by Google

conducen a la ESAF no puede explicarse totalmente en este momento. Los callos inducidos con 2,4-D y ANA parecen fenotípicamente similares cuando se hace una observación visual. Sin embargo, es posible que 2,4-D induzca la diferenciación de una población diferente de células. Se requiere más trabajo experimental para explicar el efecto fisiológico diferente de 2,4-D o de ANA cuando inducen la embriogénesis somática en los tejidos foliares del café.

Dos poblaciones distintas de células aparecen en la masa de callo durante el cultivo de tejidos del café: una consta de células elongadas y la otra de pequeñas células esféricas. Los explantes foliares desarrollan un tejido de callo blando de color crema que contiene células elongadas similares al parénquima (alrededor de 140 x 25 μ) durante el cultivo primario. Después de 50 días en el cultivo primario, los tejidos de callo toman un color marrón y ya no se observa su proliferación. Después de 16 a 19 semanas de cultivo secundario en un medio de inducción, del que se remueve más tarde el 2,4-D, es aparente la diferenciación, en el tejido de callo, de un tejido embriogénico friable. Este tejido se aisla de la masa de callo original a medida que ocurre la proliferación de células las cuales se separan hacia el medio de cultivo circundante. El tejido embriogénico consta de pequeñas células esféricas que se dividen con mucha frecuencia durante el desarrollo temprano.

En este período de proliferación, todas las células esféricas hijas, resultantes de estas divisiones, se separan unas de otras. En un período posterior, las células hijas originadas de las esféricas ya no se separan más sino que permanecen como un tejido coherente. Estos cambios conducen al desarrollo de los embriones globulares, que son las primeras estructuras en el desarrollo embrionario in vitro de las células de *Coffea* sp. Recientemente se ha encontrado que la ESBF, en particular, puede inducirse de explantes foliares de café cultivados en un medio basal, con un suplemento de citocinina y sin auxina. La sensibilidad diferencial a los reguladores del crecimiento de las plantas, los lapsos entre la ESBF y la ESAF, y el patrón de diferenciación de la ESBF sugieren que las células madre de la ESBF provienen de una población celular distinta de aquélla responsable de la ESAF. Un modelo de desarrollo para la embriogénesis somática de explantes foliares de café se presenta en la Figura 27.2.

Resumen de la hipótesis

Las condiciones de cultivo, especialmente los reguladores del crecimiento de las plantas, desempeñan un papel importante en la inducción de la actividad mitótica de diferentes poblaciones celulares de los tejidos

Digitized by Google

cultivados. Esas condiciones propiciarán diferentes tiempos de los ciclos celulares y diversos bloqueos, según el estado regulatorio particular de una población de células. Los embriones somáticos pueden rastrearse hasta las CEM que están asociadas con dos secuencias de desarrollo: la de las células proembriogénicamente determinadas (CPD) y la inducción de células embriogénicamente determinadas (ICED).

El estrés derivado del ambiente y del cultivo puede afectar selectivamente las diferentes poblaciones celulares, favoreciendo en ellas los cambios regulatorios y de sincronización en el ciclo celular así como la determinación de las CEM. Al aumentar la población de CEM de un sistema particular, puede hacerse un análisis más detallado (niveles citológicos y bioquímicos) y se observará que también aumenta la producción de los embriones somáticos.

Se espera que la marcación del ADN permita una estrecha monitoría de la acción (o las acciones) de los genes durante la determinación de las CEM y en su posterior desarrollo.

La secuencia de desarrollo de CPD deberá diferir de la ICED durante las etapas iniciales de cultivo, para que la comparación entre estas dos vías ayude a comprender el control de la embriogénesis somática. El modelo para la diferenciación de los embriones somáticos (Figura 27.3) sugiere que las CEM están siempre asociadas ya sea con las CPD o con las de ICED. El modelo también explica el origen de la vía organogénica, que es una desviación de la vía embriogénica normal. La organogénesis se efectúa en una fase temprana de la formación del tejido embriogénico; por medio de ella las células hijas permanecen unidas entre sí, en un grupo celular sin bipolaridad.

Digitized by Google

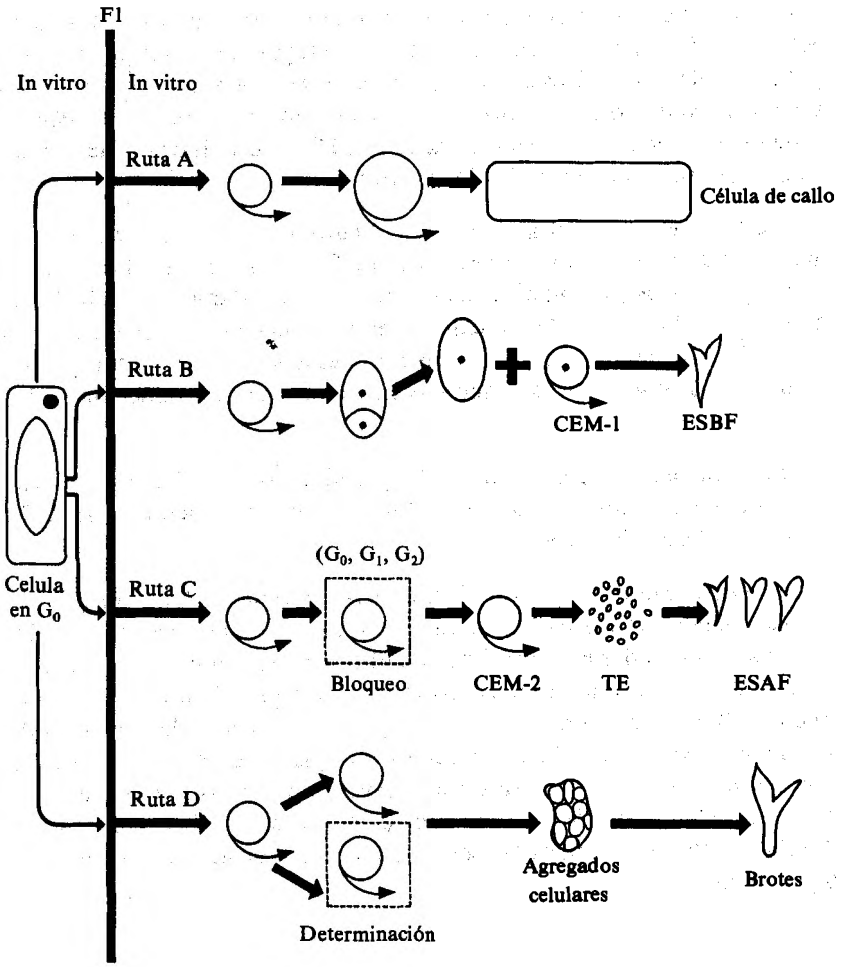


Figura 27.3. Modelo de diferenciación de embriones somáticos para la regeneración de plantas in vitro. A, B, C y D se refieren a cuatro vías distintas de diferenciación que siguen las divisiones celulares in vitro. **Ruta A**: Divisiones celulares sucesivas que conducen a la célula de callo. **Ruta B**: División celular desigual, y redeterminación orientada a la célula embriogénica madre CEM-1 y a la embriogénesis directa. **Ruta C**: Redeterminación mediante un bloqueo celular y liberación de la célula embriogénica madre CEM-2; derivación del tejido embriogénico (TE) a partir de divisiones celulares sucesivas de CEM-2; finalmente, formación del embrión de alta frecuencia. **Ruta D**: Durante la división celular in vitro, algunas poblaciones celulares se determinan para seguir la vía de organogénesis que conduce a la formación de brotes. Este modelo propone que tanto la embriogénesis como la organogénesis podrían rastrearse hasta una sola célula, que se predetermina in vivo o se induce in vitro mediante las condiciones del cultivo.

Digitized by Google

Referencias

Bayliss, M. W. 1977. The effects of 2,4-D on growth and mitosis in suspension cultures of *Daucus carota*. Plant Sci. Let. 8:99-111.

Custer, J. B. M.; van Ee, G. y Buijs, L. C. 1980. Clonal propagation on *Coffea arabica* L. by nodal culture. En: Colleque de l'Association Scientifique Internationale du Café (ASIC). 9ème, Londres.

Dublin, P. 1980. Multiplication végétative *in vitro* de l'*Arabusta*. Café-Cacao-Thé 24:281-290.

Gupta, V. y Stebbins, G. L. 1969. Peroxidase activity in hooded and awned barley at successive stages of development. Biochem. Genet. 3:15.

Kartha, K. K.; Mroginski, L. A.; Pahl, K. y Leung, N. L. 1981. Germplasm preservation of coffee (*Coffea arabica*) by *in vitro* culture of shoot apical meristems. Plant Sci. Lett. 22:301-307.

Kato, H. y Takeuchi, M. 1966. Embryogenesis from the epidermal cells of carrot hypocotyl. Sci. Papers College Gen. Educ. Univ. Tokyo 16:245.

Kochba, J. y Button, J. 1974. The stimulation of embryogenesis and embryoid development in habituated ovular callus from the Shamouti orange (*Citrus sinensis*) as affected by tissue age and sucrose concentration. Z. Pflanzenphysiol. 73:415.

———; Lavee, S. y Spiegel-Roy, P. 1977. Differences in peroxidase activity and isoenzymes in embryogenic and non-embryogenic Shamouti orange ovular callus lines. Plant & Cell Physiol. 18:463-467.

Konar, R. N. y Nataraja, K. 1965. Experimental studies in *Ranunculus sceleratus* L.: Development of embryos from the stem epidermis. Phytomorphology 15:132.

MacLeod, R. D. 1968. Changes in the mitotic cycle in lateral root meristems of *Vicia faba* following kinetin treatment. Chromosoma 24:177.

Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473.

Nakamura, T. y Sondahl, M. R. 1981. Multiplicação *in vitro* de genes ortotropicas em *Coffea* spp. Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, 9o., São Lourenço, Brasil. Memorias. p. 162-163.

Sondahl, M. R. y Sharp, W. R. 1977. High frequency induction of somatic embryos in culture leaf explants of *Coffea arabica* L. Z. Pflanzenphysiol. 81:395-408.

Digitized by Google

——— y Sharp, W. R. 1979. Research in *Coffea* spp. and applications of tissue culture methods. En: Sharp, W. R.; Larsen, P. O.; Paddock, E. F. y Raghavan, V. (eds.). Plant cell and tissue culture: Principles and applications. Ohio State University Press, Columbus, Ohio, E.U. p. 527-584.

———; Salisbury, J. L. y Sharp, W. R. 1979a. SEM characterization of embryogenic tissue and globular embryos during high frequency somatic embryogenesis in coffee callus cells. Z. Pflanzenphysiol. 94:185-188.

———; Spahlinger, D. A. y Sharp, W. R. 1979b. A histological study of high frequency and low frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. Z. Pflanzenphysiol. 94:101-108.

——— y Nakamura, T. 1980. Propagação vegetativa *in vitro* de *Coffea* spp. En: Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, 8o., Campos Jordão, Brasil. p. 129.

Van't Hof, J. y Kovacs, C. 1972. Mitotic cycle regulation in the meristem of culture roots: The principal control point hypothesis. En: Miller, M. W. y Ceuhnert, C. C. (eds.). The dynamics of the meristem cell populations. Plenum Press, Nueva York. p. 13-33.

Webster, P.L. y Davidson, D. 1968. Evidence from thymidine-^{3}H labeled meristems of *Vicia faba* of two cell populations. J. Cell Biol. 39:332.

Digitized by Google

Capítulo 28

Micropropagación de opuntias y agaves

V. M. Villalobos A.*
J. M. Mejía Muñoz**
H. A. Escobar Araya***

* Unidad de Recursos Fitogenéticos, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba, Costa Rica.
** Laboratorio de Biotecnología, Centro de Genética, Colegio de Posgraduados, Chapingo, México.
*** Instituto de Agronomía, Universidad de Tarapacá, Arica, Chile.

Digitized by Google

Introducción

La multiplicación intensiva de plantas empleando las técnicas desarrolladas in vitro ha sido una poderosa herramienta en la floricultura del siglo XX. Este éxito ha propiciado el empleo de la micropropagación en hortalizas, frutales y más recientemente, en especies forestales. Los resultados disponibles permiten suponer que la micropropagación sustituirá los sistemas convencionales de multiplicación de muchas especies.

La versatilidad de los sistemas de micropropagación ha favorecido el desarrollo de investigaciones para micropropagar especies de zonas áridas y semiáridas como jojoba (*Simmondsia chinensis*), guayule (*Parthenium argentatum* Gray), mesquite (*Prosopis* spp.), nopal (*Opuntia* spp.) y agaves (*Agave* spp.). Estas especies han sido fuente de productos destinados tanto a la alimentación humana y del ganado como a una diversidad de usos industriales. Una importante característica de estas plantas es su capacidad de establecerse en suelos pobres y con poca agua disponible. La posibilidad de multiplicar masivamente clones de individuos sobresalientes hace muy atractivo el estudio de la micropropagación de estas importantes especies. A continuación se discutirán los logros obtenidos en este laboratorio en la micropropagación de opuntias (nopales) y agaves.

Micropropagación de *Opuntia amyclaea* Tenore

Las opuntias han sido propagadas por semilla o clonalmente mediante la siembra de cladodios o pencas (Escobar, 1985). La propagación por semilla ha sido poco empleada a causa de la amplia segregación en la progenie y del largo período juvenil que muestran los individuos (Escobar et al., en impresión). Por estas razones, la propagación clonal se ha generalizado, empleando los cladodios o fracciones de éstos (García y Grajeda, 1982). Utilizando este último sistema es posible obtener hasta 15 plantas por cada cladodio (Barrientos y Brauer, 1964).

Escobar et al. (en impresión) han considerado que para una eficiente explotación de las especies que crecen en zonas semiáridas, se requiere del establecimiento de sistemas intensivos de producción, donde se aprovechen más eficientemente los limitados recursos de suelo y agua. Sin embargo, es evidente que para implementar estos sistemas se necesita una gran cantidad de clones seleccionados, requisito que limita los métodos tradicionales de propagación referidos anteriormente. En este laboratorio se ha desarrollado un sistema de micropropagación en *Opuntia amyclaea*

Digitized by Google

Tenore (Escobar, 1985; Escobar et al., 1986) que se discutirá en este capítulo junto con algunos resultados recientes relacionados con el comportamiento de esas plantas en las condiciones del suelo.

Explante y condiciones de cultivo

El material para micropropagar —cladodios de unos 5 cm de largo— fue seleccionado en el campo experimental 'La Nopalera' en Chapingo. Los cladodios fueron desinfectados en el laboratorio después de haberles removido cuidadosamente las espinas. La desinfección se realizó en forma superficial empleando etanol al 70% durante pocos segundos, seguido de una imersión en hipoclorito de calcio al 6% durante 10 minutos. Después de los enjuagues usuales con agua estéril, el cladodio fue fraccionado en unas 30 pequeñas fracciones que contenían al menos una aréola. Los explantes se cultivaron en el medio básico de Murashige y Skoog (1962) complementado con diferentes concentraciones de benciladenina (BA).

Multiplicación

De los explantes inoculados en el medio, y mantenidos en las condiciones de luz y temperatura normalmente empleadas en la micropropagación de cualquier especie, fue factible regenerar una planta por cada explante después de 40 días de cultivo. Este método permitió rebasar significativamente el sistema tradicional de multiplicación con fracciones de cladodio.

Una modalidad en el sistema in vitro permitió incrementar significativamente el número de plantas regeneradas por cada explante. Los 30 brotes desarrollados, en promedio, durante los primeros 25 días de cultivo (antes de inducir la diferenciación radical) se cortaron longitudinalmente, a la vez que se descartó el meristema apical. Estas mitades se incubaron paralelas a la superficie del medio, el cual contenía BA 10 µM. En los 60 explantes resultantes se desarrollaron las yemas laterales a causa de la eliminación de la dominancia apical por el estímulo del BA sobre el crecimiento de las yemas. En estas condiciones fue posible regenerar un promedio de 15 brotes por cada explante, el cual provenía, a su vez, de una mitad del brote inicial. En suma, se obtuvieron 900 brotes axilares después de 55 días de cultivo. Estos 900 brotes, cortados asépticamente y trasplantados al mismo medio, produjeron un rendimiento de 25,000 brotes después de 85 días de cultivo.

Experimentos llevados a cabo para estimular la rizogénesis demostraron que los brotes forman raíces ya sea espontáneamente o con ayuda de

Digitized by Google

auxinas. La inducción del sistema radical, en presencia o en ausencia de auxinas, ocurrió 15 días después del trasplante; este resultado demostró la independencia de esta fase respecto a la auxina exógena y permitió, además, pronosticar un promedio de 25,000 plantas después de 100 días de cultivo. La Figura 28.1 resume el proceso de micropropagación de *Opuntia amyclaea* Tenore.

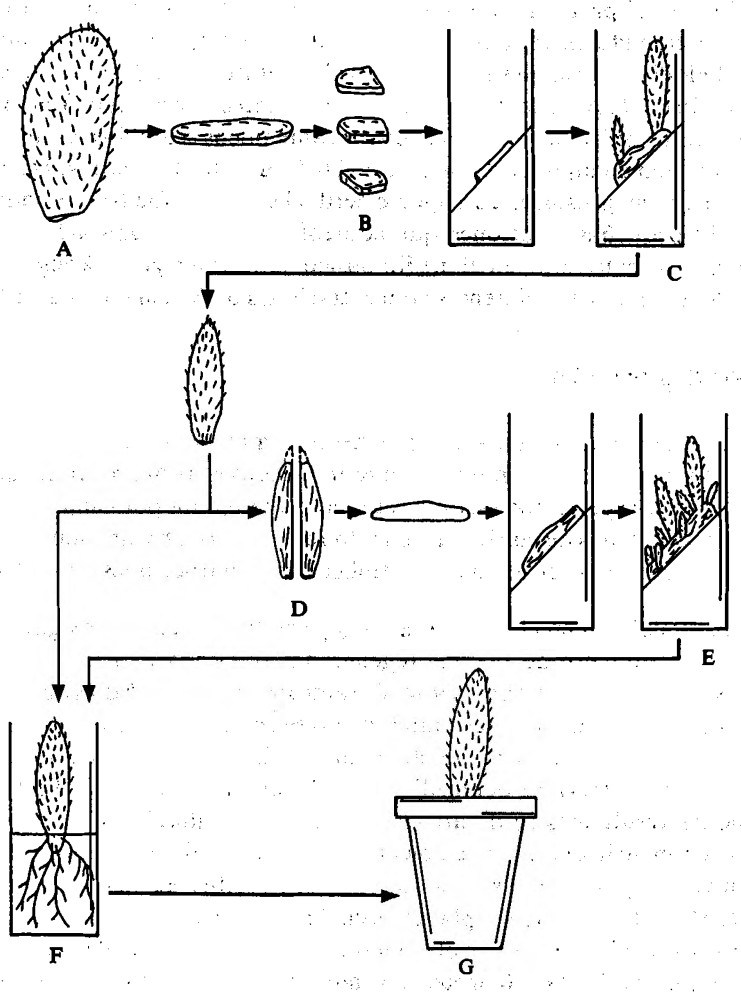


Figura 28.1. Micropropagación de *Opuntia amyclaea* Tenore. A) Cladodio de aproximadamente 5 cm obtenido en el campo. B) Explantes con una o más aréolas. C) Desarrollo de las yemas laterales. D) Corte longitudinal de los brotes eliminando el meristema apical. E) Desarrollo múltiple de las yemas laterales. F) Diferenciación de las raíces en un medio, diluido al 50%, de sales de MS. G) Trasplante al suelo.

Digitized by Google

Actualmente hay en este laboratorio plantas derivadas de este sistema de multiplicación, que se hallan en condiciones de desarrollarse en suelo. Estos individuos han mostrado diferencias en la velocidad de crecimiento porque experimentaron diferentes tratamientos con auxinas durante la inducción de la raíz; sin embargo, casi todos tienen igual número de cladodios.

Micropropagación de *Agave* spp.

El género *Agave* comprende cerca de 300 especies las cuales, al igual que las del género Opuntia, se desarrollan en zonas áridas y semiáridas. Las agaves se han cultivado para la producción de fibras, bebidas alcohólicas, mieles, celulosa y forraje, además de emplearse para el control de la erosión y la conservación de suelos. En lugares con suelos pobres y poca precipitación, las agaves son, frecuentemente, uno de los pocos sustentos económicos de los agricultores de esas regiones.

Las agaves se han propagado clonalmente por bulbillos y por vástagos o rizomas. Cuando se emplea el método de propagación por vástagos, se producen de 6 a 12 plantas anualmente por individuo. El método de propagación por bulbillos es mucho más eficiente, ya que con ellos se pueden producir de 2000 a 3000 plantas de una planta madre adulta, es decir, de aproximadamente 10 años de edad.

El sistema de propagación por vástagos ha probado ser muy ineficiente por el escaso número de plantas regeneradas; no ocurre así, en cambio, con el método alterno. Una de las desventajas de la propagación por bulbillos es el largo tiempo que tarda la multiplicación de clones sobresalientes. Por otro lado, hay una creciente demanda de plantas y se estima, únicamente para 1984, un déficit de 10 millones. Una promisoria alternativa para cubrir esta demanda sería la complementación del sistema de multiplicación por bulbillos con la micropropagación.

En este laboratorio se han ensayado dos métodos de micropropagación de agaves: a) el cultivo de yemas laterales y b) el cultivo de cambium vascular.

Propagación por yemas laterales

Para el estudio de este sistema de micropropagación se emplearon plantas de *Agave atrovirens* de seis meses de edad, las cuales a su vez eran

Digitized by Google

clones propagados por bulbillos. En el laboratorio se les eliminaron las hojas y raíces dejando un promedio de 10 yemas laterales expuestas en cada planta. Las yemas, junto con una porción del tejido adyacente, fueron aisladas cuidadosamente. En un recipiente limpio se lavaron y desinfectaron superficialmente con una solución de hipoclorito de calcio al 5% durante 25 minutos; luego se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril.

El medio de cultivo empleado fue el medio basal de Murashige y Skoog (1962) suplementado con Tiamina-HCl, 1 mg/litro; i-inositol, 100 mg/litro; cisteína, 10 mg/litro; sacarosa, 30 g/litro; y agar, 0.8 g/litro. Con este medio se probaron diferentes concentraciones y combinaciones de ácido indol-3-acético (AIA), benciladenina (BA) y cinetina (KIN). En todos los casos el pH se ajustó a 5.7 antes de la esterilización del medio. Las yemas sembradas fueron incubadas en un cuarto de cultivo con temperatura constante de 27 ± 2 °C y un fotoperíodo de 16 h con una intensidad lumínica de 29 $\mu E/cm^2$ por sg.

En los medios que contenían KIN (1 mg/litro) más AIA (0.5 mg/litro) observamos que las yemas se desarrollaron rápidamente y alcanzaron 5 cm de largo en 3 semanas de cultivo. Con este proceso fue posible obtener un brote por cada yema incubada. Comparativamente, las yemas cultivadas en el medio que contenía KIN (1 mg/litro) BA (1 mg/litro) y AIA (2 mg/litro) tuvieron un crecimiento lento, pero después de 15 días de cultivo fue evidente el desarrollo de yemas secundarias de tal modo que a los 45 días de cultivo se obtuvo un promedio de 6 brotes, cada uno de cerca de 3 cm de largo, por cada explante.

Cultivo del cambium vascular

En este método las plantas se lavaron con un detergente comercial una vez eliminadas las hojas y la raíz, luego con agua durante 5 minutos, y finalmente se desinfectaron como en el método anterior.

Empleando un sacabocados de 6 mm de diámetro, se aislaron 2 ó 3 cilindros del eje principal de la planta y se los cortó en porciones de 2 mm cada una. Los explantes se cultivaron en el medio MS suplementado con ANA (2 mg/litro) y con kinetina (0.1 mg/litro). En estas condiciones se observó la formación de un callo de color verde en toda la superficie del explante después de dos semanas de cultivo. A la cuarta semana de la siembra estos callos se trasplantaban al mismo medio para estimular su proliferación, o bien se inducían brotes de ellos empleando un medio con KIN (1 mg/litro) más AIA (1 mg/litro). En este último medio la formación

Digitized by Google

de brotes apareció dos semanas después del trasplante y el día 45 después de éste los brotes tenían un tamaño de 2 cm y estaban listos para inducir el sistema radical. Estos brotes derivados de los callos se pueden multiplicar aún más a razón de 6 brotes por explante, en promedio, empleando el mismo medio usado para la proliferación por yemas laterales.

Enraizamiento

El enraizamiento de los brotes de opuntia y agave no presenta grandes dificultades, y para lograrlo se pueden emplear varios métodos:

a. Los brotes pueden enraizar simplemente si se trasplantan a un medio de cultivo sin reguladores del crecimiento.

b. La diferenciación de la raíz puede estimularse rápidamente si los brotes se trasplantan a un medio que contenga 0.5 mg/litro de AIB, diluyendo las sales del medio en un 50%. Se ha observado mejor respuesta al enraizamiento cuando el azúcar se reduce del 3% al 2%; en estas condiciones las primeras raíces se hacen visibles 10 días después del trasplante.

c. La formación de raíces se estimula in situ, esto es, se trasplantan los brotes a vermiculita y se mantienen en una cámara con alta humedad relativa.

En este último método es importante controlar el ataque de hongos, principalmente.

Establecimiento en el suelo

Una vez enraizados los brotes, se establecen las plantas en el suelo. Debe evitarse que las raíces lleven residuos de agar; para contrarrestar su presencia, la planta debe enjuagarse en soluciones de fungicidas de contacto. Una vez enjuagadas, las plantitas se colocan en bandejas de plástico (o en recipientes similares) y se cubren con bolsas de plástico para mantener una alta humedad relativa. Paulatinamente se reduce la humedad haciendo perforaciones en el plástico, hasta que después de 15 días se descarta el plástico completamente.

Digitized by Google

Referencias

Barrientos, P. F. y Brauer, H. O. 1964. Multiplicación vegetativa del nopal a partir de fracciones mínimas de una planta. Serie de investigaciones, no. 1. Colegio de Posgraduados, Chapingo, México. 4 p.

Escobar, H. A. 1985. Micropropagación y almacenamiento *in vitro* de *Opuntia amyclaea* Tenore. Tesis. Centro de Fruticultura, Colegio de Posgraduados, Chapingo, México. 80 p.

———; Villalobos A., V. M. y Villegas M., A. Estudio de las condiciones de enraizamiento, establecimiento y conservación del nopal tunero (*Opuntia amyclaea* Tenore) propagado *in vitro*. Agrociencia. (En impresión.)

———; ——— y ———. 1986. *Opuntia* micropropagation by axillary proliferation. Plant Cell Tissue & Organ Culture 7(3):269-277.

García, V. M. A. y Grajeda, G. J. E. 1982. Cultive nopal para verdura. Centro de Genética, Colegio de Posgraduados, Chapingo, México.

Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.

Digitized by Google

Capítulo 29

Propagación masiva de piretro y guanto mediante el cultivo de tejidos

L. W. Levy*
P. E. Levy*

Agradecimientos

Los autores agradecen la cooperación del Dr. T. Murashige, la Sra. Iudith Steiner y el Ing. Julio Cabrera en el desarrollo de las técnicas descritas en el presente informe.

* Industria Extractora C. A. (INEXA), Quito, Ecuador.

Digitized by Google

El Caso del Piretro (*Chrysanthemum cinerariaefolium*)

La planta de piretro es la fuente de un insecticida de amplio espectro, baja toxicidad para los humanos y animales de sangre caliente, y corta persistencia en el medio ambiente; por estas cualidades es el insecticida preferido en un mundo cada vez más consciente de la ecología y de la necesidad de preservarla (McLaughlin, 1973; Moore y Levy, 1975).

Las áreas más importantes de producción de piretro en el mundo están localizadas en las zonas montañosas altas de Kenya, Tanzania, Ruanda y Ecuador. En Ecuador, la siembra comercial de esta especie se inició en 1954 (Levy, 1954; Moore y Levy, 1975); en 1958, INEXA construyó en Quito una planta para la extracción química del producto, y en 1967 instaló otra para la refinación del extracto.

El extracto de piretro es uno de los principales artículos de exportación de la región de los Andes ecuatorianos y constituye, por lo tanto, no sólo una fuente de divisas para el país sino una fuente de ingresos para cientos de campesinos que viven en zonas marginales, donde es muy difícil sembrar cualquier otro cultivo. El piretro se ha considerado como un factor importante en el progreso social de estas zonas.

Cosecha manual y sus implicaciones

El análisis de un aspecto del cultivo del piretro, el relacionado con la cosecha manual de las flores, y de su efecto económico en los costos de producción permitirán entender mejor la decisión de recurrir a técnicas de propagación por medio del cultivo de tejidos.

Los componentes insecticidas del piretro, las piretrinas, se encuentran en las flores; su contenido aumenta a medida que la flor se desarrolla, y alcanza un nivel máximo cuando se han abierto completamente por lo menos dos anillos de florecillas. Pero las plantas de piretro que crecen en los Andes ecuatorianos a 3000 metros sobre el nivel del mar producen flores en forma continua durante unos cuatro años; de esa manera, las flores totalmente abiertas, que son las que se cosechan, están mezcladas con numerosas flores parcialmente abiertas y con capullos.

Por la razón anterior, es importante cosechar en forma selectiva, y el único método de remover solamente las flores maduras sin afectar el desarrollo de las inmaduras y los capullos, es la cosecha manual; esto hace del piretro un cultivo con altos requerimientos de mano de obra. Se ha

Digitized by Google

calculado que cada día del año se cosechan a mano unos 150 millones de flores de piretro en Kenya, Tanzania, y Ecuador.

Por ser el piretro un cultivo que requiere tanta mano de obra, sus costos de producción están siempre en aumento, debido principalmente a las constantes alzas de los salarios. Este aumento encarece a su vez el precio del extracto y este hecho, unido a la inestabilidad en la oferta mundial típica de un producto natural —cuya producción sufre por cambios climáticos y fracasos agronómicos— ha influido para que los piretroides sintéticos (Elliot, 1977) alejen el producto natural de los mercados mundiales. Consecuentemente, la demanda por el piretro natural ha disminuido, y si esta tendencia continúa, podrían presentarse desastres económicos y sociales en las áreas productoras del mundo.

Obtención de plantas más eficientes

Tanto en Ecuador como en Kenya se ha aceptado que los aumentos en los costos de producción del piretro, como los de otros productos naturales, se pueden compensar solamente con aumentos permanentes en la eficiencia de la producción. Por lo tanto, se está dando prioridad a la búsqueda de plantas más productivas en términos de volumen de flores y, especialmente, en términos de contenido de piretrinas, siendo este último el factor más importante en los intentos por aumentar la eficiencia.

Tanto en Kenya (Parlevliet, 1975) como en Ecuador se han encontrado plantas individuales con esas características. Para 1975 se habían seleccionado en Ecuador 57 plantas diferentes luego de 10 años de intensos y arduos trabajos financiados por la industria privada local. Había menos de 50 clones de cada una de estas plantas madre, los cuales habían sido multiplicados vegetativamente en la forma convencional. Se presentaba entonces el problema de cómo reproducir masiva y rápidamente estas plantas en cantidades suficientemente altas para sustituir las plantas menos productivas que estaban sembradas en grandes extensiones.

El objetivo de las empresas productoras de piretro consistía en multiplicar las selecciones a razón de 8 millones de plantas por año, para cubrir una extensión de 1000 hectáreas en cuatro años. Siendo el piretro una especie autoincompatible, la producción de semilla alteraría la constitución genética de las plantas seleccionadas; por lo tanto, el camino más rápido y seguro para reproducir estas plantas era mediante algún método de multiplicación vegetativa.

Digitized by Google

El cultivo de tejidos como alternativa

Toshio Murashige, de la Universidad de California en Riverside, había realizado experimentos preliminares con el cultivo in vitro de plantas de piretro; lo hizo por iniciativa de Joseph B. Moore, de McLaughlin Gormley King Co., la principal distribuidora de piretro de los Estados Unidos. Roest (1976), en Holanda, también había realizado experimentos con el cultivo in vitro de piretro, pero había concluido que el método no era aún apropiado para uso comercial, por las dificultades que encontró en el desarrollo de los brotes.

Los primeros informes sobre el trabajo de Murashige llegaron a Ecuador en 1976[1]. Fue entonces cuando se decidió estudiar, junto con R. H. Binnington, la posibilidad de propagar masivamente el piretro en el país, para alcanzar el objetivo de la siembra con plantas seleccionadas.

Usando 100 cortes de uno de los clones ecuatorianos, T. Murashige y Iudith Steiner (de Ecuador) efectuaron un experimento en los laboratorios de la Universidad de California en Riverside, en 1976; las plántulas obtenidas de este experimento fueron llevadas en tubos de ensayo a Ecuador, donde se enraizaron en un invernadero improvisado y posteriormente se trasplantaron al campo. Hubo cerca de 90% de sobrevivencia y desarrollo de plantas maduras y sanas con excelentes características de producción floral.

Producción masiva de piretro mediante el cultivo de tejidos. Como laboratorio de cultivo de tejidos se usó un edificio pequeño que ya existía en las instalaciones de la fábrica INEXA, cerca de Quito; tres habitaciones con una superficie total de 30 m^2 se adecuaron para la preparación del medio de cultivo, la trasferencia y el cultivo; se trabajaba allí con 12,500 tubos de ensayo en la etapa I (iniciación del cultivo) y en la etapa II (subcultivo para multiplicación de brotes). Para la etapa III, de enraizamiento, se construyó un invernadero muy simple para 500 frascos Mason (frascos de boca ancha, de 1 litro).

Para ampliar la capacidad de trabajo desde la escala de laboratorio, con sólo unos pocos tubos de ensayo, hasta una escala de producción comercial, se aplicaron los principios clásicos de la ingeniería química para aumentar la escala en procesos químicos. En el diseño inicial de la instalación se tomaron decisiones arbitrarias, basadas en observaciones que el

1. Binnington, R. H. Comunicación personal.

Digitized by Google

equipo había realizado en diferentes laboratorios de investigación; luego, este diseño se fue optimizando progresivamente, aprendiendo de los éxitos y fracasos de diversos ensayos.

El objetivo era aumentar el ritmo de crecimiento de los cortes en la etapa I y de los cortes de multiplicación en la etapa II, así como aumentar el porcentaje de plántulas que lograban formar raíces en la etapa III. Simultáneamente, se hicieron mejoras sanitarias en respuesta a infecciones que ocurrían en las tres etapas. Los factores que requerían optimización eran los siguientes:

- Condición de la planta madre usada para el primer corte.
- Sistema de preparación de cortes usado en las etapas I y II.
- Composición del medio para las tres etapas.
- Composición de la tierra para la etapa de aclimatación de las plantas en el invernadero.
- Condiciones ambientales en el invernadero.

Esencialmente, se emplearon las técnicas y el medio descritos por Huang y Murashige (1976).

Cuando el número de plántulas producidas en la etapa II se acercaba al requerido para satisfacer el objetivo inicial, se ampliaron las instalaciones de la etapa III para acomodar 2100 frascos (en un invernadero de 42 m^2). Para las etapas de 'aclimatación' de las plantas ya enraizadas y sembradas en tierra se construyó un segundo invernadero de 205 m^2.

A los ocho meses de haber iniciado el programa se logró llegar a un nivel óptimo de trabajo para satisfacer el objetivo deseado. Entonces se diseñó un calendario de producción de plantas, el cual se tenía que seguir rigurosamente, no sólo para evitar la excesiva eliminación de plantas en una etapa en que pudiera ocasionar la interrupción de la siguiente etapa (o hasta el fracaso de todo el programa) sino también para ajustar la producción al período normal de siembra para el piretro. En Ecuador este período se limita a la primera mitad de la estación lluviosa, la cual ocurre normalmente de febrero a julio. En otras palabras, el programa de siembras del año se limita a un período de 90 días, de febrero a mayo y, de acuerdo con éste, hay que organizar el programa de trabajo del laboratorio.

Las plántulas que entraban a la etapa III después de abril ya no podían estar listas para las siembras comerciales que comenzaban en febrero del

Digitized by Google

año siguiente (Figura 29.1) y se tenían que guardar para las próximas siembras, 12 meses más tarde. Esta limitación era muy severa ya que el objetivo era producir 8 millones de plantas para poder sembrar 200 hectáreas en el año.

La producción de plántulas por cultivo de tejidos para siembras comerciales tolera en menor grado las fallas y contratiempos que comúnmente se aceptan en los programas de investigación a nivel de laboratorio. Esto es así, no solamente porque cada paso de la secuencia tiene que cumplirse a tiempo para permitir el siguiente, sino también por razones económicas obvias. Por ejemplo, en un laboratorio de investigación es común que una de cinco plantas cultivadas in vitro no esté creciendo bien, y se puede eliminar; eso representa un 20% de fracaso, porcentaje que es muy aceptable a nivel de investigación pero no así cuando se trabaja a nivel de cultivo comercial; en este caso, tal porcentaje implica eliminar en un solo mes 12,400 plantas en la Etapa III, o sea la cantidad de material de siembra necesario para 50 hectáreas (Figura 29.1).

Durante el trascurso del programa de producción de plantas de piretro in vitro, se ha podido demostrar que sí es posible alcanzar un nivel muy aceptable de precisión en el desenvolvimiento de cada etapa, hecho que convierte esta técnica en un proceso comercialmente viable.

Capacidad de producción y costos. Como lo muestra el diagrama de flujo del proyecto (Figura 29.1) que operó en Ecuador, el trabajo comienza con una sola planta de piretro, la cual da hasta 100 cortes para la etapa I en el proceso de micropropagación; el crecimiento inicial de estos cortes tarda unas cuatro semanas.

Luego empiezan las etapas de multiplicación cada cuatro semanas, con un coeficiente de 5 a 1, en la etapa II. Para esta multiplicación, se retiran las plantas de los tubos, se colocan en cajas Petri esterilizadas, y se dividen en cinco secciones iguales. Cada sección se replanta en un tubo con medio de cultivo fresco de tal manera que, después de cuatro semanas, los 100 tubos iniciales de la etapa I se convierten en 500 tubos; cada planta puede subdividirse nuevamente cuatro semanas más tarde, lo que da como resultado 2500 tubos.

Después del tercer período de cuatro semanas, se obtienen 12,500 plantas en igual número de tubos; a este nivel se introduce un cambio en el sistema. Luego de una nueva subdivisión en cinco secciones, la mayor parte de las plantas se trasfieren a frascos Mason con medio para enraizamiento, o sea que pasan a la etapa III; un número menor de secciones

Digitized by Google

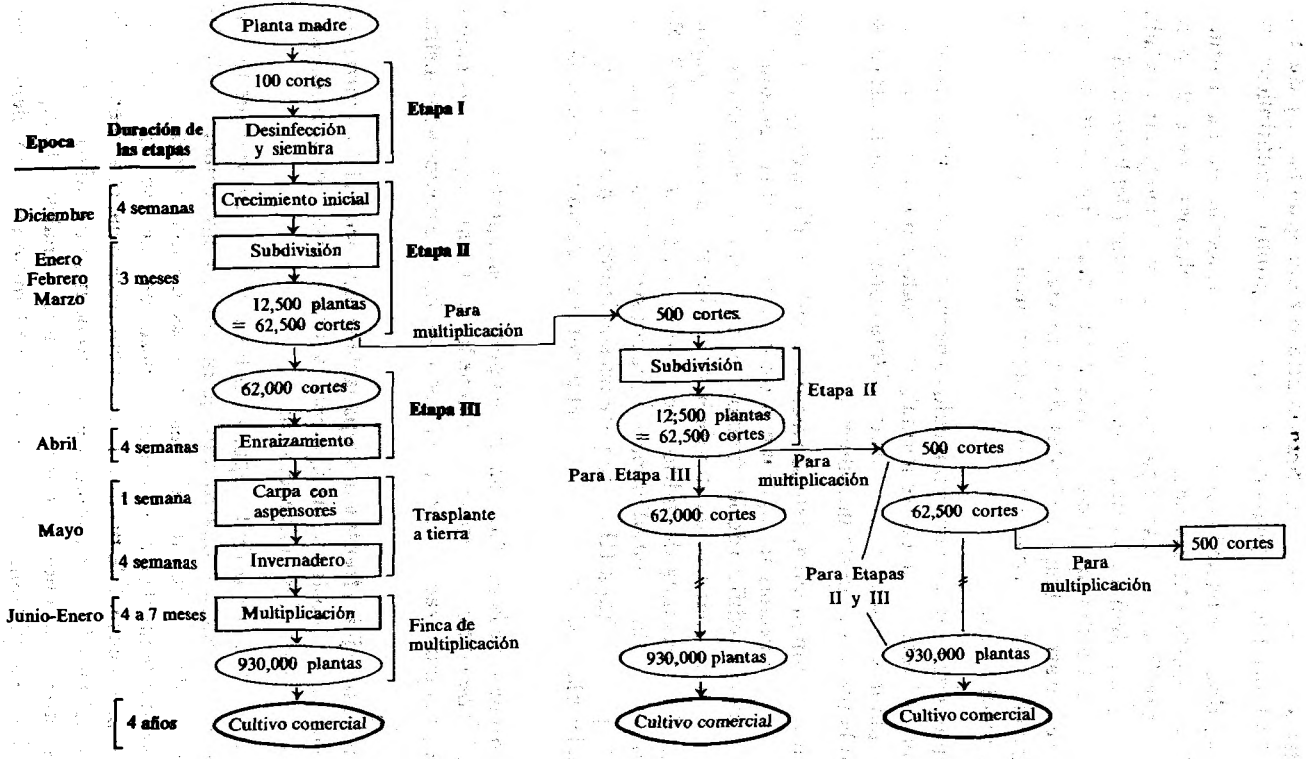


Figura 29.1. Diagrama de flujo para la propagación del piretro *(Chrisanthemum cinerariaefolium)* mediante el cultivo de tejidos, en un cuarto con capacidad para 12,500 plantas. Pasan 62,000 cortes/mes a enraizamiento, y 930,000 plantas/mes al cultivo comercial.

Digitized by Google

permanece en la etapa de multiplicación para producir otras 12,500 plantas cuatro semanas más tarde, cuando otra vez una gran parte pasa a la etapa III, y una parte más pequeña queda para continuar la multiplicación.

La finca donde se hacía la multiplicación estaba localizada a una altura de 2700 msnm; esta altura es menor que la de los cultivos comerciales para producción de flores, y más propicia para el crecimiento vegetativo. Cada mes se trasplantaban a esta finca unas 62,000 plantas (del laboratorio) y permanecían allí durante cuatro a seis meses, bajo riego; durante este tiempo se desarrollaban en plantas de gran vigor, apropiadas para la propagación vegetativa convencional. La producción era de 15 a 20 ramillas por planta madre.

Combinando la propagación por cultivo de tejidos con el último paso de propagación vegetativa convencional, se produjeron cada mes unas 930,000 plantas, o sea 11 millones de plantas por año. Por lo tanto, se cumplió la meta propuesta inicialmente.

El aspecto económico de este proyecto se puede dividir en dos partes: las inversiones fijas hechas al empezar el programa y los costos de producción de cada planta. El edificio donde funciona el laboratorio ya existía y sólo se requirió acondicionarlo en un área de 30 m^2. La inversión total en equipos, instrumentos, artículos de vidrio, etc., fue de US$30,000 en 1977. Se gastaron otros US$25,000 adicionales en la construcción de los invernaderos tanto para la Etapa III como para las siguientes etapas de 'aclimatación' de las plantas. La inversión total fue entonces de unos US$55,000 en 1977.

El costo neto de la producción de una planta, lista para el trasplante al campo, fue de US$0.15. Este costo incluye los materiales usados, la mano de obra y la amortización de equipos, pero no incluye costos administrativos.

El cultivo de tejidos frente a la propagación convencional. La reproducción in vitro ha demostrado las siguientes ventajas en comparación con la propagación vegetativa convencional:

a. Importante ahorro de tiempo. Con los métodos convencionales se hubieran requerido cuatro años para obtener las primeras 930,000 plantas de piretro; usando las técnicas de micropropagación se alcanzó este nivel en el primer año y desde entonces se convirtió en el volumen mensual de producción. En consecuencia, el aumento en la productividad de los campos de piretro ocurrió tres años antes de lo que hubiera sido posible por medios convencionales; esto representó un ingreso adicional estimado en US$4 millones para cientos de campesinos en Ecuador.

Digitized by Google

b. Mejores características de crecimiento de las plantas propagadas in vitro.

c. Posibilidad de mayor previsión en la planificación de las siembras. La micropropagación permite producir un número predecible de plantas en cualquier momento y aplicar por ello sistemas industriales de planificación, ya que la producción de plantas se independiza de las condiciones climáticas.

En resumen, se encontró que la inversión que se había decidido hacer para trasformar un trabajo de investigación en un programa a nivel industrial estuvo bien justificada.

La Reproducción del Guanto (*Datura sanguinea*)

Esta especie, conocida comúnmente con el nombre de guanto, es una solanácea arbórea y perenne. Se conoce también como ***Brugmansia sanguinea***. Es originaria de los Andes ecuatorianos, entre los 2000 y los 3000 msnm, y tiene una larga historia de uso en la medicina tradicional indígena de la zona (Trease y Evans, 1983).

La planta del guanto contiene varios alcaloides, uno de los cuales es la escopolamina, que INEXA está extrayendo desde comienzos de los años setenta. La escopolamina tiene propiedades calmantes que se aprovechan en todo el mundo en fármacos contra mareos y cólicos de diversa índole.

Igual que con las piretrinas, en el caso de la escopolamina los esfuerzos para aumentar la eficiencia en la producción se orientan hacia la selección de plantas individuales de alta productividad, tanto en términos del volumen (de hojas en este caso) como en términos de contenido del alcaloide de interés comercial; este segundo factor permite aumentar la eficiencia industrial, lo cual es de sumo interés cuando los procesos de extracción son caros.

Por lo tanto, la mayor productividad permite no sólo aumentar la eficiencia de la operación agrícola sino también mejorar la eficiencia industrial, ya que en el proceso de extracción se logran mayores rendimientos usando volúmenes similares de solvente, energía, mano de obra y materia prima.

Digitized by Google

Para 1979 los productores de hojas de guanto de Ecuador habían logrado seleccionar plantas individuales con estas características. Se presentaba entonces la misma situación que con el piretro en 1975: la necesidad de multiplicar rápida y masivamente estas plantas para aprovechar su alta productividad a la mayor brevedad posible.

A diferencia de la situación de 1975, cuando la reproducción por cultivo de tejidos era un concepto nuevo y lejano, en 1980 se contaba con la infraestructura completa y con personal especializado con amplia experiencia para aplicar estas técnicas. I. Steiner, entrenada en California en 1976 para la multiplicación del piretro, dirigió en Ecuador el desarrollo de la investigación para la reproducción in vitro de *Datura sanguinea*.

Tomando como guía las técnicas usadas en otras especies de la misma familia botánica, se probaron simultáneamente varias combinaciones y concentraciones de medios de cultivo. Las observaciones hechas con respecto al tipo de crecimiento, ritmo de crecimiento, coeficientes de multiplicación, y apariencia general de las plantas permitieron determinar los medios deseables para cada etapa, y optimizar los niveles de sales y hormonas.

En agosto de 1981, 16 meses después de haber iniciado los experimentos, ya se tenían las primeras 6000 plantas de guanto en la etapa de aclimatación, en el invernadero. Las primeras 50,000 plantas producidas in vitro permitieron continuar el programa de multiplicación por la vía vegetativa convencional (estacas), simultáneamente con la micropropagación. Para 1985, la mayor proporción del guanto sembrado en Ecuador estaba conformado por clones de las plantas 'madres' seleccionadas por su productividad y reproducidas usando las técnicas del cultivo de tejidos; además, se había alcanzado el objetivo de aumentar la eficiencia industrial, al aumentar la calidad de la materia prima.

En la actualidad prosigue la selección de plantas con niveles altos de producción, y se cuenta con el apoyo del laboratorio de cultivo de tejidos para la tarea de multiplicar plantas individuales de interés.

Cultivo de Tejidos para Acelerar el Uso de Plantas Seleccionadas

Como ocurre con la mayor parte de las técnicas nuevas que reciben mucha publicidad, el cultivo de tejidos ha creado grandes expectativas acerca de sus posibles aplicaciones industriales y comerciales. Sin embargo, algunos

Digitized by Google

investigadores han lanzado su voz de alerta en contra de estas esperanzas prematuras y posiblemente exageradas, e insisten en que los usos comerciales del cultivo de tejidos y de células de plantas son actualmente muy limitados. Añaden que la mayoría de las plantas pueden ser propagadas por métodos convencionales, sin tener que acudir al difícil trabajo de desarrollar procesos de cultivo de tejidos comercialmente factibles (Krikorian, 1979).

A pesar de esto, los países en desarrollo, que históricamente han derivado gran parte de sus ingresos de las exportaciones agrícolas, encuentran que en los mercados mundiales 600 de sus productos naturales, constituidos por importantes ingredientes de fármacos, alimentos, textiles, etc., se enfrentan cada día más a la competencia de sustancias análogas, artificiales o sintéticas, producidas por las naciones industrializadas. La producción de estas últimas sustancias es muchas veces más barata que la de sus similares naturales y, además, no sufre las fluctuaciones causadas por el clima o por el impacto considerable de los aumentos salariales a que están sometidas las operaciones agrícolas por el uso intensivo de mano de obra.

Generalmente se reconoce que, por razones meramente económicas, la producción de materiales de origen vegetal en los países en desarrollo no debe disminuir; el cultivo de productos económicamente importantes es la principal y en muchos casos la única fuente de ingresos para importantes segmentos de la población, y la exportación de esos productos es una importante fuente de divisas para estos países. Por otra parte, los productos naturales son también, en general, más seguros que sus análogos artificiales, tanto desde el punto de vista de la toxicología humana como de la preservación del medio ambiente.

El dilema se puede solucionar con el desarrollo y la introducción de nuevas variedades de plantas con mejores características de producción; de esa manera, el aumento en las cosechas y en el rendimiento unitario de los cultivos permite contrarrestar los incrementos en los costos de la mano de obra necesaria para la producción de estas nuevas variedades.

Con los trabajos sobre piretro y *Datura sanguinea* descritos aquí, se ha comprobado que las técnicas del cultivo de tejidos, debidamente incrementadas, pueden contribuir en forma significativa a colocar más tempranamente las plantas mejoradas a niveles comerciales. Sin embargo, se reconoce que es principalmente en la etapa inicial del cumplimiento de este propósito, cuando estas técnicas desempeñan un papel importante.

Una vez que una planta individual con características de producción superiores se ha multiplicado mediante el cultivo de tejidos hasta obtener

Digitized by Google

varios millones de plantas genéticamente idénticas, la propagación subsiguiente se puede realizar por métodos vegetativos convencionales, los cuales pueden ser mucho más económicos.

Desde este punto de vista, el cultivo de tejidos se debe considerar como el 'motor de arranque' para cualquier introducción de plantas especiales. Su ventaja consiste en el tiempo necesario para completar esta introducción a gran escala, que puede ser de vital importancia para mantener un cultivo o sus productos derivados en los mercados mundiales.

Por lo tanto, la propagación masiva de plantas por medio del cultivo de tejidos es una herramienta cuyo uso puede tener consecuencias de gran alcance para importantes segmentos de la población en los países en desarrollo. La búsqueda de variedades más productivas y su propagación masiva, usando las técnicas del cultivo de tejidos, deben considerarse como objetivos importantes para los investigadores latinoamericanos.

Referencias

Elliot, M. 1977. Synthetic pyrethroids. Symposium Series, no. 42. American Chemical Society (ACS), Washington, D. C.

Huang, L. C. y Murashige, T. 1976. Plant tissue culture media: Their preparation and some applications. Manual 3. Tissue Culture Association. p. 539-548.

Krikorian, A. D. 1979. Book review. Econ. Bot. 33(1):97-98.

Levy, L. W. 1954. El piretro en Ecuador. Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador.

———. 1981. A large scale application of tissue culture: The mass propagation of pyrethrum clones in Ecuador. Environ. Exp. Bot. 21(3-4):389-395.

McLaughlin, G. A. 1973. Pyrethrum, the natural insecticide. En: Cassida, J. E. (ed.). Pests and insecticides. Academic Press, Nueva York. p. 3-15.

Moore, J. B. y Levy, L. W. 1975. Pyrethrum flowers. En: Nelson, R. H. (ed.). McLaughlin Gormley King Co., Minneápolis, MN, E.U. p. 1-9.

Parlevliet, J. E. 1975. Breeding pyrethrum in Kenya. Pyrethrum Post 13 (2):47-54.

Roest, S. 1976. Flowering and vegetative propagation of pyrethrum in vivo and in vitro. Centre of Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen, Holanda.

Trease, G. E. y Evans, W. C. 1983. Pharmacognosy. 12 ed. Baillière Tindall, Londres.

Digitized by Google

Capítulo 30

Pruebas de detección de virus, viroides y organismos fitopatógenos sistémicos aplicadas al cultivo de tejidos

S. F. Nome*

Agradecimientos

A la Ing. Agr. Delia M. Docampo, al Dr. Bernardo Latorre y a la Biol. Graciela Laguna por la revisión crítica del manuscrito. A Juliana Prósperi por los trabajos fotográficos y a Graciela Vega por los trabajos de preparación mecanográfica.

* Instituto de Fitovirología, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Córdoba, Argentina.

Digitized by Google

Conceptos Básicos

Un principio de patología vegetal señala que las especies multiplicadas vegetativamente durante muchos años se infectan sistémicamente con uno o varios patógenos, en especial virus o agentes similares (Nyland, 1968). No todos los virus producen síntomas definidos en sus hospedantes, por lo cual, en muchas circunstancias, las enfermedades pasan inadvertidas o son difíciles de evidenciar; en consecuencia, es posible que el daño económico o las pérdidas originadas por la enfermedad no sean percibidas. Una moderada reducción del número o del tamaño de frutas, raíces o tubérculos, o la disminución de la vida productiva de la planta probablemente no se notan o se atribuyan a factores culturales o ambientales, especialmente si todas las plantas del cultivo están infectadas de modo uniforme y no existen ejemplares sanos para compararlas.

Un método para controlar las virosis que afectan las especies de propagación agámica consiste en establecer programas de producción, multiplicación y distribución de material vegetal libre de virus, de sanidad controlada, o libre de patógenos específicos. Este mismo método es válido para todos los patógenos que son sistémicos en sus hospedantes, como los hongos y las bacterias que invaden los tejidos de conducción.

Las técnicas empleadas para obtener el material madre o básico libre de patógenos son, principalmente, la termoterapia, la crioterapia, la quimioterapia, y el cultivo in vitro de meristemas apicales. Estas técnicas, que se pueden emplear individualmente o en combinación, se considerarán también en los Capítulos 11 y 36.

El material regenerado mediante cualquiera de esas técnicas debe ser probado para saber si ha sido eliminado el patógeno considerado (virus, viroides, bacterias, hongos, etc). Estas pruebas han sido denominadas 'indización' (indexing, en la literatura inglesa) y son de distinta índole según la combinación hospedante-patógeno; en algunos casos son específicas, es decir, referidas a un solo patógeno, y en otros permiten la detección simultánea de diferentes patógenos. No existe, sin embargo, una técnica que permita asegurar la ausencia de todos los virus que pueden infectar las plantas; de ahí que el término 'libre de virus' debe entenderse como libre de los virus conocidos o descritos, o bien libre de aquéllos que la prueba es capaz de evidenciar. Más aún, todos los métodos empleados están diseñados para detectar la presencia de patógenos en una planta; la ausencia de 'reacción' permite suponer que esa planta no los posee, y el rigor con que se repitan las pruebas y se alternen distintos métodos establecerá el grado de garantía con que se respalde la sanidad del material obtenido.

Digitized by Google

Los métodos de detección de virus y viroides son diferentes de los empleados para bacterias y hongos sistémicos y serán considerados por separado. Los virus se identifican mediante técnicas adecuadas; en cambio, los organismos que pueden ser aislados y cultivados in vitro se identifican por medio de prácticas comunes de microbiología. Las bacterias cuyo aislamiento aún no ha sido posible, como sucede con algunos *Mollicutes* (diversos micoplasmas), se detectan con técnicas empleadas en fitovirología.

Algunas de las pruebas que se describirán a continuación pueden realizarse a partir de fragmentos del material cultivado in vitro (hojas, tallos o trozos de callo). De obtenerse un resultado negativo, se puede inferir que el cultivo estudiado y toda su descendencia producirán plantas carentes de esos patógenos; en otros casos no es posible inferirlo porque se requiere tejido en mayor cantidad o de más consistencia, y porque las pruebas deben hacerse partiendo de plantas cultivadas en macetas. Si se prueba que esas plantas están libres del patógeno, pueden emplearse como plantas madre para proceder a multiplicarlas por el método más conveniente.

Los métodos señalados en la literatura han sido aplicados, generalmente, a situaciones específicas, es decir, para detectar un determinado patógeno en un hospedante. Por ello resulta inadecuado intentar una clasificación de los mismos. Parece más indicado hacer una descripción de las principales técnicas empleadas y luego dar algunos ejemplos de su empleo, referidos a diferentes especies de plantas y a patógenos de distintos tipos como virus, viroides, bacterias y hongos (Cuadro 30.1).

Detección de Virus

Los métodos de detección de virus van, en orden de complejidad, desde la simple observación de síntomas, su trasmisión y el empleo de hospedantes diferenciales, al serodiagnóstico y la visualización del patógeno en el microscopio electrónico. El empleo de una u otra técnica dependerá de las posibilidades de cada laboratorio, del tipo de patógeno, y del número de plantas que sea necesario estudiar.

Selección visual

Se basa únicamente en la observación de síntomas para eliminar las plantas con manifiesta infección viral. Es un método muy impreciso e induce a frecuentes errores ya que en ocasiones se eliminan plantas que,

Digitized by Google

Cuadro 30.1. Los elementos de una prueba de detección de virus: hospedante, método, planta indicadora y patógeno.

Hospedante	Patógeno[a]	Método[b]	Planta indicadora	Referencias
Citrus sinensis	*S. citri*	ELISA	—	Remah et al., 1981
(naranjo y otros cítricos)	CTV	ELISA	—	Clark et al., 1977a Bar-Joseph et al., 1979a
Chrysanthemum morifolium	ChSV	IC	*Chrysanthemum morifolium* cv. Blanche	
(crisantemo)	ChMV	IC	*Ch. morifolium* cv. Fanfare	
	ChCMV	IC	*Ch. morifolium*	
	ChTAV	TM	*Nicotiana tabacum* Samsum	Ben-Jacob et al., 1973
	ChVB	ELISA		Koenig et al., 1979
		TM; ME	*Petunia hybrida*	Hollings, 1972
Dianthus caryophyllus;	CaMV	ELISA	-	
		TM	*Chenopodium quinoa*	Devergne et al., 1982
Dianthus barbatus	CaRSV	TM; S	*Ch. amaranticolor*	
(clavel)	CaVMV	TM	*Ch. amaranticolor*	
	CaERV	TI	*Dianthus caryophyllus* cv. Joker	Houten et al., 1968
	CaLV	TM; S	*Ch. amaranticolor*; *Ch. quinoa*	
Fragaria x *ananassa*	SMV	TI	*Fragaria vesca* UC-5	
(frutilla, fresa)	SMYV		*Fragaria vesca* UC-6	
	SVBV		*F. virginiana* UC-10	Frazier, 1974a y 1974b
	SCV		*F. virginiana* UC-11	
	SLCV		*F. virginiana* Alpine	

(Continúa)

Digitized by Google

Cuadro 30.1. Continuación.

Hospedante	Patógeno[a]	Método[b]	Planta indicadora	Referencias
Ipomoea batatas (batata, camote)	SPVMV	TI	*Ipomoea setosa*	Nome et al., 1980a
	SPFMV	TI	*I. setosa*	Alconero et al., 1975
Manihot esculenta (yuca)	CsXV	ELISA, dsRNA	—	Nolt, B. y Pineda, B. (CIAT, comunicación personal)
	CMV	TI, dsRNA	*M. esculenta*	idem
	FSD	SV, TI	*M. esculenta*	idem
	CCMV	ELISA, dsRNA	—	idem
	ACMV	TM, ELISA, HAN	*N. benthamiana*	idem
Persea americana (palta)	ASBV	TI	*Persea americana* cv. Collinson	Graça et al., 1981
	ASBV	HAN	—	Palukaitis et al., 1981
		EGP		Utermohlen et al., 1981
Prunus spp. (duraznero, almendro, cerezo, ciruelo, etc.)	PRSV	TI; ELISA; TM	*Prunus serrulata* cv. Shiro fugen	
			Cucumis sativus	Barbara et al., 1978
	PDV	TI; TM	*Momordica balsamina*	Fridlund, 1976
	PLPV	TI; TM	*Prunus hybridus* cv. Schiroplum	Nyland et al., 1976
	ChLRV	S; TM	*Nicotiana tabacum* cv. White Burley	Cropley et al., 1971
Saccharum spp. (caña de azúcar)	SucMV	S; TM	*Sorghum bicolor* cv. Atlas	Pirone, 1972

(Continúa)

Digitized by Google

Cuadro 30.1. Continuación.

Hospedante	Patógeno[a]	Método[b]	Planta indicadora	Referencias
Solanum tuberosum (papa)	PVA, PVM	SV; S	*Chenopodium amaranticolor*	Salazar, 1982
	PVS, PVX	TM	*Physalis floridana*	Fernández-Valiela, 1969
	PVY, PVT	ELISA	*Gomphrena globosa*	Casper, 1977
	PLRV, APLV	TM	*Nicotiana debneyii*	Wooster, 1981
		ME	*N. clevelandii*	Jones, 1981
				Stace-Smith et al., 1968
				Wetter, 1972
	PSTV	TM; HAN; EG	*Lycopersicon esculentum*	Salazar, 1982
Vitis vinifera (vid)	GFLV	TM; TI	*Chenopodium amaranticolor*	Hewitt et al., 1970
			C. quinoa; Vitis vinifera	
			V. rupestris	
		ELISA		Ramsdell et al., 1979
	Nepovirus	TM	*Ch. quinoa*	Vetten, 1981
	PDB	ELISA	-	Nome et al., 1980b

a. El nombre completo del patógeno figura en el Apéndice C.
b. TI = trasmisión a planta indicadora mediante injerto; TM = trasmisión mecánica a plantas indicadoras; SV = observación de síntomas; HAN = hibridación de ácidos nucleicos; ME = observación al microscopio electrónico; IC = injerto de callo en planta indicadora; S = cualquier método serológico a excepción de ELISA; EG = electroforesis en gel; EGP = electroforesis en gel de poliacrilamida; ELISA = prueba inmunoenzimática (enzime-linked immunosorbent assay); dsRNA = prueba del ARN de doble hebra.

Digitized by Google

por efecto de tratamientos previos en el medio de cultivo o por causa del ambiente, presentan anormalidades fisiológicas reversibles. A la inversa, debido a los fenómenos de enmascaramiento de síntomas o de recuperación temporal, o por acción de los llamados virus latentes, es posible conservar plantas que efectivamente estén infectadas.

Sin embargo, es éste un método de detección de patógenos empleado con éxito en algunos cultivos, cuando no se han implementado otras técnicas más refinadas. Por ejemplo, el virus del estriado amarillo del ajo (Garlic Yellow Stripe Virus) induce en ciertos cultivares de ajo síntomas conspicuos, principalmente en condiciones de baja temperatura; en casos como éste, el conocimiento de la especie, del virus, y de la enfermedad permiten asegurar cierta confiabilidad al método (Nome et al., 1981).

Empleo de hospedantes indicadores

Algunos virus pueden ser trasmitidos a plantas indicadoras por medio del jugo infeccioso extraído de plantas enfermas; ésta es la prueba más simple y más fácil de realizar. La técnica se conoce como 'trasmisión mecánica' y consiste en tomar un fragmento de la planta que se desea probar (de las hojas nuevas, de los elementos florales, o de las raíces) y macerarlo en un mortero agregando un tampón (buffer) adecuado (generalmente fosfato 0.01-0.05 M de pH 7.0) y otros preservativos químicos apropiados. El material macerado se filtra a través de gasa y se aplica suavemente sobre las hojas de las plantas indicadoras que han sido previamente espolvoreadas con un abrasivo como Carborundum 400-600 o Corundum. La aplicación del extracto puede hacerse con los dedos, con espátulas de vidrio, con pincel, con gasa, o con cualquier elemento apropiado.

Las hojas inoculadas se lavan inmediatamente o se secan con papel filtro o con toalla de papel. La penetración del virus es instantánea en las células heridas por el abrasivo y el efecto del lavado es simplemente eliminar residuos que puedan obstaculizar la observación posterior de los síntomas. Las plantas se observan durante varios días hasta constatar la aparición de los síntomas propios de la infección viral. Cuando éstos se manifiestan como lesiones en el lugar de la inoculación, ya sea del tipo necrótico o clorótico, suelen presentarse entre los 4 y 10 días posteriores a la inoculación; cuando los síntomas esperados son del tipo sistémico (mosaico, deformaciones en las hojas, ampollas, etc.) su aparición es más lenta: suele demorar de una a varias semanas en las plantas herbáceas y de varios meses a años en las plantas leñosas. Las plantas que se usan como indicadoras

Digitized by Google

son o bien variedades muy susceptibles de la misma especie estudiada o bien otras especies que desarrollan síntomas característicos en el menor tiempo posible (Cuadro 30.1). Los síntomas inducidos en las especies indicadoras ayudan a identificar el virus involucrado (o más de uno, si los hay).

El injerto en plantas indicadoras apropiadas permite detectar virus que no son trasmisibles mecánicamente o aquéllos que son difíciles de trasmitir por la presencia de inactivadores o inhibidores virales en las plantas hospedantes. Los injertos pueden hacerse entre plantas herbáceas, o entre herbáceas y leñosas, y no es necesario, aunque sí conveniente, que el injerto prenda de modo permanente. El contacto entre los tejidos del injerto y del portainjerto debe ser suficiente para permitir el paso del virus de uno a otro. Los métodos más comunes incluyen el injerto de púa, de yemas, de trozos de corteza, la aproximación de tallos con diversas formas de empalme, y en algunos casos, la aproximación de pecíolos de hojas. Las plantas indicadoras adecuadas para detectar los virus en las especies más estudiadas (papa, frutilla, batata, yuca, ornamentales, frutales, etc.) se encuentran ampliamente descritas en la literatura. No obstante, cualquier variedad o especie que exhiba buenos síntomas, según la experiencia particular de cada investigador, puede ser empleada exitosamente como indicadora.

Métodos serológicos

Una gran variedad de métodos se emplean en la detección e identificación de virus y bacterias fitopatógenos. Todos se basan en la alta especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo, en la cual un anticuerpo reconoce y se combina sólo con la porción de antígeno que le dio origen (p. ej., secuencia de aminoácidos de una proteína) o con otra muy semejante. La mayoría de los virus poseen proteínas que son inmunogénicas, es decir, que inyectadas en un animal de sangre caliente estimulan la producción de anticuerpos. El suero de la sangre que contiene anticuerpos se denomina 'antisuero' o 'suero-anti' y al mezclarlo con su antígeno respectivo produce reacciones que se pueden visualizar de diferentes maneras. Esta es la base del serodiagnóstico.

Los diferentes métodos serológicos poseen características que limitan su empleo cuando se dan determinadas condiciones. Los de más amplia aceptación —que describiremos a continuación— son los de difusión en agar, de microprecipitación, de floculación de látex sensibilizado, y los inmunoenzimáticos (ELISA). Algunas consideraciones generales, aplicables a cualquiera de ellos, se refieren a la forma de procesar la muestra que

Digitized by Google

contiene el probable antígeno (jugo de la planta infectada), al empleo de controles o testigos adecuados, y a las diluciones con que se empleen tanto el antígeno como el suero-anti (Ball, 1974; Shepard, 1972).

- El jugo de la planta se obtiene por maceración del fragmento vegetal en mortero o por medio de cualquier prensa adecuada. Se denomina 'jugo crudo' si tan sólo se filtra el macerado en una gasa. Este jugo contiene restos de pared celular, epidermis, cloroplastos, etc. En cambio, se dice que el extracto está 'clarificado' si se eliminan esos elementos por centrifugación (3,000g a 10,000g) durante 5 a 15 minutos. De los métodos aquí señalados, sólo el de microprecipitación requiere el empleo de jugo clarificado, que es optativo para el de floculación de látex.
- En todas las pruebas es imprescindible incluir como testigos extractos de plantas enfermas y sanas de la misma especie, obtenidos en forma idéntica que los de las muestras que se estudian. Estos dos testigos permiten establecer los límites de las reacciones positivas y negativas. Además, conviene incluir un control adicional correspondiente al 'suero normal', es decir, sueros sin anticuerpos específicos del antígeno que se está probando, obtenidos de un animal antes de inmunizarlo. Estos controles están destinados a evitar confusiones frente a reacciones no específicas, como las que ocurrirían con proteínas normales de la planta o con otros componentes del suero.
- Las reacciones en que ocurre una precipitación necesitan que tanto el antígeno como el anticuerpo se encuentren en proporciones equivalentes. Si éstas no se han determinado, conviene considerar más de una reacción por elemento reaccionante. El título de un antisuero es la máxima dilución del mismo que permite obtener reacciones frente a un antígeno determinado; la 'dilución de empleo' es aquélla que permite obtener reacciones fuertemente positivas en el menor tiempo posible. Ambas suelen indicarse en los antisueros que se comercializan o que se tipifican para un trabajo determinado.

Doble difusión en agar. Si se colocan el antígeno y el antisuero homólogo en celdillas enfrentadas hechas en un medio agarizado, se difunden en el medio a una velocidad determinada tanto por la concentración, la densidad, y la composición del agar como por ciertas propiedades de los elementos reaccionantes, como el tamaño y la forma del antígeno.

Cuando el antígeno y el anticuerpo se encuentran en proporciones equivalentes en el agar, se producen zonas de precipitación en forma de bandas o líneas. La prueba es aplicable a la identificación de virus, partiendo de savia cruda o clarificada o de virus purificado. No hay inconveniente en el empleo de antisueros que reaccionen con proteínas normales

Digitized by Google

de la planta dado que, en general, las líneas de precipitación que producen no coinciden con las del virus.

El medio para realizar la prueba se obtiene fundiendo agar en una solución salina (NaCl 0.85%) o en cualquier tampón apropiado (TRIS, PBS) con pH cercano a la neutralidad, que además contenga azida sódica al 0.2% como biocida. El agar debe ser de extrema pureza por lo cual se suele emplear Oxoid Ionoagar no. 2 o Agarosa en concentraciones de 0.5% a 0.9%. Una vez fundido el agar, ya sea en autoclave durante 15 minutos (Ionoagar) o en un plato caliente (Agarosa), se vierte en una caja Petri de plástico la cantidad suficiente para formar una capa de 2 mm de espesor (aproximadamente 12 ml para una caja de 100 mm de diámetro) y se deja solidificar sobre una superficie plana. Si no hay cajas de plástico, se emplean las de vidrio teniendo la precaución de recubrir su fondo con una sustancia hidrofóbica como el Formvar (0.1% a 1% en cloroformo) a fin de evitar que las gotas escurran entre el agar y el vidrio (Ball, 1974).

El gel de agar forma poros de tamaño variable según la concentración y el tipo de agar empleado. En muy bajas concentraciones (0.3%) forma poros de alrededor de 780 nm (Aekers et al., 1962) que permiten la difusión de virus alargados hasta de 650 nm. En una concentración del 1%, se difunden en el gel virus poliédricos de alrededor de 30 nm. En concentraciones intermedias permiten el desplazamiento de virus de tamaños intermedios (Noordam, 1973); aquéllos de partículas mayores, como los pertenecientes al grupo de los Potyvirus, deben ser degradados a unidades menores o directamente a subunidades proteicas antes de ser probados por este método (Shepard, 1972). Organismos como las bacterias del xilema deben ser desintegrados mediante ultrasonido para permitir la difusión en agar de los diversos compuestos antigénicos que poseen.

Las celdillas se marcan con un sacabocados o con moldes preparados para este propósito, y el agar sobrante se retira mediante succión con pipeta. La forma más frecuente de celdilla es la circular; en ésta, una celdilla de 4 a 8 mm de diámetro está rodeada de otras, en número variable, de igual o menor diámetro (4 a 6 mm). Generalmente, la celdilla central se emplea para colocar el antisuero y las periféricas para las muestras de antígenos. La distancia comúnmente empleada entre celdillas de antisueros y antígenos es de 4 a 5 mm, medida entre los bordes más cercanos de ambas. Los reactivos se colocan con jeringas provistas de agujas finas o bien con pipetas de punta fina, evitando esparcir los reaccionantes sobre el agar. La caja Petri se debe mantener en una cámara húmeda durante una o dos semanas y las observaciones se hacen diariamente. Es conveniente observar las bandas o líneas que se formen en una habitación oscura, sobre

Digitized by Google

un fondo negro, y con luz indirecta emitida desde abajo por un tubo fluorescente circular o por una lámpara puntiforme (Figura 30.1, A).

Microprecipitación. Esta prueba se realiza en cajas Petri plásticas, o en cajas de vidrio recubiertas con Formvar (0.1% a 1.0 % en cloroformo) u otra sustancia hidrofóbica; en ellas se colocan y se mezclan pequeñas gotas de antisuero y antígeno en diversas concentraciones. Las gotas se recubren totalmente con un aceite mineral liviano (p. ej., vaselina líquida) y se observan después de dos horas a temperatura ambiente —y al día siguiente, si se las mantiene a baja temperatura— para detectar la presencia de un precipitado. Debe emplearse un extracto clarificado, ya sea por centrifugación o mediante el empleo de solventes orgánicos como cloroformo, éter o butanol; en este último caso es conveniente dializar el extracto clarificado para remover cualquier residuo de solvente.

En este procedimiento es conveniente dibujar con lápiz de cera en el fondo de la caja Petri un reticulado para demarcar la ubicación de las gotas; la dimensión de los cuadrados dependerá del tamaño de la gota que se pueda obtener. En cada cuadrado se coloca una pequeña gota de antisuero en la concentración que se ha establecido previamente como óptima, y a su costado una de antígeno. Las gotas del antígeno (jugo de la planta) corresponden a una serie de diluciones efectuadas previamente. Como se indicó antes, se mezclan las gotas, se cubren con aceite mineral o vaselina líquida, y se dejan en incubación para hacer las lecturas. La observación se puede hacer al microscopio en campo oscuro con 50X o con una lupa iluminada desde abajo. Es muy importante incluir los testigos sanos y enfermos con el fin de comparar reacciones positivas y negativas. Los precipitados obtenidos por esta prueba difieren según el tipo de virus: en los de partículas alargadas, el precipitado aparece en forma de nubes; en los icosahédricos, en cambio, es granular. En algunos casos se observan precipitados no específicos, generalmente de fosfato de calcio, cuando se emplean plantas con altos contenidos de calcio; este resultado puede evitarse precipitando el calcio con un exceso de fosfato u oxalato de calcio antes de la clarificación por centrifugación (Noordam, 1973; Ball, 1974).

Floculación de látex sensibilizado. Este método es semejante al de microprecipitación con la diferencia de que emplea partículas de látex de tamaño uniforme (Látex 0.81 μ, Difco Laboratories, y Colab Laboratories Inc.) recubiertas por los anticuerpos correspondientes al virus que se determinará. La sensibilización del látex se realiza mezclándolo con la gammaglobulina purificada del antisuero. Al ponerlas en contacto con el antígeno respectivo, las partículas de látex se agregan originando precipitados visibles a simple vista o con microscopio (Figura 30.1, B). Este

Digitized by Google

método es 100 a 1000 veces más sensible que el de microprecipitación. Los detalles de su implementación se describen en el ejemplo B., en la sección **Aplicaciones** al final de este capítulo.

Pruebas inmunoenzimáticas (ELISA). La prueba inmunoenzimática ELISA ('enzime-linked immunosorbent assay') es de gran sensibilidad y permite detectar cantidades pequeñísimas de antígeno, o de anticuerpos, en situaciones en que la mayoría de los otros métodos serológicos fracasan. Además, permite el análisis simultáneo de un gran número de muestras. Fue desarrollada en 1971 para emplearla en medicina y adaptada en 1977 a la patología vegetal, en especial para la detección de virus en plantas.

La prueba se basa en que tanto el antígeno como el anticuerpo pueden acoplarse (conjugarse) a una enzima sin que pierdan antigenicidad o capacidad de reacción enzimática. Existen varias versiones de la prueba, pero la más común en fitopatología, en especial tratándose de virus de plantas, es la llamada 'sandwich de anticuerpos' (Clark et al., 1977b). La prueba se realiza sobre soportes sólidos de diversos tipos siendo los más empleados las placas o cajas de plástico de microtitulación que, en un modelo común, poseen 96 celdillas con fondo plano o en forma de U. El primer paso consiste en recubrir (sensibilizar) la superficie de las celdillas del plato con una capa de anticuerpos; para ello, en cada una se coloca una alícuota de gammaglobulina purificada de un determinado antisuero. El plástico adsorbe pasivamente los anticuerpos en forma irreversible; para eliminar el exceso no adsorbido, se lava el plato con un bófer de fosfato salino (PBS) que contiene además un detergente no iónico. Se procede, en una segunda etapa, a colocar la muestra problema (el antígeno) que en este caso es el jugo de planta que se analiza; si en este jugo existe el antígeno específico que originó los anticuerpos adsorbidos, se producirá la unión antígeno-anticuerpo. Se lava nuevamente el plato para eliminar el exceso de jugo y de antígenos y se procede, en una tercera etapa, a agregar los mismos anticuerpos usados en la primera pero conjugados con una enzima; si el antígeno ha sido fijado, el conjugado se le unirá completando el 'sandwich' de anticuerpos. Las enzimas que se emplean con más frecuencia en esta prueba son la fosfatasa alcalina y la peroxidasa.

La última etapa de la prueba consiste en la adición del sustrato. Cuando en las etapas anteriores se ha logrado establecer la cadena 'anticuerpo-antígeno-conjugado', la enzima del conjugado actuará sobre el sustrato modificando su color y señalando una reacción positiva. En el caso de la fosfatasa alcalina, el sustrato usado es p-nitrofenilfosfato que, por hidrólisis, da un compuesto de color amarillo que presenta un pico de absorción en 405 nm. La intensidad del color es un índice de la cantidad de antígeno

Digitized by Google

presente en la muestra; la lectura final se puede realizar a simple vista o midiendo la absorbancia en un fotómetro calibrado a 405 nm (Figura 30.1, C). Como se ha recomendado para otros métodos, es importante incluir una muestra con el antígeno o control positivo (virus o antígeno purificado, jugo de la planta enferma) y un testigo correspondiente al jugo de la planta sana o control negativo. Estos testigos permiten seguir la marcha de la reacción y detectar las anormalidades que pudiesen presentarse.

Las enzimas que se empleen deben ser suficientemente estables, de gran capacidad de reacción, y fáciles de conseguir; además, deben actuar sobre un sustrato de características parecidas, que dé origen a un producto final de color diferente. La gran sensibilidad del método se basa, justamente, en el efecto amplificador de estas enzimas que en pequeñas cantidades son capaces de modificar una gran cantidad de sustrato.

Considerando que ELISA es un método cuantitativo, técnicamente todas las muestras que den una coloración más intensa que el control negativo debieran ser positivas; sin embargo, se considera también que hay variación en los valores de absorbancia de los controles negativos, y por ello se han hecho varias sugerencias para establecer el límite entre negativo y positivo. En una de ellas se propone emplear el doble de la desviación estándar de los controles sanos; en otra, emplear el doble del promedio de estos controles o bien agregar 0.05 a ese promedio.

Teniendo en cuenta que este método es uno de los de mayor valor en la detección de virus de plantas, los detalles de su manejo se indican en la sección **Aplicaciones** de este capítulo.

Microscopía electrónica

La microscopía electrónica constituye un recurso valiosísimo en la detección de virus y *Mollicutes* (*Micoplasmas* y *Syproplasmas*) en plantas. Se puede emplear en cualquier etapa del cultivo in vitro de tejidos, desde el incipiente desarrollo de un explante hasta la planta desarrollada fuera del medio de cultivo.

Las técnicas en uso y su grado de complejidad son variados; por tanto, su elección estará directamente condicionada por las posibilidades técnicas del laboratorio. La ausencia de un microscopio electrónico en el sitio de trabajo no es un factor limitativo porque los 'preparados' se pueden enviar a otro centro que posea el microscopio.

Digitized by Google

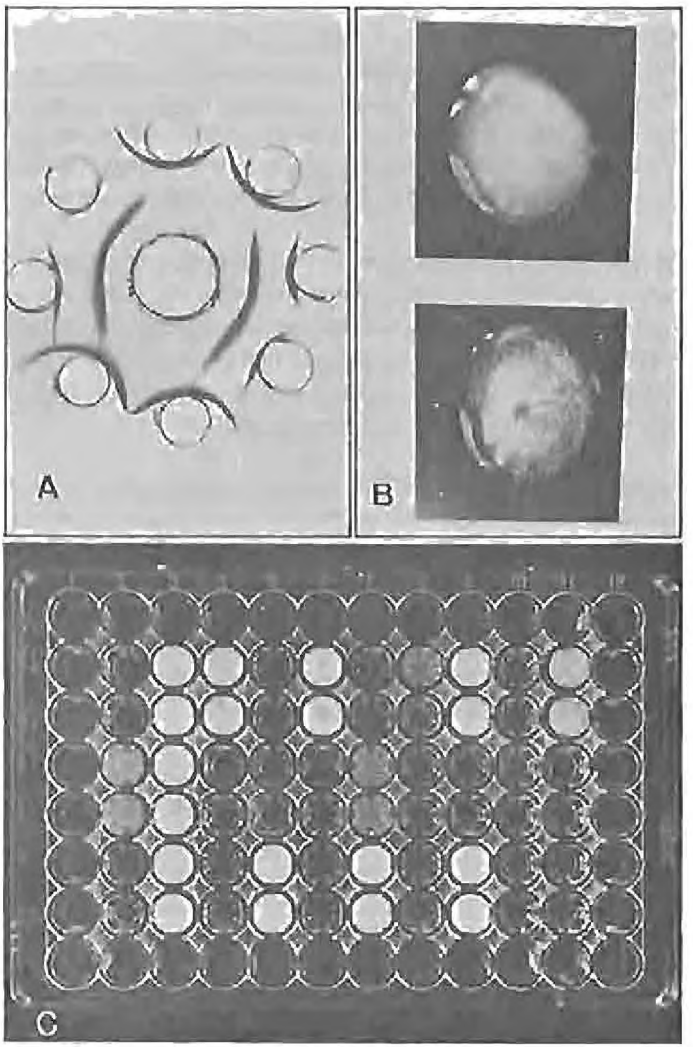


Figura 30.1 Pruebas serológicas empleadas frecuentemente para la detección de virus. A) *Doble difusión en agar*. la celdilla central contiene antisuero y las externas el extracto vegetal; las líneas oscuras corresponden al precipitado de la reacción antígeno-anticuerpo. B) *Floculación de látex*: la gota superior muestra el látex distribuido homogéneamente, lo que corresponde a una reacción negativa; en la gota inferior el látex ha floculado indicando una reacción positiva (Foto: Salazar, 1980). C) *ELISA*. placa de micro-ELISA en la que se observan reacciones positivas (blancas o grises en la foto) y negativas (negras, o trasparentes sobre el fondo negro). las celdillas externas no han sido utilizadas en la prueba

Digitized by Google

De las técnicas más generalizadas cabe mencionar la observación de partículas virales en extractos vegetales ('dip method'), la inmunoelectromicroscopía (IEM) con sus variantes, y los cortes ultrafinos de tejidos vegetales donde se observan, ya sea el patógeno directamente o ya las anomalías citológicas (inclusiones virales y efectos citopatológicos) que son una secuela de la presencia de aquél.

El material elegido para estudio debe someterse a distintos procesos que lo ponen en condiciones de ser observado al microscopio electrónico ofreciendo una visión adecuada de viriones y componentes celulares. Asimismo, es necesario un adecuado 'soporte' o porta-espécimen para lograr un buen preparado. La preparación del soporte y del espécimen se describen a continuación de manera resumida.

Básicamente, se emplean como portaespecímenes pequeñas rejillas de metales no magnéticos como cobre, níquel, oro y otros. Las más comunes son de cobre, tienen forma circular con 3 mm de diámetro, y un reticulado de malla 300.

El montaje del espécimen requiere a veces que se cubra la rejilla con una fina película trasparente a los electrones, que ayude al sostén del material y a su visualización. Por lo común, las coberturas se hacen con los siguientes materiales: a) nitrocelulosa en solución (Colodión, Parlodión, Necolordine, etc.); b) formaldehídos polivinílicos (Formvar); c) deposición de carbón evaporado; d) una combinación de los anteriores.

Las películas de Colodión se preparan dejando caer una o dos gotas de Colodión disuelto al 2% en acetato de amilo, sobre una superficie de agua muy limpia: la solución se esparce sobre la superficie, el solvente se evapora, y queda flotando una película de Colodión. De varias maneras se coloca esa película sobre las rejillas; la más simple consiste en tomar la rejilla con una pinza, sumergirla en el agua por debajo de la película y, con un movimiento rápido, levantarla con el fin de que aquélla quede adherida a la superficie de la rejilla. La desventaja del Colodión es su debilidad frente al bombardeo de electrones; por ello, en algunos casos conviene remplazarlo por Formvar o reforzarlo con una fina capa de carbón. Los detalles de estos procedimientos pueden consultarse en diversos textos (Kado y Agrawal, 1972; Noordam, 1973).

Preparados a partir de extractos vegetales. Las suspensiones virales pueden obtenerse de exudados celulares obtenidos de cortes de tejidos frescos, de trozos de callos, o de estrías de epidermis. Una forma simple de visualizar los viriones es el método de inmersión ('dips'), propuesto por Brandes en 1957 y mejorado con las variantes y modificaciones introducidas desde esa fecha. Consiste, básicamente, en colocar una gota de agua o

Digitized by Google

de alguna solución sobre un portaobjeto limpio y tocar su superficie con la zona recién cortada de un tejido vegetal fresco, durante unos segundos; de este modo, el contenido de las células rotas fluye hacia la gota de agua y los viriones quedan en suspensión. Se toma una rejilla, ya cubierta con una película, y se toca con ella la superficie de la gota permitiendo que la suspensión adhiera a la película; se retira luego el exceso de líquido y se deja secar la rejilla al ambiente, protejida del polvo.

Los virus son relativamente trasparentes a los electrones y para visualizarlos eficazmente deben contrastarse con átomos de algún metal pesado. Las técnicas más empleadas, y aplicables al trabajo con plantas, son la de 'tinción negativa' y la de 'sombreado'; este último estaba muy difundido antes de que se propusiera la tinción negativa. El sombreado consiste en cubrir los viriones con una capa de un metal denso a los electrones como el paladio, el tungsteno, el platino, el oro, o el uranio. El proceso se realiza vaporizando esos metales en el interior de cámaras de alto vacío, de modo que los átomos proyectados se depositen sobre las partículas virales, cubriéndolas parcialmente. De esta manera se las puede visualizar y reconocer sin inconvenientes (Milne, 1972).

La tinción negativa ('dips') consiste en colocar el extracto celular en una solución de un metal pesado como el tungsteno, el molibdeno, o el uranio. Se han probado diferentes derivados de esos metales, pero los virólogos prefieren emplear el fosfotungstato de potasio, el molibdato de amonio, el silicotungstato de sodio, el acetato de uranilo, o el formiato de uranilo. De ellos, el más común es el fosfotungstato de potasio (KPT); se emplea en solución acuosa al 1%-2%, de pH 6.5-7.0 o en bófer de acetato de amonio 0.1 M, de pH 6.5 a 7.0. Sobre una rejilla previamente cubierta con Colodión u otra película se vierte una gota de KPT; flotando sobre su superficie se coloca un pequeño trocito de epidermis o del tejido que se estudia y se deja allí de 1 a 5 minutos. También se puede proceder a la inversa: sobre una gota colocada en un portaobjeto se rompen células del tejido que se observará y se deja flotar la rejilla en la gota de modo que la cara cubierta por la película quede en contacto con la superficie de la gota. Se toma luego la rejilla con una pinza de punta fina y se le retira el exceso de líquido, absorbiéndolo por uno de sus costados con un trozo de papel de filtro. Finalmente, se deja secar la rejilla y se observa.

La tinción negativa permite que el metal pesado se infiltre en las depresiones, intersticios y orificios de los viriones a medida que la solución se deshidrata. Al observar la muestra al microscopio electrónico aparecen oscuras las zonas donde se concentró el metal y claras las zonas de menor densidad (protuberancias), lo que da origen a una imagen 'negativa' del

Digitized by Google

espécimen. En la detección de virus en cultivos de tejidos, estos métodos se deben emplear con precaución, ya que los virus que se encuentren en baja concentración pueden no ser detectados.

Inmuno-electromicroscopía. Hay varios métodos que combinan las ventajas de la microscopía electrónica y del serodiagnóstico; en uno de ellos se emplean rejillas cuyo soporte ha sido cubierto con una capa de anticuerpos específicos al virus que se pretende detectar. El método fue originalmente publicado por Dervick en 1973 y ha sido denominado de diversas maneras: 'método Dervick', 'rejillas activadas con anticuerpos', 'microscopía electrónica serológicamente específica' (serologically specific electron microscopy, SSEM), y 'microscopía electrónica de inmunoadsorción' (immunosorbent electron microscopy, ISEM). Este último es probablemente el nombre más adecuado y se empleará en este capítulo al describir la técnica (Milne, 1980).

La técnica consiste en adsorber anticuerpos a la película soporte que se emplea para 'atrapar', en forma específica, cualquier partícula viral serológicamente relacionada. De esta manera se puede aumentar la sensibilidad hasta 10,000 veces en relación con las rejillas no tratadas.

Se necesitan dos etapas de incubación: a) para adsorción de los anticuerpos a la rejilla, y b) para adsorción del virus a los anticuerpos. En ambas etapas se pueden emplear períodos cortos [5 min para a) y 15 min para b)] o largos [1/2 h a 3 h para a) y hasta 70 h para b)]; la elección depende de la necesidad de un diagnóstico rápido o de una mayor precisión. Se recomienda emplear rejillas cuyas coberturas de carbón sean recientes. El antisuero debe emplearse en diluciones equivalentes al título para pruebas de difusión en agar o de precipitación en portaobjetos, si el título es de 1/1024 o mayor; si es menor que este valor, la dilución puede llevarse al doble del título. Las diluciones se hacen con bófer de fosfato 0.1 M, pH 7.0, o bien en Tris, veronal, o cacodilato. La temperatura de incubación puede variar entre 4 y 37 °C, aunque en general se prefieren temperaturas bajas para evitar problemas de evaporación o de interacción electrolítica con el metal de la rejilla. Los pasos que se siguen para aplicar la técnica son:

1) Colocar pequeñas gotas de antisuero diluido sobre trozos de 'Parafilm', en cajas Petri humedecidas. Incubar las rejillas durante 30 minutos haciéndolas flotar sobre las gotas por la cara cubierta por la película.

2) Enjuagar la cara húmeda de la rejilla (manteneniendo la otra cara seca) con 20 gotas consecutivas de tampón (bófer) de fosfato 0.1 M, de

Digitized by Google

pH 7.0; eliminar luego el exceso con papel de filtro evitando que la rejilla se seque.

3) Colocar la rejilla por la cara sensibilizada sobre una gota del extracto que puede contener el virus, durante varias horas (p. ej. durante la noche) a baja temperatura.

4) Enjuagar, igual que en en el paso 2), con 30 gotas de agua destilada.

5) Enjuagar con 6 gotas de acetato de uranilo disuelto en agua al 2%, para proporcionar contraste, y retirar luego el exceso con papel de filtro. Dejar secar y observar al microscopio electrónico.

Estudio de cortes ultrafinos. Los cortes ultrafinos permiten observar las partículas virales en las células, así como los efectos citopatológicos que son consecuencia de la infección viral. En este último caso, las anormalidades citopatológicas (p. ej., la deformación de cloroplastos o membranas, la presencia de inclusiones, etc.) son suficientes para confirmar la infección viral. Los cortes se pueden preparar con material procedente de cualquier etapa del cultivo de tejidos o de plantas establecidas en tierra.

El método es costoso y se justifica su empleo sólo cuando otras técnicas han resultado dudosas y cuando se trata de relaciones hospedante-patógeno suficientemente documentadas que facilitan el reconocimiento de los efectos citopatológicos. Sin embargo, es un elemento valiosísimo para asegurar la presencia de ciertos patógenos como los micoplasmas. Los detalles y los procedimientos para aplicar esta técnica escapan al objetivo de este trabajo y pueden consultarse en Kado y Agrawal, 1972.

Observación de inclusiones virales en el microscopio de luz

Uno de los cambios específicos más espectaculares causados por la infección viral es la producción, en la célula, de pequeños cuerpos, llamados inclusiones, que difieren de las estructuras celulares normales. Estos cuerpos varían en forma y composición y pueden estar localizados en el núcleo o en el citoplasma. En términos generales, las inclusiones se clasifican como amorfas y cristalinas (Figura 30.2) y dentro de estos tipos hay variantes que en muchos casos, por sus características, permiten realizar un diagnóstico certero del virus (Rubio-Huertos, 1972; Edwardson, 1974). Las inclusiones pueden visualizarse directamente con óptica de contraste de fase o se tiñen para diferenciarlas de otros elementos celulares. Las inclusiones son abundantes en las células epidérmicas de hojas y tallos que

Digitized by Google

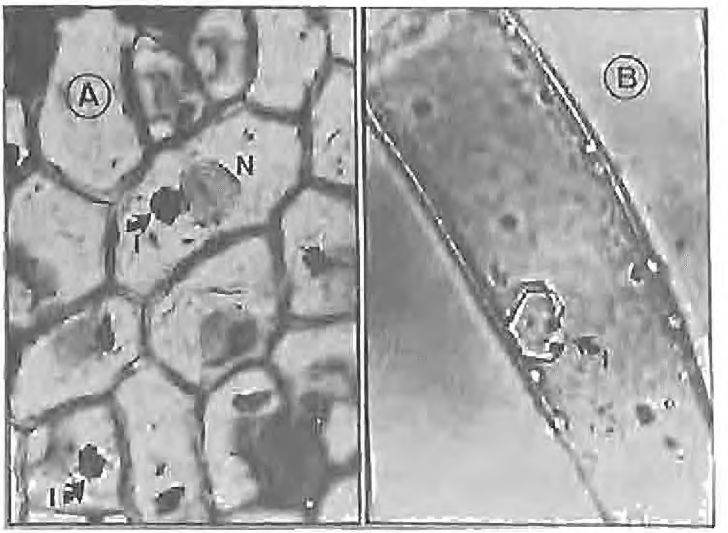


Figura 30.2. Inclusiones virales observadas con microscopio de luz. A) Tricoma de *Nicotiana tabacum* donde se observa una inclusión cristalina (I) del virus del mosaico del tabaco. B) Células epidérmicas de *Vicia faba* donde se observan inclusiones amorfas (I = inclusiones; N = núcleo).

muestren síntomas de la enfermedad. En consecuencia, este método permitiría discriminar los síntomas virales de aquéllos producidos por anormalidades fisiológicas. Las inclusiones se pueden observar en estrías epidérmicas obtenidas de hojas, en tricomas, o en cortes cuando no es posible extraer la epidermis o cuando las inclusiones están localizadas en otros tejidos.

Algunos de los colorantes empleados en métodos rápidos son 'Calcomine orange 2 Rs', 'Congo rubin', 'Luxol brilliant green Bl', 'Methyl green', 'Methylene blue chloride' y 'Phloxine'. Todos ellos pueden disolverse en una mezcla de 'Methyl cellosolve' al 1%, alcohol etílico de 95%, y agua, en la proporción 2:1:1 (Christie, 1967). Los detalles sobre el empleo de estas técnicas y los resultados obtenidos con ellas pueden consultarse en el trabajo de Rubio-Huertos (1972).

Detección de viroides por electroforesis

En el Centro Internacional de la Papa (CIP), además de las plantas indicadoras como tomate (*Lycopersicon esculentum*) y *Scopolia sinensis*,

Digitized by Google

se ha puesto en práctica un método electroforético para detectar el viroide del 'tubérculo ahusado de la papa', PSTV (Potato Spindle Tuber Viroid). Los viroides no se recubren de proteína y están constituidos únicamente por ácido nucleico (RNA) de bajo peso molecular. La mayoría de los métodos aplicados en forma rutinaria para la detección de virus (microscopio electrónico, serología) no son aplicables a los viroides y por ello es necesario 'visualizar' el RNA del viroide separándolo de los RNA de la planta mediante electroforesis. El procedimiento según Salazar (1982) incluye los siguientes pasos:

1) Extraer la savia de 0.5 g de tejido infectado con 1.5 ml de bófer de extracción (20 ml tetraacetato de etilenodiamino de sodio (EDTA) 0.1 M + 10 ml NH_4OH 4 M + 60 ml LiCl 10 M + 50 ml H_2O) y con 2 ml de fenol saturado que contenga 10% de m-cresol y 0.1% de 8-hidroxiquinolina. Agitar. Mantener los extractos en hielo.

2) Centrifugar el extracto a 9000*g* durante 10 minutos.

3) Extraer la fase acuosa y añadir dos volúmenes de etanol. Agitar la mezcla y almacenarla a -20 °C de 30 minutos a 1 hora.

4) Hacer sedimentar el ácido nucleico a 10,000 rpm durante 10 minutos; disolver el precipitado ('pellet') en 0.1 ml de agua destilada más una gota de sacarosa al 20% con azul de bromofenol.

Las muestras así procesadas se siembran en geles laminares ('slabs') de poliacrilamida y se someten a una corriente de 100 voltios durante 4 horas (a 12-15 °C) o hasta que el marcador (azul de bromofenol) haya migrado de 9 a 10 cm. Se tiñen toda la noche con azul de toluidina 0.1% o con azul de metileno y se destiñen con dos o tres cambios de agua corriente. El RNA del PSTV migra más lentamente que el 9S RNA y suele ubicarse en la mitad del camino recorrido por éste, junto con el 5S RNA. Su ubicación se hace por comparación con el testigo sano que siempre debe incluirse en la prueba.

Detección de Microorganismos Patógenos Vasculares

Al hacer un cultivo con explantes que poseen sistema vascular diferenciado (p. ej., ápices de estolones, yemas o meristemas apicales con varios primordios foliares), debe tenerse en cuenta la posibilidad de una infección sistémica por hongos y bacterias fitopatógenos, como ocurre con algunos

Digitized by Google

representantes de los géneros *Fusarium*, *Verticillum* y *Erwinia*. Esta situación es común al multiplicar especies ornamentales como helechos, *Dieffenbachia*, crisantemos, claveles, y otras especies. En algunos casos, la acidez del medio, acentuada por acción de las raíces de las plantas (p. ej., de *Dieffenbachia*) impiden que las bacterias presentes en el tejido vegetal se manifiesten visiblemente en el medio de cultivo; por ello, las plantas que allí crecen pueden estar infectadas.

Un método eficaz para detectar esas infecciones enmascaradas ha sido propuesto para *Dieffenbachia picta* 'Perfection' (Knauss, 1976) y puede adaptarse perfectamente a otras especies. El método consta de varios pasos que pueden resumirse de la siguiente manera (Figura 30.3). A una planta desarrollada en un medio de cultivo se le separa el tallo de la raíz, que es eliminada; el tallo se corta en secciones o discos de 0.5 a 1.0 mm de espesor, comenzando desde la porción basal y dejando intacto el ápice, que se siembra en un medio de enraizamiento para producir una nueva planta. Las secciones se dividen en grupos de cuatro, para sembrar cada una de ellas en cuatro medios diferenciales. La incubación se realiza durante 3 semanas, a una temperatura de 26 a 28 °C, en tubos agitados periódicamente para promover la aireación. El crecimiento de hongos o bacterias en cualquiera de los tubos significa la eliminación del ápice que se conservó para hacerlo arraigar. Si no se observa el crecimiento de organismos, la prueba se repite de igual modo con la planta derivada del ápice; si de nuevo hay resultado negativo, se hace una tercera prueba para decidir definitivamente sobre el destino de la planta resultante. Los cuatro medios de cultivo empleados son: a) Extracto de levadura, 10 gr; dextrosa, 10 gr; caldo de cultivo, 1 litro. b) 'Sabourad' Difco. c) 'Broth AC' Difco. d) Caldo 'Trypticase Soy' BBL.

Aplicaciones

A. Pruebas para detectar virus de frutilla (fresa)

Objetivo

Determinar la presencia de alguna de las siguientes enfermedades trasmisibles de la frutilla: 'mottle', 'veinbanding', 'crinkle', 'mild yellow-edge', 'tomato ring spot', 'pseudo mild yellow-edge', 'latent C' y 'leaf roll' (Frazier, 1974a y 1974b).

Digitized by Google

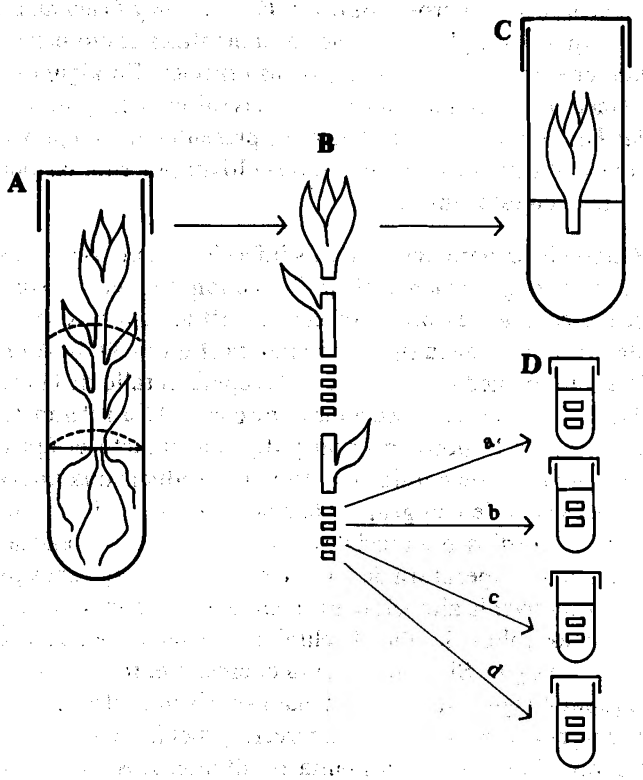


Figura 30.3. Esquema del método de detección de bacterias y hongos en plantas cultivadas in vitro (según Knauss, 1976).
A) Planta que ha adquirido un desarrollo adecuado para iniciar la prueba. B) La planta se retira del tubo y se secciona asépticamente en pequeños discos dejando intacto el ápice. C) El ápice se coloca en un tubo con medio para enraizamiento. La planta enraizada se somete al mismo proceso dos veces consecutivas. D) Los discos del tallo se siembran en cuatro medios de cultivo diferentes (a, b, c y d). Evaluación: si no se observa crecimiento de hongos o bacterias en los medios empleados después de repetir tres veces la prueba, se considera que la planta está libre de ellos. Si, por el contrario, hay crecimiento, en cualquiera de ellos, el cultivo y la planta se eliminan.

Materiales

- Plantas de frutilla obtenidas de cultivos de meristemas apicales o tratadas por termoterapia —o ambas cosas: cultivadas y tratadas— presuntamente libres de virus y micoplasmas.

- Plantas sanas y bien desarrolladas de las siguientes especies y clones:

Digitized by Google

a. de *Fragaria vesca*: clones UC-4, UC-5, UC-6;
b. de *Fragaria virginiana*: clones UC-10, UC-11 y UC-12;
c. de *Fragaria vesca* Alpine, provenientes de semilla.

El grupo mínimo que se inocula debe incluir por lo menos los clones UC-5, UC-11 y Alpine.

- Hojas de afeitar.

- Cintas de látex, 'Parafilm' o polietileno para atar los injertos.

Procedimiento

1) Elegir una hoja madura (de la mitad de la planta) que posea un pecíolo vigoroso. Separar el folíolo central preparándolo en forma de cuña, cuyo extremo más fino deje visibles los haces vasculares. Mantener esa porción sumergida en agua para evitar deshidratación (Figura 30.4, A y B).

2) Elegir una planta de cada clon indicador; tomar de ella hojas desarrolladas completamente, cortar el folíolo central, y practicar una incisión a lo largo y por el centro del pecíolo, de longitud similar a la de la cuña del folíolo preparado antes (Figura 30.4, C).

3) Insertar el folíolo de la planta que se probará en el corte del pecíolo de la planta indicadora. Atar con la cinta de látex, 'Parafilm' o polietileno (Figura 30.4, D).

4) Cortar todas las demás hojas del clon indicador y cubrir la planta con una bolsa de polietileno, o ponerla en ambiente de alta humedad relativa (Figura 30.4, E).

5) Al cabo de 2 a 5 semanas observar síntomas en las nuevas hojas desarrolladas (Figura 30.4, F).

Nota: Conviene dejar una planta de cada clon, a la cual se han cortado también las hojas, como testigo sano.

B. Pruebas serológicas de floculación de látex

Objetivo

Verificar la presencia de virus en tejidos vegetales de diversas especies, especialmente en papa y cultivos hortícolas. La prueba, según Salazar (1982), se describe así:

Digitized by Google

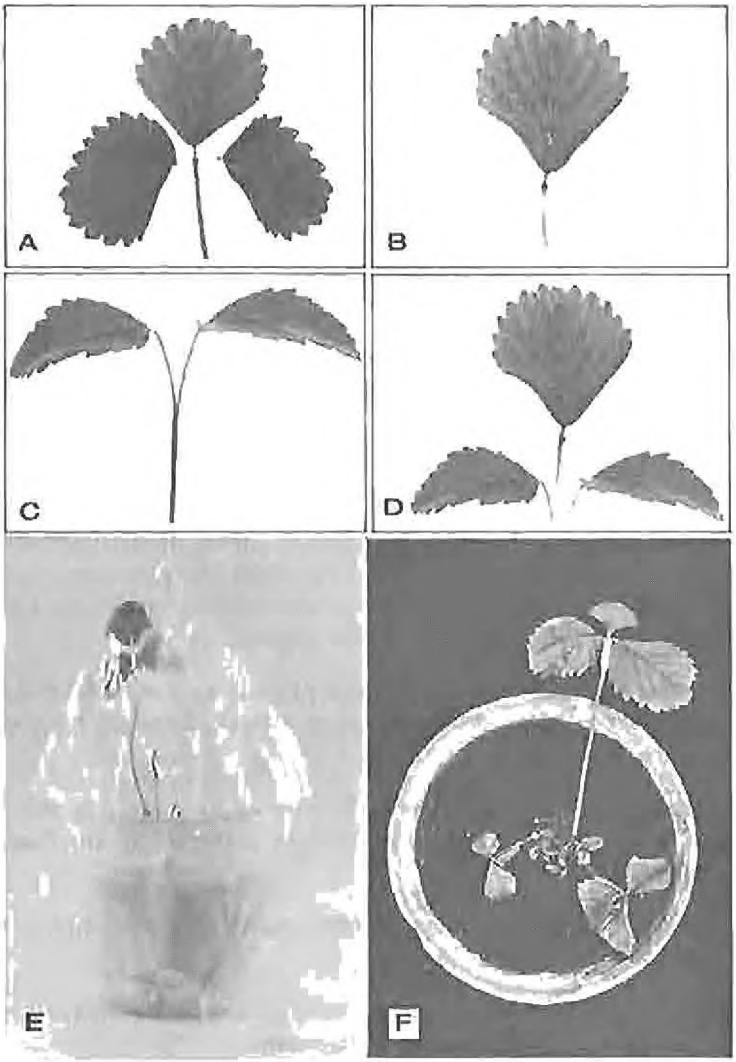


Figura 30.4. Detección de virus en frutilla (fresa) mediante el método de injerto de hoja en plantas indicadoras. A) Hoja de la planta que se quiere probar; se han separado los folíolos laterales. B) Se corta el peciolo en forma de cuña con el extremo tan delgado que permita visualizar los haces vasculares. C) Hoja de la planta indicadora en la cual se ha retirado el folíolo central y en cuyo peciolo se ha practicado un corte longitudinal. D) Se inserta el folíolo de la planta que se prueba en el peciolo de la indicadora y se ata con cinta plástica o de látex. E) Se elimina el resto de las hojas de la planta injertada y se cubre con plástico por 2-4 días. F) Los síntomas se observan en las hojas nuevas.

Digitized by Google

Materiales

- Cajas Petri plásticas, o las de vidrio recubiertas con Formvar.
- Pipetas de diversos tamaños y micropipetas automáticas o de vidrio estirado a mano, o jeringas con agujas finas.
- Solución salina (0.85% de cloruro de sodio).
- Tris-HCl 0.05 M, pH 7.2.
- Tris-HCl 0.05 M, pH 7.2 + PVP (polivinil pirrolidona grado 40) 0.02% + N_3Na (azida sódica) 0.05%.
- Tris-HCl 0.05 M, pH 8.0 + bisulfito de sodio 1% + Tween-20 0.05%.
- Látex 0.81μ (Difco Laboratories).
- Antisuero.
- Palillos.
- Lápiz de cera.
- Agitador rotatorio regulable, aproximadamente 120 oscilaciones/minuto.
- Lupa con aumentos de 80X a 100X.
- Centrífuga.
- Muestras para estudio, incluyendo testigos sanos y enfermos.
- Gammaglobulina.

Procedimiento

1) Purificar la gammaglobulina y diluirla a la concentración más adecuada.
2) Diluir 1 ml de la suspensión de látex en 14 ml de solución salina (1/15).
3) Sensibilizar el látex mezclando partes iguales (1 ml de cada uno) de la gammaglobulina diluida y del látex también diluido. Dejar 30 minutos a temperatura ambiente agitando periódicamente; centrifugar a 6000*g* durante 20 minutos.

Digitized by Google

4) Lavar el sedimento mediante centrifugación por tres veces consecutivas, empleando 2 ml de Tris-HCl 0.05 M, pH 7.2 + 0.02% PVP + 0.5% N_3Na.

5) La solución final de látex sensibilizado se suspende en 1 ml de tampón (bófer) Tris-HCl + PVP + azida sódica 0.05%. Conservarla a 4 °C.

6) Extraer jugo de hojas infectadas y sanas (testigos) en mortero o prensa empleando un tampón Tris-HCl 0.05 M, pH 8.0 + bisulfito de sodio 1% + Tween-20 0.05%. Hacer dos o más diluciones (p. ej. 1/10 y 1/100) del extracto.

7) En el fondo de la caja Petri dibujar con lápiz de cera una cuadrícula de 8 mm de lado.

8) Con una micropipeta o jeringa colocar en los cuadrados las gotas (0.1 ml aproximadamente) del jugo diluido, comenzando por la mayor dilución. Emplear un cuadrado para cada una. Agregar sobre el antígeno, con una micropipeta o jeringa, una gota de látex sensibilizado. Homogeneizar las mezclas con un palillo, empezando por las de menor dilución.

9) Tapar la caja y colocarla en agitador rotatorio a 130 vueltas por minuto, de 1/2 h a 1 h.

10) Leer a simple vista o con lupa, sobre fondo oscuro.

La reacción positiva se observa como grumos distribuidos homogéneamente en la gota; en las negativas la gota mantiene un aspecto lechoso (Figura 30.1, B).

Nota: La gammaglobulina puede purificarse de modo similar al descrito en la prueba de ELISA. La concentración óptima se determina en una prueba previa haciendo reaccionar diluciones dobles (de 1/4 hasta 1/2048) de gammaglobulina, con diluciones desde 10^{-2} hasta 10^{-6} del antígeno. La reacción más clara con la mayor dilución del antígeno señala la dilución óptima de la gammaglobulina para sensibilizar mayores cantidades de látex. Más antecedentes se pueden consultar en Ball (1974) y en Salazar (1982).

C. Prueba inmunoenzimática ELISA

Objetivo

Detectar virus que se encuentren en baja concentración en tejidos vegetales y realizar pruebas con un número elevado de muestras. La prueba, según Clark y Adams (1977b), se describe así:

Digitized by Google

Materiales

- Placas para micro-ELISA.
- Pipetas automáticas de 0.50 µl y 50-200 µl.
- Fotómetros para lectura a 405 nm y en ultravioleta.
- Tampones: PBS; PBS-T; PBS-T-PVP; 'sensibilizado'; 'sustrato' (ver fórmulas más adelante).
- Polivinil pirrolidona PM 40,000.
- Ovoalbúmina.
- Gammaglobulina purificada (IgG).
- Fosfatasa alcalina tipo VII-T o Tipo VII-TA (Sigma Chemical Co.)
- Sustrato para fosfatasa alcalina (fosfato de p-nitrofenilo).

Procedimiento

1) Agregar 200 µl de IgG diluida en tampón de 'sensibilizado' (la concentración óptima debe ajustarse previamente para cada lote, probando valores de 0.1, 1.0 y 10 µg/ml). Cubrir con Parafilm o colocar en cámara húmeda. Incubar de 2 a 6 horas a 37 °C. Vaciar la placa y lavar con PBS-T tres veces consecutivas. Vaciar nuevamente y secar la superficie con papel filtro.

2) Añadir a cada celdilla 200 µl de jugo de planta o de antígeno (o de la solución que se prueba) diluidos (aprox. 1/10) en PBS-T-PVP. Emplear como testigos celdillas con muestra de planta sana, de planta enferma y con tampón PBS-T-PVP. Cubrir para evitar la evaporación e incubar durante la noche a 4 °C. Lavar como en el paso anterior.

3) Agregar a cada celdilla 200 µl de conjugado diluido (se determina previamente el óptimo con valores de dilución de 1/400, 1/1200 y 1/3600) en PBS-T-PVP + ovoalbúmina 0.2%. Incubar a 37 °C, de 3 a 8 horas. Lavar como en el paso anterior.

4) Añadir 200 ml de sustrato (fosfato de p-nitrofenilo) recién disuelto en tampón sustrato en concentración de 0.6-1.0 mg/ml. Incubar a temperatura ambiente hasta visualizar la reacción (generalmente, 1/2 hora a 2 horas). La aparición de color en los testigos sanos es una señal para estimar el tiempo máximo de reacción.

5) Si la lectura no se realiza inmediatamente o se prolonga por mucho tiempo, detener la reacción agregando 50 µl de NaOH 3N.

Digitized by Google

6) Hacer la lectura visualmente o con fotómetro para valores de absorbancia A 405 nm.

Teóricamente, cualquier valor de A 405 superior al del testigo sano debiera considerarse procedente de tejido enfermo. Sin embargo, las lecturas en los testigos negativos (sanos) suelen ser variables. Como límite para separar lo sano de lo enfermo se puede considerar dos veces la desviación estándar de los testigos sanos o el doble del promedio de los mismos. El criterio que se emplea debe ajustarse a la experiencia acumulada en cada caso.

Nota: Las placas se pueden reutilizar, manteniendo la sensibilización con la IgG, mediante lavado con 0.2 ml de glicina-HCl de pH 2.2 durante una hora (Bar-Joseph et al., 1979b). También se puede emplear HCl 1N durante 24 horas, en cuyo caso las placas no quedan sensibilizadas.

Purificación de la IgG

1) Agregar 9 ml de agua destilada a 1 ml de antisuero.

2) Agregar 10 ml de solución saturada de sulfato de amonio para precipitar la IgG.

3) Dejar la solución a temperatura ambiente de 30 a 60 minutos.

4) Centrifugar a 10,000*g* durante 15 minutos. El sedimento se resuspende en 2 ml de PBS diluido a la mitad (PBS $\frac{1}{2}$).

5) Dializar tres veces contra 500 ml de PBS $\frac{1}{2}$, durante períodos de 4 horas o más.

6) Pasar la IgG a través de una columna de celulosa del tipo Whatman DE 22 o DEAE 52 equilibrado con PBS $\frac{1}{2}$. Un tamaño conveniente de columna es de 0.8 a 1.0 cm de diámetro y de 4 a 5 cm de alto.

7) Agregar PBS $\frac{1}{2}$ a la columna para eluir la IgG. Recoger fracciones que muestren mayor absorción a 280 nm (proteínas) y ajustar la mezcla a una concentración de 1 mg/ml, correspondiente a un valor de absorbancia de A 1.4.

8) Almacenar en tubos de vidrio tratados con siliconas o en tubos de plástico de 1 ml (Eppendorf) a -20 °C, o bien agregar Na_3 Na 0.2% y almacenar a 4 °C.

Digitized by Google

Preparación del conjugado IgG con fosfatasa alcalina

1) La fosfatasa alcalina puede venir precipitada en sulfato de amonio Sigma (Tipo VII-S) o disuelta en NaCl Sigma (Tipo VII-T). Si se adquiere el primer tipo es necesario centrifugar 1 ml (aproximadamente 5 mg) y eliminar el sobrenadante. La del segundo tipo se puede emplear directamente.

2) Disolver el sedimento (o agregar la fosfatasa disuelta en NaCl) en 2 ml (= 2 mg) de IgG purificada.

3) Dializar tres veces consecutivas contra 500 ml de PBS.

4) Añadir glutaraldehído hasta una concentración final de 0.06%. Mezclar bien.

5) Dejar 4 horas a temperatura ambiente.

6) Eliminar el exceso de glutaraldehído mediante diálisis en 500 ml de PBS, tres veces.

7) Añadir albúmina de suero bovino hasta obtener una concentración final de 5 mg/ml y almacenar a 4 °C, hasta su empleo. No debe congelarse el conjugado. La azida sódica, incorporada a través del PBS de diálisis, permite su conservación.

Tampones necesarios para la prueba ELISA

1) PBS (pH 7.4):

8.0 g NaCl
0.2 g KH_2PO_4
2.9 g $Na_2HPO_4.12H_2O$
0.2 g KCl
0.2 g N_3Na

Completar el volumen hasta el litro. Se puede preparar una solución madre concentrada 10X.

2) PBS-T:

PBS + 0.5 ml Tween-20 por litro.

3) PBS-T-PVP:

PBS-T + polivinil pirrolidona PM 40,000 al 2%.

Digitized by Google

4) Tampón de 'sensibilizado' (coating), pH 9.6:

1.59 g Na_2CO_3
2.93 g $NaHCO_3$
0.20 g N_3Na

Disolver en un litro de agua destilada.

5) Tampón sustrato:

97 ml dietanolamina
800 ml agua destilada
0.2 g N_3Na

Agregar HCl 1 M hasta pH 9.8. Completar el volumen hasta un litro.

Referencias

Aekers, G. K. y Steere, R. L. 1962. Restricted diffusion of macromolecules through agar-gel membranes. Biochem. Biophys. Acta 59:137-144.

Alconero, R.; Santiago, A.; Morales, F. y Rodríguez, F. 1975. Meristem tips culture and virus indexing of sweet potatoes. Phytopath. 65:773-776.

Ball, E. 1974. Serological test for the identification of plant viruses. Am. Phytopathol. Soc., Ithaca, Nueva York. 31 p.

Barbara, D. J.; Clark, M. F. y Tress, J. M. 1978. Rapid detection and serotyping of Prunus Ringspot Virus in perennial crops by enzime-linked immunosorbent assay. Am. Appl. Biol. 90:395-399.

Bar-Joseph, M.; Garnsey, S. M.; Gonçalves, D.; Moscovitz, M.; Purcifull, D. E.; Clark, M. E. y Loebenstein, G. 1979a. The use of enzime-linked immunosorbent assay for the detection of Citrus Tristeza Virus. Phytopath. 69:190-194.

———; Moscovitz, M. y Sharafi, Y. 1979b. Reuse of coated enzime-linked immunosorbent assay plates. Phytopath. 69:424-426.

Ben-Jacob, J.; Horst, R. K.; Geissinger, C. M.; Dimock, A. W. y Langlhans, R. W. 1973. Virus indexing of callus cultures of *Chrysanthemum morifolium* by tissue implantation and mechanical inoculation. Phytopath. 63:37-38.

Casper, R. 1977. Detection of Potato Leaf Roll Virus in potato and in *Physalis floridana* by enzime-linked immunosorbent assay. Phytopath. Z. 90:364-368.

Chistie, R. G. 1967. Rapid staining procedures for differentiating plant virus inclusions in epidermal strips. Virology 31:268-271.

Digitized by Google

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1982. El cultivo de meristemas para saneamiento de clones de yuca: Guía de estudio. [Contenido científico: W. M. Roca y U. Jayasinghe. Producción: Fernández, F.]. Cali, Colombia. 45 p.

Clark, M. F.; Flegg, C. L.; Bar-Joseph, M. y Rotten, S. 1977a. The detection of *Spyroplasma citri* by enzime-linked immunosorbent assay (ELISA). Phytopath. Z. 92:332-337.

——— y Adams, A. N. 1977b. Characteristics of microplate method of enzime-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 34:475-483.

Cropley, R. y Tomlinson, J. A. 1971. Cherry Leaf Roll Virus. Description of plant viruses no. 80, CMI/AAB. Culross and Son, Coupar Angus, Perthshire, Escocia.

Devergne, J. C.; Cardin, L. y Bontemps, J. 1982. Indexage biologique et immunoenzimatique (ELISA) pour la production d'oeillets indemnes de virus de la marbrure (CarMV). Agronomie 2:655-666.

Edwardson, J. R. 1974. Some properties of the Potato Virus Y group. Florida. Agr. Expt. Sta. Monograph series no. 4. 398 p.

Fernández-Valiela, M. V. 1969. Introducción a la fitopatología; I: Virus. 3a. ed. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Buenos Aires, Argentina. 1011 p.

Frazier, N. W. 1974a. Six new strawberry indicator clones evaluated for the detection and diagnosis of twelve graft transmissible diseases. Plant Disease Reporter 58:28-31.

———. 1974b. Detection of graft transmissible disease in strawberry by a modified leaf grafting technique. Plant Disease Reporter 58:203-207.

Fridlund, P. R. 1976. IR-2 interregional deciduous tree fruit repository. En: United States Department of Agriculture (USDA), Agriculture handbook no. 437. p. 16-22.

Graça, J. V. da y van Vuvren, S. P. 1981. Use of high temperature to increase the rate of avocado sun blotch symptom development in indicator seedlings. Plant Disease 65:46-47.

Hewitt, W. B.; Martelli, G.; Dias, H. F. y Taylor, R. H. 1970. Description of plant viruses no. 28, CMI/AAB. Culross and Son, Coupar Angus, Perthshire, Escocia.

Hollings, M. 1972. *Chrysanthemum* virus B. Description of plant viruses no. 110, CMI/AAB. Culross and Son, Coupar Angus, Perthshire, Escocia.

Digitized by Google

Houten, J. G. ten; Quak, F. y van der Meer, F. A. 1968. Heat treatment and meristem culture for the production of virus free plant material. Neth. J. Pl. Path. 74:17-24.

Jones, R. A. C. 1981. Use of continuous light to improve diagnosis of Potato Leafroll Virus in tuber indexing test. Plant Pathol. 30:225-232.

Kado, C. I. y Agrawal, H. O. 1972. Principles and techniques in plant virology. Van Nostrand Reinhold, Nueva York. 688 p.

Knauss, J. F. 1976. A tissue culture method for producing *Dieffenbachia picta* cv. 'Perfection' free of fungi and bacteria. Proc. Fla. State Hort. Soc. 89:293-296.

Koenig, R.; Dalchow, J.; Lesemann, D. E. y Preil, W. 1979. Enzime-linked immunosorbent assay as a reliable tool for the detection of Chrysanthemum Virus B in chrysanthemum troughout the year. Plant Dis. Reptr. 63:301-303.

Milne, R. G. 1972. Electron microscopy of viruses. En: Kado, C. I. y Agrawal, H. O. (eds). Principles and techniques in plant virology. Van Nostrand Reinhold, Nueva York. p. 76-126.

———. 1980. Notes of the course of immunoelectron microscopy (IEM) of plant viruses. Instituto di Fitovirologia Applicata, Torino, Italia. 19 p.

Nome, S. F. y Salvadores, C. 1980a. Obtención de plantas de batata (*Ipomoea batatas* L.) libres de virus. Rev. Fac. Cienc. Agrop. Univ. Nac. de Córdoba (Argentina) 1:87-96.

———; Raju, B. C.; Goheen, A. C.; Nyland, G. y Docampo, D. M. 1980b. Enzime-linked immunosorbent assay for Pierce's disease bacteria in plant tissues. Phytopath. 70:746-749.

———; Abril, A. y Racca, R. 1981. Obtención de plantas de ajo (*Allium sativum* L.) libres de virus mediante el cultivo de meristemas apicales. Phyton 41 (1/2):139-151.

Noordam, D. 1973. Identification of plant viruses: Method experiments. Centre for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen, Holanda. 207 p.

Nyland, G. 1968. Development and maintenance of virus-free propagating material. Proceedings of the International Plant Propagators Society Annual Meeting.

———; Gilmer, R. M. y Moore, D. J. 1976. Prunus ringspot group. United States Department of Agriculture (USDA). Agriculture handbook no. 437. p. 104-134.

Digitized by Google

Palukaitis, P.; Rakowsky, A. G.; Alexander, D. M. y Symons, R. H. 1981. Rapid indexing of the sun blotch disease of avocados using a complementary DNA probe to Avocado Sunblotch Viroid. Ann. Appl. Biol. 93:439-449.

Pirone, T. P. 1972. Sugar cane mosaic virus. Description of plant viruses no. 88, CMI/AAB. Culross and Son, Coupar Angus, Perthshire, Escocia.

Ramsdell, D. C.; Andrews, R.; Gillet, J. M. y Morris, C. E. 1979. A comparison between enzime-linked immunosorbent assay (ELISA) and *Quenopodium quinoa* for detection of Peach Rosette Mosaic Virus in 'concord' grapevines. Plant Disease Reporter 63:74-78.

Remah, A.; Hafidł, B. y Vanderveken, J. 1981. Essais de mise au point d'une technique d'échantillonnage pour l'indexage de la maladie du 'stubborn' des agrumes par le test ELISA. Review of Plant Pathology 60:267.

Rubio-Huertos, M. 1972. Inclusion bodies. En: Kado, C. I. y Agrawal, H. D. (eds.). Principles and techniques in plant virology. Van Nostrand Reinhold, Nueva York. p. 62-74.

Salazar, L. F. 1982. Manual de enfermedades virales de la papa. Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú. 111 p.

Shepard, J. F. 1972. Gel-diffusion methods for the serological detection of potato viruses X, S and M. Department of Botany and Microbiology, Montana State University. 71 p.

Stace-Smith, R. y Mellor, F. C. 1968. Eradication of potato viruses X and S by thermoterapy and axillary buds culture. Phytopathology 58:119-203.

Stone, O. M. 1968. The elimination of viruses from carnation and Sweet William by meristem-tips culture. Ann. Appl. Biol. 62:119-122.

Utermohlen, J. G. y Ohr, H. D. 1981. A polyacrylamide gel electrophoresis index method for avocado sunblotch. Plant Disease 65:800-802.

Vetten, H. J. 1981. Indexing of nepoviruses on *Chenopodium* quinoa after elimination of virus inhibitors in grape leaf extracts. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz 88:99-110.

Wetter, C. 1972. Potato virus M. Description of plant viruses no. 87, CMI/AAB. Culross and Son, Coupar Angus, Perthshire, Escocia.

Wooster, P. 1981. Post-harvest tuber indexing in the seed potato seed certification schemes of England and Wales, 1978. Plant Pathol. 30:153-158.

Digitized by Google

Capítulo 31

Métodos de conservación in vitro del germoplasma

W. M. Roca*
D. I. Arias*
R. Chávez**

Agradecimientos

Los autores manifiestan su gratitud a la Dra. L. Withers, del International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR), Roma, por la ayuda proporcionada de diversas maneras en la preparación de este trabajo.

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

** Unidad de Investigación en Biotecnología (UIB), Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. Dirección actual: Agrupación Rosa Ara Ter., Tacna, Perú.

Digitized by Google

Introducción

La necesidad de mantener clones seleccionados e híbridos promisorios de especies vegetales para su distribución, en condición sana, a programas nacionales de investigación agrícola estimuló algunos de los primeros estudios sobre el mantenimiento in vitro del germoplasma de papa (*Solanum* spp.) en el Centro Internacional de la Papa (CIP), y de yuca (*Manihot* spp.) en el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).

El trabajo, realizado a principios y a finales de la década del setenta, mostró que los cultivos de yema de papa, mantenidos entre 9 y 10 °C, podían permanecer viables durante un año. Un resultado comparable se obtuvo aplicando estrés osmótico y añadiendo inhibidores del crecimiento al medio de cultivo (Schilde-Rentschler y Roca, 1987). Los cultivos de yuca, en cambio, se deterioraban a temperaturas inferiores a 18 °C, aunque su viabilidad se podía mantener aun durante 18 meses si los cultivos se mantuvieran entre 22 y 24 °C (Roca, 1985). La utilización inmediata del germoplasma mejorado era la fuerza que impulsaba estos esfuerzos tempranos de conservación in vitro.

Aproximadamente al mismo tiempo, Morel (1975) y Henshaw (1975) abogaron por la función que podían tener las técnicas de cultivo in vitro en la conservación de los recursos fitogenéticos como alternativa al mantenimiento de colecciones para uso inmediato en el mejoramiento de plantas. También en este período se realizó un trabajo exitoso en la conservación de tejidos vegetales por crioconservación en la Universidad de Nottingham, con el finado profesor Street (1973). Sólo en 1980 se reconoció el potencial de los métodos de cultivo in vitro para la conservación de especies de plantas 'difíciles' (Withers y Williams, 1985); este término se refería a especies propagadas vegetativamente cuya semilla no era sensible a las condiciones corrientes de conservación de semillas, es decir, a la temperatura baja y al contenido de agua reducido, como ocurre en numerosos frutales tropicales perennes y en diversas palmas.

Basada en un informe global de Withers (1979) sobre conservación in vitro, la Junta Internacional para Recursos Fitogenéticos (IBPGR, en inglés) estableció, a principios de la década del ochenta, un grupo científico de trabajo para que considerara todos los aspectos de la conservación in vitro de plantas. Como resultado de ese trabajo, se tomaron decisiones relevantes para esta actividad científica (Withers, 1980; Bajaj, 1977; IBPGR, 1983), a saber:

Digitized by Google

a. se clarificó el marco conceptual básico de la conservación in vitro;

b. se identificaron las especies que requieren atención prioritaria para su conservación in vitro;

c. se identificaron las siguientes áreas críticas de investigación en la conservación in vitro: el problema de la estabilidad genética de los cultivos, la necesidad de parámetros para caracterizar las accesiones que entren a almacenamiento in vitro, la necesidad de técnicas de indización de enfermedades en el germoplasma conservado in vitro, el desarrollo de técnicas para la colección e intercambio de germoplasma in vitro, y el desarrollo de un sistema eficiente de documentación y manejo de datos para la conservación in vitro.

Desde el esfuerzo inicial de la década del setenta se ha logrado un notorio progreso. Sin embargo, sólo recientemente se acometió el estudio de varios temas importantes relacionados con la conservación in vitro de los recursos fitogenéticos.

Esta actividad facilita principalmente la conservación de los genes (en genotecas) y de los genotipos. Las genotecas pueden formarse dejando el DNA desnudo en los plásmidos o incorporándolo a ciertas bacterias. Los genotipos se conservarán mediante el cultivo de ápices, de nudos o de cualquier otro explante regenerativo.

La conservación in vitro tiene que considerarse como parte de la estrategia general de conservación de una especie vegetal; es más bien un auxiliar valioso y un suplemento de la conservación de los recursos genéticos. Sólo ocasionalmente, el almacenamiento in vitro sería la única estrategia para conservar una especie dada. Para algunos frutales tropicales como el cacao (*Theobroma*), la estrategia principal de conservación estaría probablemente en los bancos genéticos in vitro que utilizan las técnicas in vitro para evaluar la variabilidad genética de la especie, y para la colección e intercambio de ésta. Los cultivos de raíces y tubérculos, como papa, yuca y batata (*Ipomoea*), se almacenarían como semilla durante cortos períodos, de modo que, para ellos, los métodos in vitro serían complementarios para la conservación de genotipos específicos (cultivares, híbridos, clones elite) y para el traslado internacional de clones. Para otros cultivos de tubérculos y raíces tropicales y para especies de frutales como *Musa* sp., que rara vez producen semilla y son prácticamente estériles, el almacenamiento in vitro y los bancos genéticos ex situ en el campo estarían probablemente a la par. Por último, en las especies tropicales de semilla recalcitrante, la colección y el intercambio de materiales in vitro tendrán una función básica.

Digitized by Google

Estrategias para la Conservación in Vitro

Es grande el rango de especies vegetales cultivadas cuya conservación es accesible a las técnicas in vitro (Cuadro 31.1). La conservación de los recursos fitogenéticos mediante los métodos del cultivo in vitro se logra haciendo cambios en el ambiente de cultivo para desacelerar o suprimir totalmente el crecimiento de las células y de los tejidos; el objetivo es aumentar al máximo el período de trasferencia del cultivo o extenderlo indefinidamente. No obstante, debe realizarse, como se indicó anteriormente, una evaluación científica cuidadosa de las ventajas y desventajas de una estrategia in vitro de la conservación de recursos genéticos para cada caso específico (Figura 31.1).

Cuadro 31.1. Géneros que pueden conservarse cultivados in vitro.

Cultivos	Géneros	
Propagados vegetativamente		
	*Solanum**	*Vitis**
	*Manihot**	*Olea*
	*Musa**	*Ananas*
	*Ipomoea**	*Ficus*
	*Xanthosoma**	*Agave*
	*Colocasia**	*Vanilla*
	*Dioscorea**	*Allium**
	*Canna**	*Piper*
		*Saccharum**
		Tubérculos andinos (Varios géneros)
Propagados sexualmente		
	*Citrus**	*Theobroma**
	*Elaeis**	*Hevea*
	*Coccus**	*Chinchona*
	*Malus**	*Cinnamonium*
	Persea	*Coffea*
	Mangifera	*Camellia*
	Macadamia	*Prunus**
	Durio	*Artocarpus*
	Anacardium	

* Tienen prioridad para IBPGR respecto a su conservación in vitro.

Digitized by Google

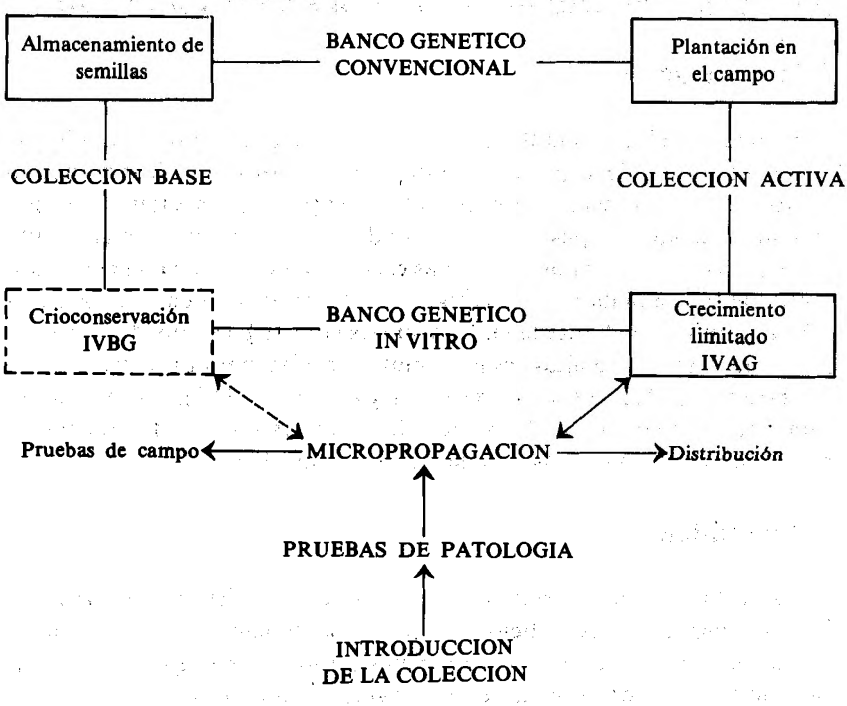


Figura 31.1. Integración de los métodos in vitro en las estrategias convencionales de conservación de germoplasma de yuca (*Manihot esculenta*).

Se han propuesto dos tipos de conservación in vitro de los bancos genéticos (Withers y Williams, 1985): a) el banco genético in vitro activo (IVAG, en inglés) donde los cultivos se mantienen en crecimiento lento, y b) el banco genético in vitro básico (IVBG, en inglés) donde los cultivos son crioconservados. El IVAG se está desarrollando, en alto grado, para las especies yuca, papa, batata, banano y caña de azúcar, y constituye una colección de trabajo; su contraparte estaría representada por la colección de campo y por la colección de semilla sexual almacenada a corto plazo. El IVBG constituye una colección básica —es decir, conservada en plazos largos y no activa o de trabajo— ya que la criopreservación no se ha desarrollado aún plenamente en ningún cultivo; este banco permite un mantenimiento total de la estabilidad genotípica del germoplasma, y su contraparte estaría representada por la colección de semilla sexual mantenida bajo almacenamiento a largo plazo.

Digitized by Google

Aspectos Importantes de la Conservación in Vitro

Regeneración

La regeneración de plantas enteras basada en los sistemas de cultivo de células es, a menudo, el paso que limita la aplicación de técnicas de cultivo in vitro a especies vegetales que no se pueden propagar mediante meristemas preformados. A pesar de la capacidad que tienen para iniciar callo diversos tejidos y órganos de muchas especies cultivadas, la regeneración reproducible de plantas enteras sigue siendo problemática. La regeneración adventicia mediante la embriogénesis somática es muy deseable, ya que el proceso ofrece altas tasas de multiplicación y produce propágulos que poseen ejes de raíz y de yema (Stamp y Henshaw, 1987). Los embriones somáticos pueden desarrollarse de células únicas y se pueden recuperar plantas con genotipos más estables (Evans et al., 1981).

Viabilidad

La evaluación de la viabilidad de los cultivos in vitro se debe realizar sistemáticamente. En condiciones de crecimiento lento, en que el período de trasferencia se extiende durante meses o años, la frecuencia de evaluación de los cultivos aumenta en comparación con la evaluación que se haría al material conservado bajo nitrógeno líquido, por ejemplo. Las características más importantes que se evalúan en el almacenamiento de crecimiento lento de cultivos derivados del ápice de yemas son: contaminación, senescencia de la hoja (la razón hojas verdes/hojas muertas), número de brotes verdes (para micropropagación adicional), número de nudos viables (verdes) en relación con la longitud del tallo (verde), presencia o ausencia de raíces, y ocurrencia de callo.

Estabilidad genética

La estabilidad genética de los cultivos ha sido, durante mucho tiempo, un motivo de inquietud cuando se piensa aplicar las técnicas in vitro para la conservación del germoplasma. El material recuperado de la conservación in vitro debe representar genéticamente al material utilizado. Cualquier sistema de cultivo in vitro será inaceptable si introduce un alto riesgo de inestabilidad genética o de selección entre genotipos —o de ambas cosas (Withers, 1988).

En cultivos propagados vegetativamente se han aplicado criterios morfológicos para caracterizar los genotipos, diferencias que son difíciles de

Digitized by Google

detectar en los cultivos propagados in vitro. Se ha señalado que la variación genética causada por un reajuste cromosómico puede presentarse en el cultivo de tejidos (D'Amato, 1964). Existe también una correlación entre el tiempo en que el material vegetal se cultiva como callo y la probabilidad de que ocurran en él cambios cromosómicos; esto podría causar un cambio hacia un tipo variante en la propagación in vitro (Schilde-Rentschler y Roca, 1987).

Los sistemas de cultivo de tejidos presentan diferentes niveles de riesgo de variación genética. Así, por ejemplo, los sistemas más estables son los cultivos de meristemas y la micropropagación nodal; les siguen los embriones somáticos y las yemas adventicias; por último, los más inestables, en teoría, son los cultivos de células y protoplastos. Igualmente, entre las dos estrategias de conservación in vitro —el crecimiento lento y la crioconservación— hay posibilidades de variación debidas a la posible regeneración de yemas adventicias. Por otra parte, en los procesos de renovación de cultivos (subcultivos) del material conservado bajo crecimiento lento, hay posibilidades de seleccionar los explantes mejores o más vigorosos por parte de la persona que realiza estos procesos.

La monitoría de la estabilidad genética de los cultivos in vitro de las especies cultivadas está adquiriendo gran interés. Se han adelantado criterios morfológicos, bioquímicos y moleculares para la detección de los cambios genéticos (Withers y Williams, 1985). Se deben desarrollar, como complemento de la evaluación de la estabilidad, técnicas electroforéticas para evaluar la variabilidad de las isozimas en muestras pequeñas de tejido obtenidas de cultivos in vitro. Además, se debe probar la monitoría que se ha hecho a esa estabilidad genética mediante técnicas moleculares, para detectar la variación del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción de ADN (RFLPs).

Sistematización de la información

Un banco genético in vitro debe mantener y actualizar continuamente una base de datos computarizada que contenga información relacionada con todos los aspectos de la conservación in vitro y con las áreas de investigación asociadas. La base de datos contiene una gran cantidad de información relacionada con cada una de las accesiones, como datos de pasaporte, caracterización genotípica, indización de enfermedades, micropropagación, intercambio internacional, equipo y suministros, y otros aspectos logísticos de la operación de conservación in vitro.

Digitized by Google

Métodos de Conservación in Vitro

Hay dos sistemas básicos de conservación del germoplasma in vitro, uno mediante la limitación del crecimiento hasta tasas mínimas, y otro mediante la supresión total del crecimiento y del metabolismo celular.

Limitación del crecimiento

El crecimiento rápido de los cultivos a tasas normales exige más mano de obra y aumenta la posibilidad de pérdidas debidas a accidentes o a contaminación microbiana durante la repetición continua de los subcultivos; es necesario entonces reducir al mínimo la frecuencia de los subcultivos, con lo que se logra además minimizar la posibilidad de variación genética.

El método consiste en mantener los cultivos (yemas, plántulas derivadas de nudos o directamente de meristemas) en condiciones físicas (factores ambientales) o químicas (composición del medio de cultivo) que permitan extender al máximo el intervalo de trasferencia a los medios frescos, sin que ello afecte la viabilidad de los cultivos.

La tasa de crecimiento de los cultivos in vitro puede controlarse empleando, principalmente, los siguientes factores: temperatura, nutrimentos inorgánicos y orgánicos, reguladores del crecimiento, y concentración osmótica del medio.

Otros factores, como el tamaño de los tubos de ensayo o de los frascos, la calidad y concentración del agente gelificante, la adición de carbón activado al medio, la limitación de la oxigenación, la intensidad de la luz y del fotoperíodo, entre otros, son también importantes en el control del crecimiento.

Temperatura. La reducción de la temperatura ha sido el recurso más comúnmente utilizado para disminuir el crecimiento de los cultivos. La mayoría de los cultivos in vitro son mantenidos a temperaturas entre 20 °C y 30 °C; a temperaturas más bajas la tasa de crecimiento disminuye, pero esta reducción depende de la especie en cuestión (Withers, 1980).

Concentración de nutrimentos. La relación entre la concentración de carbohidratos y los componentes nitrogenados del medio nutritivo puede tener efectos sobre las tasas de crecimiento y la morfogénesis en los cultivos in vitro (Staritsky, 1980). La sacarosa tiene, igualmente, un efecto en la

Digitized by Google

viabilidad de los cultivos: concentraciones muy altas o muy bajas de ese azúcar resultan nocivas para la conservación de los tejidos in vitro.

Concentración de los reguladores del crecimiento. Los niveles de citoquininas y de inhibidores del crecimiento, como el ácido abscísico, interaccionan con la concentración de sacarosa y con la temperatura de conservación y afectan así la viabilidad de los cultivos in vitro (Roca, 1985).

Entre los reguladores del crecimiento empleados por los investigadores figuran el ácido abscísico (ABA), el cloruro de fosfonio o clorfoniom (Phosphon-D), la hidrazida maleica o daminazida (B995), el cicocel o 2-cloroetil-cloruro de trimetil (CCC); el ácido N-dimetil succínico y el ancimidol (Nair et al., 1979); y el ácido acetil salicílico, ASA (López, 1985).

Concentración osmótica. La limitación del crecimiento por causa de la concentración osmótica se debe, posiblemente, a la reducción de la absorción de agua y de nutrimentos del medio. Puesto que es altamente metabolizable, la sacarosa actúa osmóticamente en concentraciones altas. Otros agentes osmóticos difíciles de metabolizar, como el manitol y el sorbitol, son posiblemente más efectivos que la sacarosa en la limitación del crecimiento de los cultivos, pero se debe tener en cuenta que estas sustancias interaccionan con el contenido de sacarosa y con la temperatura de conservación.

Supresión del crecimiento

Como se discutió antes, siempre existe un riesgo, mayor o menor, de inestabilidad citogenética cuando se conserva el germoplasma mediante el cultivo de tejidos in vitro a largo plazo. Este riesgo se puede minimizar utilizando tejidos organizados (meristemas, yemas y cultivos derivados) y reduciendo la tasa de crecimiento mediante la temperatura baja. Conforme se reduce la temperatura de un tejido, el metabolismo celular disminuye hasta llegar a un estado de 'suspensión animada' cuando la temperatura alcanza niveles inferiores a -150 °C; a esta temperatura, los procesos biológicos han cesado y las posibles causas de inestabilidad se habrán, por tanto, minimizado o eliminado. Este tema se trata con mayor detalle en el Capítulo 13 de esta obra.

Se han discutido hasta aquí los aspectos generales relacionados con la conservación in vitro; se discutirán ahora estos aspectos pero aplicándolos a la yuca (*Manihot esculenta* Crantz), cultivo que ha sido objeto de investigación profunda en la Unidad de Investigación en Biotecnología del CIAT.

Digitized by Google

Conservación in Vitro de la Yuca

La yuca es uno de los principales cultivos alimenticios de primera necesidad en las regiones tropicales bajas. Constituye una fuente principal de calorías para casi 500 millones de personas en más de 60 países. La producción mundial de yuca alcanza actualmente 130 millones de toneladas, distribuidas principalmente en el Sudeste Asiático, en Africa, y en América Latina tropical. La yuca se utiliza en gran parte para el consumo humano y está disponible en el mercado fresco o procesada como harina.

El peligro potencial de la erosión genética de los recursos cultivados y silvestres del germoplasma de *Manihot* y el requerimiento de variabilidad genética para usar en el mejoramiento del cultivo, justifican los esfuerzos de conservación del germoplasma de yuca.

El mantenimiento convencional de los bancos de germoplasma de yuca se hace mediante el cultivo continuo de campo. Las nuevas 'siembras' de germoplasma se hacen a menudo con estacas recientemente cortadas de campos viejos. Además de su costo alto, el mantenimiento del cultivo de campo expone muchas veces un germoplasma valioso al ataque de insectos, al contagio de enfermedades, y a los problemas del suelo o del clima. Las estacas recién cortadas sólo pueden guardarse durante un tiempo corto porque aparecen brotes prematuros y ocurren ataques de insectos o microbios.

La propagación vegetativa propicia la trasmisión de plagas y enfermedades en las estacas a través de generaciones sucesivas. Enfermedades así trasmitidas, como el añublo bacteriano de la yuca, la enfermedad del mosaico africano, la enfermedad del superalargamiento, y el cuero de sapo pueden producir pérdidas muy altas en el rendimiento.

Es posible hacer el mantenimiento del germoplasma de yuca por medio del cultivo de meristemas, empleando una combinación de técnicas criogénicas y de condiciones de almacenamiento de crecimiento mínimo.

Almacenamiento de crecimiento lento

Las investigaciones recientes hechas en el CIAT sobre conservación de la yuca han proporcionado medios para almacenar cultivos in vitro bajo condiciones de crecimiento mínimo; se ha conformado así un banco de genes in vitro activo (IVAG) que representa la colección de trabajo. Se ha indicado (Roca, 1984; 1985) que el almacenamiento a 22 °C reduce la tasa de crecimiento de las yemas o nudos con respecto a la de los cultivos

Digitized by Google

mantenidos entre 28 y 30 °C (Cuadro 31.2). Las temperaturas de almacenamiento inferiores a 18 °C fueron perjudiciales para algunas variedades de yuca cuando la iluminación permanecía alta. Sin embargo, la viabilidad del cultivo se podía mantener reduciendo la iluminación a menos de 500 lux.

El aumento de BA de 0.04 a 0.22 mM, y el de sacarosa de 0.05 a 0.12 M, redujo también el alargamiento de los brotes que tenían más de 90% de viabilidad. Sin embargo, si el almacenamiento de baja temperatura se combinaba con altos niveles de BA y de sacarosa, el crecimiento de los cultivos se detenía al grado de que la mayoría de ellos se deterioraba al cabo de tres meses. Los resultados recientes señalan que el crecimiento de los cultivos se reduce cuando el contenido total de nitrógeno del medio decrece hasta 20 mM a 27 ó 28 °C y hasta 40 mM si hay de 20 a 22 °C. La combinación de 1% de sacarosa y de 1% de manitol redujo la tasa de crecimiento de la yuca in vitro, pero al cabo de 12 meses se presentaron efectos nocivos. Cuando se usó sorbitol en vez de manitol, también se presentó un descenso en la tasa de crecimiento, pero no disminuyó la viabilidad y se logró un tiempo de conservación de más de 18 meses en algunas variedades.

Más de 4000 variedades del banco mundial de germoplasma de yuca reunido en el CIAT han sido puestas en almacenamiento in vitro bajo condiciones de crecimiento mínimo. Según la variedad, estos cultivos se pueden mantener de 18 a 24 meses sin necesidad de trasferencia a medios

Cuadro 31.2. Efecto de la temperatura en la tasa de crecimiento y en la viabilidad de dos clones de yuca conservados in vitro.[a]

Temperatura (°C)	Elongación de los tallos (cm/mes)	Viabilidad		
		Tallos por cultivo (no.)	Nudos por tallo (no.)	Nudos por cultivo (no.)
Clon M Col 22				
18	0.1	1.5	3.0	4.5
22	0.5	2.5	6.8	17.0
30	1.5	5.0	6.3	31.5
Clon M Col 1467				
18	0.6	2.0	12.0	24.0
22	1.2	3.0	15.0	45.0
30	1.5	6.5	10.5	68.2

a. Evaluación: 9 meses de conservación; iluminación: 1500 a 2000 lux; tubos de ensayo de 25 x 150 mm.

Digitized by Google

nuevos. Las variedades difieren en su tolerancia relativa a la temperatura baja y en su tasa relativa de crecimiento. Además, los cultivos viejos de ciertas variedades tienden a deteriorarse a causa de la oxidación de los exudados de tipo fenólico de las raíces. Durante todo el tiempo de almacenamiento, los cultivos producen yemas axilares cuyo número está directamente relacionado con la viabilidad del cultivo y, en consecuencia, con su potencial de micropropagación una vez que el cultivo ha sido recuperado del almacenamiento. Al final de cada ciclo de almacenamiento, las yemas axilares se trasfieren a un medio recién preparado y se inicia así un nuevo ciclo. El banco de germoplasma in vitro es una habitación de 5 x 7.5 x 30 m que puede contener 5000 accesiones de yuca las cuales, si estuvieran en el campo, requerirían 6 ha de terreno. Dos técnicos de laboratorio, de tiempo completo, manejan el banco in vitro, y más de 10 personas, entre obreros y agrónomos, manejan el banco en el campo.

La evaluación de la estabilidad fenotípica es permanente en el CIAT, y emplea criterios morfoagronómicos y bioquímicos (Ramírez et al., 1987). Empleando los sistemas EST (α y β esterasas) y DIAP (diaforasas) se ha hecho seguimiento de los posibles cambios en los patrones electroforéticos de 18 variedades de yuca, que fueron conservadas in vitro durante 0, 2, 4 y 6 años. Estos patrones, revelados por la actividad enzimática, han permanecido constantes en las 18 variedades a lo largo de los seis años de conservación. La Figura 31.2 presenta estos resultados en una variedad de yuca y para ambas enzimas.

Se ha observado una reducción de los lóbulos de la hoja en unas pocas variedades después de que han sido recuperadas del almacenamiento y han crecido en el campo, aunque la reversión al tipo de lóbulo amplio empezó después del segundo ciclo de crecimiento vegetativo. En general, las plantas no han manifestado cambios mayores.

Crioconservación

Después de los resultados promisorios que obtuvieron Kartha et al. (1982) en el Instituto de Biotecnología de Plantas, en Saskatoon, Canadá, se iniciaron en 1985 algunas investigaciones colaborativas entre el CIAT y el IBPGR para desarrollar más esta técnica con meristemas de yuca y con otros tejidos, y para constituir una colección a largo plazo, es decir, un banco genético in vitro básico (IVBG).

En trabajos anteriores hechos en Saskatoon, se demostró la supervivencia de los meristemas cuando se usaba el método del enfriamiento lento (0.5 °C/min) con una temperatura terminal de -25 a -30 °C y agregando

Digitized by Google

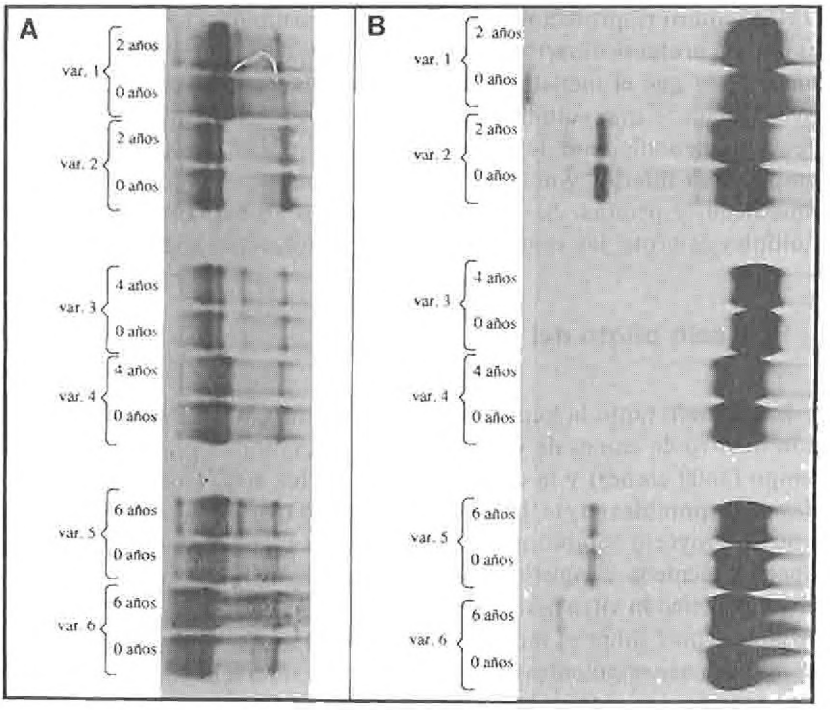


Figura 31.2. Estabilidad de los patrones electroforéticos de las isoenzimas esterasa (A) y diaforasa (B) de seis variedades de yuca recuperadas de un almacenamiento in vitro que duró 2, 4 ó 6 años, según el caso. Se usaron raíces del cultivo in vitro para la electroforesis. El testigo (la variedad sin almacenar) está representado por 0 años.

DMSO y sorbitol como crioprotectantes. El proyecto actual ensayó, desde un principio, la supervivencia de ápices de cinco variedades de yuca empleando combinaciones de métodos de enfriamiento lento y rápido con diversos tipos de frascos y con varios crioprotectores. El enfriamiento rápido produjo una tasa mucho mayor de supervivencia de los tejidos que el enfriamiento lento, aunque los ápices desarrollaron callo después de su recuperación del nitrógeno líquido. El crioprotector DMSO permitió un nivel más alto de supervivencia en todas las variedades cuando se usaron ampollas plásticas para contener el especimen durante el enfriamiento y el almacenamiento por congelación. En la mayoría de los casos, sólo se desarrolló una masa de callo del segmento, y en muy pocos casos el callo

Digitized by Google

estaba acompañado por un brote. Una vez más, el uso de ampollas y de DMSO como crioprotector produjo mejores resultados. En la congelación lenta, más brotes se desarrollaron en los flancos del brote apical original, lo que sugiere que el meristema apical del explante original se dañó. Las investigaciones que actualmente hace el CIAT se orientan a probar el efecto de acondicionar los explantes en un precultivo, es decir, a una temperatura inferior y añadiendo al medio sacarosa, manitol, glicol de polietileno, y prolina. Se usarán, además, como explantes los cultivos múltiples de brote, las yemas latentes, y los embriones somáticos.

Proyecto piloto del IVAG

Empleando tanto la experiencia adquirida en el CIAT en la conservación in vitro de clones de yuca (4000 clones), como la gran colección de campo (4600 clones) y la colección in vitro (los 4000 clones) de germoplasma disponibles en el CIAT, este Centro y el IBPGR acordaron llevar a cabo un proyecto colaborativo para estimar la viabilidad y demostrar los aspectos técnicos y logísticos del establecimiento y la operación de un banco genético in vitro activo (P-IVAG) de yuca. Al final del proyecto se darían normas sobre el modo de operar un IVAG. Este proyecto comprende los pasos siguientes: 1) selección y caracterización de 100 clones de yuca para usar en el P-IVAG; 2) cultivo in vitro de clones, micropropagación, e introducción al almacenamiento bajo condiciones de crecimiento mínimo; 3) monitoría de la estabilidad genética, de la viabilidad de los cultivos, de la indización de enfermedades, y de otros aspectos logísticos (laboratorio, instalaciones, equipo); 4) desarrollo de una base de datos computarizada para administrar todos los aspectos del P-IVAG.

De los factores que probablemente afectan la estabilidad de los cultivos durante el almacenamiento de crecimiento lento, la tasa de subcultivo es uno de los que requiere consideración. Tres genotipos de yuca, con notorias diferencias morfológicas y electroforéticas, han sido seleccionados para este fin. La frecuencia de subcultivo de estos clones será de tres meses, momento en que se hará también una evaluación morfológica y otra electroforética de isozimas. El grueso de los clones contenidos en el P-IVAG, en cambio, se someterá a subcultivo cada 18 meses.

Se ha desarrollado una base de datos computarizada para el manejo de toda la información recogida en el P-IVAG. Los datos de pasaporte, los morfoagronómicos de campo, la caracterización morfológica in vitro, la indización de enfermedades, los datos electroforéticos, la micropropagación y el subcultivo, la viabilidad, y otros datos como la localización física

Digitized by Google

de los cultivos, el equipo, los requisitos de suministro y de mano de obra se están incorporando a la base de datos.

Intercambio Internacional de Germoplasma de Yuca

La reglamentación cuarentenaria de la yuca varía de un país a otro; sin embargo, la metodología del cultivo in vitro ha sido aceptada por diversos países como uno de los medios más seguros para recibir el material vegetativo de yuca. Entre 1979 y 1988, más de 800 materiales de yuca, entre variedades e híbridos, libres de organismos patógenos fueron distribuidos por el CIAT como cultivos in vitro a 34 países de América Latina y Asia, principalmente. El sistema in vitro se ha utilizado también para introducir al CIAT germoplasma nuevo de yuca desde los países de América Latina; entre 1980 y 1988, se introdujeron a este Centro, como cultivos de meristema, casi 2000 accesiones de cultivares de yuca nativos.

Conclusión

El almacenamiento de germoplasma en crecimiento lento es ahora un método viable para mantener grandes colecciones en poco espacio, libres de los riesgos que causan plagas y enfermedades. Actualmente existen bancos genéticos in vitro activos (IVAG) para *Manihot* y *Solanum*, y se adelanta ese trabajo con *Ipomoea*, *Colocasia*, *Xanthosoma*, *Musa*, *Saccharum*, *Theobroma* y *Citrus*. El futuro de la crioconservación de los recursos genéticos es promisorio, y en esa labor se trabaja actualmente en yuca, papa y plátano.

El establecimiento de bancos de germoplasma in vitro se ha convertido en una contribución importante al mantenimiento convencional, en el campo, de grandes colecciones. El proyecto piloto del IVAG proporciona normas para la adopción de la conservación in vitro de la yuca por las instituciones nacionales de la zona tórrida, o para la extrapolación de esas normas a otros cultivos propagados vegetativamente.

Las investigaciones recientes sobre el cultivo de tejidos de yuca señalan que la regeneración de plantas de varios cultivares de esa especie es posible por embriogénesis somática. Se ha establecido la embriogénesis secundaria que permite la regeneración de plantas derivadas de cultivos embriogénicos de largo plazo (Szabados et al., 1987). Este logro ayudará el desarrollo futuro de métodos genéticos celulares y moleculares que mejorarán el cultivo de la yuca. La disponibilidad de bancos de germoplasma in vitro,

Digitized by Google

integrales y fácilmente accesibles, tanto en condiciones de crecimiento lento como de carácter criogénico, será crucial para ese esfuerzo.

Referencias

Bajaj, Y. P. S. 1977. Clonal multiplication and cryopreservation of cassava through tissue culture. Crop Improvement 4:198-204.

D'Amato, F. 1964. Endopolyploidy as a factor in plant tissue development. Caryologia 17:41-51.

Evans, D. A.; Sharp, W. R. y Flick, C. E. 1981. Growth and behavior of cell cultures: Embryogenesis and organogenesis. En: Thorpe, T. A. (ed.). Plant tissue culture: Methods and applications in agriculture. Academic Press, Nueva York. p. 45-113.

Henshaw, G. G. 1975. Technical aspects of tissue culture storage for genetic conservation. En: Frankel, O. H. y Hawks, J. G. (eds.). Crop genetic resources for today and tomorrow. Cambridge University Press, Cambridge, Inglaterra. p. 349-358.

IBPGR (International Board for Plant Genetic Resources). 1983. IBPGR Advisory Committee on *in vitro* storage: Report of the first meeting. Roma, Italia. 11 p.

Kartha, K. K.; Leung, N. L. y Mroginski, L. A. 1982. *In vitro* growth responses and plant regeneration from cryopreserved meristems of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). Z. Pflanzenphysiol. 107:133-140.

López, H. A. 1985. Efecto del ácido acetilsalicílico en el crecimiento de yemas de *Solanum cardiophyllus* (Lindl.) cultivadas *in vitro*. Tesis (M.S.). Colegio de Posgraduados, Chapingo, México.

Morel, G. 1975. Meristem culture techniques for the long-term storage of cultivated plants. En: Frankel, O. H. y Hawkes, J. G. (eds.). Crop genetic resources for today and tomorrow. Cambridge University Press, Cambridge, Inglaterra. p. 327-332.

Nair, N. G.; Kartha, K. K. y Gamborg, O. L. 1979. Effect of growth regulators on plant regeneration from shoot apical meristems of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and on the culture of internodes *in vitro*. Z. Pflanzenphysiol. 95:51-56.

Ramírez, H.; Hussain, A.; Roca, W. y Bushuk, W. 1987. Isozyme electrophoregrams of sixteen enzymes in five tissues of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) varieties. Euphytica 36:39-48.

Digitized by Google

Roca, W. M. 1984. Cassava. En: Sharp, W. R.; Evans, D. A.; Amirato, R. V. y Yamada, Y. (eds.). Handbook of plant cell culture. v. 2, p. 269-301.

———. 1985. Cassava tissue culture. En: Cock, J. H. y Reyes, J. A. (eds.). Cassava: Research, production and utilization. United Nations Development Programme-Centro Internacional de Agricultura Tropical (UNDP-CIAT), Cali, Colombia.

Schilde-Rentschler, L. y Roca, W. 1987. Tissue culture for the international exchange of potato and cassava germplasm. En: Bajaj, Y. P. S. (ed.). Biotechnology in agriculture and forestry. Springer-Verlag, Berlín. v. 3, p. 453-465.

Stamp, J. A. y Henshaw, G. G. 1987. Secondary somatic embryogenesis and plant regeneration in cassava. Plant Cell Tissue & Organ Culture 10:227-233.

Staritsky, G. 1980. Growth inhibition and dormancy. En: Crop genetic resources: The conservation of difficult material. Proceedings of an international workshop. University of Reading, Reino Unido.

Street, H. E. (ed.). 1973. Plant tissue and cell culture. Blackwell Sci. Publ., Oxford.

Szabados, L.; Hoyos, R. y Roca, W. 1987. *In vitro* somatic embryogenesis and plant regeneration of cassava. Plant Cell Reports 6:248-251.

Withers, L. A. 1979. Freeze-preservation of somatic embryos and clonal plantlets of *Daucus carota*. Plant Physiol. 68:460-467.

———. 1980. Tissue culture storage for genetic conservation. IBPGR Technical Report. Roma, Italia.

———. 1988. *In vitro* conservation and germplasm utilization. En: Brown, A. D. H.; Frankel, O. H.; Marshall, D. R. y Williams, J. T. (eds.). The use of crop genetic resources collection. Cambridge University Press.

——— y Williams, J. T. 1985. *In vitro* conservation. IBPGR Research Highlights. Roma, Italia.

Digitized by Google

Capítulo 32

Crioconservación del germoplasma

L. A. Mroginski*
W. M. Roca**
K. K. Kartha***

* Facultad de Ciencias Agrarias, Instituto de Botánica del Nordeste, Corrientes, Argentina.
** Unidad de Investigación en Biotecnología (UIB), Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia.
*** National Research Council of Canada, Plant Biotechnology Institute, Saskatoon, Saskatchewan, Canadá.

Digitized by Google

Introducción

La erosión genética causada por la destrucción de los hábitat, por la selección natural, y por los agentes bióticos ha acrecentado en los últimos años el interés por la conservación del germoplasma vegetal. En la agricultura, paradójicamente, el éxito de los fitomejoradores en la obtención de cultivares de mayor rendimiento, así como en la adopción de tecnología de avanzada, son factores que contribuyen a destruir la diversidad genética (Hawkes, 1981).

Los métodos para la conservación del germoplasma de plantas superiores se adecúan a los sistemas de propagación de las especies. Para aquéllas que se propagan por semilla y cuya viabilidad no se altera en mayor grado luego de un largo período de almacenamiento a bajas temperaturas y con un bajo contenido de humedad, resulta eficiente y económica su conservación en los denominados bancos de semillas. Sin embargo, este método no se puede aplicar a numerosas especies propagadas por semilla, pues la longevidad de ésta, aun en las mejores condiciones de conservación, es muy reducida; tampoco puede emplearse el método en las especies de propagación vegetativa obligada, ni en aquellas autoincompatibles. El germoplasma de estos grupos de plantas se debe conservar manteniendo colecciones vivas, las cuales son costosas y están sometidas a peligros ambientales como plagas, enfermedades y factores climáticos adversos, y a errores humanos.

Las técnicas del cultivo in vitro de tejidos aparecen en la actualidad como una alternativa interesante para la conservación y el intercambio de germoplasma; además, son las técnicas obligadas para la conservación de valiosos genotipos derivados de la ingeniería genética y la manipulación de protoplastos, células o callos, siempre y cuando se consiga su regeneración como plantas enteras. Si bien la conservación del germoplasma puede lograrse mediante el cultivo de diferentes explantes, el de meristemas es el más adecuado por las siguientes razones:

- las probabilidades de ocurrencia de cambios genéticos son menores;
- dentro de ciertos límites, el germoplasma conservado está libre de patógenos;
- los meristemas son frecuentemente explantes adecuados para la micropropagación.

La conservación del germoplasma mediante el cultivo de tejidos se basa bien sea en la limitación del crecimiento, conseguida generalmente con el

Digitized by Google

empleo de temperaturas de incubación y de medios de cultivo subóptimos (ver Capítulo 8), o bien en la utilización de la denominada crioconservación a las temperaturas ultrabajas (-196 °C) del nitrógeno líquido que causan el cese de todas, o casi todas, las reacciones metabólicas celulares. Los métodos que emplean la desecación parcial (Nitzsche, 1983) y los sistemas de almacenaje con baja presión (Bridgen y Staby, 1983) y con bajo nivel de oxígeno (Bridgen y Staby, 1981), se consideran como alternativas de la crioconservación.

La crioconservación de las plantas superiores, si bien se encuentra en un estado menos desarrollado que la del reino animal, ofrece técnicas muy promisorias para la conservación de germoplasma a largo plazo. Desde que Quatrano (1968) informó acerca de la crioconservación de células de lino, numerosos trabajos han contribuido al progreso de esta técnica que últimamente ha sido objeto de varias revisiones (Finkle y Ulrich, 1983; Finkle et al., 1983, Kartha, 1981a; 1981b; 1982a; 1982b; Withers, 1980a; 1980b; 1980c; 1982; 1983).

Técnicas

Diferentes explantes (ápices caulinares, meristemas, anteras, embriones, protoplastos) así como callos y suspensiones celulares han sido crioconservados a -196 °C (Cuadro 32.1). La heterogeneidad del material vegetal obliga al empleo de diversas técnicas de crioconservación; no obstante, en un intento de generalización, es posible reconocer aspectos comunes entre ellas que, de acuerdo con Withers (1983), son: a) pretratamiento, b) crioprotección, c) congelamiento, d) almacenaje, e) descongelamiento, f) pruebas de viabilidad, y g) 'recultivo'.

Pretratamiento

El grado de tolerancia de las plantas a temperaturas ultrabajas depende de su genotipo, de sus condiciones fisiológicas, y del ambiente en que crecen (Levitt, 1980). La viabilidad del material vegetal de un genotipo determinado puede incrementarse si se lo crioconserva en fases adecuadas de su crecimiento como las siguientes: el estado globular en los embriones somáticos, la fase exponencial de las suspensiones celulares, y los meristemas luego de 2 días de su extracción (Withers, 1983).

Asimismo, el precultivo del material vegetal puede ser de utilidad. El precultivo en medios nutritivos de los ápices caulinares de *Solanum goniocalyx* mejoró el porcentaje de sobrevivencia de éstos (Grout y Henshaw,

Digitized by Google

Cuadro 32.1. Crioconservación a -196 °C de diferentes explantes de algunas especies de interés agronómico.[a]

Especie y (explante)	Crioprotector	Procedimiento de congelación	Viabilidad	Referencias
Arachis hypogaea (meristemas)	Glicerol 5% + DMSO 5% + sacarosa 5%	Rápido	21%-31% vástagos y/o raíces	Bajaj, 1979
Capsicum annuum (suspensión celular)	Glicerol 10% + DMSO 5%	1 °C/min, hasta -100 °C	25% (FDA)	Withers y Street, 1977
Cicer arietinum (meristemas)	DMSO 4%	0.6 °C/min, hasta -40 °C	40% plantas	Kartha y Gamborg, 1978
Daucus carota (embriones somáticos y plántulas)	DMSO, 2.5% a 20%	1 °C/min, hasta -40 °C	100% de meristemas crecen	Withers, 1979
Daucus carota (suspensión celular)	DMSO 5%	1.8 °C/min, hasta -196 °C	65% (FDA) y embriones	Nag y Street, 1973
Daucus carota (protoplastos)	DMSO 5%	2 °C/min, hasta -100 °C	90% (FDA) y embriones	Withers y Street, 1977; Withers, 1980c
Dianthus caryophyllus (meristemas)	DMSO 5%	50 °C/min, aproximadamente	100% plantas	Seibert y Wetherbee, 1977
Fragaria x *ananassa* (meristemas)	DMSO 5%	0.84 °C/min, hasta -40 °C	95% plantas	Kartha et al., 1980

(Continúa)

Digitized by Google

Cuadro 32.1. Continuación.

Especie y (explante)	Crioprotector	Procedimiento de congelación	Viabilidad	Referencias
Glycine max (suspensión celular)	DMSO 7%	2 °C/min, hasta -100 °C	52% (FDA)	Bajaj, 1976
Lycipersicon esculentum (plántulas)	DMSO 10%	Rápido	30% callos	Grout et al., 1978
Manihot esculenta (meristemas)	DMSO 15% + sacarosa 3%	0.5 °C/min, hasta -40 °C	callos, callos y hojas, plantas	Kartha et al., 1982a (ver Figura 32.2).
Medicago sativa (callos)	10% DMSO + 10% PEG + glucosa 8%	1 °C/min, hasta -30 °C	crecimiento, plantas	Finkle et al., 1980
Nicotiana tabacum (suspensión celular)	DMSO 5% +	2 °C/min, hasta -196 °C	5%-10% plantas	Bajaj y Reinert, 1977
Nicotiana tabacum (anteras)	DMSO 7%	2 °C/min	1.5% plantas	Bajaj, 1978
Nicotiana tabacum (embriones de polen)	DMSO 5% a 7%	1 a 3 °C/min	31% (FDA)	Bajaj, 1978
Oryza sativa (suspensión celular)	DMSO 5%	0.1 °C/min, hasta -40 °C	60%-65% (TTC)	Sala et al., 1979
Pisum sativum (meristemas)	DMSO 5%	0.6 °C/min, hasta -40 °C	60% plantas	Kartha et al., 1979

(Continúa)

Digitized by Google

Cuadro 32.1. Continuación.

Especie y (explante)	Crioprotector	Procedimiento de congelación	Viabilidad	Referencias
Saccharum sp. (callos)	DMSO 10% + PEG 10% + glucosa 8%	2 °C/min, hasta -40 °C; 5 °C/min, hasta -80 °C	callos y raíces	Ulrich et al., 1979
Solanum tuberosum (ápices caulinares)	DMSO 10%	Rápido en N líquido	60% sobreviven, plantas	Henshaw et al., 1980
Sorghum bicolor (suspensión celular)	0.5 M DMSO + 0.5 M glicerol + 1 M prolina	1 °C/min, hasta -35 °C	25% (FDA)	Withers y King, 1980
Zea mays (suspensión celular)	0.5 M DMSO + 0.5 M glicerol + 1 M prolina	1 °C/min, hasta -35 °C	75% (FDA)	Withers y King, 1980

a. FDA, PEG, DMSO, TTC: ver Apéndice A, Abreviaturas y acrónimos.

Digitized by Google

1978a). Las suspensiones celulares de *Zea mays* crioconservadas manifestaron mayor viabilidad cuando fueron precultivadas en un medio que contenía prolina (Withers y King, 1979). Un resultado semejante fue observado cuando se usó manitol en suspensiones celulares de *Acer pseudoplatanus* (Withers y Street, 1977). Precultivos en medios con 5% de DMSO incrementaron la viabilidad de las suspensiones celulares de *Atropa belladona* (Nag y Street, 1975) y de *Catharanthus roseus* (Kartha et al., 1982b), así como la de meristemas de *Pisum sativum* (Kartha et al., 1979) y de *Fragaria* x *ananassa* (Kartha et al., 1980). Por otra parte, la crioconservación de meristemas de *Dianthus caryophyllus* fue favorecida por el pretratamiento de los meristemas a 4 °C durante 3 días (Seibert y Wetherbee, 1977).

Crioprotección

Para proteger al material vegetal de los daños del congelamiento y del descongelamiento, se utilizan sustancias crioprotectoras (Cuadro 32.1). Las más utilizadas son DMSO (5%-15%) y glicerol (5%-20%). También se emplean otras sustancias como azúcares, azúcares-alcoholes, aminoácidos, y polímeros de alto peso molecular. Una lista de esas sustancias puede consultarse en un trabajo de Withers (1980c).

En muchos casos se emplean mezclas de sustancias crioprotectoras. Una mezcla de PEG (10%), glucosa (8%) y DMSO (10%) fue empleada en tejidos de caña de azúcar y de arroz (Finkle et al., 1983). Una mezcla de DMSO (10%), glicerol (5%) y prolina (10%) fue efectiva en la crioconservación de suspensiones celulares de maíz y zanahorias, y de otras especies (Withers, 1980b).

El tipo y la concentración de las sustancias crioprotectoras debe determinarse para cada material vegetal; es necesario, además, subrayar la citotoxicidad de la mayor parte de estas sustancias en concentraciones altas (Kartha, 1982a). Aunque su aplicación puede hacerse de varias formas, es conveniente aplicarlas gradualmente en ampollas de polipropileno (o eventualmente en vidrio) que contengan un medio de cultivo y material vegetal, colocadas en un recipiente con hielo.

Congelamiento

El éxito de la crioconservación de material vegetal depende, en gran medida, de la acertada elección del procedimiento de congelación que se utilice. Básicamente, se pueden distinguir tres procedimientos (Figura 32.1):

Digitized by Google

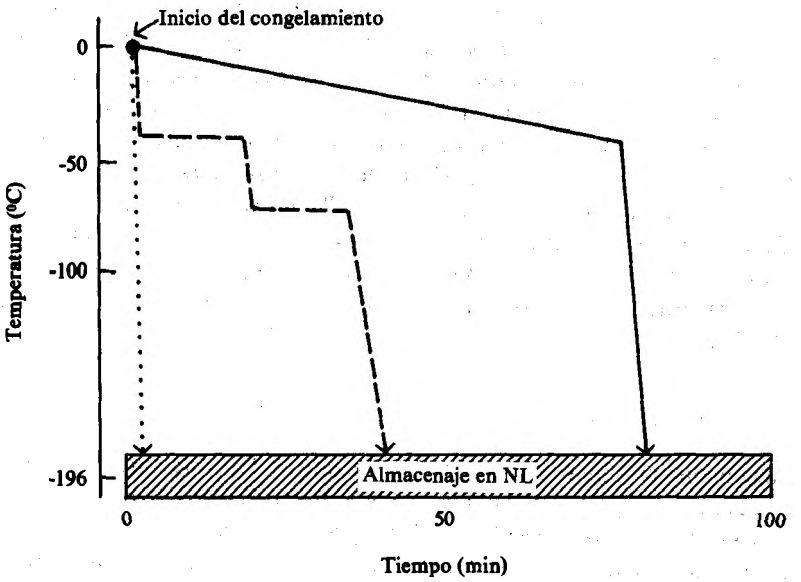


Figura 32.1. Procedimientos para lograr la congelación rápida (· · · ·), escalonada (— —) y lenta (——) del material vegetal. NL = nitrógeno líquido.

Congelamiento rápido. El material vegetal se coloca directamente en nitrógeno líquido (NL). La velocidad de disminución de la temperatura puede ser hasta de 1000 °C/min. Uno de los riesgos de este procedimiento es la formación de cristales intracelulares de hielo que pueden dañar el material vegetal. Este efecto se evita empleando sustancias crioprotectoras adecuadas y procurando que el congelamiento se produzca tan rápidamente como sea posible (a mayor velocidad de congelamiento, menor tamaño de los cristales de hielo). También es conveniente emplear un volumen pequeño de material vegetal cuyo contenido de agua sea bajo (Nitzsche, 1983). Con este procedimiento se han crioconservado explantes de varias especies (Cuadro 32.1).

Congelamiento lento. El material vegetal se congela de modo gradual. La disminución de la temperatura oscila entre 0.1 y 3 °C/min. Este procedimiento permite una deshidratación celular protectora, de manera que los cristales de hielo se forman extracelularmente. Sin embargo, es conveniente insistir en que una excesiva deshidratación de las células puede exponerlas a una alta concentración interna de solutos. Generalmente, el

Digitized by Google

material se congela lentamente, a una velocidad adecuada, hasta que alcance una temperatura determinada —usualmente -40 °C, punto en que la mayor parte del agua ha sido congelada extracelularmente— y luego se coloca directamente en NL. También puede mantenerse durante un período de tiempo a esa temperatura antes de su trasferencia al NL. El congelamiento lento ha sido empleado en la crioconservación de materiales vegetales de numerosas especies (Cuadro 32.1).

Congelamiento escalonado. Según este procedimiento (step-wise freesing), el material vegetal se somete sucesivamente a varias temperaturas por debajo de 0 °C y se mantiene en cada una de ellas durante cierto tiempo; posteriormente, se sumerge en NL (Figura 32.1).

Almacenaje

Es preferible que el almacenaje se haga a la temperatura del NL (-196 °C). En los ejemplos citados en el Cuadro 32.1, el material vegetal fue almacenado a -196 °C, lo que posibilita el cese de prácticamente toda la actividad metabólica. El uso de congeladores que brinden temperaturas de almacenaje entre -70 y -100 °C puede ser otra alternativa, pero no es recomendable para la crioconservación a largo plazo (Withers, 1980c).

Descongelamiento

En general, cualquiera sea el procedimiento empleado para la congelación del material vegetal, su descongelamiento puede llevarse a cabo en forma rápida por medio de baños de 1 a 2 min de duración en agua a 40 °C, teniendo la precaución de agregar gradualmente medio de cultivo para diluir las sustancias crioprotectoras y evitar la deplasmólisis celular.

También puede aplicarse el descongelamiento lento por simple exposición del material vegetal crioconservado (contenido en ampollas) a la temperatura del laboratorio (Withers, 1979), o colocándolo en una corriente de aire caliente (Seibert y Wetherbee, 1977).

Pruebas de viabilidad

La estimación de la viabilidad del material vegetal crioconservado puede hacerse de diferentes maneras. Tratándose de meristemas, lo más adecuado es recultivarlos y determinar su capacidad de regenerar plantas; otras evidencias, a menudo empleadas, como su habilidad para formar

Digitized by Google

callos o adquirir una coloración verde, son inadecuadas porque no garantizan que los meristemas crioconservados regeneren plantas más tarde.

Para estimar la viabilidad de células y protoplastos se puede recurrir a la coloración con diacetato de fluoresceína (FDA). Esta técnica se basa en el hecho de que únicamente las células vivas adquieren coloración con FDA y emiten fluorescencia cuando son iluminadas con luz ultravioleta (Widholm, 1972); para aplicarla se sugiere el siguiente procedimiento (Kartha, 1982b):

1) Preparar, con acetona, una solución madre de FDA al 0.5%. Conservarla a -20 °C.

2) Agregar 0.5 ml de la solución madre a 25 ml de medio de cultivo, para lograr una concentración final de FDA de 0.01%.

3) Mezclar, sobre un portaobjeto, una gota de esta solución con una gota de la suspensión celular o de los protoplastos descongelados. Colocar encima un cubreobjeto. En un microscopio con lámpara de tungsteno, contar el número de células o protoplastos. Realizar la misma operación utilizando iluminación ultravioleta (deben trascurrir de 5 a 20 min desde la iniciación de la coloración).

4) Expresar la viabilidad como el porcentaje de células o protoplastos que emitan fluorescencia con iluminación ultravioleta.

Para estimar la viabilidad de suspensiones celulares, también puede utilizarse el método del cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio (TTC). Este método, adaptado por Steponkus y Lanphear (1967) se basa en la reducción del TTC, por la actividad mitocondrial de las células vivas, a trifenilformazán (un compuesto rojo e insoluble en agua). Este compuesto se puede solubilizar con etanol y medir espectrofotométricamente a 530 nm. El procedimiento para aplicar este método comprende los siguientes pasos (Bajaj y Reinert, 1977):

1) Preparar una solución de TTC al 0.6% en una solución bófer (8.9 g/litro de Na_2HPO_4 + 6.8 g/litro de KH_2PO_4).

2) Incubar, a 30 °C durante 15 h, 100 mg de células descongeladas en 3 ml de TTC.

3) Desechar la solución de TTC y lavar las células con agua bidestilada.

4) Centrifugar las células y extraer el trifenilformazán con 7 ml de etanol al 95% durante 5 min, en un baño con agua a 80 °C.

Digitized by Google

5) Una vez enfriado el extracto, completar a 10 ml con etanol al 95%. Medir la absorbancia de la solución rosada con un espectrofotómetro a 530 nm. Comparar los valores obtenidos con los del testigo (células no congeladas).

Recultivo

Una vez descongelado, el material vegetal debe ser recultivado; para ello se utilizan, en general, los mismos medios y condiciones en que crecía antes de su congelamiento.

Crioconservación de Meristemas de Fresa o Frutilla (*Fragaria* x *ananassa*)

En los últimos años se han desarrollado numerosos sistemas para lograr que los ápices caulinares y los meristemas de varias especies vegetales sean crioconservados a -196 °C (Cuadro 32.1). El sistema desarrollado para frutilla —una especie de propagación vegetativa (Kartha et al., 1980)— además de brindar una alta viabilidad luego del recultivo (95%), posibilita la propagación masiva de esta especie (de 150 a 200 plantas/meristema cultivado). El procedimiento sugerido para la aplicación de este sistema (Kartha et al., 1982b) comprende los siguientes pasos ilustrados en la Figura 32.2:

1) La porción apical (± 5 cm de longitud) de los estolones provenientes de plantas de frutilla cultivadas en invernadero se desinfectan con NaOCl al 1.2% durante 20 min, y se lavan con agua destilada estéril. Posteriormente, se disectan los meristemas (de 0.4 a 0.5 mm) y se los cultiva en MS + 1 µM AIB + 1 µM BAP + 0.1 µM AG, a 26 °C, con un fotoperíodo de 16 h (4000 lux). Al cabo de 3 semanas se obtienen vástagos.

2) Los vástagos se trasfieren a un medio de propagación (MS + 10 µM BAP) donde se obtienen, al cabo de 4 ó 5 semanas, entre 150 y 200 nuevos vástagos.

3) Los meristemas apicales de los nuevos vástagos se someten a un pretratamiento consistente en cultivarlos durante 48 h en el mismo medio de propagación suplementado con DMSO al 5%.

4) Luego del pretratamiento, los frascos con los meristemas se colocan en una conservadora con hielo durante 2 h. Luego, los meristemas se

Digitized by Google

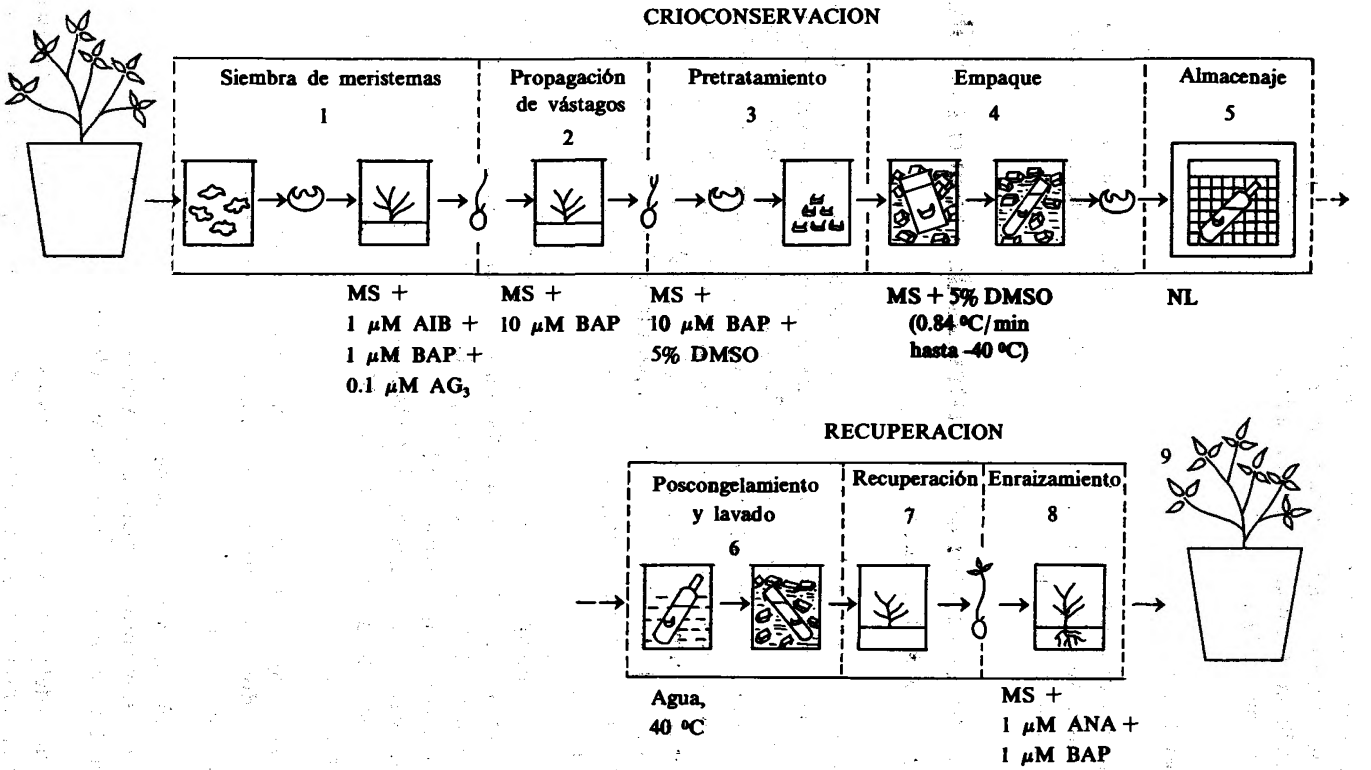


Figura 32.2. Procedimiento para la crioconservación de meristemas de frutilla (*Fragaria* x *ananassa*); véase el texto. NL = nitrógeno líquido.

Digitized by Google

trasfieren a tubos de centrífuga (mantenidos en una conservadora con hielo) que contengan 10 ml de MS enfriado. Durante 30 min se agregan, gradualmente, 10 ml de MS + DMSO al 10%, de manera que la concentración final de este último sea del 5%. En seguida, los lotes de 20 meristemas se trasfieren a ampollas de vidrio de 1.2 ml que contengan 1 ml de MS + DMSO al 5%; las ampollas son obturadas, excepto una en la que se coloca el termopar. Las ampollas se congelan lentamente (0.84 °C/min) hasta -40 °C.

5) El almacenaje de los meristemas contenidos en las ampollas se lleva a cabo mediante su inmersión en NL (-196 °C).

6) El descongelamiento se realiza por inmersión de las ampollas en agua a 40 °C durante 90 segundos; éstas se colocan luego en una conservadora con hielo. El contenido de las ampollas se trasfiere a un tubo de centrífuga ubicado en una conservadora con hielo. Los meristemas se lavan cuatro veces con MS líquido.

7) Los meristemas se cultivan en el medio de propagación con el fin de recuperar plantas.

8) Los vástagos se trasfieren a un medio de enraizamiento (MS + 1 µM ANA + 1 µM BAP).

9) Las plantas obtenidas se trasladan a macetas.

Referencias

Bajaj, Y. P. S. 1976. Regeneration of plants from cell suspensions frozen at -20, -70, and -196 °C. Physiol. Plant. 37:263-268.

——— . 1978. Effect of super-low temperature on excised anthers and pollen embryos of *Atropa*, *Nicotiana* and *Petunia*. Phytomorphology 28:171-176.

——— . 1979. Freeze-preservation of *Arachis hypogaea* and *Cicer arietinum*. Indian J. Exptl. Biol. 17:1405-1407.

——— y Reinert, J. 1977. Cryobiology of plant cell cultures and establishment of gene banks. En: Reinert, J. y Bajaj, Y. P. S. (eds.). Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture. Springer-Verlag, Nueva York, E.U. p. 757-777.

Bridgen, M. P. y Staby, G. 1981. Low pressure and low oxigen storage of *Nicotiana tabacum* and *Chrysanthemum morifolium* tissue cultures. Plant Sci. Letters 22:177-186.

Digitized by Google

——— y ———. 1983. Protocols of low-pressure storage. En: Evans, D. A.; Sharp, W. R.; Ammirato, P.V. y Yamada, Y. (eds.). Handbook of plant cell culture. McMillan Publishing, Nueva York, E.U. v. 1, p. 816-827.

Finkle, B. J.; Ulrich, J. M.; Tisserat, B. y Rains, D. W. 1980. Regeneration of date palm and alfalfa plants after freezing callus tissues to -196 °C in a combination of cryoprotective agents. Cryobiology 17:625-626. (Resumen.)

——— y Ulrich, J. 1983. Protocols of cryopreservation. En: Evans, D. A.; Sharp, W. R.; Ammirato, P. V. y Yamada, Y. (eds.). Handbook of plant cell culture. McMillan Publishing, Nueva York, E.U. v. 1, p. 806-815.

———; ———; Scheffer, G. W. y Sharpe, F. (Jr.). 1983. Cryopreservation of rice cells. En: Cell and tissue culture techniques for cereal crop improvement. Memorias de un taller. Sciences Press, Beijing, China, e International Rice Research Institute (IRRI), Manila, Filipinas. p. 343-369.

Grout, B. W. W. y Henshaw, G. G. 1978. Freeze-preservation of potato shoot-tip cultures. Ann. Bot. 42:1227-1229.

———; Westcott, R. J. y Henshaw, G. G. 1978. Survival of shoot meristems of tomato seedlings frozen in liquid nitrogen. Cryobiology 15:478-483.

Hawkes, J. G. 1981. Germoplasma collection, preservation, and use. En: Frey, K. J. (ed.). Plant Breeding; II. Iowa State University Press, Ames, Iowa, E.U. p. 57-83.

Henshaw, G. G.; Stamps, J. A. y Wescott, R. J. 1980. Tissue culture and germplasm storage. En: Sala, F.; Parisi, B.; Cella, R. y Ciferri, O. (eds.). Plant cell cultures: Results and perspectives. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Holanda. p. 277-282.

Kartha, K. K. 1981a. Meristem culture and cryopreservation: Methods and applications. En: Thorpe, T. A. (ed.). Plant tissue culture: Methods and applications in agriculture. Academic Press, Nueva York, E.U. p. 181-211.

———. 1981b. Genepool conservation through tissue culture. En: Rao, A. N. (ed.). COSTED sympossium on tissue culture of economically important plants. Memorias. Singapur. p. 213-218.

———. 1982a. Cryopreservation of germplasm using meristem and tissue culture. En: Tomes et al. (eds.). Application of plant cell and tissue culture to agriculture and industry. University of Guelph, Guelph, Canadá. p. 139-161.

———. 1982b. Cryopreservation of plant meristems and cells. En: Wetter, L. R. y Constabel, F. (eds.). Plant tissue culture methods. National Research Council Canada, Saskatoon, Canadá. p. 25-33.

——— y Gamborg, O. L. 1978. Meristem culture techniques in the production of disease free plants and freeze-preservation of germplasm of tropical tuber crops and grain legumes. En: Maraite, H. y Meyer, J. A. (eds.). Diseases of tropical food crops. Université Catholique Louvain, Bélgica. p. 267-283.

Digitized by Google

——— ; Leung, N. L. y Gamborg, O. L. 1979. Freeze-preservation of pea meristems in liquid nitrogen and subsequent plant regeneration. Plant Sci. Letters 15:7-15.

——— ; ——— y Pahl, K. 1980. Cryopreservation of strawberry meristems and mass propagation of plantlets. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 105:481-484.

——— ; ——— y Mroginski, L. A. 1982a. *In vitro* growth responses and plant regeneration from cryopreserved meristems of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). Z. Pflanzenphysiol. 107:133-140.

——— ; ——— ; Gaudet-La Prairie, P. y Constabel, F. 1982b. Cryopreservation of periwinkle, *Catharanthus roseus* cells, cultured in vitro. Plant Cell Reports 1:135-138.

Levitt, J. 1980. Freezing-resistance types, measurement, and changes. 2a. ed. En: Levitt, J. (ed.). Responses of plant to environmental stresses. Academic Press, Nueva York, E.U. v. 1, p. 116-162.

Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.

Nag, K. K. y Street, H. E. 1973. Carrot embryogenesis from frozen cultured cells. Nature 245:270-272.

——— y ——— . 1975. Freeze-preservation of cultured plant cells; I: The pretreatment phase. Physiol. Plant. 34:254-260.

Nitzsche, W. 1983. Germplasm preservation. En: Evans, D. A.; Sharp, W. R.; Ammirato, P. V. y Yamada, Y. (eds.). Handbook of plant cell culture. McMillan Publishing., Nueva York, E.U. v. 1, p. 782-805.

Quatrano, R. S. 1968. Freeze-preservation of cultured flax cells utilizing dimethyl-sulfoxide. Plant Physiol. 43:2057-2061.

Sala, F.; Cella, R. y Rollo, F. 1979. Freeze-preservation of rice cells. Physiol. Plant. 45:170-176.

Seibert, M. y Wetherbee, P. J. 1977. Increased survival and differentiation of frozen herbaceous plant organ cultures through cold treatment. Plant Physiol. 59:1043-1046.

Steponkus, P. L. y Lanphear, F. O. 1967. Refinement of the triphenyl tetrazolium chloride method of determining cold injury. Plant Physiol. 42:1423-1426.

Ulrich, J. M.; Finkle, B.; Moore, P. H. y Ginoza, H. 1979. Effect of a mixture of cryoprotectants in liquid nitrogen survival of callus of a tropical plant. Cryobiology 16:550-556.

Widholm, J. M. 1972. The use of fluorescein diacetate and phenosafranin for determining viability of cultured plant cell. Stain Technol. 47:189-194.

Digitized by Google

Withers, L. A. 1979. Freeze-preservation of somatic embryos and clonal plantlets of carrot (*Daucus carota* L.). Plant Physiol. 63:460-467.

———. 1980a. Storage of plant tissue cultures. En: Withers L. A. y Williams, J. T. (eds.). Crop genetic resources: The conservation of difficult material. Memorias de reunión internacional. University of Reading, Inglaterra. p. 49-82.

———. 1980b. Preservation of germplasm. Intl. Rev. Pytology. Suppl. 11B. p. 101-136.

———. 1980c. Tissue culture storage for genetic conservation. IBPGR technical report. International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR), Roma. 91 p.

———. 1982. Crioconservación de tejidos vegetales cultivados in vitro. En: Villalobos, V. M. (comp.). Contribuciones del cultivo de tejidos al mejoramiento y conservación de las plantas. Centro de Genética, México. p. 29-50.

———. 1983. Germplasm preservation through tissue culture: An overview. En: Cell and tissue culture techniques for cereal crop improvement. Memorias de un taller. Sciences Press, Beijing, China, e International Rice Research Institute (IRRI), Manila, Filipinas. p. 315-341.

——— y Street, H. E. 1977. The freeze-preservation of plant cell cultures. En: Barz, W. et al. (eds.). Plant tissue culture and its bio-technical applications. Springer-Verlag, Nueva York, E.U. p. 226-244.

——— y King, P. J. 1979. Proline; a novel cryoprotectant for the freeze-preservation of *Zea mays*. Plant Physiol. 64:675-678.

——— y ———. 1980. A simple freezing-unit and routine cryopreservation method for plant cell cultures. Cryo-letters 1:213-220.

Digitized by Google

Parte C

Aplicaciones de Técnicas Bioquímicas y Moleculares al Cultivo de Tejidos Vegetales

Digitized by Google

Capítulo 33

Ingeniería genética y cultivo de tejidos

A. Calderón*
W. M. Roca*
J. Jaynes**

* Unidad de Investigación en Biotecnología (UIB), Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia.
** Department of Biochemistry, Louisiana State University, Baton Rouge, Louisiana, E. U.

Digitized by Google

Introducción

En los últimos 50 años, el mejoramiento tradicional de plantas, combinado con prácticas agrícolas perfeccionadas y enriquecido con tecnología moderna, ha incrementado la producción agrícola destinada a la alimentación humana y animal. La ingeniería genética ofrece, por medio de la biotecnología agrícola, nuevos elementos de análisis a nivel de las moléculas, las células y los tejidos para comprender mejor las características agronómicas de las plantas y, por consiguiente, para manipularlas.

Tanto la ingeniería genética —también llamada tecnología del ADN recombinante— como la biología molecular en general se están aplicando actualmente para modificar caracteres unigénicos como la resistencia vegetal a virus e insectos, o el incremento de la calidad nutricional de las plantas mediante una proteína rica en aminoácidos esenciales y codificada por un solo gen. En los últimos 15 años se ha levantado, en el campo agrícola, una gran pirámide de conocimientos básicos y aplicados que crece con rapidez.

El cultivo de tejidos vegetales in vitro se ha convertido en el eje sobre el cual giran las nuevas tecnologías del mejoramiento genético de las plantas y un mejor conocimiento de los procesos genéticos y fisiológicos de éstas. Las condiciones medioambientales del cultivo in vitro (luz, temperatura, hormonas, nutrimentos) favorecen, en gran medida, esa tendencia, porque son controlables y facilitan por ello el aprendizaje de los procesos biológicos involucrados en el desarrollo de las plantas.

El fitomejoramiento, es decir, la introducción de características útiles en las plantas por medio de las técnicas tradicionales de Mendel, ha trasformado el mundo haciendo la llamada 'revolución verde'. Sin embargo, las técnicas tradicionales son dispendiosas y consumen gran cantidad de tiempo para seleccionar y establecer una característica particular y deseable en un cultivar; a menudo, es imposible incorporar algunas características empleando estos medios convencionales. La tecnología del ADN recombinante, en cambio, posee un gran potencial para la introducción de características deseables en las plantas. No obstante, esta tecnología no debe considerarse como un fin sino como un instrumento adicional para alcanzar el objetivo final de modificar y mejorar las plantas.

En este capítulo se describirá el estado actual de la manipulación genética dentro del campo del mejoramiento genético y de la nueva biotecnología.

Digitized by Google

Conceptos Fundamentales

La ingeniería genética, o técnica del ADN recombinante o manipulación genética, podría definirse, muy ampliamente, del modo siguiente: es la técnica con que se forman artificialmente combinaciones nuevas de material hereditario (ADN, ARN) mediante la inserción de moléculas de ácidos nucleicos —producidas fuera de la célula— dentro de virus, plásmidos bacterianos u otro vector de ácidos nucleicos; estos vectores incorporan las nuevas moléculas de ácido nucleico dentro de un organismo hospedante, en el cual éstas no se hallan presentes en condiciones naturales pero pueden ser replicadas. La publicación, en 1972, del trabajo realizado en el laboratorio del Dr. Paul Berg (Jackson et al., 1972) comenzó el desarrollo de la que posteriormente se llamaría técnica del ADN recombinante.

Un adelanto significativo en el desarrollo de la manipulación genética lo constituyeron, indudablemente, el estudio de los procesos de restricción (Arber y Linn, 1969) del ADN del bacteriófago lambda y el estudio de la modificación del ADN (Meselson y Yuan, 1968) de la bacteria *Escherichia coli* en su proceso de infección. El fenómeno de restricción se debe al fraccionamiento enzimático del ADN infectante por medio de enzimas de restricción, mientras que el de modificación es el resultado de la metilación del ADN del organismo hospedante mediante enzimas metilasas, reacción que evita el fraccionamiento del ADN del mismo hospedante por las enzimas de restricción. Estas enzimas son las que más se utilizan en la manipulación genética. Se conocen tres clases de enzimas de restricción, los tipos I, II y III (Yuan, 1981). Hasta 1985 se habían clasificado y catalogado 355 de tales enzimas (Kessler et al., 1985) y en los últimos años esta lista ha crecido casi a diario. Las enzimas de restricción de tipo II, que son las más usadas en la minipulación genética, reconocen y cortan el ADN en una secuencia particular de tetra, penta, hexa o heptanucleótidos que tienen un eje de simetría rotacional. Estas secuencias se llaman también palíndromos por analogía con las palabras que se pueden leer de igual manera de adelante hacia atrás y viceversa.

El Cuadro 33.1 presenta una lista de las enzimas de restricción más comunes. La investigación con enzimas ha evolucionado hasta tal punto que ya existen enzimas sintéticas que cortan el ADN en los sitios específicos en que lo hacen sus homólogos purificados de los microorganismos (Sluka et al., 1987). Estas enzimas sintéticas combinan secuencias de polipéptidos que identifican secuencias específicas de ADN, con secuencias de polipéptidos capaces de cortar la molécula de ADN por donde están aquéllas secuencias identificadas.

Digitized by Google

Cuadro 33.1. Lista de algunas enzimas de restricción y de sus secuencias de segmentación.

Microorganismo de origen	Enzima (abreviatura)	Secuencias específicas de segmentación[a]
Bacillus amyloliquefaciens H	BamHI	↓ GGATCC CCTAGG ↑
Escherichia coli	EcoRI	↓ GAATTC CTTAAG ↑
Haemophilus aegyptius	HaeIII	↓ GGCC CCGG ↑
Haemophilus influenzae	HindIII	↓ AAGCTT TTCGAA ↑
Providentia stuartii 164	PstI	CTGCAG GACGTC
Streptomyces albus G	SalI	↓ GTCGAC CAGCTG ↑

a. Las flechas (↑ ↓) indican el sitio de corte.

Otro descubrimiento importante que ha impulsado la manipulación genética es el aislamiento de los plásmidos bacterianos y su caracterización. Los plásmidos son ADN extracromosómico circular que se encuentra en la mayoría de los microorganismos gram-positivos y gram-negativos y en algunas levaduras, pero no en eucariontes superiores (Helinski, 1979). Para que puedan utilizarse como vehículos de clonamiento de moléculas de ADN, los plásmidos deben tener las tres propiedades siguientes:

- bajo peso molecular;
- genes que faciliten la selección cuando estén en células hospedantes, es decir genes marcadores;
- sitios únicos para el corte con enzimas de restricción, preferiblemente en genes que codifiquen para un fenotipo fácilmente detectable.

La manipulación de estos plásmidos para lograr la integración de moléculas 'pasajeras' se hace fuera de las células. Una vez construido, el vector se

Digitized by Google

trasporta dentro de una célula hospedante, la cual se encargará de multiplicarlo. En la Figura 33.1 se describe la genealogía de uno de los más populares vectores de clonamiento: el pBR322 (Sutcliffe, 1979); en la Figura 33.2 se describe una estrategia general de clonamiento con el pBR322. El lector interesado en clonamiento de genes puede consultar el excelente libro de Winnacker (1987).

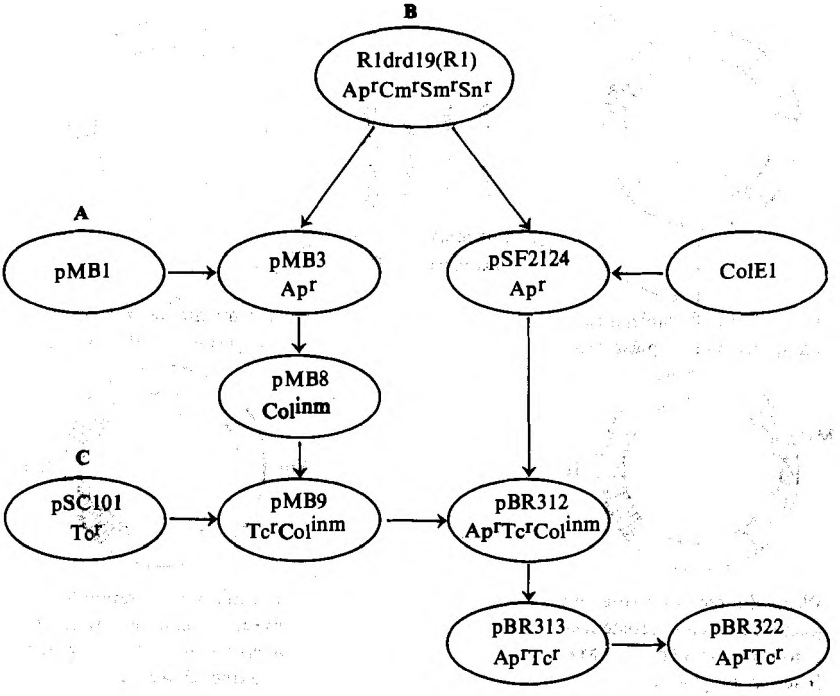


Figura 33.1. Genealogía del plásmido pBR322 en la cual aparecen: A) replicación de pMB1; B) el transposon Tn3 de resistencia a la ampicilina obtenido del plásmido R1drd19; y C) el gen de resistencia a tetraciclina proveniente del pSC101.

Trasformación Genética en los Vegetales

Básicamente, hay dos sistemas para introducir genes en el genoma de las plantas: la trasferencia directa y la trasferencia mediada por bacterias del género *Agrobacterium*. El primero consiste en la introducción directa de genes empleando técnicas como la microinyección o el bombardeo de

Digitized by Google

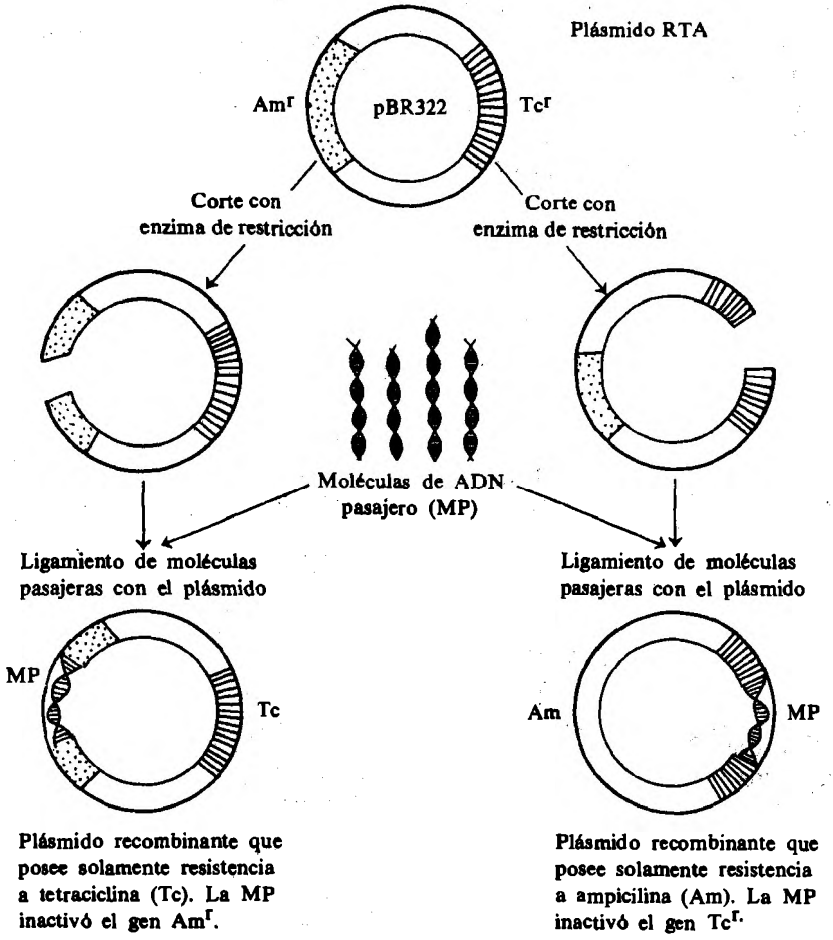


Figura 33.2. Estrategia de clonamiento en el plásmido pBR322. RTA = plásmido resistente a la tetraciclina y a la ampicilina; MP = molécula pasajera.

partículas de oro con un acelerador de partículas. El segundo utiliza las propiedades biológicas de la bacteria del suelo *Agrobacterium* sp. para introducir el ADN foráneo.

Introducción directa de genes

Se considera que la introducción directa de genes es una trasformación de las moléculas de ADN dentro de la célula vegetal sin la mediación de los

Digitized by Google

microorganismos. La trasformación puede ser mediada por sistemas que trasporten las moléculas de ADN hasta la célula. Ejemplos de estos sistemas son los liposomas, la microinyección, y el bombardeo con partículas de oro (Figura 33.3)

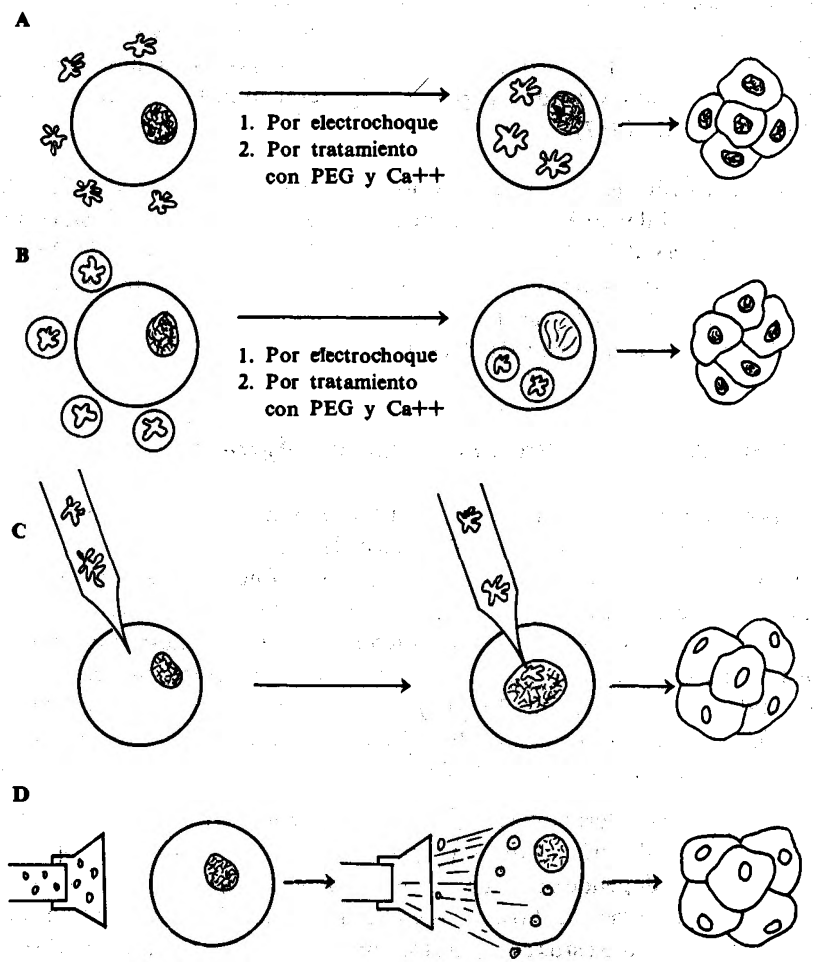


Figura 33.3. Métodos para trasportar ADN extraño al interior de las células vegetales. A) moléculas de ADN; B) moléculas de ADN encerradas en liposomas; C) microinyección de ADN; D) bombardeo con partículas de oro o de tungsteno que contienen ADN. = molécula.

Digitized by Google

La introducción directa de moléculas de ADN exógenas ha hecho posible la trasformación de protoplastos (Paszkowski et al., 1984; Hain et al., 1985). Existe, sin embargo, una gran limitante: deben establecerse sistemas de obtención de protoplastos y de regeneración de plantas a partir de ellos. La falta de estos sistemas es especialmente notoria en los cereales; solamente en el arroz existe un sistema de regeneración a partir de protoplastos (Kyozuka et al., 1987). Como solución a esta limitante, se desarrolló la inyección directa de moléculas de ADN en los retoños florales (de la Peña et al., 1987) y la llamada agroinoculación (Grimsley et al., 1987). Otro de estos sistemas promisorios es la microinyección de moléculas de ADN en embriones, ya que se pueden regenerar plantas a partir de ellos (Neuhaus et al., 1987).

Se desarrolló recientemente un novedoso sistema de introducción de ADN en la célula: en él se utilizan microproyectiles a alta velocidad como trasportadores del ADN (Klein et al., 1987). Las moléculas de ADN, atrapadas dentro de partículas de oro, son disparadas a la célula mediante un acelerador de partículas. Este sistema ha demostrado su eficiencia en la trasformación de la soya (MaCabe et al., 1988).

Introducción de genes mediada por *Agrobacterium*

Agrobacterium tumefaciens es una bacteria del suelo gram-negativa, que causa la enfermedad llamada 'agalla de la corona' en la mayor'ía de las plantas dicotiledóneas y en algunas monocotiledóneas; la bacteria infecta la planta en el sitio de una herida (de Cleene y de Ley, 1976). Las células de la agalla de la corona tienen dos características principales: 1) producen sustancias denominadas opinas que no están presentes en las células normales (Murai y Kemp, 1982), y 2) tienen la capacidad de proliferar indefinidamente en un medio de cultivo sin necesidad de hormonas de crecimiento (White y Braun, 1942).

Las opinas son derivados de intermediarios comunes en las rutas metabólicas. La producción de opinas específicas —por ejemplo, de octopina y de nopalina— depende de la cepa de *Agrobacterium* que induce el tumor y no de la especie vegetal hospedante (Petit et al., 1970). La bacteria que infecta la planta usa estos compuestos como fuente de energía, de carbono y de nitrógeno. La trasformación de las células de la planta, después de ser infectadas por *Agrobacterium*, se debe a un plásmido de elevado peso molecular (200 kilopares de bases) denominado plásmido-Ti, que es trasportado por *Agrobacterium* (van Larebeke et al., 1974). Más exactamente, un fragmento del plásmido-Ti es trasferido al genoma de la planta y se

Digitized by Google

expresará más tarde (Chilton et al., 1977). El fragmento trasferido se llama ADN-T, en las células de la planta, y región-T, en el plásmido bacteriano.

Para la integración del ADN-T en el genoma de la planta es indispensable, primero, una secuencia de 25 pares de bases (bp) de repetición directa que se encuentra a ambos lados de la región-T (Zambryski et al., 1980). El segundo componente indispensable para esa integración de la región-T son los denominados genes *vir*. Estos genes no son trasferidos al genoma de la planta, sino que actúan en trans sobre la región-T para promover su trasferencia (Hoekema et al., 1983). El ADN-T está conformado por dos grupos de genes: un grupo responsable de la morfología del tumor, y otro responsable de su crecimiento sin necesidad de hormonas (Schell et al., 1984). Esta clase de parasitismo de *Agrobacterium* en las plantas, por el cual el parásito (*Agrobacterium*) no sólo se adapta a las propiedades del hospedante (planta) sino que cambia específicamente las propiedades genéticas de éste, ha sido llamado colonización genética (Schell et al., 1979).

Considerando la biología del proceso de infección de *Agrobacterium* descrito anteriormente, es evidente que, desde el punto de vista práctico, no todas las características de ese proceso son necesarias. No hay necesidad de plantas que expresen opinas ni nadie desea plantas con tumores. Los conocimientos actuales sobre el proceso de trasferencia y de expresión del ADN-T en las plantas permite modificar los plásmidos-Ti para convertirlos en convenientes y eficaces vectores de genes en las plantas.

Para la trasferencia de la región-T, lo único indispensable son las secuencias en los bordes de esa región y, lógicamente, los genes *vir*. Esto quiere decir que, si la parte interna de la región-T ha sido escindida del plámido-Ti, éste deja de ser oncogénico y las células obtenidas de la infección con el plásmido mantendrán su capacidad regenerativa. Es necesario, sin embargo, desarrollar métodos para remplazar los genes de la región-T, si se quiere utilizar el plásmido-Ti como vector.

Hay dos métodos para lograr este remplazo de genes e introducir a la vez genes en las plantas. El primero, denominado de los vectores cointegrantes, se basa en el uso de un plásmido-Ti en el cual los genes de la región-T han sido remplazados por las secuencias de un plásmido de clonamiento en *E. coli*, como el pBR322; de este modo, un gen determinado, clonado en pBR322, puede cointegrarse con el plásmido-Ti por la vía de una recombinación homóloga (Zambryski et al., 1983). El segundo sistema, denominado vector binario, se basa en la interacción de dos plásmidos compatibles: uno que trasporta los genes *vir* y otro que trasporta el ADN-T (junto con el gen de interés) y las secuencias que le confieren la capacidad de

Digitized by Google

replicación en bacterias de los géneros *Escherichia* y *Agrobacterium* (Hoekema et al., 1983).

Los explantes vegetales utilizados para la trasformación mediada por *Agrobacterium* han sido muy variados: protoplastos (Fraley et al., 1983), discos de hojas (Horsch et al., 1985), embriones somáticos (McGranahan et al., 1988) y meristemas apicales (Ulian et al., 1988). La Figura 33.4 presenta un diagrama de algunas alternativas de trasformación.

Aplicación de las Tecnologías de Introducción de Genes en Vegetales

Varias estrategias se aplican en ingeniería genética para obtener plantas tolerantes a virus, patógenos e insectos, resistentes a los herbicidas, y con mejor calidad nutricional.

Plantas tolerantes a infecciones virales

La introducción de genes dentro de las plantas es una técnica muy promisoria para lograr plantas tolerantes a infecciones virales. Se introducen entonces genes virales que detengan el desarrollo del virus en la planta, o impidan su difusión entre una y otra célula, o regulen la producción de partículas virales.

Protección cruzada ha sido un término ampliamente utilizado para identificar la protección obtenida por una planta después de su inoculación con una cepa benigna de un virus, que la protejería de la infección causada por una cepa virulenta del mismo virus. Esta metodología es bastante eficaz pero tiene las siguientes limitaciones desde el punto de vista práctico: a) la cepa benigna del virus puede convertirse, después de un proceso de mutación, en una cepa altamente virulenta que causaría a la postre pérdidas en vez de protección; b) una cepa viral puede ser benigna para un tipo de planta pero muy virulenta para otro, por lo cual no es recomendable distribuir el virus directamente en el campo.

Estas limitaciones podrían superarse si la protección dependiera de la planta, es decir, si ella fuera la expresión de un gen y no el resultado de la infección de un virus completo. Publicaciones recientes demuestran la veracidad de esta hipótesis (Abel et al., 1986; Nelson et al., 1988) porque se obtuvieron plantas de tomate tolerantes a la infección causada por el virus

Digitized by Google

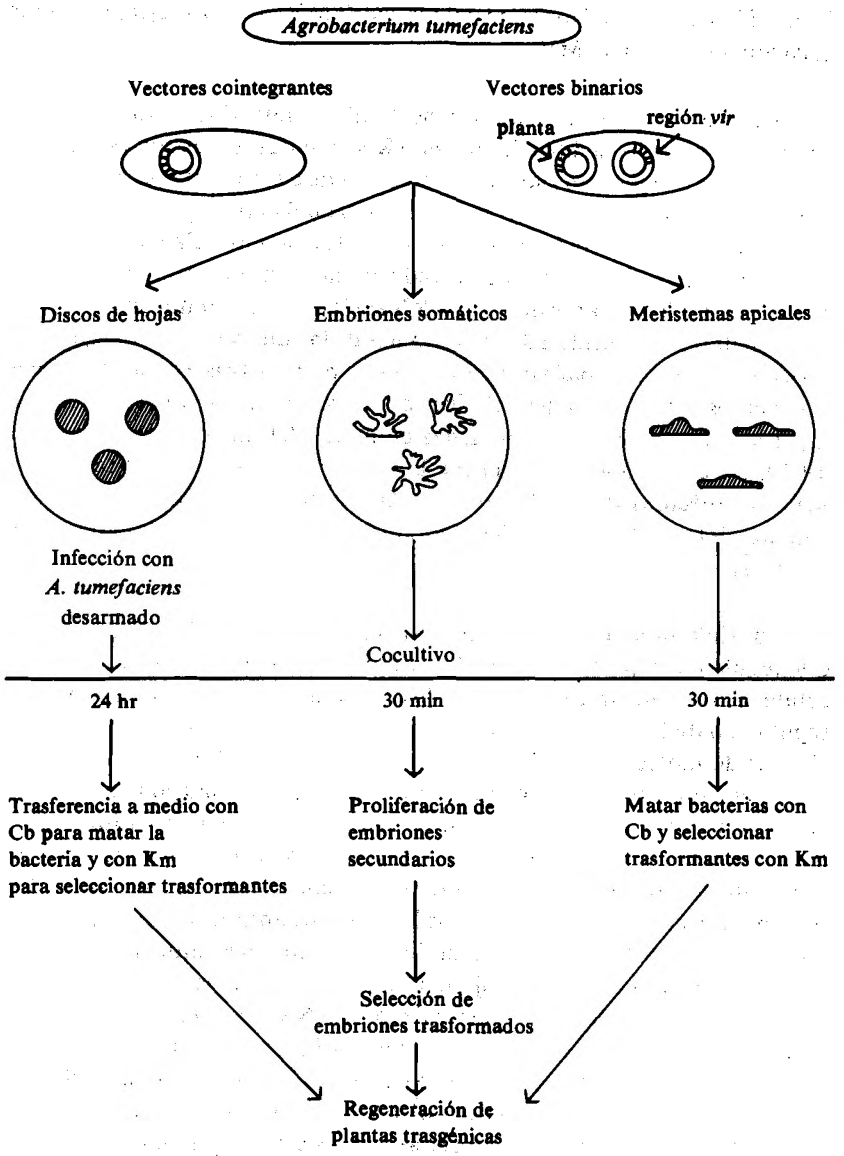


Figura 33.4. Introducción de genes en las plantas mediada por *A. tumefaciens*. (En el plásmido 'desarmado' los genes que inducen tumores han sido eliminados.) Cb = carbenicilina; Km = kanamicina.

Digitized by Google

del mosaico del tomate (ToMV); las plantas eran trasgénicas, y expresaban un gen introducido por *A. tumefaciens* que codifica para la proteína de la cápsida del virus del mosaico del tabaco (TMV), un virus estrechamente relacionado con el ToMV.

La protección cruzada se obtiene también introduciendo genes que codifiquen para los ácidos llamados ARN satélites. Estos son especies de ARN que se encuentran asociadas con cepas de ciertos virus; se replican en células infectadas por el virus particular del cual ellos dependen y, puesto que quedan empaquetados con el ARN viral en la partícula viral, acompañan a los virus de un tejido infectado de la planta a un nuevo sitio de infección. Lo interesante de estos ARN satélites es que reducen, a veces en gran medida, la severidad de los síntomas de la enfermedad causada por el virus que ellos acompañan. Se obtuvieron plantas trasgénicas de tabaco que demostraron tolerancia al virus del mosaico del pepino (Harrison et al,. 1987) y al virus de las manchas en anillo del tabaco (Gerlach et al., 1987). La estrategia empleada fue la introducción dentro del tabaco de genes (moléculas de ADN) que, al ser trascritos, resultaban ser ARN satélites del tipo descrito, es decir, los que atenúan síntomas de enfermedades virales.

Es posible también conferir tolerancia a los virus utilizando métodos que regulen la expresión del ARN viral, una vez se halle éste dentro de la célula. Esto es posible empleando los llamados ARN de antisentido. La regulación dicha consiste en que los ARN de antisentido participan en la síntesis de moléculas de ARN pequeñas que no codifican para ninguna proteína, pero tienen un alto grado de complementariedad con un segundo ARN con el cual se pueden hibridar. Este tipo de regulación fue descubierto primero en procariontes, y en todos los casos descritos hasta el momento los ARN de antisentido actúan como represores del mARN funcional. Una detallada revisión de los ARN de antisentido fue hecha por Green et al. (1986). Estas secuencias han sido llamadas también secuencias de interferencia con el mensajero (micARN), y pueden construirse de manera que sean complementarias de los ARN virales. Recientemente se han construido secuencias de ADN que codifican para ciertos micARN que son complementarios, por el extremo 5', de algunos virus ARN de plantas tropicales.[1] Estas secuencias de ADN se podrían introducir en plantas y se espera que les confieran protección regulando en ellas la

1. Jaynes, J. Información sin publicar.

Digitized by Google

expresión del ARN viral. En la Figura 33.5 se esquematiza la estrategia general para lograr el control de enfermedades virales utilizando los ARN de antisentido.

Plantas tolerantes a los insectos y resistentes a los herbicidas

Hay dos estrategias prometedoras para inducir en las plantas resistencia a los insectos: la resistencia conferida por la toxina de la bacteria *Bacillus thuringiensis*, y la acción de los inhibidores de proteasas inducidos por heridas causadas en la planta.

La bacteria *Bacillus thuringiensis* produce un polipéptido activo contra varias especies de insectos. Durante la esporulación, la bacteria produce una delta-protoxina que se almacena en cuerpos de inclusión celular; una vez ingerida por un insecto susceptible, la toxina es solubilizada y cortada por proteasas en el tracto digestivo del insecto, y se forma entonces el principio activo de la toxina. Hay varias cepas bacterianas que producen delta-toxinas diferentes; por ejemplo, la cepa *israelensis* es activa contra las especies del orden Diptera, mientras que la cepa *berliner* lo es contra las especies del orden Lepidoptera. Las delta-toxinas se consideran un sistema interesante de biocontrol puesto que afectan de manera específica un grupo de insectos; además, han sido utilizadas durante mucho tiempo como insecticidas biológicos seguros. Para obtener plantas resistentes se clonaron varios subfragmentos del gen que codifica para la delta-toxina de la cepa *berliner*, y se introdujeron en las plantas de tabaco utilizando *A. tumefaciens* como vector (Vaeck et al., 1987). Las plantas regeneradas produjeron suficiente toxina como para asegurar su protección cuando fueran atacadas por la larva del gusano del tabaco. Este nuevo gen fue trasmitido como un carácter dominante a las siguientes generaciones. Un gen similar ha sido introducido también en el tomate y, de igual manera, le confiere resistencia a los insectos (Fischhoff et al., 1987).

Como se mencionó antes, otra estrategia interesante son los genes que codifican para los inhibidores de proteasas producidos después de que se ha causado una herida a una planta, ya sea mecánicamente o por la acción de un insecto; cuando así ocurre, se liberan, de manera sistemática, factores que inducen la producción de inhibidores de proteasas. Estos inhibidores están dirigidos contra las proteasas del insecto y no contra las de la planta, de modo que interfieren con la digestión del insecto protegiendo así a la planta. El gen que codifica para el inhibidor de la tripsina, clonado de una leguminosa (*Vigna unguiculata*), fue introducido en plantas de tabaco y demostró que daba una resistencia mucho más general al ataque de

Digitized by Google

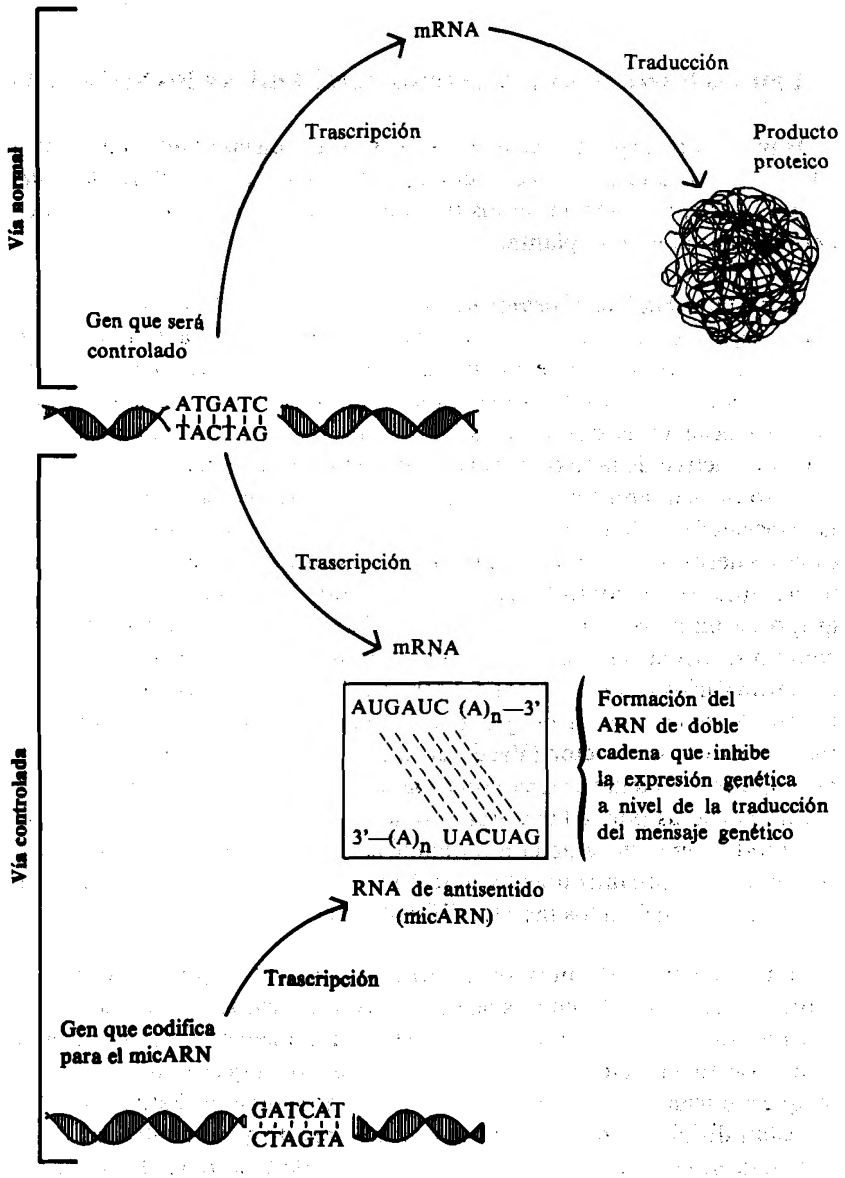


Figura 33.5. Mecanismo de inhibición de la expresión genética por medio de los micARN.

Digitized by Google

insectos herbívoros de lo que se podría esperar de las delta-toxinas (Hilder et al., 1987).

El uso de herbicidas para reducir las pérdidas en la producción de las especies vegetales económicamente importantes se ha convertido en una práctica frecuente en la agricultura moderna. La industria moderna ha producido herbicidas muy efectivos y seguros para los animales y, en general, para el medio ambiente. Estos nuevos herbicidas inhiben en la planta vías biosintéticas específicas en la producción de aminoácidos y, por lo regular, no pueden discriminar entre una maleza y la especie cultivada. Para enmendar esta limitación, se han producido plantas trasgénicas capaces de modificar el herbicida para que no tenga efectos tóxicos en ellas (de Block et al., 1987). El gen que codifica para la enzima fosfinotricina acetiltransferasa (PAT) ha sido clonado del hongo *Streptomyces hygroscopicus* (Thompson et al., 1987). Esta enzima confiere resistencia al herbicida fosfinotricina, que es un potente inhibidor de la glutaminosintetasa (una enzima clave en la regulación del metabolismo del nitrógeno). Las plantas transgénicas que contienen el gen que codifica para PAT son resistentes a altas concentraciones del herbicida fosfinotricina.

Mejoramiento de la calidad nutricional de los cultivos

El contenido de proteína nutritiva de las plantas se considera bajo si se compara con el de fuentes proteicas animales. Por otro lado, la calidad nutricional de las proteínas se determina según su contenido de aminoácidos esenciales. Los aminoácidos, componentes estructurales de las proteínas, se clasifican en no esenciales, o sea, que pueden ser sintetizados por el organismo animal, y esenciales, que deben ser suministrados en la dieta. Algunas proteínas de origen animal, como la ovoalbúmina, tienen un gran valor nutritivo ya que poseen un alto porcentaje de aminoácidos esenciales: 22.8% de sus nutrimentos corresponde a lisina, metionina, triptofano, treonina e isoleucina, que son los cinco aminoácidos esenciales más escasos en las gramíneas. Este porcentaje contrasta grandemente con el contenido de aminoácidos esenciales de las gramíneas, que es de aproximadamente 13%.

En los países semitropicales y tropicales, las dietas son nutricionalmente inadecuadas porque carecen, principalmente, de proteínas de alta calidad nutritiva. Las deficiencias en aminoácidos esenciales de los alimentos básicos del trópico (cereales y tubérculos) son ampliamente conocidas. El Cuadro 33.2 presenta la cantidad de aminoácidos esenciales contenida en determinada unidad de alimento derivado de algunos de los cultivos de más consumo en las regiones tropicales.

Digitized by Google

Cuadro 33.2. Aminoácidos esenciales[a] contenidos en una cantidad calórica de alimento (500 g).

Aminoácido	Requerimientos[b] (g/día)	Contenido de aminoácidos (g) en:						
		Arroz	Trigo	Maíz	Cebada	Papa	Yuca	Soya
Histidina	0.60	0.74	1.04	0.98	0.95	0.15	0.09	4.7
Isoleucina	2.23	1.48	2.03	2.50	1.75	0.44	0.16	9.1
Leucina	2.66	2.76	3.37	5.85	3.30	0.50	0.23	13.8
Lisina	1.83	1.08	1.34	0.90	1.60	0.54	0.23	12.3
Metionina	0.80	0.61	0.99	1.21	0.77	0.13	0.04	2.9
Fenilalanina	1.70	1.55	2.48	1.96	2.46	0.44	0.16	8.9
Treonina	1.54	1.18	1.49	1.44	1.68	0.40	0.16	7.7
Triptofano	0.40	0.034	0.60	0.234	0.60	0.11	0.07	2.3
Valina	1.86	2.12	2.13	2.07	2.44	0.54	0.17	9.7

a. La producción presentada aquí supone que la proteína se encuentra biodisponible en un 100%; por tanto, estas cifras sobrestiman la producción de aminoácidos esenciales.
b. Los requerimientos en g/día han sido determinados por la FAO para un niño de 20 kg.

Una estrategia para corregir esos defectos nutricionales es la síntesis e introducción de genes que codifiquen para proteínas homopoliméricas (o sea, que contengan un solo tipo de aminoácido) o para proteínas conformadas por la repetición de 2 ó 3 aminoácidos esenciales. Se han sintetizado y clonado los genes Sp44(1), Sp44(2), Sp47(1) y Sp47(2) (Figura 33.6), que codifican para los polipéptidos poseedores de un alto contenido de los aminoácidos esenciales más limitantes (lisina, triptofano, metionina, treonina e isoleucina) de una dieta a base de cereales y tubérculos.[2]

Conclusiones y Perspectivas

Parece evidente, por lo expuesto en este capítulo, que las técnicas de manipulación genética son importantes en el contexto general de la agricultura moderna. La biotecnología agrícola se encargará de conectar áreas básicas de biología molecular y de biología celular con las prácticas agrícolas tradicionales; esta labor de conjunto producirá las nuevas variedades de plantas que se cultivarán en los próximos 15 a 20 años en los países industrializados.

2. Jaynes, J. Comunicación personal.

Digitized by Google

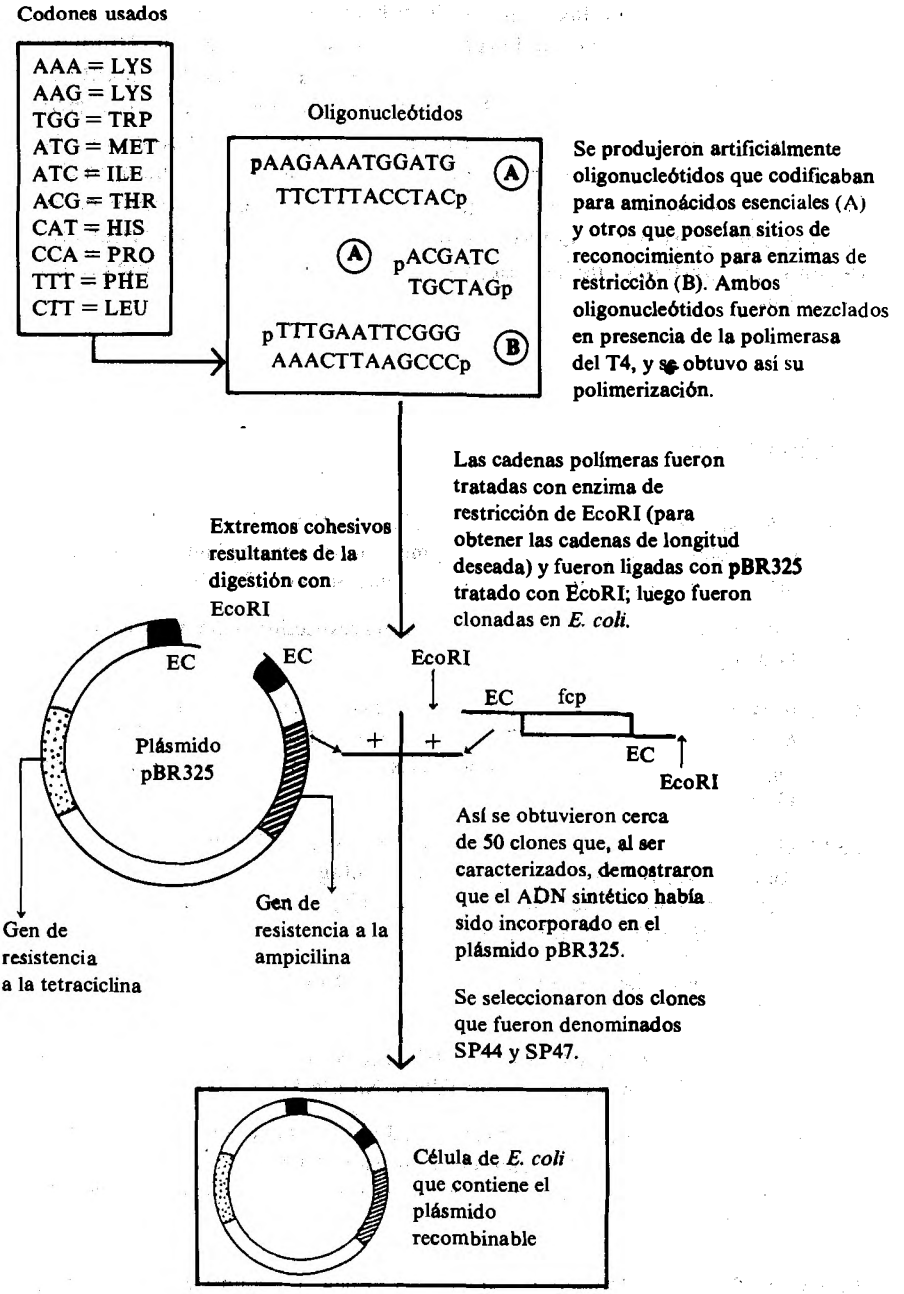


Figura 33.6. Construcción y clonamiento de ADN sintético. EC = extremo cohesivo (AATT); fcp = fragmento de la cadena polimerizada.

Digitized by Google

Conviene anotar que las técnicas de cultivo de tejidos y de células en condiciones in vitro despojan de realidad la llamada 'ventaja del trópico'. Esta ventaja confería a los países de la zona tórrida, que generalmente se consideran países subdesarrollados o en vías de desarrollo, un factor importante para la consecución de divisas, ya que se encargaban de la producción y exportación de los cultivos que solamente crecían en esa zona. Hoy, en cambio, los países en vías de desarrollo deben tomar parte activa en el desarrollo de la biotecnología agrícola con miras a evitar una dependencia agrícola que hace tan sólo unos pocos años se hubiese creído imposible.

Referencias

Abel, P. P.; Nelson, R. S.; Hoffman, B.de N.; Rogers, S. G.; Fraley, R. T. y Beachy, R. N. 1986. Delay of disease development in transgenic plant that expresses the tobacco mosaic virus coat protein gene. Science 232:738-743.

Arber, W. y Linn, S. 1969. DNA modification and restriction. Ann. Rev. Biochem. 38:467-500.

Chilton, M. D.; Drumond, M. H.; Merlo, D. J.; Sciaky, D.; Montoya, A.; Gordon, M. P. y Nester, E. W. 1977. Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: The molecular bases of crown-gall tumor genesis. Cell 11:263-271.

de Block, M.; Botterman, J.; Vandewiele, M.; Dockx, J.; Thoen, C.; Gosselé, V.; Rao Morva, N.; Thompson, C.; van Montagu, M. y Leemans, J. 1987. Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. EMBO J. 6:2513-2518.

de Cleene, M. y de Ley, J. 1976. The host range of crown gall. J. Bot. Rev. 42:289-466.

de la Peña, A.; Lorz, H. y Schell, J. 1987. Transgenic rye plants obtained by injecting DNA into young flora: Tillers. Nature 325:274-276.

Fischhoff, D. A.; Bowdish, K. S.; Perlak, F. J.; Morrone, P. G.; McCormick, S. M.; Niedermeyer, J. G.; Dean, D. A.; Kusano-Kretzmer, K.; Mayer, E. J. y Rochester, D. E. et al. 1987. Insect tolerant transgenic tomato plants. Biotechnology 5:807-813.

Fraley, R.; Rogers, S.; Horsch, R.; Sanders, S.; Flick, J.; Adams, S.; Bittner, M.; Brand, L.; Fink, C. y Fry, J. et al. 1983. Expression of bacterial genes in plant cells. Proc. Natl. Acad. Sci. (E.U.) 80:4803-4807.

Digitized by Google

Gerlach, W. L.; Llewellyn, D. y Haseloff, J. 1987. Construction of a plant disease resistence gene from the satellite RNA of tobacco ringspot virus. Nature 328:802-805.

Green, P. J.; Pines, O. e Inouye, M. 1986. The role of antisense RNA in gene regulation. Annu. Rev. Biochem. 55:569-597.

Grimsley, N.; Hohn, T.; Davies, J. W. y Hohn, B. 1987. *Agrobacterium*-mediated delivery of infectious maize streak virus into maize plants. Nature 325: 177-179.

Hain, R.; Stabel, P.; Czernilofsky, A. P.; Steinbiss, H. H.; Herrera-Estrella, L. y Schell, J. 1985. Uptake, integration, expression and genetic transmission of a selectable chimeric gene by plant protoplasts. Mol. Gen. Genet. 199:161-168.

Harrison, B. D.; Mayo, M. A. y Baulcombe, D. C. 1987. Virus resistance in transgenic plants that express cucumber mosaic virus satellite RNA. Nature 328:799-802.

Helinski, D. R. 1979. Bacterial plasmids: Autonomous replication and vehicles for gene cloning. CRC Crit. Rev. Biochem. 7:83-101.

Hilder, V. A.; Gatehouse, A. M. R.; Sheerman, S. E.; Borker, R. F. y Boulter, D. 1987. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. Nature 300:160-163.

Hoekema, A.; Hirsch, P. R; Hookaas, P. J. J. y Shilperoort, R. A. 1983. A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T- regions of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. Nature 303:179-180.

Horsch, R. B.; Fry, J. E.; Hoffman, N. L.; Eichholtz, D.; Rogers, S. G. y Fraley, R. T. 1985. A simple and general method for transferring genes to plants. Science 227:1229-1231.

Jackson, D. A.; Symons, R. H. y Berg, P. 1972. Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of simian virus 40: Circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. (E.U.) 69:2904-2909.

Kessler, C.; Neumaier, P. S. y Wolf, W. 1985. Recognition sequences of restriction endonucleases and methylases: A review. Gene 33:1-102.

Klein, T. M.; Wolf, E. D.; Wu, R. y Sanford, J. C. 1987. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. Nature 327:70-73.

Kyozuka, I.; Hayashi, Y. y Shimamoto, K. 1987. High frequency plant regeneration from rice protoplasts by novel nurse culture methods. Mol. Gen. Genet. 206:408-413.

Digitized by Google

McCabe, D. E.; Swain, W. F.; Mortinell, B. J. y Christou, P. 1988. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. Biotechnology 6:923-926.

McGranahan, G. H.; Leslie, C. A.; Uratsu, S. L.; Martin, L. A. y Dandekar, A. M. 1988. *Agrobacterium*-mediated transformation of walnut somatic embryos and regeneration of transgenic plants. Bio/technology 6:800-804.

Meselson, M. y Yan, R. 1968. DNA restriction enzyme from *E. coli* nature. 217:1110-1114.

Murai, N. y Kemp, J. D. 1982. Octopine synthase mRNA isolated from sunflower crown gall is homologous to the Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. Proc. Natl. Acad. Sci. (E.U.) 79:86-91.

Nelson, R. S.; McCormick, S. M.; Delannay, X.; Dubé, P.; Layton, J.; Anderson, E. J.; Kaniewska, M.; Protesch, R. K.; Horsch, R. B.; Rogers, S. G.; Fraley, R. T. y Beachy, R. N. 1988. Virus tolerance, plant growth and performance of transgenic tomato plants expressing coat protein from tobacco mosaic virus. Bio/technology 6:403-409.

Neuhaus, G.; Spangenberg, G.; Mittelsten-Scheid, O. y Schweiger, H.G. 1987. Transgenic rapeseed plants obtained by the microinjection of DNA into microspore-derived embrioids. Theor. Appl. Genet. 75:30-36.

Paszkowski, J.; Shillito, R. D.; Saul, M.; Mandak, V.; Hohn, T. C.; Hohn, B. y Potrykus, I. 1984. Direct gene transfer to plants. EMBO J. 3:2717-2722.

Petit, A.; Delhaye, S.; Tempe, J. y Morel, G. 1970. Recherches sur les guanidines des tissus de crown gall: mise en évidence d'une relation biochimique spécifique entre les sources d'*Agrobacterium* et les tumeurs qu'elles induisent. Physiol. Vég. 8:205-213.

Schell, J.; van Montagu, M.; de Beuckeleer, M.; de Block, M.; Depicker, A.; de Wilde, M.; Engler, G.; Genetello, C.; Hernalsteens, J.-P., Holters, M. et al. 1979. Interactions and DNA transfer between *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid and the plant host. Proc. Roy. Soc. Lond. B. 204:251-266.

———; ———; Willmitzer, L.; Leemans, J.; Deblaere, R.; Hoos, H.; Inze, D.; Wostemeyer, A.; Otten, L. y Zambryski, P. 1984. Transfer of foreign genes to plants and its use to study development processes. En: Beers Jr., R.F. y Basset, E.G. (eds.). Cell fusion: Gene transfer and transformation. Raven Press, Nueva York.

Sluka, J. P.; Horvath, S. J.; Bruist, M. P.; Simon, M. I. y Dervan, P. B. 1987. Synthesis of a sequence-specific DNA-cleaving peptide. Science 238: 1129-1132.

Sutcliffe, G. 1979. Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322: Cold Spring Harbor symposium. Quant. Biol. 43:77-90.

Digitized by Google

Thompson, C. J.; Rao-Movra, N.; Tizard, R.; Crameri, R.; Davies, J. E.; Lauwereys, M. y Botterman, J. 1987. Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*. EMBO J. 6: 2519-2523.

Ulian, E. C.; Smith, R. H.; Gould, J. H. y McKnight, T. D. 1988. Transformation of plants via the shoot apex. In vitro Cel. Dev. Biol. 24:951-954.

Vaeck, M.; Reynaerts, A.; Hofte, H.; Jansens, S.; de Beuckeleer, M.; Carolline, D.; Zabeau, M.; van Montagu, M. y Leemans, J. 1987. Transgenic plants protected from insect attack. Nature 328:33-37.

van Larebeke, N.; Engler, G.; Holsters, M.; van den Elsacker, S.; Zaenen, I.; Schilperoort, R. A. y Schell, J. 1974. Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown-gall induction ability. Nature 252:169-170.

White, P. R. y Braun, A. C. 1942. A cancerous neoplasm of plant: Autonomous bacterial-free crown-gall tissue. Cancer Res. 2:597-617.

Winnacker, E. L. 1987. From genes to clones: Introduction to gene technology. VCH, Weinheim, Nueva York.

Yuan, R. 1981. Structure and mechanism of multifunctional restriction endonucleases. Ann. Rev. Biochem. 50:285-315.

Zambryski, P.; Holsters, M.; Kruger, K.; Depicker, A.; Schell, J.; van Montagu, M. y Goodman, H. M. 1980. Tumor DNA in plant cells transformed by *Agrobacterium tumefaciens*. Science 209:1385-1391.

———; Joos, H.; Genetello, C.; Leemans, J.; van Montagu, M. y Schell, J. 1983. Ti plasmid vector for introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. EMBO J. 2:2143-2150.

Digitized by Google

Capítulo 34

Manipulaciones genéticas con protoplastos

L. Szabados*

* Unidad de Investigación en Biotecnología (UIB), Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. Dirección actual: Biological Research Center, Institute of Plant Physiology, Szeged, Hungría.

Digitized by Google

Introducción

Los protoplastos ofrecen una excelente oportunidad para aplicar los conceptos y técnicas de la genética microbiana a las plantas superiores. Se pueden manipular grandes poblaciones de protoplastos como si fueran células individuales y regenerar luego plantas de las células que se seleccionen. Las manipulaciones genéticas in vitro de las plantas superiores son importantes no sólo en los estudios de genética básica, sino también en programas aplicados de fitomejoramiento. Las posibilidades que abre el uso de sistemas de protoplastos para el mejoramiento de las plantas de especies cultivadas —y los problemas asociados con ellos— se han discutido y revisado ampliamente (Chaleff, 1983; Negrutiu et al., 1984; Sybenga, 1983; Thomas et al., 1979; Evans et al., 1983).

Los pasos que se siguen en un programa de manipulación genética de plantas (Figura 34.1) son:

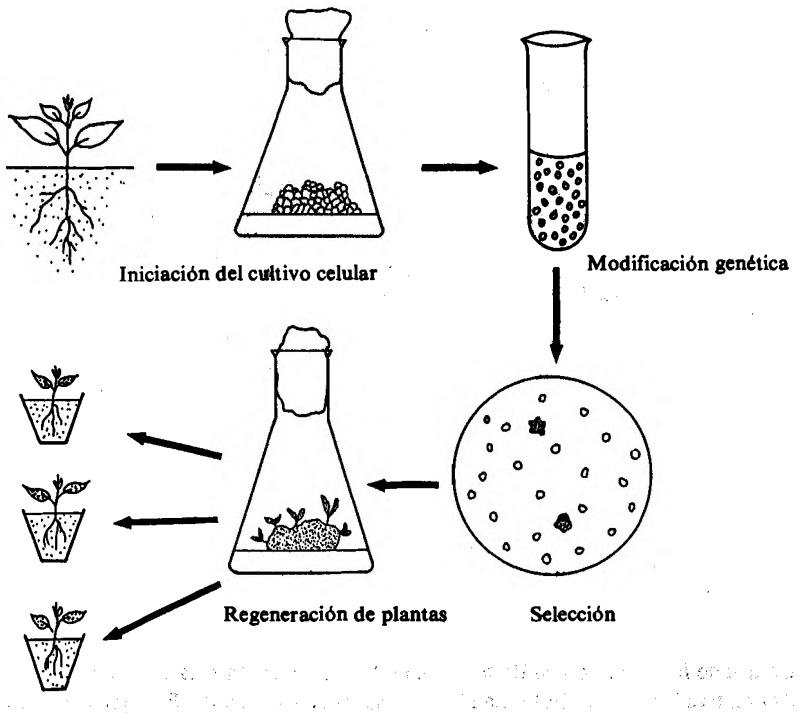


Figura 34.1. Esquema general de la manipulación genética in vitro.

Digitized by Google

1) Aislamiento de los protoplastos partiendo de cultivos celulares o de cultivos de hoja (ver el Capítulo 10).

2) Modificación genética de los protoplastos aislados: mutagénesis, fusión, trasformación.

3) Selección del fenotipo deseado.

4) Regeneración de las plantas a partir de los clones seleccionados.

Protoplastos y Aislamiento de Mutantes

Las células mutantes se han utilizado extensivamente para estudios bioquímicos y genéticos. Hay diversas razones para aislar mutantes bioquímicos de los cultivos de protoplastos o de células:

- Para el estudio del metabolismo celular.
- Para programas genéticos que emplean células somáticas.
- Por su importancia agronómica.

El uso de protoplastos para el aislamiento y la selección de mutantes tiene varias ventajas: a) los protoplastos existen como células individuales; b) es posible aislar poblaciones uniformes y numerosas de protoplastos haploides partiendo de tejidos mesófilos de plantas androgénicas; c) los protoplastos recién aislados son generalmente poblaciones homogéneas que no presentan la variabilidad genética observada en cultivos celulares prolongados; d) los sistemas de protoplastos son adecuados para la interpretación estadística (Negrutiu et al., 1984; Maliga, 1984; Maliga et al., 1982a).

Para aislar mutantes, sin embargo, se requieren grandes cantidades de protoplastos que estén dividiéndose activamente. El aislamiento de protoplastos y la técnica de su cultivo deberían mejorarse hasta un nivel tal que la liberación de protoplastos, la viabilidad y la eficiencia de su cultivo sean reproducibles en grado sumo. En un sistema de alta eficiencia, la progresión del ciclo celular de la población de protoplastos presenta cierta sincronía durante las primeras mitosis, fenómeno que permite aplicar el tratamiento mutagénico en varios puntos del ciclo celular.

Poblaciones de protoplastos haploides, aptas para experimentos de aislamiento de mutantes, se han aislado de *Nicotiana plumbaginifolia* (Maliga, 1984; Negrutiu, 1981) y de *Hyosciamus muticus* (Strauss et al., 1981; Shimamoto et al., 1983).

Digitized by Google

En esos sistemas de protoplastos se han aplicado diferentes tratamientos mutagénicos. La irradiación es un método limpio y efectivo para inducir mutaciones. Negrutiu (1981) utilizó luz ultravioleta para irradiar los protoplastos haploides de *N. plumbaginifolia*. Bourgin (1978) obtuvo mutaciones en protoplastos de mesófilo de tabaco haploide empleando luz ultravioleta, tanto el día del aislamiento como uno, dos o tres días después de iniciado su cultivo. La irradiación gamma ha sido utilizada por Maliga et al. (1982a) y por Marton et al. (1982) para la mutagénesis de los protoplastos haploides de *N. plumbaginifolia*.

Varios mutágenos químicos se han utilizado para inducir mutagenésis en protoplastos de plantas. Uno de ellos es N-etil-N-nitrosourea (Cséplo et al., 1982; Evola, 1983; Ohyama, 1982) cuyo resultado ha sido exitoso; este mutágeno pierde su actividad aproximadamente 48 horas después de aplicado y puede usarse en el medio de cultivo de los protoplastos sin que sea necesario lavarlo. N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) o el sulfonato de etilmetano (EMS) también se han utilizado como mutágenos químicos para la obtención y aislamiento de mutantes partiendo de protoplastos (Ohyama, 1982; Strauss et al., 1981). Gebhardt et al. (1981) encontraron que el tratamiento con MNNG es más efectivo en las poblaciones de protoplastos en división —dos días después, por ejemplo, de la iniciación del cultivo— que en las de protoplastos recién aislados.

Las condiciones de cultivo, la programación del tratamiento mutagénico, el tipo de mutágeno y su dosis se deberían optimizar experimentalmente para cada sistema de protoplastos. Frecuentemente, los protoplastos se incuban en altas densidades durante los primeros días de cultivo, en el momento de la mutagénesis. Una vez que han empezado a dividirse, se cultivan en bajas densidades para permitir la separación de las colonias originadas de células individuales y para hacer la selección.

Los protoplastos de *N. plumbaginifolia* se han utilizado para estos experimentos. Se han aislado mutantes auxótrofos que requieren una base de ácido nucleico y aminoácidos. El procedimiento de aislamiento consiste en cultivar los protoplastos que han experimentado mutaciones para producir colonias en un medio completo; más tarde se realizan pruebas individuales para conocer sus requerimientos nutricionales en un medio mínimo. Tres colonias auxótrofas seleccionadas se han identificado como líneas que requieren uracilo, isoleucina y leucina (Maliga et al., 1982a, Sidorov et al., 1981a). Mediante un procedimiento similar se han aislado mutantes que requieren histidina, triptofano y nicotinamida de protoplastos haploides de *H. muticus* (Gebhardt et al., 1981). Shimamoto y King (1983) aislaron también de *H. muticus* mutantes auxótrofos que requieren histidina.

Digitized by Google

Líneas celulares deficientes en nitratoreductasa se aislaron de protoplastos de mesófilo de *N. plumbaginifolia* haploide sometidos a mutación (Maliga et al., 1982a; Marton et al., 1982a), de *H. muticus* haploide (Strauss et al., 1981), y de *N. tabacum* dihaploide (Evola, 1983). En los tres casos, las líneas aisladas se seleccionaron por su resistencia al ion clorato. La nitratoreductasa reduce el clorato a clorito, que es tóxico para las células de las plantas. Por otra parte, las células deficientes en nitratoreductasa son resistentes al clorato y, por tanto, se puede utilizar este ion para una selección indirecta de células deficientes en esa enzima.

Varios mutantes resistentes a los antibióticos, a algunas drogas, y a los análogos de aminoácidos se han seleccionado a partir de protoplastos. Líneas resistentes a la lincomicina se seleccionaron en cultivos de protoplastos foliares del tabaco (*N. plumbaginifolia*) por su capacidad para tomar un color verde en el medio de regeneración, en presencia del antibiótico (Cséplo y Maliga, 1982). Este tipo de resistencia se trasmitió por vía materna a la población F_1.

Las líneas resistentes a S-aminoetil-cisteína de *N. plumbaginifolia* fueron seleccionadas de clones de protoplastos de mesófilo foliar sometidos a mutación con luz ultravioleta (Negrutiu, 1981). Colonias celulares resistentes a concentraciones tóxicas de L-valina ó L-lisina más L-treonina fueron seleccionadas a partir de cultivos de protoplastos de mesófilo de tabaco haploide (*N. tabacum*) que sufrieron mutación con luz ultravioleta (Bourgin, 1978; Bourgin et al., 1980).

Ciertos resultados indican que las variaciones provenientes de los cultivos de protoplastos, ya sea espontáneas o inducidas, tienen una importancia no sólo científica sino también práctica en el fitomejoramiento (Chaleff, 1983).

Fusión de Protoplastos e Hibridación Somática

La hibridación somática en las plantas superiores fué posible cuando los métodos enzimáticos permitieron el aislamiento de grandes números de protoplastos viables de los cuales podían regenerarse las plantas, y cuando se desarrollaron los métodos de fusión de los protoplastos.

Schieder (1982) consideró cuatro aspectos importantes de la fusión de protoplastos:

1. La producción de híbridos somáticos anfidiploides y fértiles de especies sexualmente incompatibles.

Digitized by Google

2. La producción de líneas heterocigóticas dentro de una especie que normalmente sólo se propaga por vía vegetativa, como la papa.

3. La trasferencia de sólo una parte de la información nuclear, de una especie a otra, mediante el fenómeno de la eliminación cromosómica.

4. La trasferencia de información genética citoplásmica de una línea o especie a otra.

Fusión de protoplastos

En la Figura 34.2 se representan esquemáticamente los distintos pasos de la fusión de protoplastos. En los primeros trabajos se utilizaron sales inorgánicas, especialmente el nitrato de sodio, como agentes inductores de la fusión (Power et al., 1970). Posteriormente, Keller et al. (1973) propusieron la aplicación de un medio con alto contenido de Ca^{++} y alto pH para inducir la fusión de los protoplastos. Kao et al. (1974) y casi al mismo tiempo Wallin et al. (1974) utilizaron por primera vez polietilenglicol (PEG), como un potente agente de fusión. Desde entonces, el PEG se ha utilizado exitosamente para fusionar diferentes protoplastos vegetales. Los protoplastos pueden fusionarse en un tubo de centrífuga, mezclando la solución del PEG con la suspensión de protoplastos (Burgess et al., 1974b). Otro método consiste en fusionar los protoplastos en cajas Petri como una monocapa celular (Kao y Michayluk, 1974; Kao et al., 1974; Menczel et al., 1981; 1984; Ashmore y Gould, 1982).

A causa de los fosfolípidos de la membrana, que tienen carga negativa, los protoplastos tienden a repelerse mutuamente a pH fisiológico. Los iones calcio pueden compensar las cargas negativas y así favorecer una leve agregación de protoplastos (etapa de adherencia en un punto). El PEG puede propiciar una agregación adicional que sirva como un puente entre las membranas celulares de los protoplastos adyacentes (etapa de adhesión superficial, Figura 34.3, A).

Durante el proceso de elución, especialmente cuando se añade una solución rica en calcio y con un pH alto, puede ocurrir una redistribución de las cargas y la formación de puentes de Ca^{++} que conducirían a distorsiones de la membrana y, más adelante, a la fusión de las membranas adyacentes (Keller et al., 1973; Koblizt, 1980). El proceso de fusión empieza con la formación de canales de fusión en los puntos o áreas de agregación. Más adelante, estos canales se extienden a toda la superficie de las membranas que se hallan en contacto (Burgess et al., 1974a). Ocurrida la fusión de la membrana, el citoplasma se mezcla en un período de varias horas y se forman los heterocariontes (Figura 34.3, B y C).

Digitized by Google

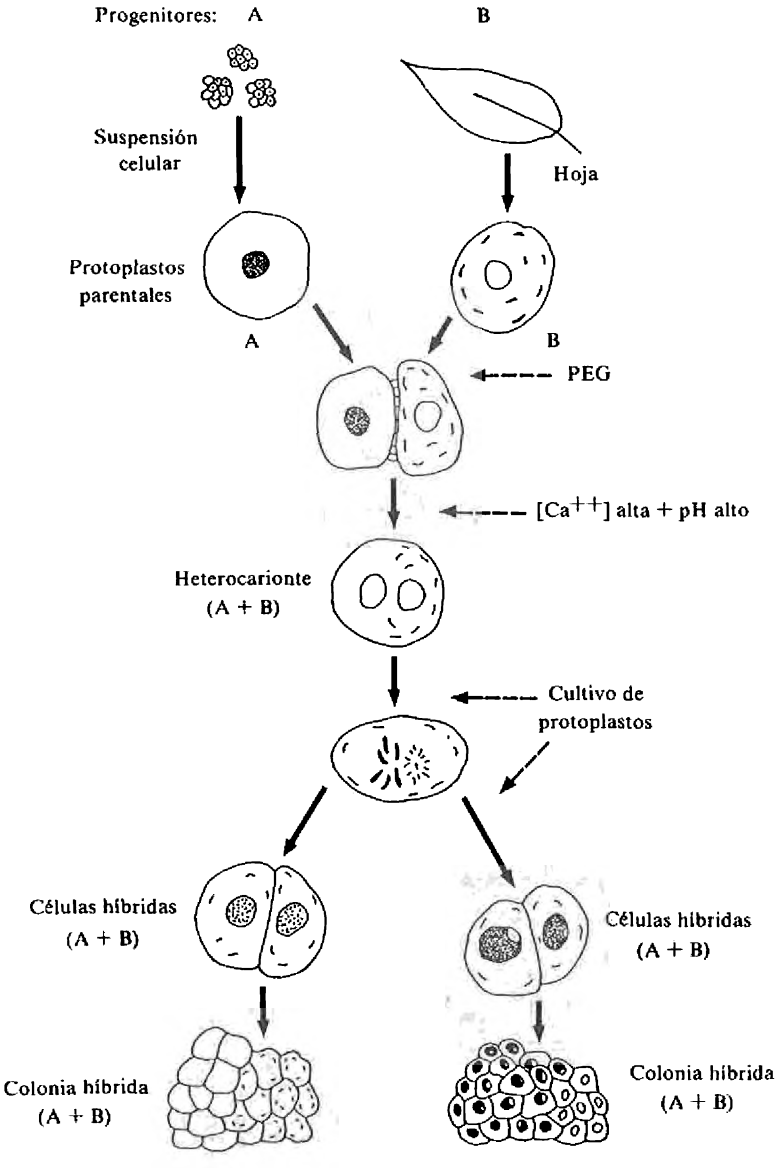


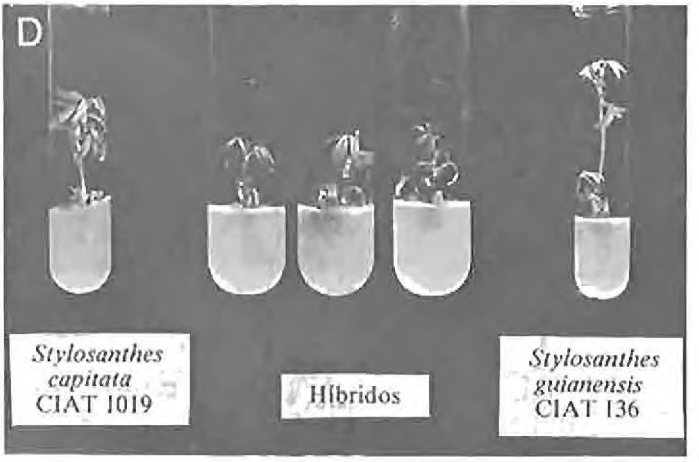
Figura 34.2. Representación esquemática de la fusión de protoplastos.

Digitized by Google

Adhesión (PEG)

Iniciación de fusión
S. guianensis + *S. capitata*

Heterocarionte
S. guianensis + *S. capitata*



Planta

Figura 34.3 La fusión de protoplastos que da origen a heterocariontes. A) Etapa de adhesión superficial. B) y C) Fusión de membranas y generación de heterocariontes. D) Plantas regeneradas.

Digitized by Google

En los últimos años, la investigación sobre la inducción de la fusión de protoplastos mediante un campo eléctrico ha progresado hasta el punto de merecer una seria consideración como alternativa del PEG. La dielectroforesis se emplea para obtener un estrecho contacto entre los protoplastos; luego se induce la fusión misma aplicando un impulso corto de corriente directa (Zimmermann et al., 1981). La electrofusión evita la toxicidad que posiblemente causa el PEG y permite fusionar un rango más amplio de protoplastos con mayor eficiencia (Zimmermann, 1982; Zachrisson y Bornmann, 1984).

Varios factores pueden influir en la frecuencia de la fusión: a) sólo los protoplastos completamente aislados tienen capacidad para fusionarse; b) los protoplastos que presentan residuos no digeridos de pared celular o que ya han sintetizado la nueva pared celular, no se fusionan; c) la concentración y el tipo de enzimas tienen efectos profundos en la fusión de los protoplastos y en la viabilidad de los heterocariocitos; d) el tratamiento de las células cultivadas en suspensión con soluciones enzimáticas que contengan driselasa da como resultado, en algunos casos, una frecuencia de fusión más alta, aunque los protoplastos tratados con esta enzima son generalmente más débiles (Kao et al., 1974).

La fluidez de la membrana es importante en el proceso de fusión de los protoplastos. La temperatura de cultivo y los fosfolípidos que componen la membrana tienen gran influencia en la fluidez de ésta (Keller et al., 1973); por eso, el efecto benéfico de temperaturas relativamente altas en la fusión se debe a la mayor fluidez de la membrana (Keller et al., 1973; Senda et al., 1980).

Ashmore et al. (1982) encontraron que los protoplastos, en ciertas fases del ciclo celular, participaban en las fusiones con mayor frecuencia de lo que se esperaba. Además, si los protoplastos se hallaban en una misma fase del ciclo celular, se fusionaban con mayor frecuencia que si estaban en diferentes fases. No obstante, con el fin de estudiar los procesos de regulación, es interesante fusionar los protoplastos en diferentes etapas del ciclo celular. La interacción entre los protoplastos mitóticos y los de interfase dio como resultado la inducción de la condensación cromosómica prematura (CCP) en el núcleo interfásico (Szabados y Dudits, 1980; Dudits et al., 1982).

Se ha informado también sobre la fusión de protoplastos de plantas con diferentes células animales, que resulta en la formación de heterocariontes planta-animal. Dudits et al. (1976) fusionaron células de HeLa con protoplastos de zanahoria y observaron la formación de una nueva pared celular a los 3 días después de la fusión. Davey et al. (1978) fusionaron células

Digitized by Google

anfibias con protoplastos de plantas superiores y realizaron un estudio ultraestructural sobre la fusión. Hadlaczky et al. (1980) fusionaron células de *Drosophila* sp. y protoplastos de soya; pudieron observar en esa fusión la continuación de la síntesis del ADN y las divisiones de los heterocariontes. La fusión de las células mitóticas de HeLa con protoplastos de zanahoria o soya condujo a la inducción de la CCP en el núcleo de la planta en interfase (Dudits et al., 1982). También se ha informado sobre la fusión de esferoplastos bacterianos con protoplastos de plantas superiores (Hasezawa et al., 1983; Hain et al., 1984); este tipo de fusiones pueden ayudar a superar las limitaciones del rango hospedante de los sistemas de trasformación.

Los heterocariontes que resultan de la fusión de protoplastos pueden experimentar divisiones celulares si se cultivan adecuadamente. Las investigaciones sobre el comportamiento del núcleo en los heterocariontes revelaron que, en general, el núcleo se divide sincrónicamente. Dependiendo de la orientación de los husos, la mitosis sincrónica puede resultar en la yuxtaposición de cromosomas heteroespecíficos en una figura de la metafase y en una verdadera hibridación celular (Kao et al., 1974). Igualmente, se ha observado la fusión nuclear en los heterocariontes (Constabel et al., 1977).

Selección de híbridos somáticos

El proceso de fusión resulta en una variedad de productos de fusión homocariontes y heterocariontes. Las verdaderas colonias híbrido-somáticas deberían seleccionarse, tan pronto como fuese posible, de las poblaciones resultantes. Se han establecido dos procedimientos principales de selección:

- Selección mecánica directa.
- Selección de complementación.

Selección mecánica. El aislamiento mecánico de los heterocariontes se ha utilizado en los experimentos de fusión cuando no se dispone de mutantes adecuados para la selección de complementación. Kao (1977) fusionó los protoplastos incoloros (de cultivos celulares) de la soya y los protoplastos verdes del mesófilo del tabaco. Los protoplastos fusionados se pueden distinguir fácilmente puesto que presentan color y apariencia diferentes. La trasferencia, con micropipeta, de los protoplastos fusionados a los pequeños alvéolos de las placas de +Cuprac ha permitido el cultivo y la observación de las células híbridas individuales. Un sistema

Digitized by Google

similar se utilizó para la selección y el cultivo individual de heterocariontes de *Arabidopsis thaliana* y *Brassica campestris* (Gleba y Hoffmann, 1978).

Menczel et al. (1978) aislaron heterocariontes de *N. knightiana* y *N. silvestris* usando micropipetas y los cultivaron separadamente. Las colonias que se originaron de los heterocariontes podían distinguirse por su color verde. Patnaik et al. (1982) utilizaron un marcador fluorescente para la identificación de los heterocariontes de las plantas. Los productos de fusión se seleccionaron mediante un patrón apropiado de coloración y se aislaron con un micromanipulador.

Selección de complementación. Con este método, sólo las colonias híbridas pueden crecer en un medio que es selectivo para ellas o pueden distinguirse fácilmente de las colonias progenitoras. Carlson et al. (1972) utilizaron por primera vez, y con éxito, la complementación para aislar híbridos somáticos auxotróficos a auxinas, después de la fusión de dos especies de *Nicotiana* que requieren auxinas.

Un procedimiento utilizado con frecuencia es la complementación de los mutantes albinos no alélicos: en ella se seleccionan los híbridos, como colonias verdes, entre los albinos blancos (Douglas et al., 1981a; 1981b). A menudo se combina el uso de un marcador albino con otra presión selectiva. Dudits y sus colaboradores utilizaron un mutante albino de *Daucus carota* para realizar varios experimentos de hibridación; los protoplastos derivados de suspensiones celulares de este mutante se fusionaron con protoplastos foliares que no se dividían de *Daucus capillifolius*, de *Petroselinum hortense*, o de *Aegopodium podagraria*. Las colonias verdes regeneradas se seleccionaron e identificaron como híbridos (Dudits et al., 1979; Dudits et al., 1980a; 1980b). Un procedimiento de selección similar se utilizó en la hibridación somática de *N. glauca* y *N. tabacum* (Evans et al., 1980).

El empleo de mutantes auxotróficos para la selección de híbridos somáticos es promisoria, porque sólo las líneas híbridas pueden sobrevivir en el medio selectivo, y de esta manera la selección de híbridos puede efectuarse en un período temprano del cultivo.

Según varios informes, la hibridación somática se obtiene mediante el empleo de mutantes deficientes en nitratoreductasa, por una parte, y la complementación de esta deficiencia enzimática, por la otra (Glimelius et al., 1978; Gupta et al., 1982; Marton et al., 1982b). Los híbridos somáticos interespecíficos de *Nicotiana* + *Hyosciamus* se obtuvieron empleando auxotrofia (nicotinamida) y deficiencia (nitratoreductasa) como marcadores selectivos complementarios (Potrykus et al., 1984).

Digitized by Google

Los mutantes con resistencia estable contra los análogos de aminoácidos, los inhibidores metabólicos o los antibióticos suministran otros procedimientos de selección. Harms et al. (1981) y Cella et al. (1983) utilizaron diferentes mutantes de zanahoria resistentes a los análogos de aminoácidos. Evola et al. (1983) emplearon para la hibridación somática intraespecífica líneas celulares de tabaco resistentes, por una parte, a la hidroxiurea y al picloram, y que además utilizan glicerina. Horn et al. (1983) hibridaron protoplastos de *N. tabacum* resistentes a 5-metiltriptofano con protoplastos de *N. glutinosa* y seleccionaron los híbridos por su resistencia a 5-metiltriptofano. Kameya et al. (1981) utilizaron la resistencia a 5-metiltriptofano y a acetidina-2-carboxilato para seleccionar híbridos somáticos de *D. carota* y de *D. capillifolius*.

Maliga y sus colaboradores emplearon mutaciones de marcadores de cloroplastos que poseían resistencia codificada a los antibióticos, para la selección de híbridos somáticos de especies de *Nicotiana*. La resistencia de *N. silvestris* a la kanamicina se utilizó para seleccionar los híbridos de esa especie con *N. knightiana* (Maliga et al., 1977). La resistencia a la estreptomicina sirvió también para la selección de híbridos de *N. tabacum* (SR 1) y *N. silvestris* (Medgyesy et al., 1980).

Los marcadores fenotípicos no selectivos se han utilizado en la hibridación de *D. innoxia* y *Atropa belladonna*. Los callos híbridos se reconocieron por la producción de vellosidades, típicas de *D. innoxia*, y por el color verde derivado de *A. belladonna* (Krumbiegel y Schieder, 1979).

Cuando los marcadores genéticos no están disponibles, la complementación metabólica puede ayudar en la recuperación de los productos de fusión (Nehls, 1978). Sidorov et al. (1981b) fusionaron protoplastos de *N. plumbaginifolia* tratados con yodoacetato, e irradiaron protoplastos de *N. tabacum*. Los protoplastos progenitores tratados no pudieron dividirse, pero los heterocariontes podían formar colonias híbridas debido a la complementación metabólica. En otros experimentos sólo un progenitor fue inactivado por tratamientos con yodoacetato (Cella et al., 1983), con yodoacetamida (Lázar et al., 1981), o por irradiación (Zelcer et al., 1978; Gupta et al., 1982).

Análisis de los híbridos somáticos

La naturaleza híbrida de las plantas seleccionadas puede verificarse con varios métodos.

Digitized by Google

Análisis morfológico. Generalmente, las plantas híbrido-somáticas regeneradas difieren de las plantas progenitoras en el hábito de crecimiento y en el vigor. Frecuentemente, presentan un fenotipo intermedio (Douglas et al., 1981b; Dudits et al., 1977; Gleba et al., 1979; Horn et al., 1983). Ejemplos conocidos son los híbridos somáticos entre la papa y el tomate. Las flores, frutos, hojas y raíces tienen características morfológicas que se asemejan tanto a un progenitor, el tomate, como al otro, la papa (Melchers et al., 1978).

Cuando se disponga de marcadores morfológicos, deberían compararse con los de los híbridos sexuales, labor que sólo es posible en los híbridos de especies estrechamente relacionadas (Evans et al., 1982).

Análisis isoenzimático. El análisis isoenzimático ha sido utilizado extensivamente para verificar la naturaleza híbrida de los regenerantes seleccionados. Se han hecho estudios con esterasa (Douglas et al., 1981b; Menczel et al., 1978), aspartato-amino transferasa y superóxido dismutasa (Douglas et al., 1981b), con glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y glutamina-oxaloacético transaminasa (Dudits et al., 1980a), con alcohol deshidrogenasa (Gleba et al., 1978; Menczel et al., 1978), lactato deshidrogenasa y peroxidasa (Gleba et al., 1978), y con otras enzimas.

La ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa (Rubisco) es interesante porque su subunidad mayor es codificada por un gen localizado en el ADN del cloroplasto, mientras que la subunidad menor lo es por genes nucleares. Por tanto, el análisis de las isoenzimas Rubisco suministra información sobre la expresión de los genes, tanto del núcleo como del cloroplasto, y sobre la herencia (Melchers et al., 1978; Glimelius et al., 1978; Horn et al., 1983).

Aunque las isoenzimas varían dentro de los tejidos de las plantas —razón por la cual los zimogramas deberían interpretarse cautelosamente— éstos se consideran como una prueba de la presencia, y de la expresión, de diferentes alelos de ciertos genes y, en consecuencia, como prueba de la naturaleza híbrida de la planta. Frecuentemente, el patrón de las isoenzimas no es sólo una suma de las bandas progenitoras: se ha observado en los híbridos la desaparición de ciertas bandas progenitoras y la aparición de nuevas bandas denominadas híbridas (Douglas et al., 1981b).

Análisis cromosómico. En la mayoría de los híbridos somáticos seleccionados se encontró un alto número de cromosomas. En general, se han utilizado protoplastos diploides para los experimentos de fusión y se esperaba, por tanto, obtener híbridos somáticos predominantes tetraploides o anfidiploides; esta condición cromosómica se ha encontrado, en

Digitized by Google

efecto, en varios híbridos somáticos intraespecíficos e interespecíficos (Douglas et al., 1981b; Evans et al., 1980; Lázar et al., 1981).

En las combinaciones intergenéricas, la naturaleza del híbrido somático de las colonias seleccionadas podría confirmarse por medio del tamaño diferente de los cromosomas de ambos progenitores (Gleba y Hoffmann, 1978; Krumbiegel y Schieder, 1979).

Análisis del ADN nuclear. Se han desarrollado métodos bioquímicos para comprobar la presencia de un tipo particular de ADN en los híbridos somáticos. Estos métodos tienen la ventaja de que poseen una alta resolución y de que no dependen de la expresión de genes particulares. Saul et al. (1984) utilizaron sondas de hibridación no cruzada de *H. muticus* y *N. tabacum* en una prueba sencilla de hibridación de ADN para caracterizar los híbridos somáticos posibles.

Variabilidad genética y eliminación de cromosomas

La variabilidad se ha observado como un fenómeno común en los híbridos somáticos. Kao (1977) describió la eliminación aleatoria de cromosomas de *N. glauca* en híbridos de soya x *N. glauca*. Las primeras divisiones fueron asincrónicas y condujeron a pérdidas cromosómicas. En las líneas híbridas estabilizadas, los cromosomas de *N. glauca* estaban en sincronía con los cromosomas de soya.

Los datos citológicos y bioquímicos han confirmado la inestabilidad genética y la segregación cromosómica no específica de los cromosomas progenitores en las líneas híbrido-somáticas (Douglas et al., 1981b; Dudits et al., 1980a; Gleba et al., 1978; Evans et al., 1983). El patrón y la tasa de segregación cromosómicos y el grado de estabilidad genética son diferentes en diversas líneas híbridas. Mayor estabilidad cromosómica se ha encontrado en *N. tabacum* x soya (Chien, 1982) que en los híbridos de *N. glauca* x soya (Kao, 1977).

Diferentes líneas de células híbridas podrían seleccionarse dentro de un experimento, cada una con diferente tasa de segregación. En los híbridos celulares de *N. chinensis* x *A. belladonna*, las células de la mayoría de los líneas conservaron los cromosomas de ambos progenitores, mientras que en tres líneas fueron eliminados casi todos los cromosomas de *A. belladonna* (Gleba et al., 1983). La inestabilidad genética observada generalmente en las células de plantas cultivadas puede conducir a la variabilidad cromosómica y a la segregación de características de los progenitores en los híbridos somáticos intraespecíficos (Bayliss, 1980).

Digitized by Google

Se ha observado recombinación cromosómica en varios híbridos somáticos. Además de la segregación cromosómica, el reordenamiento cromosómico puede ser responsable de la variabilidad observada (Evans et al., 1981; Evans et al., 1983; Hoffmann et al., 1981). Las fusiones entre los protoplastos en división, los mitóticamente inactivos o los irradiados con rayos X, conduce a la rápida y extensiva eliminación de los cromosomas de los progenitores de división inactiva.

En los híbridos somáticos de *Aegopodium* x *Daucus*, los marcadores bioquímicos y morfológicos indicaron la presencia de genes de *Aegopodium*; en cambio, sólo se encontraron cromosomas de *Daucus* en las plantas regeneradas. Se ha sugerido que una condensación cromosómica prematura podría ser la causa de la pérdida repentina de los cromosomas de un progenitor (Dudits et al., 1979; Dudits et al., 1980b; Dudits et al., 1982).

En los híbridos de *Petroselinum* x *Daucus*, la mayor parte de los cromosomas de *Petroselinum* fueron eliminados mediante la irradiación de sus protoplastos antes de la fusión. Sin embargo, las características morfológicas y las isoenzimas confirmaron la presencia de genes de *Petroselinum* en dichos híbridos (Dudits et al., 1980b). En un experimento similar, Gupta et al. (1982) describieron la trasferencia de fragmentos del genoma de los protoplastos irradiados de *Physalis minima* y *Datura innoxia* a la línea cnx-68 de *N. tabacum*. La fusión de protoplastos, seguida por la eliminación y la recombinación cromosómicas, puede llevar a la trasferencia de unidades de material genético, más pequeñas que los cromosomas completos.

El análisis de la endonucleasa de restricción del genoma nuclear sirve también como un método sensitivo para caracterizar los híbridos somáticos. Uchimiya et al. (1983) utilizaron los genes ribosomo-nucleares del ARN para identificar las líneas celulares híbrido-somáticas de *N. glauca* y *N. langsdorfii*.

Regeneración de plantas y problemas de incompatibilidad

Generalmente, la regeneración de plantas es fácil cuando se producen híbridos somáticos intraespecíficos o interespecíficos. La regeneración de las plantas híbrido-somáticas es difícil cuando la distancia filogenética entre los progenitores de fusión es grande. Parece que se presenta una interacción entre la diferenciación celular y las reacciones incompatibles; la fusión de protoplastos puede producir líneas celulares híbridas, pero no

Digitized by Google

se observa una respuesta morfogenética en las combinaciones interfamiliares (Kao, 1977; Chien et al., 1982).

Las plantas híbrido-somáticas de diferentes géneros podrían regenerarse si se obtiene una reducción significativa en el tamaño de uno de los genomas parentales, introducido en los híbridos (Krumbiegel et al., 1979; Gleba et al., 1978; Dudits et al., 1980a). La regeneración de plantas híbrido-somáticas interespecíficas (Cuadro 34.1, Figura 34.3, D) e intergenéricas ha sido posible en varios casos (Cuadros 34.2 y 34.3).

Fusión de protoplastos y genética citoplásmica

En la hibridación sexual de casi todas las plantas superiores hay trasmisión materna de las características citoplasmáticamente codificadas. Esto significa que la recombinación no tiene lugar; por tanto, no se puede efectuar, mediante cruzamientos sexuales, un análisis genético de los genes de los cloroplastos y de las mitocondrias. La trasmisión biparental de estos orgánulos se ha logrado mediante la fusión de protoplastos.

La hibridación somática de *N. glauca* x *N. langsdorfii* mostró, en el citoplasma híbrido, la exclusión completa de los cloroplastos de un progenitor (Kung et al., 1975). El análisis de los marcadores de cloroplastos

Cuadro 34.1. Obtención de híbridos somáticos interespecíficos.

Progenitores	Resultado[a]	Referencias
Datura innoxia + *D. stramonium*	Pl	Schieder, 1980
Datura innoxia + *D. discolor*	Pl	Schieder, 1980
Daucus carota + *D. capillifolius*	Pl	Dudits et al., 1977; Kameya et al., 1981
Medicago sativa + *M. falcata*	Pl	Teoulé, 1983
Nicotiana tabacum + *N. nesophyla*	Pl	Evans et al., 1982
Nicotiana tabacum + *N. rustica*	Pl	Douglas et al., 1981b
Nicotiana glauca + *N. langsdorfii*	Pl	Uchimiya et al., 1983; Kung et al., 1975
Nicotiana tabacum + *N. knightiana*	Pl	Menczel et al., 1981
Nicotiana knightiana + *N. silvestris*	Pl	Menczel et al., 1978
Nicotiana tabacum + *N. glutinosa*	Pl	Horn et al., 1983, Uchimiya et al., 1983
Nicotiana stocktonii + *N. tabacum*	Pl	Evans et al., 1981
Nicotiana glauca + *N. tabacum*	Pl	Evans et al., 1980
Nicotiana tabacum + *N. otophora*	Pl	Evans et al., 1983
Nicotiana tabacum + *N. sylvestris*	Pl	Evans et al., 1982
Petunia hybrida + *P. parodii*	Pl	Power et al., 1976; Boeshore et al., 1983
Solanum tuberosum + *N. brevidens*	Pl	Barsby et al., 1984
Solanum tuberosum + *S. nigrum*	Pl	Binding et al., 1982

a) Pl = regeneración de plantas.

Digitized by Google

Cuadro 34.2. Obtención de híbridos somáticos intergenéricos.

Progenitores	Resultados[a]	Referencias
Daucus carota + *Petroselinum hortense*	Pl	Dudits et al., 1980b
Lycopersicon esculentum + *Solanum tuberosum*	Pl	Melchers et al., 1978
Datura innoxia + *Atropa belladonna*	Pl	Krumbiegel et al., 1979
Daucus carota + *Aegopodium podagraria*	Pl	Dudits et al., 1979
Arabidopsis thaliana + *Brassica campestris*	Pl	Gleba et al., 1979
Atropa belladonna + *Nicotiana chinensis*	Pl	Gleba et al., 1982
Hyoscíamus muticus + *Nicotiana tabacum*	Pl	Potrykus et al., 1984
Nicotiana glauca + *Glycine max*	C	Kao, 1977
Nicotiana tabacum + *Glycine max*	C	Chien et al., 1982
Physalis minima + *Nicotiana tabacum*	C	Gupta et al., 1982
Datura innoxia + *Nicotiana tabacum*	C	Gupta et al., 1982
Daucus carota + *Angelica archangelica*	C	Dudits et al., 1980b
Daucus carota + *Pisum sativum*	C	Dudits et al., 1980b
Daucus carota + *Secale cereale*	C	Dudits et al., 1980b
Glycine max + *Vicia hajastana*	C	Constabel et al., 1977

a. Pl = regeneración de plantas; C = callos.

—por ejemplo, la resistencia a la estreptomicina citoplásmica, un patrón de subunidad mayor de la ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa, un patrón de la endonucleasa de restricción del ADN del plástido, la resistencia a la tentoxina, y la resistencia a la atrazina— en los diferentes híbridos somáticos ha confirmado la segregación de los cloroplastos. Este resultado conduce a la producción de células con uno u otro tipo de cloroplastos (Pelletier et al., 1983; Menczel et al., 1981; Belliard et al., 1978; Glimelius et al., 1981). Los experimentos de Akada et al. (1983) han mostrado que el

Digitized by Google

Cuadro 34.3. Obtención de 'cíbridos'.

Progenitores	Resultados[a]	Referencias
Brassica napus x *Raphanus sativus*	P1	Pelletier et al., 1983
Brassica campestris x *Raphanus sativus*	P1	Pelletier et al., 1983
Nicotiana tabacum (*N. suaveolens*, citoplasma: ECM) x *N. silvestris*	P1	Zelcer et al., 1978; Fluhr et al., 1983.
Nicotiana tabacum (Str.^{R}) x *N. silvestris*	P1	Medgyesy et al., 1980
Nicotiana tabacum (*N. megalosyphon*, citoplasma: Str.^{R}, ECM) x *N. plumbaginifolia*	P1	Menczel et al., 1983
Nicotiana tabacum (mutante plastoma) x *N. plumbaginifolia*	P1	Sidorov et al., 1981b
Nicotiana tabacum (fertilidad masculina) x *N. silvestris*	P1	Aviv et al., 1980
Nicotiana tabacum (fotoautotrofia) x *N. tabacum*		Glimelius et al., 1981
Nicotiana tabacum (Str.^{R}) x *N. tabacum* (ECM)	P1	Fluhr et al., 1983

a. P1 = regeneración de plantas. ECM = esterilidad citoplásmica masculina. Str.^{R} = 'strain' R (raza o cepa R).

callo híbrido es un mosaico de células que contienen, en diferentes proporciones, dos tipos de genomas de cloroplastos. Este hecho indica la segregación temprana de los diferentes cloroplastos. Las plantas que contienen mezclas de cloroplastos sólo se han regenerado en unos pocos híbridos (Glimelius et al., 1981; Fluhr et al., 1983). En los experimentos de hibridación somática no se observó recombinación entre los genomas de los cloroplastos (Menczel et al., 1981; Galun, 1982).

En los híbridos somáticos, las mitocondrias presentan una selección independiente de los cloroplastos (Glimelius et al., 1981; Fluhr et al., 1983; Galun, 1982; Galun et al., 1982). La recombinación entre los diferentes genomas de las mitocondrias también puede lograrse. En los híbridos somáticos, según se ha indicado, los patrones de restricción del mtADN fueron similares, pero no idénticos, a uno u otro de los patrones de los progenitores, y contenían también nuevos fragmentos. Se ha sugerido que

Digitized by Google

la recombinación del ADN produjo los nuevos patrones de restricción (Belliard et al., 1979; Nagy et al., 1981).

Se encontró una correlación entre los genomas de las mitocondrias y la esterilidad citoplásmica masculina (ECM) en las progenies híbridas de *Nicotiana* (Galun et al., 1982; Belliard et al., 1979). No se encontró una clara correlación entre el patrón de restricción del mtADN y la ECM en algunos híbridos somáticos de *Petunia* sp. (Izhar et al., 1983; Boeshore et al., 1983). Tal vez la naturaleza de la ECM en *Petunia* difiere de la ECM del tabaco. El estudio de la trasmisión de la esterilidad masculina mediante hibridación somática mostró que la heterogeneidad de las mitocondrias en las plantas híbridas regeneradas se puede mantener en *Petunia* y *Nicotiana* (Izhar et al., 1980; Izhar et al., 1983; Menczel et al., 1983).

Se ha descrito un sistema donante-receptor para la trasferencia de las características citoplásmicas. Se fusionaron protoplastos de tabaco portadores de ECM —inactivados e irradiados con rayos X (donante: *N. tabacum* con ECM recibida de *N. suaveolens*)— con protoplastos de plantas fértiles de *N. silvestris* (receptor). De los productos de esta fusión se regeneraron plantas estériles masculinas de *N. silvestris* (Zelcer et al., 1978). El sistema donante-receptor ha sido utilizado para trasferir las mitocondrias de *N. tabacum* a *N. silvestris* (Aviv et al., 1980), las de *N. tabacum* a *N. plumbaginifolia* (Menczel et al., 1983), los cloroplastos de *N. tabacum* a *N. plumbaginifolia* (Sidorov et al., 1981b), y los de *N. tabacum* a *N. tabacum* y a *N. silvestris* (Fluhr et al., 1983).

El comportamiento independiente del genoma de los cloroplastos y de las mitocondrias permite la combinación de diferentes características citoplásmicas, codificadas ya sea en el mtADN o en el chlADN, mediante la fusión de protoplastos. Pelletier et al. (1983) describieron la corrección de una deficiencia de los cloroplastos de *Brassica napus* y una trasferencia de la característica ECM de *Raphanus sativus*. En otro experimento describieron la combinación de la característica ECM de *R. sativus* y de los cloroplastos resistentes a la atrazina de *B. campestris* con el núcleo de una tercera especie, *B. napus*.

Otro método de trasferir los orgánulos citoplásmicos es la fusión de citoplastos (protoplastos enucleados) con protoplastos. La centrifugación de protoplastos a alta velocidad en presencia de citocalasina B (Wallin et al., 1978) o la centrifugación a alta velocidad en los gradientes de densidad iso-osmótica de Percoll (Lorz et al., 1981) fragmenta los protoplastos y conduce a la formación de citoplastos (protoplastos enucleados) y cariplastos (núcleos cubiertos sólo por una membrana plasmática). Los citoplastos así preparados son aptos para la trasferencia de orgánulos después de la fusión con los protoplastos (Maliga et al., 1982b).

Digitized by Google

Trasformación Genética con Protoplastos

La trasformación genética implica que el ADN de una planta donante sea absorbido por una célula receptora o protoplasto e incorporado por ella en forma estable, y que la información genética codificada en el ADN foráneo se exprese como una característica nueva y estable. La trasferencia de orgánulos portadores de ADN, así como el ADN purificado de la planta o los genes clonados de la planta en las moléculas vectoras de ADN, ofrecen enfoques nuevos y efectivos para la trasferencia de genes.

Trasferencia de orgánulos

Se han descrito varios métodos para aislar, de protoplastos intactos, los siguientes orgánulos: cloroplastos (Horvath et al., 1978; Rathnam et al., 1976; Nishimura et al., 1976), núcleos (Hadlaczky et al., 1983; Ohyama et al., 1977) y cromosomas (Griesbach et al., 1982; Hadlaczky et al., 1983; Szabados et al., 1981; Malmberg y Griesbach, 1983).

La captación de los orgánulos aislados por los protoplastos receptores es posible en la endocitosis, fenómeno que ocurre naturalmente en las células (Ueda et al., 1978). El tratamiento con PEG o PVA (alcohol polivinílico) puede aumentar la frecuencia de captación que sin esos compuestos sería baja, pero presenta también los problemas inherentes a todo procedimiento similar a la fusión.

Varios autores han informado sobre la trasferencia de cloroplastos aislados (Potrykus, 1973; Davey et al., 1976). Un estudio detallado ha mostrado que no sólo los procesos endocitóticos sino también los de fusión son responsables de la trasferencia de cloroplastos (Davey et al., 1976). Mientras que las frecuencias de captación de cloroplastos fluctuaron alrededor del 20%, la trasferencia nuclear, empleando métodos similares, fue menor del 5% (Lorz, 1978; Potrykus y Hoffmann, 1973).

El tratamiento con PEG facilitó la captación de cromosomas aislados por los protoplastos receptores (Szabados et al., 1981). El porcentaje relativamente alto de dicariontes que contenían cromosomas trasferidos indica que existe una fuerte asociación entre los procesos de captación y los de fusión (Szabados et al., 1981). Griesbach (1983) desarrolló un sistema de microinyección para introducir los cromosomas aislados en los protoplastos de plantas superiores, con miras a evitar los problemas que resultarían si ocurriera un proceso de fusión; encontró este autor que la microinyección es un sistema de suministro altamente eficiente para la trasferencia

Digitized by Google

cromosómica. El sistema, con leves modificaciones, podría utilizarse fácilmente para inyectar una amplia gama de objetos y productos químicos en los protoplastos. Por otra parte, el fraccionamiento de los cromosomas aislados permite la trasferencia de cromosomas específicos (Malmberg et al., 1983).

Es de esperar que la trasferencia cromosómica, un sistema bien establecido y ampliamente utilizado en experimentos de trasformación celular en los mamíferos (Klobutcher y Ruddle, 1981), desempeñe un papel importante en el futuro de la genética somáticocelular de las plantas.

Captación de ADN purificado

Existen claras evidencias de que los protoplastos de las plantas superiores pueden captar ADN (Kado et al, 1980) siendo Ohyama et al. (1972) los primeros en informar sobre la captación exitosa del ADN de *E. coli* por los protoplastos de las plantas superiores.

La captación de ADN es estimulada por policationes como poli-L-lisina, poli-L-ornitina y DEAE-dextrano; por iones de Ca^{++}, Mg^{++} o Zn^{++}; o por un tratamiento similar a la fusión con PEG y, opcionalmente, con $CaCl_2$ y pH alto (Ohyama et al., 1972; Lurquin et al., 1977; Lurquin et al., 1980; Suzuki et al., 1978). Los protoplastos tienen una fuerte actividad enzimática (ADN-asa) que puede despolimerizar el ADN añadido al medio de incubación antes de que éste llegue hasta ellos. La estabilidad del ADN donante depende de la configuración del mismo ADN y de las condiciones de incubación; además, se encontró que las moléculas superenrolladas y los plásmidos cerrados covalentemente eran más resistentes a la digestión que el ADN lineal. Los cationes bivalentes y polivalentes actúan como agentes protectores porque estimulan la compactación y agregación del ADN. Un pH alto (pH 10.5), en presencia de $CaCl_2$, contribuye a la adecuada conservación del ADN donante tanto en el medio como en el protoplasto (Lurquin et al., 1977; Hughes et al., 1977; Lurquin y Marton, 1980).

Liposomas

Las vesículas lípidas (liposomas) han sido propuestas como valiosas herramientas para evitar la degradación de las moléculas de ADN y para llevarlas hasta los protoplastos. Varios métodos se han utilizado para la preparación de liposomas; tal vez el más eficiente es la evaporación de fase invertida (REV) desarrollado por Szoka et al., (1978). Los liposomas REV

Digitized by Google

pueden prepararse con muchos tipos de lípidos y presentan una gran capacidad de encapsulación. Se ha demostrado que los liposomas pueden proteger eficientemente el ADN y el ARN de la acción de las nucleasas presentes en las suspensiones de protoplastos, y que los liposomas que contienen ADN o ARN encapsulados pueden trasferir los ácidos nucleicos a los protoplastos de las plantas (Uchimiya et al., 1981; Rollo et al., 1981; Fraley et al., 1982; Lurquin, 1979). Lurquin y Sheehy (1982) han sugerido que la trasferencia ocurre durante la fusión entre los liposomas y la membrana plasmática.

Fukunaga et al. (1983) demostraron que los protoplastos de los cultivos de suspensión de *Vinca* sp. captaban los liposomas en la endocitosis. Según este método, el PEG favorece la adhesión primaria de los liposomas a los protoplastos, y un pH alto junto con un alto contenido de Ca^{++} la estabilizan y promueven la captación endocitótica de la vesícula. No se ha observado aquí ningún evento de fusión. Aunque la fusión puede efectuarse en otros sistemas liposomas/protoplastos, se supone que la captación endocitótica de los liposomas es común en los protoplastos vegetales.

Christen y Lurquin (1983) demostraron por su parte que el ARN del virus del moteado clorótico del caupí, encapsulado en los liposomas REV, podía infectar los protoplastos del mesófilo del caupí.

Esferoplastos

Hasezawa et al. (1983) describieron la introducción de esferoplastos de *Agrobacterium tumefaciens* en protoplastos de *Vinca rosea*. Cuando se añadió PEG o PVA, los esferoplastos se adhirieron fuertemente a la superficie de los protoplastos, y después de 10 minutos fueron absorbidos por endocitosis. Más tarde, los esferoplastos absorbidos perdieron su integridad y sus componentes parecían dispersarse en el citoplasma de los protoplastos.

La introducción de genes clonados en los protoplastos de las plantas por medio de los esferoplastos bacterianos parece un método nuevo y poderoso de trasformación genética.

Vectores moleculares de las plantas

El ADN foráneo que ha sido introducido en los protoplastos de las plantas debería integrarse establemente en el ADN del núcleo (o en el de los orgánulos), y los genes contenidos en ese ADN, mediante sus códigos,

Digitized by Google

deberían expresarse. Se ha tratado además de trasformar las células de las plantas o los protoplastos con ADN purificado, pero se observó que, para lograr una modificación genética exitosa, era preciso contar con vectores moleculares especiales y con cierto número de copias de los genes introducidos. Los siguientes son algunos de los vectores potenciales (Howell, 1982): plásmidos (plasmidios) de bacterias patógenas (*Agrobacterium* sp.), el ADN o el ARN de los virus de las plantas (caulimovirus, geminivirus, virus ARN, viroides), o los componentes de genomas inestables de las plantas (por ejemplo, elementos extracromosómicos de las mitocondrias del maíz).

Plásmidos Ti de *Agrobacterium* sp.

Los plásmidos Ti, inductores del tumor de *A. tumefaciens*, son los vectores más promisorios que se conocen actualmente para las plantas. *A. tumefaciens* promueve en varias dicotilodóneas la formación de tumores conocidos como agalla de la corona; el plásmido Ti de esta bacteria es el responsable de la tumogénesis (van Larebeke et al., 1974). Una porción específica del plásmido Ti, el ADN-T, se trasfiere al núcleo de la célula de la planta huésped y se integra mediante unión covalente a los cromosomas de las plantas; contiene este fragmento los genes responsables del crecimiento del tumor y de la síntesis de metabolitos especiales, los opinos: octopina, nopalina y agropina (Bevan y Chilton, 1982, Depicker et al., 1983).

Varios trabajos se han publicado sobre la trasformación de las células vegetales in vitro. Marton et al. (1979) informaron sobre la trasformación de células de tabaco derivadas de protoplastos, en un cocultivo con la bacteria *A. tumefaciens*. En un experimento similar, Hanold (1983) trasformó células derivadas de protoplastos de *Hyosciamus muticus* por medio de la bacteria *A. tumefaciens*. Los protoplastos de *Petunia* sp. y de tabaco fueron trasformados con plásmidos Ti aislados, por medio de un tratamiento con poli-L-ornitina (Davey et al., 1980), o con PEG y alto contenido de Ca^{++} (Krens et al., 1982). Se logró tambien alta frecuencia de trasferencia a los protoplastos de *Vinca* por medio de esferoplastos de *Agrobacterium* junto con un tratamiento de PEG o PVA (Hasezawa et al., 1981). En estos experimentos, el crecimiento tumoral, sin mencionar la hormona (auxina) y la síntesis de diferentes opinos, indicaron la transformación genética.

Existe la posibilidad de manipular genes en la región T sin que se altere el potencial de trasferencia de ADN-T del plásmido. Cuando se producen

Digitized by Google

genes quiméricos, mediante la utilización de secuencias promotoras reconocibles por el sistema de trascripción de la planta y de secuencias de codificación de cualquier gen foráneo, los genes manipulados no sólo son trasferidos sino que se expresan funcionalmente en las células de las plantas después de la trasformación (Herrera-Estrella et al., 1983a; 1984; Broglie et al., 1984).

El objetivo final es la regeneración de las plantas modificadas genéticamente; se ha comprobado que es posible lograrlo, ya que ninguno de los genes de la región T es esencial para la trasferencia del ADN-T. Hóekema et al. (1983) han informado sobre la separación de la región 'vir' (inducción del tumor) y el ADN-T. Plantas fértiles de tabaco podrían regenerarse partiendo de tejidos tumorales, y las plantas regeneradas podrían trasmitir los marcadores ligados al ADN-T a la progenie F1 con los coeficientes de segregación de Mendel. Así, el ADN-T se mantendría establemente integrado en los procesos de regeneración y propagación sexual (Wullems et al., 1981; Memelink et al., 1983). La Figura 34.4 ilustra los diferentes pasos para la trasformación genética de las plantas mediante la utilización de *A. tumefaciens*. Otras especies de *Agrobacterium*, además del *A. tumefaciens*, podrían utilizarse en la manipulación genética de las plantas superiores. *A. rhizogenes* induce en varias plantas una enfermedad de las raíces caracterizada por la presencia de pilosidad ('raíces pilosas'). Esta enfermedad es análoga a los tumores de la agalla de la corona (Bevan et al., 1982). Estas bacterias tienen un plásmido inductor de raíces (Ri) y por lo menos una parte del ADN-T del plásmido Ri se trasfiere, se mantiene estable, y se expresa en los tejidos de las plantas como raíces pilosas (Chilton et al., 1982). Además, es posible lograr la regeneración de las plantas a partir de cultivos de callo de ralz inducidos por *A. rhizogenes* (Spano y Constantino, 1982).

Aplicaciones Agrícolas de la Genética de Células Somáticas

Aunque los métodos clásicos seguirán siendo la base del fitomejoramiento, varias técnicas nuevas de manipulación genética somáticocelular son aplicables en diversas situaciones. Estas técnicas pueden suministrar una reserva nueva de genes como una base para el desarrollo de nuevas variedades. Las aplicaciones agrícolas exitosas de la genética somáticocelular dependen de la solución de las siguientes limitaciones (Evans et al., 1983; Schieder, 1982):

Digitized by Google

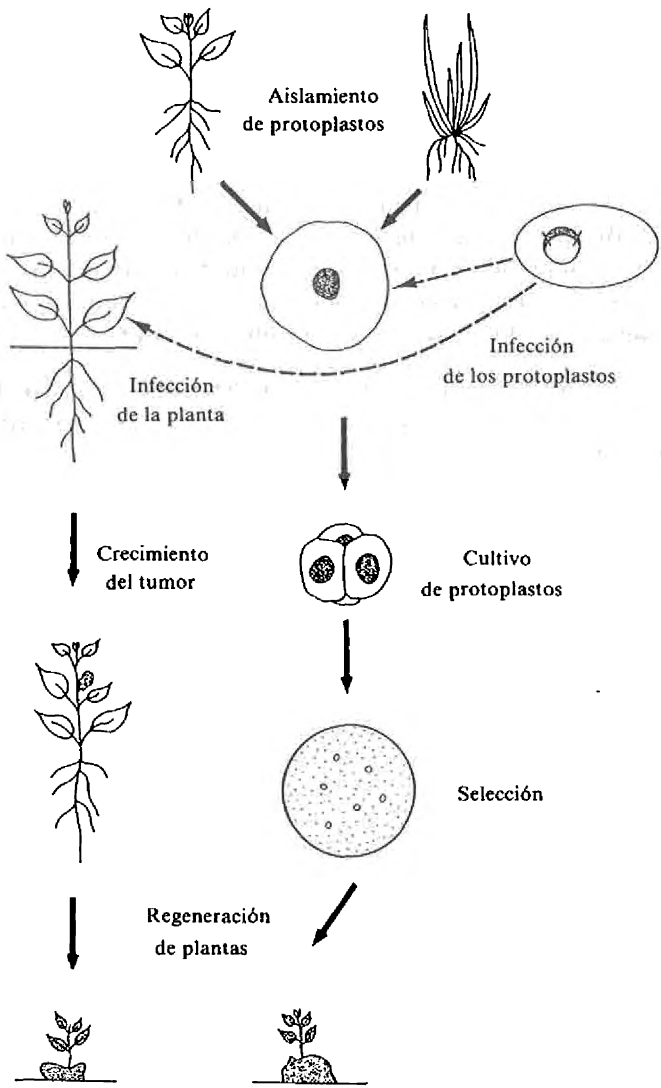


Figura 34.4. Trasformación genética de plantas con *Agrobacterium tumefaciens*.

Digitized by Google

1. Deberían desarrollarse, para todas las especies vegetales de importancia agronómica, sistemas eficientes de regeneración de plantas partiendo de los protoplastos. Hay sistemas adecuados de regeneración para muchas plantas de la familia de las Solanáceas (petunia, papa, tomate, tabaco) y para algunas plantas de las Umbelíferas y de las Crucíferas. A pesar de los esfuerzos realizados, prácticamente no se dispone de sistemas de regeneración para los cereales y para muchas leguminosas (Vasil, 1983).

2. Las plantas genéticamente manipuladas deberían ser capaces de reproducirse sexualmente para que puedan utilizarse en los programas de fitomejoramiento. La esterilidad de los híbridos somáticos intergenéricos deberá superarse mediante retrofusión, cultivo de embriones, o reduciendo el material genético a un progenitor.

3. Es necesario, para trasferir los genes útiles, lograr una recombinación intergenómica, o sustitución cromosómica, entre las dos especies. La inducción de la recombinación mitótica puede ser necesaria antes de la regeneración de la planta para asegurar la trasferencia del gen intergenómico.

4. El número cromosómico aneuploide o poliploide no es tolerable en un buen número de plantas propagadas sexualmente. La manipulación del número cromosómico de los híbridos somáticos podría ser necesaria; un ejemplo de ella es el cultivo de anteras que puede reducir el nivel de ploidía y estabilizar las nuevas combinaciones cromosómicas.

Cuando se supone que se ha construido un nuevo genotipo en un programa de fitomejoramiento, las diferentes técnicas genéticas somático-celulares pueden contribuir a la generación de nuevas combinaciones genómicas, o a la introducción de nuevos genes específicos (Sybenga, 1983).

Variación protoclonal

Chaleff (1983) y Maliga (1984) han analizado la importancia que tienen los cultivos celulares de plantas para el aislamiento de mutantes agronómicamente útiles. Tal vez la demostración más significativa del valor potencial de la variación que ocasiona el cultivo de protoplastos fue presentada por Shepard el al. (1980) en la papa. Estos investigadores seleccionaron más de 1000 clones regenerados de protoplastos foliares de la variedad Russet Burbank y encontraron en ellos una variación significativa y estable en el hábito de crecimiento, la fecha de madurez, la uniformidad de los

Digitized by Google

tubérculos, el color de la piel del tubérculo, la respuesta del clon al fotoperíodo, y el rendimiento. Algunas características nuevas aportaron mejoras agronómicas en comparación con el progenitor.

En otros experimentos se encontró también una variación en los clones de papa procedentes de protoplastos (Karp et al., 1982; Bokelman et al., 1983; Thomas et al., 1982; Secor et al., 1981; Ramulu et al., 1983).

Trasferencia de información genética en la hibridación somática

En los experimentos de hibridación somática se han utilizado sólo pocas plantas de cultivos importantes. La hibridación somática intraespecífica puede emplearse para el fitomejoramiento de especies de plantas propagadas vegetativamente. Wenzel et al. (1979) propusieron un esquema de fitomejoramiento para la papa que combina los métodos clásicos con la reducción partenogenética y androgenética de los cromosomas, al cual debe seguir la hibridación somática. El esquema se basa en la fusión de los protoplastos de plantas diploides; ésta conduce a la combinación de diferentes genomas que contienen varios genes de resistencia.

La papa también se ha utilizado en algunos experimentos de hibridación somática interespecífica. Melchers y sus colaboradores fusionaron protoplastos de tomate y de papa y obtuvieron la regeneración de los primeros híbridos somáticos que, por otra parte, no se pueden producir sexualmente (Melchers et al., 1978). Investigaron además, entre otras características, la tolerancia al frío de los híbridos y encontraron que su comportamiento era intermedio entre el tomate susceptible y la papa resistente. Llegaron a la conclusión de que estos híbridos somáticos podían servir para trasferir al tomate los genes de resistencia al frío (Smillie et al., 1979).

Se pueden obtener híbridos somáticos partiendo de protoplastos fusionados de la papa y de *Solanum brevidens*, una especie que aunque no forma tubérculos, interesa como donante potencial de resistencia a las enfermedades de la papa cultivada. Estas dos especies son sexualmente incompatibles, lo que constituye un obstáculo para la obtención de cruzamientos; ahora bien, la hibridación somática es una interesante alternativa para lograr su combinación (Barsby et al., 1984).

Se ha estudiado la hibridación somática en el género *Medicago* con miras a la introducción de variabilidad en la alfalfa. Los híbridos somáticos se produjeron mediante la fusión interespecífica de protoplastos de *Medicago sativa* y *M. falcata*. Estos resultados indican que las técnicas

Digitized by Google

genéticas somáticocelulares se están incorporando en los programas de fitomejoramiento de plantas que no pertenecen a la familia de las Solanáceas (Teoulé, 1983).

La fusión sería muy útil para la trasferencia de genes individuales o de pequeños bloques de genes estrechamente ligados. La incorporación de la resistencia a enfermedades es de especial importancia cuando no se puede lograr la hibridación sexual convencional. Evans et al. (1981) produjeron híbridos somáticos de *Nicotiana nesophila* y *N. stocktonii* con *N. tabacum* (tabaco cultivado). Además, encontraron que la resistencia al virus del mosaico del tabaco derivada de *N. nesophila* se expresaba en los híbridos somáticos.

Uchimiya (1982) creó un nuevo híbrido somático entre *N. tabacum* con esterilidad masculina y *N. glutinosa* resistente al virus del mosaico del tabaco (TMV). Encontró que en las plantas híbridas regeneradas se mantenía tanto la esterilidad masculina como la resistencia al TMV. Estos resultados muestran que diferentes caracteres agronómicamente importantes pueden combinarse mediante hibridación somática.

La trasferencia de mitocondrias o cloroplastos de plantas donantes a las receptoras y, por consiguiente, la obtención de nuevas combinaciones de características citoplásmicas es muy promisoria para la agricultura. Varias características conocidas y controladas por los genomas de cloroplastos o mitocondrias, como la esterilidad masculina, la resistencia a fitotoxinas o a los pesticidas, tienen importancia para el fitomejoramiento.

Algunos resultados obtenidos mediante hibridación citoplásmica en el fitomejoramiento son los siguientes: la exitosa trasferencia de la característica ECM en las especies de *Nicotiana* (Zelcer et al., 1978; Uchimiya, 1982), de *Raphanus* y de *Brassica* (Pelletier et al., 1983); la restauración de la fertilidad en el tabaco que presenta esterilidad citoplásmica masculina (Aviv y Galun, 1980); la trasferencia de la resistencia a la triazina en *Brassica* (Pelletier et al., 1983); y la resistencia a la atrazina en algunas especies de papa.

En los experimentos de Pelletier et al. (1983) se crearon nuevas combinaciones de citoplasmas mediante fusión de protoplastos. Estos híbridos combinan un tipo superior de cloroplasto de *Brassica napus* y la característica ECM de *Raphanus sativus*. En otro experimento, los cloroplastos de *Brassica campestris* resistentes a la triazina se combinaron con *Raphanus sativus* (portador de ECM) y se asociaron con el núcleo de una tercera especie, *B. napus*. Estas plantas pueden ser muy útiles en la estrategia del control de malezas y en la producción de semilla híbrida.

Digitized by Google

Trasformación de plantas para el mejoramiento de los cultivos

La trasformación celular de las plantas puede facilitar la trasferencia de genes de una especie a otra en un solo paso. Es posible trasferir solamente el gen elegido sin que se presenten efectos nocivos para los otros genes. Además, es posible producir genes híbridos con métodos bioquímicos y trasferir estos genes para permitir su expresión correcta en la planta receptora.

Diferentes características deben diseñarse; las más importantes, cuando se consideran experimentos de trasformación que respondan a las necesidades de un futuro cercano, son éstas (Barton y Brill, 1983):

- la trasferencia de la resistencia a los herbicidas;
- el mejoramiento de la calidad de la proteína de la semilla, enriqueciendo el contenido de ésta con aminoácidos; y
- la resistencia a ciertas plagas y enfermedades.

Conclusiones

Las perspectivas de la utilización de técnicas de manipulación genética con protoplastos para el fitomejoramiento son enormes. La mayor parte de las técnicas de ingeniería genética requieren etapas de cultivo de protoplastos y por ello la regeneración se ha vuelto necesaria.

El sistema de protoplastos unicelulares constituye el vínculo entre la biología molecular moderna y la planta, y hace posible la adaptación de los métodos genéticos microbianos a las plantas para contribuir al fitomejoramiento con métodos no convencionales. No obstante, el cultivo de protoplastos y la eficiencia de la regeneración alcanzan niveles adecuados sólo en pocos modelos de sistemas de plantas. Por tal razón, estas técnicas no son aplicables todavía a todas las especies vegetales de interés económico.

Digitized by Google

Procedimientos

Fusión de protoplastos

Hay diferentes procedimientos para fusionar protoplastos utilizando PEG (polietilenglicol). Aquí se describirá una técnica basada en el tratamiento de los protoplastos en una monocapa con una solución de PEG; aquéllos se diluyen luego empleando una alta concentración de Ca^{++} y un pH alto (Kao et al., 1974). La dilución con una solución modificada que contenga de 5% a 10% de DMSO (dimetilsulfóxido) puede aumentar la frecuencia de fusión (Menczel et al., 1981).

La técnica para la identificación de los heterocariontes requiere la utilización de protoplastos verdes aislados de las hojas y de protoplastos incoloros aislados de cultivos de suspensiones celulares.

Procedimiento de fusión. Operando como se indica en el Capítulo 10, aísle protoplastos de mesófilo foliar y de suspensiones celulares; luego proceda de la siguiente manera:

1) Suspenda de nuevo los protoplastos lavados en una solución A_3 y mezcle los protoplastos del mesófilo con los protoplastos del cultivo celular en una proporción 1:1.

2) Vierta con una pipeta gotas de 150-200 μl de la suspensión de protoplastos en una caja Petri (3-4 gotas/placa), o en las tapas estériles del portaobjetos colocadas en la caja.

3) Permita que los protoplastos se asienten y formen una monocapa (aproximadamente 5 minutos).

4) Añada lentamente 0.5 ml de la solución de PEG (Cuadro 34.4) en el borde de la gota, e incube los protoplastos durante 10-20 minutos.

5) Remueva cuidadosamente una parte de la solución de PEG (0.3-0.5 ml), añada 0.5 ml de la solución W_1 (Cuadro 34.4) a las gotas, e incube los protoplastos durante otros 5-10 minutos. La solución W_2 puede remplazar la W_1 en este paso de dilución; sin embargo, el uso de W_2 deberá someterse a monitoría cuidadosa ya que el DMSO puede dañar fácilmente los protoplastos.

6) Añada 2 ml de medio de cultivo de protoplastos y lave los protoplastos 4-5 veces cuidadosamente con alícuotas de 2 ml de medio de cultivo fresco. Cultive los productos de la fusión en la misma caja Petri, según se describió anteriormente.

Digitized by Google

Cuadro 34.4. Soluciones para lograr la fusión de protoplastos.

A) Solución de PEG[a]

Componente	Cantidad
PEG 1540 (peso molecular 1300-1600)	50 g
$CaCl_2.2H_2O$	150 mg
KH_2PO_4	10 mg
pH	5.5

B) Soluciones de lavado[a]

Componente	Grupo *a* (cant.)	Grupo *b* (cant.)	Grupo *c* (cant.)
Glucosa	—	10.8 g	10.8 g
Glicina	750 mg	—	—
$CaCl_2.2H_2O$	—	1.47 g	1.47 g
DMSO	—	—	10% v/v
pH	10.5	—	—

W_1 = Mezcla de grupo *a* + grupo *b* (1:1)
W_2 = Mezcla de grupo *a* + grupo *c* (1:1)

a. En 100 ml de agua bidestilada; cant. = cantidad.

Observe finalmente el proceso de fusión de los protoplastos bajo un microscopio invertido. La aplicación rutinaria de este procedimiento ha producido heterocariontes de varias especies vegetales con un eficiencia del 3%-5%. Los heterocariontes se reconocen fácilmente por su contenido de cloroplastos (originados en el mesófilo) y por la presencia de filamentos citoplásmicos (originados en la suspensión celular).

Métodos citológicos para protoplastos

Los protoplastos de las plantas son muy frágiles; por tanto, es preciso modificar las técnicas convencionales de coloración y fijación para conservar sus características estructurales. Kao (1982) ofrece el siguiente método sencillo para colorear el núcleo y los cromosomas de los protoplastos:

1) Mezcle 1 volumen de protoplastos purificados con 9 volúmenes de un fijador y deje los protoplastos en el fijador durante un día a 5 °C. (Se pueden conservar los protoplastos en este fijador hasta 2 semanas.)

2) Coloque una gota de 20 μl de protoplastos fijados en un portaobjeto del microscopio y añada lentamente 50 μl de la solución de fucsina modificada.

Digitized by Google

3) Coloque cuidadosamente un cubreobjeto sobre la gota y deje que se desarrolle la coloración durante un lapso de unos minutos hasta una hora.

4) Apriete cuidadosamente la preparación y selle el portaobjeto con cera viscosa.

Este método se consideró adecuado para colorear el núcleo y los cromosomas de diferentes especies. La intensidad de la coloración en el núcleo varía de una especie vegetal a otra y permite diferenciar el núcleo y los cromosomas de los heterocariontes (Constabel et al., 1975; Szabados et al., 1981).

Referencias

Akada S.; Hirai, A. y Uchimiya, H. 1983. Studies on mode of separation of chloroplast genomes in parasexual hybrid calli; 1: Fraction I protein composition in unseparated hybrid callus. Plant Sci. Lett. 31:223-230.

Altman, A.; Kaur-Sawhney, R. y Galston, A. V. 1977. Stabilization of oat leaf protoplasts through polyamine mediated inhibition of senescence. Plant Physiol. 60:570-574.

Ashmore S. E. y Gould A. R. 1982. Protoplast fusion and the cell cycle. Plant Cell Reports 1:225-228.

Aviv, D. y Galun, E. 1980. Restoration of fertility in cytoplasmic male sterile (CMS) *Nicotiana silvestris* by fusion with X-irradiated *N. tabacum* protoplats. Theor. Appl. Genet. 58:121-127.

Barsby T. L.; Shepard, J. F.; Kemble, R. Y. y Wong, R. 1984. Somatic hybridization in the genus *Solanum*: *S. tuberosum* and *S. brevidens*. Plant Cell Reports 3:165-167.

Barton, K. A. y Brill, W. J. 1983. Prospects in plant genetic engineering. Science 219:671-676.

Bayliss, M. W. 1980. Chromosomal variation in plant tissues in culture. Int. Rev. Cytol. Suppl. 11A:113-144.

Belliard, G.; Pellieter, G.; Vedel, F. y Quatier, F. 1978. Morpholofological characteristics and chloraplast DNA distribution in different cytoplasmic para-sexual hybrids of *Nicotiana tabacum*. Mol. Gen. Genet. 165:231-237.

———; Vedel, F. y Pelletier, G. 1979. Mitochondrial recombination in cytoplasmic hybrids of *Nicotiana tabacum* by protoplast fusion. Nature 218:401-403.

Digitized by Google

Bevan, M. W. y Chilton, M. D. 1982. T-DNA of the *Agrobacterium* Ti and Ri plasmids. Ann. Rev. Genet. 16:357-384.

Binding, H.; Jaim, S. M; Finger, J.; Mordhorst, G.; Nehls, R. y Gressel, J. 1982. Somatic hybridization of an atrazine resistant biotype of *Solanum nigrum* with *Solanum tuberosum*; 1: Clonal variation in morphology and in atrazine sensitivity. Theor. Appl. Genet. 63:273-277.

Boeshore, M. L.; Lifshitz, I.; Hansen, M. R. e Izhar, S. 1983. Novel compostion of mitochondrial genomes in *Petunia* somatic hybrids derived from cytoplasmic male sterile and fertile plants. Mol. Gen. Genet. 190:459-467.

Bokelman, G. S. y Roest, S. 1983. Plant regeneration from protoplasts of potato (*Solanum tuberosum* cv. Bintyc). Z. Pflanzenphysiol. 109:259-265.

Bourgin, J. P. 1978. Valine-resistant plants from *in vitro* selected tobacco cells. Mol. Gen. Genet. 161:225-230.

———; Chupeau, M. C. y Missonier, C. 1980. Aminoacid resistant plants from tobacco cells selected *in vitro*. En: Proceedings of the Centre National pour la Recherche Scientifique-National Science Foundation (CNRS-NSF) Workshop, Orsay, Francia.

Broglie, R.; Conezzi, G.; Fraley, R. T.; Rogers, S. G.; Horsch, R. B.; Niedermeyer, J. G.; Finck, J. S. y Caua, N. H. 1984. Light-regulated expression of a pea ribulose-1,5-biphosphate carboxilase small subunit gene in transformed plant cells. Science 224:838-843.

Burgess, J. y Fleming, E. N. 1974a. Ultrastructural studies of the aggregation and fusion of plant protoplasts. Planta 118:183-193.

——— y ———. 1974b. Ultrastructural observations of cell wall regeneration around isolated tobacco protoplasts. J. Cell Sci. 14:439-449.

Carlson, P. S.; Smith, H. H. y Dearing, R. D. 1972. Parasexual interspecific plant hybridization. Proc. Natl. Acad. Sci. (E.U.) 69:2292-2294.

Cella, R.; Carbonera, D. E. e Iadarola, P. 1983. Characterization of intraspecific somatic hybrids of carrot obtained by fusion of iodoacetate-inactivated A2CA-resistant and sensitive protoplasts. Z. Pflanzenphysiol. 112:449-457.

Chaleff, R. S. 1983. Isolation of agronomically useful mutants from plant cell cultures. Science 219:676-682.

Chien, Y. C.; Kao, K. N. y Wetter, L. R. 1982. Chromosomal and isozyme studies of *Nicotiana tabacum-Glycine max* hybrid cell lines. Theor. Appl. Genet. 62:301-304.

Chilton, M. D.; Tepfer, D. A.; Petit, A.; David, C.; Casse-Delbart, F. y Tempé, J. 1982. *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cells. Nature 295:432-434.

Digitized by Google

Christen, A. A. y Lurquin, P. F. 1983. Infection of cowpea mesophyll protoplasts with Cowpea Chlorotic Mottle Virus (CCMV) RNA encapsulated in large liposomes. Plant Cell Reports 2:43-46.

Constabel, F.; Dudits, D.; Gamborg, O. L. y Kao, K. N. 1975. Nuclear fusion in intergeneric heterokaryons: A note. Can. J. Bot. 53:2092-2095.

———; Weber, G. y Kirkpatrick, J. W. 1977. Sur la compatibilité des chromosomes dans les hybrides intergénériques de cellules de *Glycine max* x *Vicia hajastana*. C. R. Acad. Sci. Paris 285 Série D:319-322.

Cséplo, A. y Maliga, P. 1982. Lincomycin resistance, a new type of maternally inherited mutation in *Nicotiana plumbaginifolia*. Current Genetics 6:105-109.

Davey, R. M.; Fearson, E. M. y Power, J. B. 1976. Polyethylene glycol induced transplantation of chloroplasts into protoplasts: An ultrastructural assessment. Plant Sci. Lett. 7:7-16.

———; Clothier, R. H.; Balls, M. y Cocking, E. C. 1978. An ultrastructural study of the fusion of cultured amphibian with higher plant protoplasts. Protoplasma 96:157-172.

———; Cocking, E. C.; Freeman, J.; Pearce, N. y Tudor, I. 1980. Transformation of *Petunia* protoplasts by isolated *Agrobacterium* plasmids. Plant Sci. Lett. 18:307-313.

Depicker, A.; van Montagu, M. y Schell, J. 1983. Plant cell transformation by *Agrobacterium* plasmids. En: Kosuge, T.; Meredith, C. P. y Hollaender, A. (eds.). Genetic engineering of plants. Plenum Press. p. 143-176.

Douglas, G. C.; Keller, W. A. y Setterfield, G. 1981a. Somatic hybridization between *Nicotiana rustica* and *N. tabacum*; II: Protoplast fusion selection, and regeneration of hybrid plants. Can. J. Bot. 59:220-227.

———; Wetter, L. R.; Nakamura, C.; Keller, W. A. y Setterfield, G. 1981b. Somatic hybridization between *Nicotiana rustica* and *N. tabacum*; II: Biochemical, morphological and cytological analysis of somatic hybrids. Can. J. Bot. 59:228-230.

Dudits, D.; Raskó, I.; Hadlaczky, Gy y Lima-de-Faria, A. 1976. Fusion of human cells with carrot protoplasts induced by polyethylene glycol. Hereditas 82:121-124.

———; Hadlaczky, Gy; Levi, E.; Fejer, O.; Hajdu, Zs y Lázár, G. 1977. Somatic hybridization of *Daucus carota* and *D. capillifolius* by protoplast fusion. Theor. Appl. Genet. 51:127-132.

———; Hadlaczky, Gy; Bajszár, Gy; Koncz, Cs; Lázár, G. y Horváth, G. 1979. Plant regeneration from intergeneric cell hybrids. Plant Sci. Lett. 15:101-112.

Digitized by Google

———; Fejér, O.; Hadlaczky, Gy; Koncz, Cs; Lázár, G. y Horváth, G. 1980a. Intergeneric gene transfer mediated by plant protoplast fusion. Mol. Gen. Genet. 179:283-288.

———; Hadlaczky, Gy; Lázár, G. y Hajdu, Zs. 1980b. Increase in genetic variability through somatic cell hybridization of distantly related plant species. En: Sala, F.; Parisi, B.; Cella, R. y Ciferi, O. (eds.). Plant cell cultures: Results and perspectives. Elesevier, North Holland Biomedical Press. p. 207-214.

———; Szabados, L. y Hadlaczky, Gy. 1982. Premature chromosome condensation in plant cells and its potential use in genetic manipulation. En: Rao, P. N.; Johnson, R. T. y Sperling, K. (eds.). Premature chromosome condensation. Academic Press, New York. p. 359-369.

Evans, D. A. y Flick, C. E. 1983. Protoplast fusion: Agricultural applications of somatic hybrid plants. En: Kosuge, T.; Meredith, C. P. y Hollaender, A. (eds.). Genetic engineering of plants. Plenum Press. p. 271-288.

———; ——— y Jensen, R. A. 1981. Disease resistance: Incorporation into sexually incompatible somatic hybrids of the genus *Nicotiana*. Science 213:907-909.

———; Wetter, L. R. y Gamborg, O. L. 1980. Somatic hybrid plants of *Nicotiana glauca* and *Nicotiana tabacum* obtained by protoplast fusion. Physiol. Plant. 48:225-230.

———; Bravo, J. E.; Kut, S. A. y Flick, C. E. 1983. Genetic behaviour of somatic hybrids in the genus *Nicotiana*: *N. otohora* + *N. tabacum* and *N. silvestris* + *N. tabacum*. Theor. Appl. Genet. 65:93-101.

———; Flick, C. E.; Kut, S. A. y Reed, S. M. 1982. Comparison of *Nicotiana tabacum* and *Nicotiana mesophyla* hybrids produced by ovule culture and protoplast fusion. Theor. Appl. Genet. 62:193-198.

Evola, S. V. 1983. Chlorate-resistant variants of *Nicotiana tabacum* L. I. Selection *in vitro* and phenotypic characterization of cell lines and generated plants. Molec. Gen. Genet. 189:447-454.

———; Earle, E. D. y Chaleff, R. S. 1983. The use of genetic markers selected in vitro for the isolation and genetic verification of intraspecific somatic hybrids of *Nicotiana tabacum* L. Mol. Gen. Genet. 189:441-446.

Fluhr, R.; Aviv, D.; Edelman, M. y Galun, E. 1983. Hybrids containing mixed and sorted-out chloroplast following interspecific somatic fusions in *Nicotiana*. Theor. Appl. Genet. 65:289-294.

Fraley, R. y Papahadjopoulos, D. 1982. Liposomes: The development of a new carrier system for introducing nucleic acids into plant and animal cells. Current Topics in Microbilogy and Immunology 96:171-191.

Digitized by Google

———; Dellaporta, S. L. y Papahadjopoulos, D. 1982. Liposome-mediated delivery of tobacco mosaic virus RNA into tobacco protoplast: A sensitive assay for monitoring liposome-protoplast interactions. Proc. Natl. Acad. Sci. (E.U.) 79:1859-1863.

Fukunaga, J.; Nagata, T.; Takebe, I.; Kakehi, T. y Matsui, C. 1983. An ultrastructural study of the interaction of liposomes with plant protoplasts. Exp. Cell. Res. 144:181-189.

Galun, E. 1982. Somatic cell fusion for inducing cytoplsmic exchange: A new biological system for cytoplasmic genetics in higher plants. En: Vasil, I. K.; Scowcroft, W. R. y Frey, K. J. (eds.). Plant improvement and somatic cell genetics. Academic Press. p. 205-219.

———; Arzee-Gonen, D.; Flecher, R.; Edelman, M. y Aviv, D. 1982. Cytoplasmic hybridization in *Nicotiana*: Mitochondrial DNA analysis in progenies resulting from fusion between protoplast having different organelle constitutions. Mol. Gen. Genet. 186:50-56.

Gebhardt, C.; Schnebli, V. y King, P. J. 1981. Isolation of biochemical mutants using hapliod mesophyll protoplasts of *Hyoscyamus muticus*; 2: Auxotrophic and temperature-sensitive clones. Planta 153:81-89.

Gleba, Y. Y. y Hoffmann, F. 1978. Hybrid cell lines *Arabidopsis thaliana-Brassica campestris*: No evidence for specific chromosome elimination. Mol. Gen. Genet. 165:257-264.

——— y ———. 1979. 'Arabidobrassica': Plant-genome engineerig by protoplast fusion. Naturwissenschaften 66:547-554.

———; Momot, V. P.; Cherep, M. V. y Skorzynskaya. 1982. Intergeneric hybrid cell lines of *Atropa bellodonna* x *Nicotiana chinensis* obtained by cloning individual protoplast fusion products. Theor. Appl. Genet. 62:75-79.

———; ———; Okolot, A. N.; Cherep, N. N.; Skarzhynskaya, M. V. y Kotov, V. 1983. Genetic processing in intergeneric cell hybrids *Atropa-Nicotiana*; 2: Genetic constitution of cells of different clonal origin grown *in vitro*. Theor. Appl. Genet. 65:269-276.

Glimelius, K.; Eriksson, T.; Grafe, R. y Muller, A. J. 1978. Somatic hybridization of nitrate reductase-deficient mutants of *Nicotiana tabacum* by protoplast fusion. Physiol. Plant. 44:273-277.

——— y Bonnett, H. T. 1981. Somatic hybridization in *Nicotiana*: Restoration of photoautotrophy to an albino mutant with defective plastids. Planta 153:497-503.

———; Chen, K. y Bonnet, H. T. 1981. Somatic hybridization of *Nicotiana*: Segregation of organellar traits among hybrid and cybrid plants. Planta 153:504-510.

Digitized by Google

Gould, A. R. y Ashmore, S. E. 1982. Interaction of purified ADN with plant protoplasts of different cell cycle stage: The concept of a competent phase for plant cell transformation. Theor. Appl. Genet. 64:7-12.

Griesbach, R. J. 1983. Protoplast microinjection. Plant Mol. Biol. Reporter 1:32-37.

———; Malmberg, R. L. y Carlson, P. S. 1982. An improved technique for the isolation of higher plant chromosomes. Plant Sci. Lett. 24:55-60.

Gupta, P. P.; Gupta, M. y Schieder, O. 1982. Correction of nitrate reductase defect in auxotrophic plant cells through protoplast-mediated intergeneric gene transfers. Mol. Gen. Genet. 188:378-383.

Hadlaczky, Gy; Burg, K.; Mároy, P. y Dudits, D. 1980. DNA synthesis and division in interkingdom heterokaryions. In Vitro 16:647-650.

———; Bistroy, Gy; Praznovszky, T. y Dudits, D. 1983. Moss isolation of plant chromosomes and nuclei. Planta 157:278-285.

Hain, R.; Steinbis, H.-H. y Schell, J. 1984. Fusion of *Agrobacterium* and *E. coli* spheroplasts with *Nicotiana tabacum* protoplasts: Direct gene transfer from microorganism to higher plant. Plant Cell Reports 3:60-64.

Hanold, D. 1983. In vitro transformation of protoplast-derived *Hyosciamus muticus* cells by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Sci. Lett. 30:177-183.

Harms, C. T.; Potrykus, I. y Widholm, J. M. 1981. Complementation and dominant expression of amino acid analogue resistance markers in somatic hybrid clones from *Daucus carota* L. after protoplast fusion. Z. Pflanzenphysiol. 101:377-390.

———; Oertli, J. J. y Widholm, J. M. 1982. Characterization of aminoacid analogue resistant somatic hybrid cell lines of *Daucus carota* L. Z. Pflanzenphysiol. 106:239-249.

Hasezawa, S.; Nagata, T. y Syono, K. 1981. Transformation of *Vinca* protoplasts mediated by *Agrobacterium* spheroplasts. Mol. Gen. Genet. 182:206-210.

———; Matsui, C.; Nagata, T. y Syono, K. 1983. Cytological study of the introduction of *Agrobacterium tumefaciens* spheroplasts into *Vinca rosea* protoplasts. Can. J. Bot. 61:1052-1057.

Herrera-Estrella, L.; Depicker, A.; van Montagu, M. y Schell, J. 1983a. Expression of chimeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. Nature 303:209-213.

———; De Block, M.; Messens, E.; Hernalsteens, J. P.; van Montagu, M. y Schell, J. 1983b. Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells. The EMBO Journal 2:987-995.

Digitized by Google

———; van den Broeck, G.; Macenhant, R.; van Montagu, M.; Schell, J.; Tienko, M. y Cashmore, A. 1984. Light-inducible and chloroplast associated expression of a chimeric gene introduced into *Nicotiana tabacum* using a Ti-plasmid vector. Nature 310:115-120.

Hóekema, A.; Hirsch, P. R.; Hooykaas, P. J. J. y Schilperoort, R. A. 1983. A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. Nature 303:179-180.

Hoffmann, F. y Adachi, T. 1981. 'Arabidobrassica': Chromosomal recombination and morphogenesis in assymmetric intergeneric hybrid cells. Planta 153: 586-593.

Horn, M. E.; Kameya, T.; Brothertan, J. E. y Widholm, J. M. 1983. The use of aminoacid analog resistance and plant regeneration ability to select somatic hybrids between *Nicotiana tabacum* and *N. glutinosa*. Mol. Gen. Genet. 192:135-240.

Horvath, G.; Droppa, M.; Mustordy, L. A. y Faludi-Daniel, A. 1978. Functional characteristics of intact chloroplasts isolated from mesophyll protoplast and bundle sheath cells of maize. Planta 141:239-244.

Howell, S. H. 1982. Plant molecular vehicles: Potential vectors for introducing foreign DNA into plants. Ann. Rev. Plant Physiol. 33:609-650.

Hughes, B. G.; White, F. G. y Smith, M. A. 1979. Fate of bacterial plasmid DNA during uptake by barley and tobacco protoplasts; 2: Protection by poly-L-ornithine. Plant Sci. Lett. 14:303-310.

Izhar, S. y Tabib, Y. 1980. Somatic hybridization in *Petunia*; 2: Heteroplasmic state in somatic hybrids followed by cytoplasmic segregation into male sterile and male fertile lines. Theor. Appl. Genet. 57:241-246.

———; Schlichter, M.; Schwartzberg, D. 1983. Sorting out of cytoplasmic elements in somatic hybrids of *Petunia* and the prevalence of the hetero-plasmon through several meiotic cycles. Mol. Gen. Genet. 190:468-474.

Kado, C. I. y Klrinhofs, A. 1980. Genetic modification of plant cells through uptake of foreing DNA. Int. Rev. Cytol. Suppl. 11B.

Kameya, T.; Horn, M. E. y Widholm, J. M. 1981. Hybrid shoot formation from fused *Daucus carota* and *D. capillifolius* protoplasts. Z. Pflanzenphysiol. 104:459-466.

Kao, K. N. 1977. Chromosomal behaviour in somatic hybrids of soybean *Nicotiana glauca*. Mol. Gen. Genet. 150:225-230.

———. 1982. Plant protoplast fusion and isolation of heterokaryocytes. En: Wetter, L. R. y Constabel, F. (eds.). Plant tissue culture methods. National Research Council of Canada. p. 49-56.

Digitized by Google

——— y Michayluk, M. R. 1974. A method for high frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. Planta 115:355-367.

———; Constabel, F.; Michayluk, M. R. y Gamborg, O. L. 1974. Plant protoplast fusion and growth of intergeneric hybrid cells. Planta 120:215-227.

Karp, A.; Nelson, R. S.; Thomas, E. y Bright, S. W. J. 1982. Choromosome variation in protoplast derived potato plants. Theor. Appl. Genet. 63: 265-272.

Keller, W. A. y Melchers, G. 1973. The effect of high pH and calcium on tobacco leaf protoplast fusion. Z. Natürforsch. 280:737-741.

Klobutcher, L. A. y Ruddle, F. H. 1981. Choromosome mediated gene transfer. Ann. Rev. Biochem. 50:533-554.

Koblitz, H. 1980. The physiology of fusion in isolated higher plant protoplasts as a basis for somatic cell genetics. En: Ferenczy, L. y Farkas, G. L., (eds.). Advances in protoplast research: Proceedings of the Fifth International Protoplast Symposium, Szeged. Akadémiai Kiadó, Budapest, Hungría. p. 383-387.

Krens, F. A.; Molendijk, L.; Wullems, G. J. y Schilperoort, R. A. 1982. In vitro transformation of plant protoplasts with Ti-plasmid DNA. Nature 296: 72-74.

Krumbiegel, G. y Schieder, O. 1979. Selection of somatic hybrids after fusion of protoplasts from *Datura innoxia* Mill. and *Atropa belladonna* L. Planta 145:371-375.

Kung, S. D.; Gray, J. C.; Wildman, S. G. y Carlson, P. S. 1975. Polypeptide composition of fraction I protein from parasexual hybrid plants in the genus *Nicotiana*. Science 187:353-355.

Lázár, G. B.; Dudits, D. y Sung, Z. R. 1981. Expression of cycloheximide resistance in carrot somatic hybrids and their segregants. Genetics 98: 347-356.

Lorz, H. y Potrykus, I. 1978. Investigation on the transfer of isolated nuclei into plant protoplasts. Theor. Appl. Genet. 53:251-256.

———; Paszkowski, J.; Dierks-Ventling, C. y Potrykus, I. 1981. Isolation and characterization of cytoplasts and miniprotoplasts derived from protoplasts of cultured cells. Physiol. Plant. 53:384-391.

Lurquin, P. F. y Kado, C. I. 1977. *Escherichia coli* plasmid pBR313 insertion into plant protoplasts and into their nuclei. Mol. Gen. Genet. 154:113-121.

———. 1979. Entrapment of plasmid DNA by liposomes and their interactions with plant protoplasts. Nucleic Acids Research 6:3773-3784.

Digitized by Google

——— y Márton, L. 1980. DNA transfer experiments with plant protoplasts and bacterial plasmids. En: Frenczy, L., y Farkas, G. L., (eds.). Advances in protoplast research: Proceedings of the Fifth International Protoplast Symposium, Szeged. Akadémiai Kiadó, Budapest, Hungría. p. 387-405.

——— y Sheehy, R. E. 1982. Binding of large liposomes to plant protoplasts and delivery of encapsulated DNA. Plant Sci. Lett. 25:133-146.

Maliga, P. 1984. Isolation and characterization of mutant in plant cell culture. Ann. Rev. Plant. Physiol. 35:519-542.

———; Lázár, G.; Joo, F.; Nagy, A. H. y Menczel, L. 1977. Restoration of morphogenetic potential in *Nicotiana* by somatic hybridization. Mol. Gen. Genet. 157:291-296.

———; Menczel, L.; Sidorov, V.; Márton, L.; Cséplo, A.; Medgyesy, P.; Dung, T. M.; Lázár, G. y Nagy, F. 1982a. Cell culture mutants and their uses. En: Vasil, I. K.; Scowcroft, W. R. y Frey, K. J. (eds.). Plant improvement and somatic cell genetics. Academic Press, Nueva York. p. 221-237.

———; Lorz, H.; Lázar, G. y Nagy, F. 1982b. Cytoplast-protoplast fusion for interspecific chloroplast transfer in *Nicotiana*. Mol. Gen. Genet. 185: 211-215.

Malmberg, R. L. y Griesbach, R. J. 1983. Chromosomes from protoplasts isolation, fractionation and uptake. En: Kosuge, T.; Meredith, C. P. y Hollaender, A. (eds.). Genetic engineering of plants. Plenum Press. p. 195-201.

Marton, L.; Wullems, G. J.; Molendijk, L. y Schilperoort, L. A. 1979. In vitro transformation of cultured cells from *Nicotiana tabacum* by *Agrobacterium tumefaciens*. Nature 277:129-131.

———; Dung, T. M.; Mendel, R. R. y Maliga, P. 1982a. Nitrate reductase deficient lines from haploid protoplast cultures of *Nicotiana plumbaginifolia*. Mol. Gen. Genet. 182:301-304.

———; Sidorov, V.; Biasini, G. y Maliga, P. 1982b. Complementation in somatic hybrids indicates four types of nitrate reductase deficient lines in *Nicotiana plumbaginifolia*. Mol. Gen. Genet. 187:1-3.

Matthews, B. F. y Cress, D. E. 1981. Liposome-mediated delivery of DNA to carrot protoplasts. Planta 153:90-94.

Matzke, M. A.; Susani, M.; Binns, A. N.; Lewis, E. D.; Rubinstein, I. y Matzke, A. J. M. 1984. Transcription of a zein gene introduced into semiflower using a Ti-plasmid vector. The EMBO Journal 3:1525-1531.

Digitized by Google

Medgyesy, P.; Menczel, L. y Maliga, P. 1980. The use of cytoplasmic streptomycin resistance: Chloroplast transfer from *Nicotiana tabacum* into *Nicotiana silvestris* and isolation of their somatic hybrids. Mol. Gen. Genet. 179: 693-698.

Melchers, G. y Labib, G. 1974. Somatic hybridization of plant by fusion of protoplasts; I: Selection of light resistant hybrids of 'haploid' light sensitive varieties of tobacco. Mol. Gen. Genet. 153:277-294.

———; Sacristán, D. y Holders, A. A. 1978. Somatic hybrid plants potato and tomato regenerated from fused protoplasts. Carlsberg Res. Cominun. 43:203-218.

Memelink, J.; Wullems, G. J. y Schilperoort, R. A. 1983. Nopaline T-DNA is maintained during regenerationa and generative propagation of transformed tobacco plants. Mol. Gen. Genet. 190:516-522.

Menczel, L.; Lázár, G. y Maliga, P. 1978. Isolation of somatic hybrids by cloning *Nicotiana* heterokaryions in nurse cultures. Planta 143:29-32.

———; Nagy, F.; Kiss, Z. R. y Maliga, P. 1981. Streptomycin resistant and sensitive somatic hybrids of *Nicotiana tabacum-Nicotiana knightiana*: Correlation of resistant to sensitive *N. tabacum* plastids. Theor. Appl. Genet. 59:191-195.

———; Nagy, F.; Lázár, G. y Maliga, P. 1983. Transfer of cytoplasmic male sterility by selection for streptomycin resistance after protoplast fusion in *Nicotiana*. Mol. Gen. Genet. 189:365-369.

——— y Wold, K. 1984. High frequency of fusion induced in freely suspended protoplast mixtures by polyethyleneglycol and dimethylsulfoxide at high pH. Plant Cell Reports 3:196-198.

Murai, N.; Sutton, D. W.; Murray, M. G.; Slightom, J. L.; Merlo, D. J.; Reichert, Na.; Sengupta-Gopalan, C.; Stock, C. A.; Baker, R. F.; Kemp, J. D. y Hall, T. C. 1983. Phaseolin gene from bean is expressed after transfer to sunflower via tumor-inducing plasmid vectors. Science 222:474-482.

Nagata, T.; Okada, K.; Takebe, I. y Matsui, C. 1981. Delivery of tobacco mosaic virus RNA into plant protoplasts mediated by reverse-phase evaporation vesicles (liposomes). Mol. Gen. Genet. 184:161-165.

Nagy, F.; Torok, I. y Maliga, P. 1981. Extensive rearrangements in the mitochondrial DNA in somatic hybrids of *Nicotiana tabacum* and *N. knightiana*. Mol. Gen. Genet. 183:437-439.

Negrutiu, I. 1981. Improved conditions for large scale culture, mutagenesis, and selection of haploid protoplasts of *Nicotiana plumbaginifolia* Viviani. Z. Pflanzenphysiol. 104:431-442.

Digitized by Google

———; Jacobs, M. y Caboche, M. 1984. Advances in somatic cell genetics in plants: The protoplast approach in basic studies on mutagenesis and isolation of biochemical mutants. Theor. Appl. Genet. 67:289-304.

Nehls, R. 1978. The use of metabolic inhibitors for the selection of fusion products of higher plant protoplasts. Mol. Gen. Genet. 166:117-118.

Nishimura, M. D.; Graham, D. y Akasama, T. 1976. Isolation of intact chloroplasts and other cell organelles from spinach leaf protoplasts. Plant Physiol. 58:309-314.

Ohyama, K. 1982. Mutagenesis and isolation of 5-bromodeoxyuridine-resistant cells from soybean protoplasts. En: Wetter, L. R. y Constabel, F. (eds.). Plant tissue culture methods. Research Council of Canada. p. 101-104.

———; Gamborg, O. L. y Miller, R. A. 1972. Uptake of exogenous DNA by plant protoplasts. Can. J. Bot. 50:2077-2080.

———; Pelcher, L. E. y Horn, D. 1977. A rapid simple method for nuclei isolation from protoplasts. Plant Physiol. 60:179-181.

Patnaik, G.; Cocking, E. C.; Hamill, J. y Pentall, D. 1982. A simple procedure for the manual isolation and identification of plant heterokaryons. Plant Sci. Lett. 24:105-110.

Pelletier, G.; Primard, C.; Vedel, F.; Chetrit, P.; Remy, R.; Rouselle, B. y Renard, M. 1983. Intergeneric citoplasmic hybridization in *Cruciferae* by protoplast fusion. Mol. Gen. Genet. 191:244-250.

Potrykus, I. 1973. Transplantation of chloroplasts into protoplasts of *Petunia*. Z. Pflanzenphysiol. 70:364-366.

——— y Hoffmann, F. 1973. Transplantation of nuclei into protoplasts of higher plants. Z. Pflanzenphysiol. 69:287-289.

———; Jia, J.; Lázár, G. B. y Saul, M. 1984. *Hyoscyamus muticus* + *Nicotiana tabacum* fusion hybrids selected via auxotroph complementation. Plant Cell Reports 3:68-71.

Power, J. B.; Cummins, S. E. y Cocking, E. C. 1970. Fusion of isolated plant protoplasts. Nature 225:1016.

———; Frearson, E. M.; Hayunard, C.; George, D.; Evans, P. K.; Berry, S. F. y Cocking, E. C. 1976. Somatic hybridization of petunia hybrids and *Petunia parodii*. Nature 263:500-502.

Ramulu, K. S.; Dijkhuis, P. y Roest, S. 1983. Phenotypic variation and ploidy level of plants regenerated from protoplsts of tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L. Bintje). Theor. Appl. Genet. 65:329-338.

Digitized by Google

Rathnam, C. K. M. y Edwards, G. E. 1976. Protoplasts as a tool for isolating functional chloroplasts from leaves. Plant Cell Physiol. 17:177-186.

Rollo, F.; Galli, M. G. y Parisi, B. 1981. Liposome-mediated transfer of DNA to carrot protoplasts; A biochemical and autoradiographic analysis. Plant Sci. Lett. 20:347-354.

Saul, M. W. y Potrykus, P. 1984. Species repetitive DNA used to identify interspecific somatic hybrids. Plant Cell Reports 3:65-67.

Schieder, O. 1980. Somatic hybrids of *Datura innoxia* Mill x *Datura discolor* Beruh. and of *Datura innoxia* Mill x *Datura stramonium* L. var. Tatule. Mol. Gen. Genet. 179:387-390.

———. 1982. Somatic hybridization: a new method for plant improvement. En: Scowcroft, W. R. y Frey, K. J. (eds.). Plant improvement and somatic cell genetics. Academic Press, Nueva York. p. 239-253.

Secor, G. A. y Shepard, J. F. 1981. Variability of protoplast-derived potato clones. Crop Science 21:102-105.

Senda, M.; Morikawa, H.; Katagi, H.; Takada, T. y Yamada, Y. 1980. Effect of temperature on membrane fluidity and protoplast fusion. Theor. Appl. Genet. 57:33-35.

Shepard, J. F.; Bidney, D. y Shalin, N. 1980. Potato protoplasts in crop improvement. Science 208:17-24.

Shimamoto, K. y King, P. J. 1983. Isolation of a histidine auxotroph of *Hyosciamus muticus* during attempts to apply BUdR enrichment. Mol. Gen. Genet. 189:69-72.

Sidorov, V. A.; Menczel, L. y Maliga, P. 1981a. Isoleucin-requiring *Nicotiana* plant deficient in threonin deaminase. Nature 294:87-88.

———; Menczel, L.; Nagy, F. y Maliga, P. 1981b. Chloroplast transfer in *Nicotiana* based on metabolic complementation between irriadiated and iodoacetate treated protoplasts. Planta 152:341-345.

Smillie, R. M.; Melchers, G. y von Wettstein, D. 1979. Chilling resistance of somatic hybrids of tomato and potato. Carlsberg Res. Commun. 44:127-132.

Spano, L. y Constantino, P. 1982. Regeneration of plants from callus cultures of roots induced by *Agrobacterium rhizogenes* on tobacco. Z. Pflanzenphysiol. 106:87-92.

Strauss, A.; Bucher, F. y King, P. J. 1981. Isolation of biochemical mutants using haploid mesophyll protoplasts of *Hyosciamus muticus*; I: A NO_3^- nonutilizing clone. Planta 153:75-80.

Suzuki, M. y Takebe, I. 1978. Uptake of double-stranded bacteriophage DNA by isolated tobacco leaf protoplasts. Z. Pflanzenphysiol. 87:297-311.

Digitized by Google

Sybenga, J. 1983. Genetic manipulation in plant breeding: Somatic versus generative. Theor. Appl. Genet. 66:179-201.

Szabados, L. y Dudits, D. 1980. Fusion betwwen interphase and mitotic plant protoplasts: Induction of premature chrosome condensation. Exp. Cell. Res. 127:442-446.

———; Hadlaczky, Gy y Dudits, D. 1981. Uptake of isolated plant chromosomes by plant protoplasts. Planta 151:141-145.

Szoka, F. y Papahadjopoulos, D. 1978. Procedure for preparation of lipsomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. Proc. Natl. Acad. Sci. (E.U.) 74:4194-4198.

Teoulé, E. 1983. Hybridation somatique entre *Medicago sativa* L. et *Medicago falcata* L. C. R. Acad. Sc. Paris 297 Série 111:13-16.

Thomas, E.; King, P. J. y Potrykus, I. 1979. Improvement of crop plants via single cells *in vitro*: An assessment. Z. Pflanzenzuchtung. 82:1-30.

———; Bright, S. W. J.; Franklin, J.; Lancaster, V. A.; Miflin, B. J. y Gibson, R. 1982. Variation amongst protoplast-derived potato plants (*Solanum tuberosum* cv. Maris Bard). Theor. Appl. Genet. 62:65-68.

Uchimiya, H. 1982. Somatic hybridization between male sterile *Nicotiana tabacum* and *N. glutinosa* through protoplast fusion. Theor. Appl. Genet. 61:69-72.

——— y Harada, H. 1981. Transfer of liposome-sequestering plasmid DNA into *Daucus carota* protoplasts. Plant Physiol. 68:1027-1030.

———; Ohgawara, T.; Kato, H.; Akiyama, T.; Harada, H. y Sugiura, M. 1983. Detection of two different nuclear genomes in parasexual hybrids by ribosomal RNA gene analysis. Theor. Appl. Genet. 64:117-118.

Ueda, K.; Tan, K.; Sato, F. y Yamada, Y. 1978. Phagocytosis in plant protoplasts. Cell Structure and Function 3:25-30.

Van Larebeke, N.; Engler, G.; Holsters, M.; van den Elsacker, S.; Zaenen, I.; Schilperoort, R. A. y Schell, J. 1974. Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall inducing ability. Nature 252:169-170.

Vasil, I. K. 1983. Regeneration of plants from single cells of cereal and grasses. En: Lurquin, P. F. y Kleinhofs, R. (eds.). Genetic engineering in eukaryonts. Plenum Publ. Corp. p. 233-252.

Wallin, A.; Glimelius, K. y Eriksson, T. 1974. The induction of aggregation and fusion of *Daucus carota* protoplasts by polyethylene glycol. Z. Pflanzenphysiol. 74:64-80.

———; ——— y ———. 1978. Enucleation of plant protoplasts by cytochalasin. Z. Pflanzenphysiol. 87:333-340.

Digitized by Google

Wenzel, G.; Schieder, O.; Przewozny, T.; Sopory, S. K. y Melchers, G. 1979. Comparison of single cell culture derived *Solanum tuberosum* L. plants and a model for their application in breeding programs. Theor. Appl. Genet. 55:49-55.

Wullems, G. J.; Molendijk, L.; Ooms, G. y Schilperoort, R. A. 1981. Retention of tumor markers in F1 progeny plants from in vitro induced octopine and nopaline tumor tissues. Cell 24:719-727.

Zachrisson, A. y Bornmann, C. H. 1984. Application of electric field fusion in plant tissue culture. Physiol. Plant. 61:314-320.

Zelcer, A.; Aviv, D. y Galun, E. 1978. Interspecific transform of cytoplasmic male sterility by fusion between protoplasts of normal *Nicotiana silvestris* and X-ray irradiated protoplasts of male sterile *N. tabacum*. Z. Pflanzenphysiol. 90:397-407.

Zimmermann, U. 1982. Electric field-mediated fusion and related electrical phenomena. Biochim. Biophys. Acta 694:227-277.

——— y Scheurich, P. 1981. High frequency fusion of plant protoplasts by electric fields. Planta 151:26-32.

Digitized by Google

Capítulo 35

Protoplastos para la investigación de los virus que afectan las plantas

A. L. Fuentes K.*

* Department of Plant Science, University of British Columbia, Vancouver, Canadá.

Digitized by Google

Introducción

El desarrollo de métodos de cultivo de células animales ha contribuido en forma determinante a esclarecer los conocimientos acerca de la penetración, la reduplicación y, en general, las propiedades de los virus que afectan los animales.

La investigación virológica en plantas empezó a utilizar las técnicas de cultivo de tejidos vegetales mucho después de que lo hiciera la investigación en virología animal, debido a que la infección de células vegetales en suspensión resulta muy ineficiente; ello se debe a la naturaleza del mecanismo de penetración de los virus en las células vegetales y a la presencia de la pared celular en ellas. Una alternativa para obviar esa barrera fue la de utilizar protoplastos cultivados en un medio isosmótico que garantice su estabilidad.

Después de la introducción de un método químico para producir protoplastos en gran escala mediante el uso de enzimas del tipo de las celulasas y pectoliasas (Cocking, 1960), varios investigadores lograron simultáneamente inocular protoplastos con el virus del mosaico del tabaco (TMV) (Aoki y Takebe, 1969; Cocking y Pojnar, 1969; Otsuki y Takebe, 1969). A partir de ese momento, muchos investigadores empezaron a interesarse en el uso de los protoplastos y han contribuido a mejorar las técnicas para la preparación y el cultivo de los mismos y las técnicas de inoculación y análisis de la reduplicación viral. De esa manera, hoy en día los virólogos de plantas disponen de un sistema que permite inocular un gran número de células con virus, e inclusive con los ácidos nucleicos virales purificados, lo que no es posible trabajando con plantas completas.

Las etapas de la reduplicación viral, sincronizadas a partir de la penetración del virus, se pueden seguir mediante distintas técnicas de marcación que permiten detectar la producción de proteínas y ácidos nucleicos. El perfeccionamiento de estas técnicas ha permitido, además, estudiar las bases moleculares de la resistencia, la hipersensibilidad y la susceptibilidad a las infecciones virales.

En el presente capítulo se revisarán los métodos para la preparación, infección y cultivo de protoplastos y para la detección de partículas virales en ellos. Se esbozarán también algunos modelos que permitan explicar la resistencia que, a nivel celular, presentan las plantas a los virus.

Digitized by Google

Aislamiento de los Protoplastos

Selección del material vegetal

Las condiciones fisiológicas del tejido influyen en la estabilidad de los protoplastos y en su capacidad para sostener la reduplicación viral (Takebe et al., 1968).

Los protoplastos que se utilizan[1] en el estudio de la reduplicación viral se obtienen casi en su totalidad del mesófilo de las hojas. Por lo general se recomienda utilizar hojas jóvenes de plantas que hayan crecido en condiciones controladas; entre estas condiciones se consideran cruciales la intensidad de la luz y la humedad relativa (Sander y Mertes, 1984). Puesto que las plantas que crecen en el campo, y aun las que crecen en el invernadero, están sometidas a fluctuaciones ambientales diarias y estacionales, es recomendable utilizar cámaras de crecimiento.

Otra alternativa que se ha planteado para obviar esos problemas es la preparación de protoplastos a partir de suspensiones celulares (Muhlbach, 1983). Sin embargo, sólo en 1981 Nagata et al. lograron producir consistentemente protoplastos a partir de suspensiones, a la vez que Lesney y Murakishi (1981) lograron producirlos e infectarlos con virus. A pesar de estos avances, se siguen utilizando en general protoplastos del mesófilo para los estudios de reduplicación viral, puesto que en las suspensiones celulares la variabilidad genética es muy grande.

Preparación y digestión con enzimas proteolíticas

Después de Cocking (1960), Takebe et al. (1968) y Power y Cocking (1969) desarrollaron las primeras preparaciones de protoplastos utilizando enzimas proteolíticas. Ambos grupos coinciden en la importancia de trabajar con material previamente esterilizado, para lo cual utilizaron detergentes suaves, etanol y varios lavados con agua bidestilada estéril. Las operaciones se llevaron a cabo en una cámara de flujo laminar horizontal, y con los cuidados necesarios para evitar la contaminación.

La diferencia en los métodos de producción de protoplastos entre estos dos grupos radicó en el proceso de digestión. El método de Takebe et al. (1968) se desarrolla en dos etapas, la primera de las cuales consiste en la

1. El método general para el aislamiento de protoplastos se describe detalladamente en el Capítulo 10.

Digitized by Google

incubación del tejido foliar en pectinasa para disociar las células; la segunda etapa consiste en incubar en celulasa las células disociadas para remover la pared. El método de Power y Cocking (1969) es, en realidad, una versión simplificada del primero, puesto que el tejido se somete a la digestión simultánea por la pectinasa y la celulasa.

En estos dos métodos básicos se han modificado distintos aspectos incluyendo la osmolaridad, el pH, la composición del medio de aislamiento, la concentración de las enzimas y la duración del tratamiento enzimático; estas adaptaciones permiten hoy en día aislar protoplastos de una amplia gama de variedades vegetales. No obstante lo anterior, debe señalarse que a pesar de la existencia de muchos métodos establecidos, cuando se inicia el trabajo con una nueva especie o variedad de planta, debe hacerse una evaluación crítica de los parámetros de aislamiento.

Inoculación de los Protoplastos con Virus Purificado

La infección in vivo de los protoplastos por los virus depende de dos procesos fundamentales: la adhesión de una cantidad suficiente de partículas virales al exterior de la membrana plasmática, y la entrada de los virus a los protoplastos (Mühlbach, 1983). Se pueden adoptar los procedimientos siguientes:

Método de infección con PLO

El procedimiento básico a partir del cual se han hecho trabajos relacionados con la infección de protoplastos con virus fue desarrollado por Takebe y Otsuki (1969); estos investigadores infectaron con el TMV un 90% de protoplastos de tabaco, mezclándolo con poli-L-ornitina (PLO) y manitol en el tampón citrato.

La PLO es un policatión macromolecular, considerado por la mayor parte de los investigadores como necesario para mejorar la infección viral de los protoplastos (Sander y Mertes, 1984). Aunque los mecanismos exactos por los cuales los policationes estimulan la infección viral no se conocen, se han propuesto varias explicaciones.

El efecto principal de la PLO es, al parecer, la formación de complejos con las partículas virales cargadas negativamente. Puesto que la superficie de los protoplastos posee una carga negativa a pH ácido, la formación de complejos de partículas virales con los policationes, que neutralizan las

Digitized by Google

cargas negativas de los virus, facilita la adsorción de los agregados a la superficie celular. En el caso de virus multiparticulados (multipartite virus), esos agregados favorecen una infección efectiva puesto que la agregación hace que el virus multiparticulado se convierta en una sola partícula, aumentando así la probabilidad de infección.

Por otra parte, aún en los casos en que las partículas virales no están cargadas negativamente a pH ácido, la PLO tiene un efecto positivo sobre la infección (Sander y Mertes, 1984). Burguess et al. (1973) sugieren que este efecto se debe a lesiones en la membrana plasmática causadas por la PLO, lesiones que permiten la penetración del virus al protoplasto.

Otra explicación posible es que la PLO promueve la pinocitosis de las partículas virales; Cocking y Pojnar (1969) observaron partículas de TMV adheridas a la membrana plasmática, así como otras contenidas en vesículas. Sin embargo, esta hipótesis tiene poca aceptación ya que en muchos sistemas de protoplastos la inoculación se realiza a 0 °C, y a esta temperatura un proceso que requiere energía, como es la pinocitosis, no se lleva a cabo (Sander y Mertes, 1984).

Método de infección con PEG

Otro procedimiento para inocular protoplastos fue el desarrollado por Cassells y Barlass (1978) quienes utilizaron polietilenglicol (PEG), un agente que promueve la fusión celular. Utilizando entre 1.3% y 7.8% de PEG, ellos lograron inocular con TMV un 60% de protoplastos de mesófilo de tomate.

Los mecanismos por los cuales el PEG estimula la infección tampoco se conocen exactamente; sin embargo, se propone que durante la fusión de las células se produce un daño en las membranas, lo cual facilita la entrada del virus (Maule et al., 1980). Maule (1983) también observó que en los casos en que el PEG no inducía la aglutinación de las células, el virus se agregaba a los protoplastos pero no los infectaba. El efecto del PEG se puede observar en las Figuras 35.1, 35.2 y 35.3 que corresponden a las infección de protoplastos de frijol (*Phaseolus vulgaris*) con el virus del mosaico rugoso del frijol (Fuentes, 1986).

Factores que influyen en la infección de los protoplastos

Composición del tampón de inoculación y pH. El primer método establecido por Takebe y Otsuki (1969) para la inoculación de los protoplastos utilizaba el tampón citrato. Sin embargo, el citrato se ha sustituido

Digitized by Google

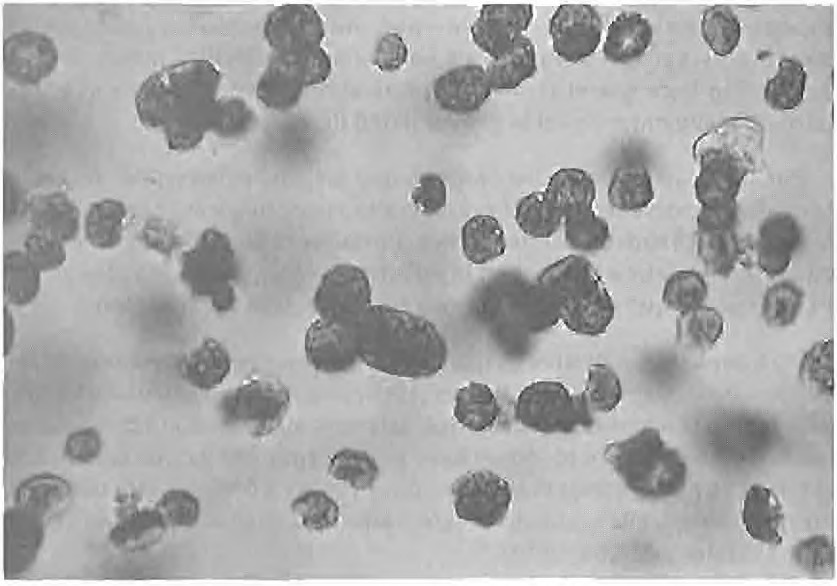


Figura 35.1. Aglutinación de los protoplastos de *P. vulgaris*, inducida y promovida por PEG al 30% (aumento de 400 X 24).

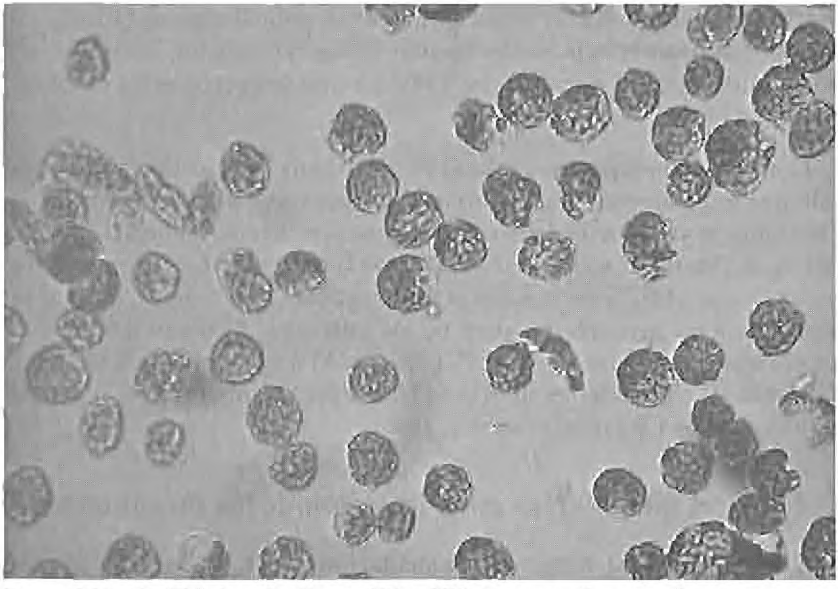


Figura 35.2. Al diluir la solución de PEG 10X, los protoplastos vuelven a separarse (aumento de 400 X 24).

Digitized by Google

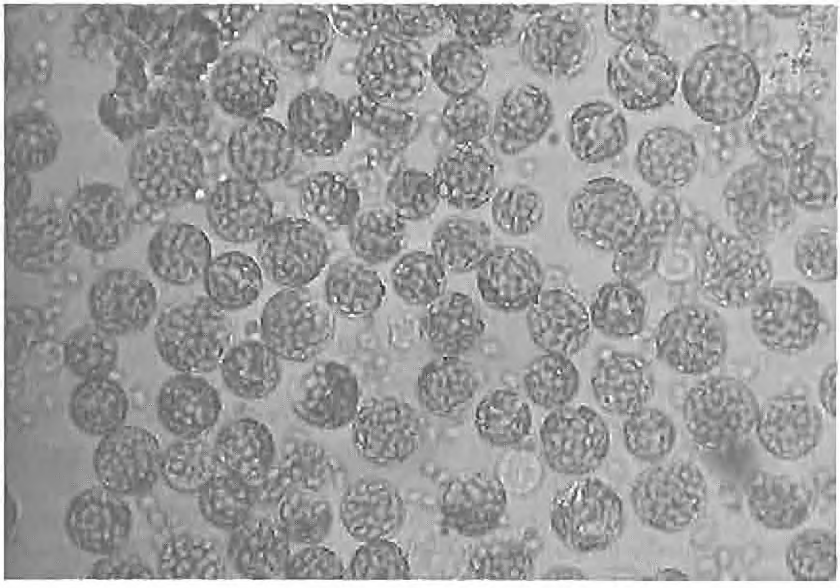


Figura 35.3. Protoplastos en el medio de cultivo después de la adición de PEG; las células vuelven a presentar un aspecto normal, igual que los testigos (aumento de 400 X 24).

por fosfato porque éste ha resultado más eficaz en muchos sistemas de virus-protoplastos (Kubo et al., 1976; Motoyoshi y Oshima, 1975; Beier y Bruening, 1976). Kubo et al. (1976) explican que este efecto se debería a la diferencia en el tamaño de los complejos de virus que se forman en cada caso, complejos que al parecer son más grandes con el tampón fosfato; sin embargo, esto es mera especulación, ya que las pruebas de infección se hacen generalmente de manera empírica hasta lograr el máximo de infección.

Por otra parte, el pH del tampón de inoculación influye también en los niveles de infección por el efecto que ejerce en las cargas de los protoplastos y del virus. Para la mayor parte de los sistemas virus-protoplastos se han utilizado valores de pH alrededor de 5.0 (Takebe, 1977); sin embargo, al preparar el inóculo en otros tampones como Tris-cloruro, se ha utilizado un pH básico y se han obtenido buenos niveles de infección debido, probablemente, a que la carga neta de los virus es diferente (Sander y Mertes, 1984).

Osmolaridad. Okuno y Furusawa (1978) estudiaron el efecto de un choque osmótico durante la inoculación; concluyeron que un cambio de

Digitized by Google

0.5 a 0.7 M aumentaba la eficiencia de la infección mientras que una disminución en la osmolaridad la reducía. Los autores proponen que, debido a la plasmólisis de los protoplastos ocurrida al aumentar la presión osmótica del medio, la estructura y las propiedades de la membrana sufren cambios que favorecen la adsorción y la entrada del virus; sin embargo, los mismos autores reconocen que el choque osmótico no siempre resulta conveniente para llevar a cabo la infección, ya que puede traer otros efectos e incluso ser letal para las células.

Concentraciones de los protoplastos y del inóculo. La concentración adecuada de protoplastos para llevar a cabo la infección varía desde 1×10^5 célula/ml (Sander y Mertes, 1984) hasta 2×10^6 célula/ml (Coutts y Cocking, 1972). Estas variaciones dependen de los tampones utilizados, del uso de PLO, de PEG o de otros policationes, y de la concentración del virus.

Mayo (1978) ha discutido las distintas relaciones entre la concentración de policationes y el número de protoplastos, según el tipo de tampón utilizado. Cuando la infección se lleva a cabo con PLO, un aumento en la concentración del inóculo da como resultado un aumento en la eficiencia de la infección. La concentración óptima de virus es de 1 μg/ml; por encima de esta cantidad de virus la eficiencia no mejora, probablemente porque se requerirían mayores cantidades de PLO y esto resultaría letal para las células.

Otros factores. Además de los factores señalados existen otros menos estudiados, entre los cuales está la edad de la planta utilizada para producir los protoplastos. Joshi et al. (1983) observaron que el porcentaje de protoplastos infectados y el nivel de producción de virus variaban según la edad de la planta.

Inoculación de los Protoplastos con Acidos Nucleicos Virales

La infección de los protoplastos con ácidos nucleicos virales y con viroides ha sido mucho menos efectiva que la inoculación con partículas virales completas (Takebe, 1983). Las dificultades en la inoculación se atribuyen al estímulo de la producción de nucleasa durante la preparación de los protoplastos y a la liberación de los mismos al medio (Lurquin y Hotta, 1975); por lo tanto, este hecho se ha tomado en cuenta para desarrollar

Digitized by Google

métodos de inoculación que permitan reducir la cantidad o la actividad de las nucleasas en el sistema de inoculación. Algunos de los métodos que se utilizan hoy en día se describen a continuación:

Estimulación con policationes

La infección de los protoplastos con ácido nucleico viral no depende de la presencia de policationes aunque, de acuerdo con varios investigadores, los policationes son agentes estimuladores del proceso de infección lo mismo que los cationes divalentes (Beier y Bruening, 1976; Okuno y Furusawa, 1978). Al parecer, ambos agentes forman complejos con las moléculas de ácido nucleico, las cuales son polianiones fuertes, dándoles estabilidad ante los ataques de las nucleasas.

Infección bajo condiciones inhibidoras de las nucleasas

Con el objetivo de inhibir la actividad de las nucleasas, se han variado la temperatura, el pH y la concentración de sales del sistema. Prácticamente, en todos los sistemas de infección las temperaturas entre 0 y 10 °C han permitido una mayor eficiencia, porque a estas bajas temperaturas la actividad enzimática se reduce y así sobreviven mejor los ácidos nucleicos.

Otro método se basa en condiciones que inactivan las nucleasas: es la inoculación en condiciones de pH muy alcalino (pH 9) y de alta concentración de sal (Sarkar et al., 1974). Sin embargo, la alta eficiencia que los informes atribuyen a este método ha sido difícil de reproducir con otros sistemas, probablemente porque los protoplastos se deterioran bajo condiciones de alta concentración de sal (Mühlbach, 1983).

Uso de liposomas

Recientemente se ha recurrido al uso de liposomas para encapsular los ácidos nucleicos y protegerlos contra el ataque de las nucleasas (Fukunaga et al., 1983). Este método, que ha resultado uno de los más eficientes, presenta varias ventajas para la inoculación con ácidos nucleicos; además de la protección que ofrece contra la degradación por las nucleasas, se puede utilizar con una gran variedad de especies vegetales, ya que los liposomas son de baja toxicidad para las células (Mühlbach, 1983).

El mecanismo de la infección a través de los liposomas no se entiende completamente aún, aunque se han ofrecido algunas hipótesis. Se ha propuesto que los liposomas y los protoplastos se fusionan permitiendo la

Digitized by Google

entrada del ácido nucleico en la célula huésped; esta hipótesis se sustenta en el hecho de que la inoculación se lleva a cabo en presencia de agentes que promueven la fusión (Fukunaga et al., 1983). Como alternativa, los mismos autores proponen la hipótesis de que los liposomas penetran en la célula por un proceso de pinocitosis.

Cultivo de Protoplastos Infectados

Debido a que los protoplastos del mesófilo fijan CO_2 mediante la fotosíntesis, para la producción de virus no se requiere un medio con una fuente de energía (Nishimura y Akazawa, 1975). El medio que más se utiliza para el cultivo de protoplastos infectados contiene manitol como estabilizador osmótico, varias sales inorgánicas y un regulador del crecimiento, pero no tiene ningún carbohidrato metabolizable (Takebe, 1977). Los reguladores del crecimiento influyen en la reduplicación viral, y su efecto sobre cada sistema debe probarse (Sander y Mertes, 1984).

Otro factor importante para el cultivo de protoplastos infectados es la luz. Los protoplastos del mesófilo sobreviven durante más tiempo en la oscuridad, pero generalmente se cultivan bajo iluminación de 2000 a 3000 lux. En estas condiciones, la producción de virus es mucho mayor (Takebe et al., 1968); en algunos casos, la luz es incluso esencial para la reduplicación viral (Alblas y Bol, 1977).

Detección de la Reduplicación Viral en los Protoplastos Inoculados

El bioensayo es la única forma de detectar la producción de partículas infectivas (Mühlbach, 1983). Para el efecto se toman alícuotas de la suspensión de protoplastos a distintos períodos después de la inoculación, y se homogeneizan en un tampón adecuado para extraer el virus. La infectividad de las muestras se prueba inoculando plantas indicadoras; las lesiones locales que se observen en estas plantas permiten una determinación cuantitativa de la infectividad.

Para la detección de la reduplicación viral en los protoplastos inoculados se pueden usar diferentes métodos, especialmente de tipo serológico y molecular.[2]

2. En los Capítulos 30 y 38 se presentan en detalle las técnicas más importantes para la detección de virus en las plantas.

Digitized by Google

Prueba con un gradiente de sacarosa. Motoyoshi y Oshima (1975) desarrollaron este método que consiste en homogeneizar y clarificar la muestra de protoplastos y montar luego las alícuotas sobre un gradiente de sacarosa de 10% a 40%. La cantidad de virus obtenida se determina fotométricamente por comparación con muestras de virus de concentración conocida.

Mecanismos de Reduplicación Viral en los Protoplastos

Una vez superadas las dificultades técnicas de su producción, los protoplastos permiten llevar a cabo estudios sobre los mecanismos de la reduplicación de virus bajo condiciones controladas.

Los primeros trabajos de esta índole se hicieron con el virus del mosaico del tabaco (TMV), utilizando protoplastos de mesófilo de esa planta; inicialmente se observó la curva de incremento viral, y se identificaron proteínas y ARN virales producidos en los protoplastos (Aoki y Takebe, 1969; Cocking y Pojnar, 1969; Otsuki y Takebe, 1969). A los trabajos mencionados han seguido muchos de la misma índole, con virus de distintos grupos, como el virus cascabel del tabaco (TRV), el virus del moteado clorótico del caupí (CCMV), el virus del mosaico del caupí (CPMV), y el virus del mosaico del pepino (CMV). Todos estos trabajos fueron revisados por Takebe, 1977, y Mühlbach, 1983.

Un ejemplo del trabajo llevado a cabo para elucidar los eventos moleculares que ocurren durante la reduplicación viral en protoplastos es el realizado con el CPMV. El CPMV tiene un genoma compuesto de dos moléculas de ARN de cadena simple, que se encapsulan por separado en dos partículas icosahédricas.

Goldbach et al. (1980) estudiaron la reduplicación de cada uno de esos ARN por separado, en los protoplastos de caupí. Encontraron que el componente inferior, ARN-B, puede reduplicarse independientemente del componente intermedio, ARN-M, y que los protoplastos inoculados con éste producen más ARN-B, aunque no se forman partículas virales. El ARN-M, por su parte, no se replicó independientemente y sólo se produjo al inocular los protoplastos con ambos componentes. Los protoplastos infectados por separado con las partículas B y M permitieron analizar las proteínas producidas en cada uno de estos casos. De estos estudios, Goldbach et al. (1982) y Rezelman et al. (1980) indujeron que el ARN-B

Digitized by Google

codifica las funciones tempranas en el ciclo de reduplicación del CPMV, mientras que el ARN-M codifica funciones tardías, principalmente la síntesis de las proteínas de la cápsula.

Otros estudios sobre la reduplicación viral en protoplastos han permitido comparar el comportamiento del virus en células provenientes de plantas resistentes y de plantas susceptibles. Boulton et al. (1981) lograron seguir el curso de la infección del CMV utilizando dos cultivares de pepino, uno susceptible y otro resistente; sus estudios demostraron que no había diferencias en la carga de la superficie de los protoplastos de los dos cultivares, ni en su habilidad para absorber el virus. Estas observaciones, junto con la demostración de que la resistencia se mantiene después de la inoculación con el ARN, llevó a los autores a sugerir que la resistencia opera en un punto del ciclo de la reduplicación posterior a la decapsulación.

Bruening et al. (1979), por otra parte, compararon el comportamiento de los protoplastos de 65 líneas de caupí y encontraron que únicamente una de ellas mantenía su resistencia al ser inoculada con el CPMV.

Hasta el momento, no hay ninguna investigación que haya permitido elucidar por entero esa resistencia. En la siguiente sección se plantean distintos mecanismos que podrían explicar este comportamiento.

Mecanismos de Control de la Infección Viral

Las respuestas de las plantas a las infecciones se han clasificado según la sintomatología que se genera en ellas después de la inoculación, en tres tipos: 1) la respuesta sensible, cuando en toda la planta se observan los síntomas, los cuales dependen del virus y del hospedante; 2) la respuesta hipersensible, que se manifiesta en forma de lesiones locales (cloróticas o necróticas) en las hojas inoculadas; y 3) la respuesta resistente, cuando no aparecen síntomas.

El concepto de resistencia basado en la ausencia de síntomas se ha ampliado gracias a los resultados de muchas investigaciones realizadas en años recientes (Matthews, 1981). Así, se han encontrado muchos casos de plantas inoculadas que, a pesar de no presentar síntomas, pueden presentar un incremento del antígeno viral; en estos casos, el virus se reduplica —generalmente, en una cantidad restringida de células de manera similar a como ocurre en la reacción hipersensible— pero sin que se produzca una lesión visible ni se disemine la infección (Sulzinski y Zaitlin, 1982).

Digitized by Google

Aunque no se conocen claramente los mecanismos que generan la resistencia ni la hipersensibilidad, estas respuestas se pueden atribuir a varios fenómenos que se presentan a distintos niveles.

En primer lugar, debe tenerse en cuenta que la mayoría de los virus de plantas se trasmiten por medio de un insecto vector (Matthews, 1981), el cual mantiene una relación estrecha con su hospedante; este hecho representa una barrera para que los virus puedan infectar otras especies no visitadas por el insecto. Por otra parte, a nivel de la epidermis existen barreras físicas, como pelos, tricomas, o la misma epidermis cuando es muy gruesa; estas barreras no permiten la trasmisión del virus por el insecto.

Los fenómenos señalados se han estudiado generalmente en plantas completas. Sin embargo, en muchos casos las causas de la resistencia o de la hipersensibilidad se encuentran a nivel de la pared celular, de la intercomunicación celular, o del protoplasto. Más adelante se analizarán algunos mecanismos ya estudiados y otros se pueden estudiar mediante la utilización de protoplastos.

Resistencia al nivel de la pared celular

Sander y Mertes (1984) señalaron que la resistencia se puede deber a impedimentos mecánicos que presenta la planta. La pared celular, al igual que otras estructuras de la planta, constituye una barrera para los agentes patógenos, incluyendo los virus. Recientemente, Albersheim y Darvill (1985) propusieron un modelo en el cual los componentes de la matriz de la pared celular tienen un papel activo en el control de ciertas funciones como el crecimiento, el desarrollo, la reproducción y la defensa contra las enfermedades.

Estos autores llevaron a cabo un estudio con las paredes celulares primarias, las cuales están constituidas en un 90% por polisacáridos y en un 10% por proteínas. Empleando varias enzimas, lograron aislar y analizar polisacáridos específicos de la matriz y encontraron que la complejidad de sus moléculas era mucho mayor de lo esperado. Se preguntaron, obviamente: ¿A qué se debe la complejidad de los polisacáridos, siendo su función aparente mantener la estructura rígida de la planta?

Utilizando un hongo que ataca a la soya, Albersheim y Darvill (1985) encontraron un oligosacárido liberado de la pared de aquél, el cual estimula la producción de las enzimas que catalizan la síntesis de antibióticos en las plantas. Al purificar el polisacárido encontraron que se requerían

Digitized by Google

10^{-9} g de su forma activa (llamada oligosacarina) para activar la producción de las enzimas que catalizan la síntesis de antibióticos.

Más adelante, los mismos investigadores encontraron, trabajando con bacterias, que una enzima de éstas promueve la liberación de una oligosacarina de la pared celular de la planta, y esta sustancia estimula la producción de antibióticos en las células vecinas. A la vez observaron que, cuando ciertas células de la planta se lesionan, liberan oligosacarinas que estimulan la producción de antibióticos.

Otro hallazgo importante de estos investigadores fue que el 'suicidio celular', que ocurre en algunas plantas como resultado de la lesión hipersensible, está regulado por una oligosacarina liberada de la pared cuando la planta es invadida por un patógeno.

Al encontrar que la pared tiene una función activa en los mecanismos de resistencia, se abre una nueva perspectiva que permite explicar algunos resultados obtenidos al infectar protoplastos. Bruening et al. (1979) encontraron que los protoplastos de un gran número de variedades de caupí resistentes al CPMV permitían la reduplicación del virus; una posible explicación de este hecho es que la resistencia se encuentra a nivel de la pared celular.

Resistencia por inhibición del movimiento intercelular del virus

Al inocular una planta con virus, ya sea mecánicamente o por medio de un insecto vector, sólo se infectan algunas células, y en ellas se reduplica el virus. Para que el virus reduplicado pueda invadir otras células, debe pasar generalmente de una célula a otra.

La inhibición del movimiento intercelular es un mecanismo de resistencia demostrado por Sulzinski y Zaitlin (1982), quienes investigaron la diferencia de susceptibilidad al TMV en plantas completas y en protoplastos de caupí. En las plantas inoculadas no se presentaron síntomas de TMV, y la cantidad de virus recuperado del tejido infectado fue mínima; por otra parte, el virus se reduplicó bien en los protoplastos con TMV. Posteriormente, estos investigadores inocularon plantas de caupí con TMV, aislaron protoplastos de las hojas infectadas, y tiñeron las células con anticuerpos fluorescentes; encontraron que por cada grupo de 50,000 a 150,000 protoplastos, uno estaba infectado, y que ese número no aumentó aun después de 11 días de haber inoculado las plantas. Los autores explicaron estos resultados así: las plantas de caupí no permiten el movimiento

Digitized by Google

intercelular, pero al nivel de cada célula, la reduplicación viral no se modifica.

Otras investigaciones hechas con plantas que dan una respuesta hipersensible a los virus, han permitido establecer que un rasgo general de este tipo de respuesta es la inducción, en las hojas, de grandes cantidades de proteínas solubles; estas proteínas se encuentran en cantidades mínimas o no se encuentran en las hojas de las plantas sanas. En investigaciones paralelas llevadas a cabo por Gianinazzi et al. (1970) y por van Loon y van Kammen (1970), se observó que en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*), que respondían hipersensiblemente a la inoculación con el TMV, ocurrían cambios específicos en el patrón de las proteínas solubles de las hojas. Ellos encontraron que al inicio de la reacción hipersensible se formaban varias proteínas que estaban ausentes en las plantas sanas. Gianinazzi et al. (1970) las denominaron 'proteínas b'.

Las propiedades de las proteínas b, así como las de proteínas similares encontradas en otras especies de plantas que dan respuesta hipersensible, han sido descritas y analizadas por Redolfi (1983) y van Loon y van Kammen (1970). La mayor parte son de bajo peso molecular (10,000 a 20,000 dalton), se extraen a pH ácido, y son altamente resistentes a la proteólisis. A pesar de la gran cantidad de proteínas b que ya han sido caracterizadas, se desconoce el papel que ellas juegan en la reacción hipersensible; al parecer, existe una relación entre la presencia de las proteínas b y el tamaño y número de las lesiones locales. En las plantas en que se ha estimulado la producción de estas proteínas antes de infectarlas con virus, se da un número menor de lesiones o bien se reduce su tamaño (Redolfi y Cantisani, 1984).

Por otra parte, Parent et al. (1985) encontraron que las proteínas b se hallaban en el fluído intercelular de las hojas infectadas y no dentro de las células. Estos investigadores propusieron que la función de estas proteínas se encuentra probablemente al nivel de las interacciones entre células o del metabolismo de la pared celular. En el primer caso, podría especularse que las proteínas b impiden la traslocación del virus de una célula a otra por alteraciones en los plasmodesmos o bien por otro tipo de bloqueos en el trasporte. En cuanto a la segunda posibilidad, las proteínas b podrían estar ligadas a la liberación de las oligosacarinas que desencadenan los mecanismos anteriormente analizados. Ambas posibilidades son, sin embargo, meramente especulativas.

Digitized by Google

Resistencia al nivel de los receptores de la membrana celular

No se ha encontrado en las plantas, cuando se investigan los hospedantes de los virus, una interacción específica entre un virus y la membrana celular. Smith et al. (1983) investigaron las interacciones del CPMV con los protoplastos de caupí. Para ello utilizaron líneas resistentes, hipersensibles y susceptibles al CPMV, inoculándolas con virus purificado marcado con ^{125}I. La evidencia que encontraron sugiere que la interacción inicial del CPMV con los protoplastos de caupí es inespecífica, ya que la cantidad de virus adherida a los protoplastos fue la misma para todas las líneas. Al agregar policationes al medio de inoculación, la cantidad de CPMV adherida a los protoplastos resistentes y susceptibles aumentó en la misma proporción. Maule et al. (1980) obtuvieron resultados similares al inocular protoplastos de pepino con el CMV: la misma cantidad de virus se adhirió a los protoplastos resistentes y a los susceptibles.

Smith et al. (1983) sugirieron que la interacción inespecífica entre los protoplastos y los virus podría ser el resultado de efectos de carga. No puede descartarse un proceso de interacción específica in vivo puesto que, para producir protoplastos, las células se someten a tratamientos enzimáticos y estos tratamientos podrían alterar la estructura del plasmalema. Sin embargo, la información que se posee sobre los sistemas in vitro sugiere la posibilidad de que la resistencia se deba a la falta de receptores específicos en la membrana.

Resistencia por inhibición de la reduplicación viral dentro de la célula

Wilson (1985) ha planteado una hipótesis que abre una nueva perspectiva en relación con la localización y el mecanismo de 'desensamblaje' de los virus ARN positivos. Este autor plantea la posibilidad de que el desensamblaje de la cápsula (cápsida) del núcleo viral ocurra in vivo como consecuencia de los eventos de traducción; para ello argumenta que los ARN de cadena simple son muy sensibles a las ribonucleasas, y que por ello no podrían mantenerse intactos y funcionales dentro de las células, aun en períodos muy cortos. El desensamblaje, completo o parcial, necesario para la liberación del ARN debería ocurrir entonces poco antes de la toma del ARN por los poliribosomas u otros complejos ribonucleoproteicos, o simultáneamente con ella, para asegurar la protección contra el ataque de las nucleasas.

Digitized by Google

La hipótesis de Wilson implicaría que las cápsidas nucleares llegan más o menos intactas al citoplasma de las células infectadas. Probablemente ocurra en aquéllas algún cambio estructural, como el aumento de volumen o la pérdida de algunas subunidades proteicas durante la penetración, debido a que se encuentran con medios hidrofóbicos, receptores proteicos, gradientes de iones de Ca^{++}, o compartimentos subcelulares de bajo pH. En esta fase, el ARN, dentro de la cápsida, estaría protegido del ataque de las ribonucleasas, aunque es de esperarse que haya cierta exposición de sus secuencias líder del extremo 5' que facilitaría los próximos eventos.

La localización topológica y la función biológica de las proteínas ligadas covalentemente al genoma en el extremo 5' podrían tener alguna función en este proceso. Cuando los componentes de la maquinaria de traducción de la célula encuentran expuestas las secuencias de iniciación del ARN viral, empezaría la síntesis proteica temprana. La traslocación ribosomal llevaría entonces a la extracción del ARN de las partículas isométricas y se daría el desensamblaje de la proteína de la cápsida. Lo atractivo de esta hipótesis es que la expresión temprana y compleja del gene viral ocurriría únicamente en el momento en que la maquinaria traduccional fuera accesible en la célula hospedante.

Partiendo de esta idea podría plantearse la posibilidad de que el mecanismo de resistencia resida en que la cápsida del núcleo viral no sufre cambios iniciales que permitan la exposición del extremo 5' del ARN viral, y en que no haya por tanto una traducción temprana ni la consecuente 'salida' del ARN protegido por los poliribosomas. Otra alternativa sería que ocurriera precisamente una proteólisis temprana de la cápsida nuclear que dejara desprotegido el ARN: éste sería entonces degradado rápidamente por las ribonucleasas.

Finalmente, otra posible explicación de la resistencia es que se bloquee la reduplicación, o la traducción, del ARN viral. Sela y Applebaum (1962) encontraron que los sobrenadantes de plantas infectadas inhibían la infección viral, y supusieron la presencia de un factor antiviral (AVF, en inglés) e iniciaron su estudio. Las purificaciones de este factor se hicieron a partir de plantas de tabaco infectadas con TMV; estas plantas eran de una variedad hipersensible que lleva el gen dominante N, responsable de la localización de la infección. La asociación del AVF con el gen N se estableció más adelante (Antignus et al., 1977).

Los resultados, tanto de la caracterización del AVF como del mecanismo de inducción de su síntesis, y los conocimientos actuales sobre su actividad antiviral han relacionado esta proteína con los interferones

Digitized by Google

producidos en células animales. Los interferones son proteínas o glucoproteínas que soportan tratamientos tales como pH muy ácido y la exposición al dodecilsulfato de sodio (SDS), y cuyos pesos moleculares están entre 17,000 y 28,000 dalton.

Sela (1984), en una revisión sobre el tema, señala las diferencias y similitudes que hay entre los interferones y el AVF. El AVF es una glucoproteína (21,000 a 22,000) que, al igual que el interferón, continúa activa después de recibir tratamientos a pH 2.0 o con SDS; tanto los interferones como el AVF son inducidos por infecciones virales o por agentes artificiales, y son activos en cantidades picomolares. El AVF induce la polimerización del ATP para formar un oligonucleótido que tiene actividad antiviral. Este nucleótido se asemeja al 2',5'-oligoadenilato (2',5'-A), que se produce por la inducción del interferón en tejidos animales y que tiene la función de activar el mecanismo que bloquea la síntesis proteica celular.

Una diferencia que se ha encontrado entre los interferones y el AVF es el proceso de su producción. Mientras que el interferón se estimula por la activación del genoma que lleva directamente a su producción, la actividad del AVF, al menos en parte, se induce por la activación de un precursor preexistente en las células.

Reichman et al. (1983) han llevado a cabo estudios en que comparan los efectos que tienen, en las plantas infectadas con virus, tanto el interferón humano de los leucocitos como el AVF. Encontraron que uno y otro inducen en las plantas una polimerización del ATP dependiente de un ARN de doble cadena, y que esta polimerización produce nucleótidos con actividad antiviral.

Aunque no se conoce a cabalidad el mecanismo por medio del cual actúa el AVF, los datos anteriores sugieren que la resistencia resulta de un bloqueo de la síntesis proteica. La ventaja de este modelo es que existe relación entre el gen dominante N, responsable de la reacción hipersensible, y la producción del AVF, y que en las plantas sensibles que llevan el alelo n, este factor no se produce.

Referencias

Albersheim, P. y Darvill, G. 1985. Oligosaccharins. Sci. Am. 253:44-50.

Alblas, F. y Bol, J. F. 1977. Factors influencing the infection of cowpea mesophyll protoplasts by alfalfa mosaic virus. J. Gen. Virol. 36:175-185.

Digitized by Google

Antignus, Y.; Sela, I. y Harpaz, I. 1977. Further studies on the biology of an antiviral factor (AVF) from virus-infected plants and its association with the N-gene of *Nicotiana* species. J. Gen. Virol. 35:107-116.

Aoki, S. y Takebe, I. 1969. Infection of tobacco mesophyll protoplast by tobacco mosaic virus ribonucleic acid. Virology 39:439-448.

Beier, H. y Bruening, G. 1976. Factors influencing the infection of cowpea protoplasts by cowpea mosaic virus RNA. Virology 72:363-369.

Boulton, M. I.; Maule, A. J. y Wood, K. R. 1981. The synthesis of cucumber mosaic virus RNA components in resistant and susceptible cucumber protoplasts: Fifth International Congress of Virology. Estrasburgo, Francia. p. 219.

Bruening, G.; Lee, S. L. y Beier, H. 1979. Immunity to plant virus infection. En: Sharp, W. R.; Larsen, P. O.; Paddock, E. F. y Raghavan, V. (eds). Plant cell and tissue culture. Ohio State University Press, E.U. p. 421-440.

Burguess, J.; Motoyoshi, F. y Fleming, E. N. 1973. The mechanisms of infection of plant protoplasts by viruses. Planta 112:323-332.

Cassells, A. C. y Barlass, M. 1978. The initiation of TMV infection in isolated protoplasts by poliethylene glycol. Virology 87:459-462.

Chiu Ben-Sin y Tien Po. 1982. Peroxidase linked antibody used to detect barley stripe mosaic virus (BSMV) in barley protoplasts. J. Gen. Virol. 58:323-327.

Clark, M. F. y Adams, A. N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 34:475-483.

Cocking, E. 1960. A method of the isolation of plant protoplasts and vacuoles. Nature (Londres) 187:962-963.

——— y Pojnar, E. 1969. An electron microscope study of the infection of isolated tomato fruit protoplasts by tobacco mosaic virus. J. Gen. Virol. 4:305-312.

Coutts, R. H. A. y Cocking, E. C. 1972. The isolation and culture of cucumber mesophyll protoplasts. J. Gen. Virol. 17:289-294.

Fuentes, A. L. 1986. Infectividad del virus del mosaico rugoso en protoplastos de frijol (*Phaseolus vulgaris*) de variedades susceptibles y resistentes. Tesis. Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

Fukunaga, Y.; Nagata, T.; Takebe, I.; Kakehi, T. y Matsui, C. 1983. An ultrastructural study of the interaction of liposomes with plant protoplasts. Exp. Cell Res. 144:181-190.

Digitized by Google

Gianinazzi, S.; Martin, C. y Vallee, J. C. 1970. Hypersensibilité aux virus, temperature et proteines solubles chez le *Nicotiana xanti*: Apparition de nouvelles macromolecules lors de la repression de la synthèse viral. C. R. Acad. Sci. París 270 D:2383-2386.

Goldbach, R.; Rezelman, G. y van Kammen, A. 1980. Independent replication and expression of B components RNA of cowpea mosaic virus. Nature (Londres) 286:297-300.

———; ———; G. Zabel, P. y van Kammen, A. 1982. Expression of the bottom-component RNA of cowpea mosaic virus: Evidence that the 60 kd Vpg precursor is cleaved into a single Vpg and 58-kilodalton polypeptide. J. Gen. Virol. 42:630-635.

Joshi, S.; Pleij, C. W. A; Haenni, A. L. y Bosch, L. 1983. Age dependence of cowpea protoplasts for uptake of spermidine and infectibility by alfalfa mosaic virus. Plant Mol. Biol. 2:089-094.

Kubo, S.; Robinson, D. J.; Harrison, B. D. y Hutcheson, A. M. 1976. Uptake of tobacco rattle virus by tobacco protoplasts and the effect of phosphate on infection. J. Gen. Virol. 30:287.

Lesney, M. S. y Murakishi, H. H. 1981. Infection of soybean protoplasts from cell suspension cultures with bean mottle virus. J. Gen. Virol. 57:387-395.

Lurquin, P. F. y Hotta, Y. 1975. Reutilization of bacterial DNA by *Arabidopsis thaliana* cells in tissue culture. Plant Sci. Lett. 5:103-112.

Matthews, R. E. F. 1981. Plant virology. 2 ed. Academic Press, E.U. p. 427-447.

Maule, A. J. 1983. Infection of protoplasts from several *Brassica* species with cauliflower mosaic virus following inoculation using polyethylene glycol. J. Gen. Virol. 64:2655-2660.

———; Boulton, M. y Wood, R. 1980. Resistance of cucumber protoplasts to cucumber mosaic virus: A comparative study. J. Gen. Virol. 52:271-279.

Mayo, M. A. 1978. Effects of increased PLO concentration on infection efficiency of protoplasts by four viruses. Intervirology 9:184-188.

Motoyoshi, F. y Oshima, N. 1975. Infection with tobacco mosaic virus of leaf mesophyll protoplasts from susceptible and resistant lines of tomato. J. Gen. Virol. 29:81-91.

Mühlbach, H. P. 1983. The use of protoplasts in plant virus research. EXS 46: Protoplasts lecture proceedings. Birkhauser Verlag, Basilea, Suiza. p. 111-122.

Nagata, T.; Okada, K.; Takebe, I. y Matsui, C. 1981. Mol. Gen. Genet. 184:161-165.

Digitized by Google

Nishimura, M. y Akazawa, T. 1975. Photosynthetic activities of spinach leaf protoplasts. Plant Physiol. 55:712.

Okuno, T. y Furusawa, I. 1978. Modes of infection of barley protoplasts with brome mosaic virus. J. Gen. Virol. 38:409-418.

Otsuki, Y. y Takebe, I. 1969. Fluorescent antibody staining of tobacco mosaic antigen in tobacco mesophyll protoplasts. Virology 38:497-499.

Parent, J. G.; Hogue, R. y Asselin, A. 1985. Glycoproteins, enzymatic activities, and b proteins in intercellular fluid extracts from hypersensitive *Nicotiana* species infected with tobacco mosaic virus. Can. J. Bot. 63:928-931.

Power, J. B. y Cocking, E. C. 1969. A simple method for the isolation of very large numbers of leaf protoplasts by using mixtures of cellulase and pectinase. Proc. Biochem. Soc. Biochem. J. 111:33.

Redolfi, P. 1983. Occurrence of pathogenesis-related (b) and similar proteins in different plant species. Neth. J. Plant Pathol. 89:245-254.

——— y Cantisani, A. 1984. Preliminary characterization of new soluble proteins in *Phaseolus vulgaris* cv. Saxa reacting hypersensitively to viral infection. Physiol. Plant Pathol. 25:9-19.

Reichman, M.; Devash, Y.; Suhadolnik, R. J. y Sela, I. 1983. Human leukocyte interferon and the antiviral factor (AVF) from virus-infected plants stimulate plant tissues to produce nucleotides with antiviral activity. Virology 128:240-244.

Rezelman, G.; Goldbach, R. y van Kammen, A. 1980. Expression of bottom component RNA of cowpea mosaic virus in cowpea protoplasts. J. Virol. 36:366-373.

Sander, E. y Mertes, G. 1984. Use of protoplasts and separate cells in plant virus research. Adv. Virus Res. 29:215-262.

Sarkar, S.; Upadhya, M. D. y Melchers, G. 1974. A highly efficient method of inoculation of tobacco mesophyll protoplasts with ribonucleic acid of tobacco mosaic virus. Mol. Gen. Genet. 135:1.

Sela, I. 1984. Interferon and interferon-like factors in plants. En: Becker, Y. (ed.). Antiviral drugs and interferon: The molecular basis of their activity. M. Nijhoff Publ., Boston. p. 335-356.

——— y Applebaum, S. W. 1962. Antiviral factor (AVF) in supernatants of tobacco leaves infected with TMV. Virology 17:543-548.

———; Reichman, M. y Weissbach, A. 1984. Comparison of dot molecular hybridization and enzyme-linked immunosorbent assay for detecting tobacco mosaic virus in plant tissues and protoplasts. Am. Phytopathol. Soc. 74:385-389.

Digitized by Google

Smith, A. G.; Durand, D. P. y Hill, J. H. 1983. Interactions of cowpea mosaic virus with cowpea protoplasts. Phytopatholog. Zeitsch. 107:182-191.

Sulzinski, M. A. y Zaitlin, M. 1982. Tobacco mosaic virus replication in resistant and susceptible plants: In some resistant species virus is confined to a small number of initially infected cells. Virology 121:12-19.

Takebe, I. 1977. Protoplasts in the study of plant virus replication. En: Fraenkel-Conrat, H. y Wagner, R. R. (eds.). Comprehensive virology. Plenum Publishing Corporation. v. 2, p. 237-283.

———. 1983. Protoplasts in plant virus research. International Review of Cytology. Suppl. 16. Academic Press. p. 89-111.

——— y Otsuki, J. 1969. Infection of tobacco mesophyll protoplasts by tobacco mosaic virus. Proc. Natl. Acad. Sci. (E.U.) 64:843-848.

———; ——— y Aoki, S. 1968. Isolation of tobacco meshophyll cells in intact and active state. Plant Cell Physiol. 9:115-124.

van Loon, L. C. y van Kammen, A. 1970. Polyacrilamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. 'Samsun' and 'Samsun NN'; 2: Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. Virology 40:199-211.

Wilson, T. M. 1985. Nucleocapsid disassembly and gene expression by positive-strand RNA viruses. J. Gen Virol. 66:1201-1207.

Digitized by Google

Capítulo 36

Técnicas moleculares para evaluar y mejorar el germoplasma vegetal

H. Ramírez*
A. Calderón*
W. M. Roca*

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

Digitized by Google

Introducción

El mejoramiento de plantas ha contribuido sin duda a la producción de nuevas variedades, que rinden más y mejor, de los cultivos tradicionales. Adelantos sin precedentes se han obtenido en la tolerancia a la sequía y a los suelos ácidos, en la habilidad simbiótica para la fijación del nitrógeno, en la arquitectura de la planta, y en otras características. Sin embargo, hay limitaciones en la velocidad y precisión con que muchas de las características útiles pueden ser identificadas, seleccionadas y utilizadas en los programas de mejoramiento. Por otro lado, en las colecciones mundiales de germoplasma hay bajas frecuencias de variabilidad genética para la mayoría de las características agronómicas de interés. Por tanto, el mejoramiento genético se beneficiaría mucho de la existencia de información disponible sobre la herencia de características importantes, sobre su localización precisa en los cromosomas, y sobre su distribución dentro de los bancos de germoplasma.

Los rápidos avances de los últimos años en biología molecular proveen las herramientas necesarias para el estudio del mejoramiento genético de las plantas. Algunas de estas técnicas son útiles en la caracterización de germoplasma y en la identificación —y ubicación física en los cromosomas— de características importantes. Estas nuevas técnicas hacen un análisis a nivel genómico, y pueden tomar diferentes rutas: una indirecta, haciendo un análisis de proteínas o de enzimas, y otra directa, analizando el ADN por medio del polimorfismo longitudinal de los fragmentos de restricción (RFLPs). Con estos análisis se identifican marcadores moleculares asociados con características morfológicas, los cuales servirían para: a) determinar la variabilidad genética en los bancos de germoplasma; b) desarrollar mapas de ligamiento genético; y c) identificar genes específicos con el fin de rastrear su flujo en los programas de mejoramiento.

Los marcadores moleculares tienen dos características muy útiles en el mejoramiento genético: primera, ocurren naturalmente y por tanto no necesitan ser inducidos, y segunda, su expresión (como en las proteínas e izoenzimas) o su presencia (en los RFLPs) no está influenciada por efectos epistáticos.

En este capítulo se señalan algunos aspectos importantes del uso de los marcadores moleculares en la caracterización del germoplasma y en los programas de mejoramiento.

Digitized by Google

Conceptos Fundamentales

Poteínas, enzimas e isoenzimas

Las proteínas son biomoléculas constituidas por aminoácidos y organizadas en unidades estructurales. Dentro de un organismo, las proteínas pueden encontrarse formando parte de estructuras (la actina, p.ej., en los microfilamentos que conforman el huso acromático), pueden ser reservorios nutritivos (la faseolina), o pueden realizar una función catalítica (las enzimas). Las enzimas, por tanto, son proteínas que ejercen una función catalítica específica, es decir, aceleran las reacciones bioquímicas que ocurren dentro de la célula. Las enzimas pueden ser desde monómeros (una sola cadena polipeptídica) hasta complejos multiméricos (más de una cadena polipeptídica asociada por medio de enlaces no covalentes) que desarrollan reacciones catalíticas muy complejas, como la replicación del ADN.

Las diferentes formas moleculares de una misma enzima que tienen afinidad por el mismo sustrato se denominan isoenzimas (Market y Moller, 1959). Varias son las causas de la variabilidad en las enzimas: a) causas primarias o genéticas, cuando el organismo porta varios genes que codifican, cada uno, un tipo diferente de subunidad; y b) causas secundarias o postraduccionales, cuando las subunidades homogéneas son modificadas diferencialmente obteniéndose así 'diferentes' subunidades, todas provenientes de un mismo gen. Por otro lado, existen dos tipos de diversidad genética en las enzimas: los alelos múltiples en un solo locus genético, y varios loci genéticos. En el Cuadro 36.1 se muestra un diagrama de la genealogía de la multiplicidad enzimática.

Electroforesis de las proteínas

Algunos de los aminoácidos que constituyen las proteínas pueden estar ionizados, es decir, tendrían carga positiva o negativa. Por tanto, la proteína que ellos constituyan puede ser catiónica (positivamente cargada) o aniónica (negativamente cargada), según el signo de la suma de las diferentes cargas parciales de los aminoácidos presentes en ella. Si una de estas proteínas cargadas se coloca en un campo eléctrico, se moverá hacia el electrodo de carga opuesta a la suya. Hay tres factores fundamentales que afectan la movilidad de una proteína bajo condiciones de electroforesis:

1. La carga de la proteína, que determina en ésta la dirección de la migración y que influye directamente en su velocidad de movilidad.

Digitized by Google

Las proteínas son electrolitos débiles y su ionización está muy afectada por el pH del medio que las rodea. La carga de una proteína en solución se puede controlar usando diferentes sistemas 'bófer'.

2. La fuerza del campo eléctrico, que afecta directamente la movilidad.

3. Las fuerzas de fricción, las cuales se oponen a la migración.

Cuadro 36.1. Genealogía de la multiplicidad enzimática.

Causas	Condición genética			
			Gen 1	Gen 2
A. Genéticas	Muchos loci genéticos	ADN		
		mARN	Trascripción 1	2
		Subunidades de la enzima activa	Traducción 1	2
		DNA paterno		Alelo 1
		DNA materno		Alelo 2
	Alelos múltiples		A_1	A_2
B. Postraduccionales		Modificaciones covalentes A ——— A'		

FUENTE: Rider y Taylor, 1980.

La matriz o soporte en el que se realiza la electroforesis es generalmente un gel de poliacrilamida. El soporte tridimensional de los geles de poliacrilamida consta de polímeros de acrilamida entrecruzados a manera de red por un segundo agente, generalmente el denominado 'bis' (N,N'-metilenbisacrilamida). El tamaño de los poros está determinado por el porcentaje de gel, y éste a su vez depende de la cantidad de acrilamida y de la proporción entre acrilamida y bis. Así, por ejemplo, los poros en un gel de 20% serán más pequeños que en un gel de 15%.

La electroforesis en geles de poliacrilamida y empleando SDS (dodecil sulfato de sodio) es la más usada cuando se analizan proteínas, puesto que da información sobre la cantidad y el tipo de las proteínas de una mezcla, su abundancia relativa, y la medida de su peso molecular. El SDS es un

Digitized by Google

detergente aniónico que reacciona con las proteínas antes de la electroforesis; después de esa reacción, la proteína adopta una carga negativa uniforme y una estructura alargada. El complejo SDS-proteína es soluble, y bajo condiciones de electroforesis viajará a través del gel de poliacrilamida hacia el ánodo.

Hay dos sistemas de coloración ampliamente utilizados para visualizar las proteínas en los geles de poliacrilamida: la tinción con el azul de Coomasie y el método de unión de iones de plata con las proteínas. Sin embargo, cuando se trata de enzimas o isoenzimas, la coloración se obtiene gracias a la actividad específica de la enzima.

Electroforesis del ADN

A pH neutro o alcalino, los grupos fosfato de la molécula de ADN confieren a ésta carga uniforme negativa por unidad de longitud. Por lo tanto, en un campo eléctrico el ADN viajará hacia el ánodo atraído por una fuerza constante que es independiente de la composición de bases del ácido, de modo que las moléculas grandes se moverán más lentamente que las moléculas pequeñas.

Los geles de poliacrilamida utilizados en la electroforesis de enzimas o de proteínas forman poros muy pequeños que no permiten el paso de grandes moléculas de ADN. Por tanto, en la electroforesis del ADN se emplean con más frecuencia geles de agarosa. Estos geles mantienen su fuerza física estructural con poros de tamaño mucho más grande que los de los geles de poliacrilamida, y por este motivo se utilizan para fraccionar moléculas de ADN que tengan más de 200 pares de bases.

La Biología Molecular en la Evaluación y Caracterización de Germoplasma

Análisis de proteínas y polipéptidos

Mediante la técnica de la electroforesis, las proteínas presentes en los extractos crudos de los tejidos vegetales pueden ser separadas y visualizadas para que sirvan a los bancos de germoplasma en la caracterización de éste. A continuación se describen ejemplos prácticos de la utilización de esta técnica en cultivos como el frijol, la yuca y algunos pastos tropicales.

Digitized by Google

La variabilidad en los patrones electroforéticos de la proteína de la semilla de frijol, la faseolina, ha sido una herramienta muy útil para los estudios de domesticación y distribución del germoplasma de frijol común (Gepts y Bliss, 1985).

El extracto crudo de proteína de la semilla de frijol está constituido principalmente por albúminas y globulinas, que representan el 40% y el 60%, respectivamente, de la proteína total. Hasta el momento[1] se han descrito 22 patrones electroforéticos de faseolina, algunos de los cuales están estrechamente relacionados con las zonas geográficas de origen del frijol (Gepts et al., 1986). De los tipos de faseolina descritos vale mencionar el tipo S (Sanilac) proveniente de la región mesoamericana, el tipo T (Tendergreen) proveniente de los Andes del sur, y el tipo C (Contender) proveniente de una zona intermedia entre meso-América y los Andes del sur.

El estudio electroforético de la faseolina en una colección de frijol del Este de Africa demostró que en la mayor parte de esos materiales predominaba el tipo T; este resultado indica que dichos materiales fueron introducidos originalmente de los Andes del sur (Triana, 1988).

Empleando electroforesis en geles de dos dimensiones se pueden analizar simultáneamente muchas cadenas polipeptídicas. Esta técnica se basa en la separación inicial de los polipéptidos en una dimensión, según el punto isoeléctrico, y en su separación posterior en una segunda dimensión, mediante la electroforesis normal.

Los niveles de expresión de los polipéptidos están influidos por el ambiente y, en consecuencia, su análisis permite asociar cadenas polipeptídicas específicas con la expresión genética de algunas características.

La arcelina es un buen ejemplo de un marcador proteico ligado a una característica de interés que, en este caso, es la resistencia al ataque de los brúquidos. Estos marcadores ligados a características de interés pueden ser proteicos, isoenzimáticos o fragmentos de DNA.

En plantas de *Phaseolus vulgaris* silvestres se han encontrado altos niveles de resistencia a dos gorgojos (*Zabrotes subfasciatus* y *Acanthoscelides obtectus*) que causan grandes pérdidas al grano de frijol almacenado (CIAT, 1988b). En estos materiales resistentes se identificó y se aisló una proteína denominada arcelina que es responsable de la resistencia a *Z. subfasciatus* (Osborn et al., 1988; CIAT, 1988a).

1. Debouck, D. Comunicación personal.

Digitized by Google

Hasta el momento se han identificado cuatro patrones electroforéticos de arcelina, y han sido denominados con este nombre y con los números 1, 2, 3 o 4. Los estudios electroforéticos de la arcelina hechos por los entomólogos de frijol del CIAT permiten discriminar rápidamente variedades resistentes y susceptibles de *P. vulgaris* silvestres.

Análisis de isoenzimas

Muchas de las proteínas obtenidas de los extractos crudos de semillas o de tejidos son enzimas que catalizan reacciones bioquímicas específicas. Una vez separadas estas enzimas por medio de la electroforesis, se puede localizar una enzima específica colocando el gel en una bandeja que contenga el sustrato, junto con cofactores y colorantes adecuados. Los productos de esa reacción enzimática reaccionan a su vez con la solución de tinción formando complejos coloreados; éstos dan lugar a una banda visible en el sitio donde se hallan dentro del gel. El conjunto de bandas generadas en la tinción se denomina zimograma.

Se dice que una proteína, una izoenzima o un fragmento de restricción de ADN es un 'marcador de clasificación' cuando presenta variaciones electroforéticas (polimorfismo) en los materiales de la especie analizada. Para seleccionar las isoenzimas que podrían usarse como marcadores de clasificación, se hará primero un 'rastreo' de todas las isoenzimas que se puedan teñir en todos los tejidos posibles; luego se seleccionan los marcadores que muestren mayor polimorfismo y el tejido donde mejor se presenten. Cuando se utiliza un marcador isoenzimático para caracterizar materiales dentro de una colección, no es necesario el conocimiento genético de la misma; cuando se trata, en cambio, de estudios de ligamiento de marcadores isoenzimáticos o de ADN con ciertas características de interés agronómico, se requiere conocer muy bien la genética de los marcadores.

Un ejemplo de la aplicación de los marcadores isoenzimáticos al germoplasma de frijol es la caracterización de líneas nativas y mejoradas de *P. vulgaris* provenientes de América del Norte, América Central y América del Sur, Africa y el Medio Oriente. Mediante la variabilidad que presentan en los patrones electroforéticos de las isoenzimas fosfatasa ácida (AcP), diaforasa (NADH-Dia), esterasa (EST), Rubisco, y shikímico-deshidrogenasa (SkDh), se analizó la base genética para la formación de subgrupos o de acervos genéticos (Vargas, 1988).

El estudio electroforético de ocho marcadores isoenzimáticos permitió definir dos grandes grupos de variabilidad genética que correspondían a

Digitized by Google

los dos principales centros de domesticación del frijol: las regiones mesoamericana y de los Andes; cada grupo fue subdividido en cinco grupos con características morfológicas y bioquímicas diferentes. En ese estudio se sugiere la búsqueda de nuevos marcadores evolutivos, como la faseolina, para definir la procedencia real de los materiales ubicados en algunos subgrupos (Vargas, 1988).

Estudios isoenzimáticos con materiales de frijol de Cajamarca, Perú, mostraron que en esos materiales hay gran variabilidad y que ésta puede aprovecharse en programas de mejoramiento para la ampliación de la base genética del frijol (Vargas, 1988).

Otro ejemplo de la aplicación de la electroforesis a las isoenzimas es el estudio del hongo *Thanatephorus cucumeris* Frank (Donk) (amorfo: *Rhizoctonia solani* Kuhn), agente causal de la mustia hilachosa del frijol, una enfermedad ampliamente distribuida, p. ej., en la zona cafetera de Colombia. En este estudio se utiliza la electroforesis de proteínas e isoenzimas como el método más eficiente para caracterizar los marcadores bioquímicos y correlacionarlos con las características patogénicas de los aislamientos de este hongo.[2]

Base genética de las isoenzimas

La combinación de tripletas de nucleótidos conforma el código genético, en el que cada aminoácido está codificado por una, al menos, de esas tripletas, a saber: dGTP, dCTP, dATP, y dTTP.

Mediante los procesos de trascripción y de traducción, fragmentos específicos de DNA (genes) se traducen en cadenas lineales de secuencias definidas de aminoácidos, llamadas polipéptidos. La mayor parte de estos polipéptidos formarán enzimas, las cuales catalizan las reacciones bioquímicas específicas en las diferentes vías metabólicas de los organismos. Algunas de esas enzimas están formadas por una sola copia de la cadena polipeptídica o producto génico, mientras que otras contienen más de una copia del producto génico que conforma la estructura cuaternaria de la enzima activa formando, p. ej., dímeros, trímeros, tetrámeros, etc.

En las enzimas multiméricas, los polipéptidos codificados en un locus simple (formado por dos alelos) se combinan al azar para formar la enzima activa. En un individuo que sea heterocigoto para un determinado locus,

2. Claros, J. L. Comunicación personal.

Digitized by Google

los segmentos de ADN que conforman los alelos (A y a) se diferencian en uno o más nucleótidos, y codifican para polipéptidos que diferirán en uno o más aminoácidos; ahora bien, no sólo difieren los polipéptidos en el tipo de aminoácido sino también en la conformación espacial y en la carga neta, lo que influirá en su movilidad dentro del gel cuando sean separados por medio de electroforesis.

Cuando el producto de los alelos de un individuo heterocigótico que codifica para una enzima monomérica es separado por electroforesis, aparecen dos bandas simples denominadas banda rápida (fast band), o sea, la que se aleja más del origen catódico, y banda lenta (slow band), la que migra poco y se halla más cerca de ese origen.

Los productos génicos de los alelos (A y a) de un individuo heterocigótico que codifican para una enzima dimérica se combinan al azar, y producen tres formas moleculares de la enzima que están representadas por los genotipos AA, Aa, y aa. Estas tres formas moleculares se hallarán en la proporción 1:2:1, donde la forma híbrida o heteromérica Aa tendrá el doble de copias que las formas AA y aa. Por tanto, al ser separadas las tres por electroforesis, se observará un patrón de tres bandas: la banda más liviana (aa) estará más alejada del origen, la banda más pesada (AA) estará más cerca del origen, y la banda híbrida (Aa) quedará en un punto intermedio y presentará el doble de intensidad de tinción que las bandas AA y aa.

La Figura 36.1 muestra los posibles patrones de bandas para enzimas monoméricas, diméricas, triméricas y tetraméricas codificadas por un locus simple de un individuo heterocigótico. En esta figura se observa que para un enzima trimérica se producen cuatro formas moleculares (AAA, AAa, Aaa y aaa) en una proporción 1:3:3:1, y que para una enzima tetramérica se producen cinco formas moleculares (AAAA, AAAa, AAaa, Aaaa, y aaaa) en una proporción 1:4:6:4:1.

Debido a que estas combinaciones ocurren al azar, ellas y sus proporciones se pueden representar por el teorema del binomio $(A + a)^n$ en donde A y a representan los productos alélicos y n el número de subunidades que conforman la enzima activa.

En ciertos casos, el producto de uno o ambos alelos de un locus determinado produce polipéptidos sin actividad catalítica, cuyo fenotipo se caracteriza por la ausencia de bandas en el gel después de su tinción. Este tipo de alelos se denomina 'alelos nulos'. La Figura 36.2 muestra los posibles patrones de bandas de una enzima dimérica procedente tanto de dos padres homocigotos —uno de ellos con alelos nulos que producen polipéptidos sin actividad enzimática—como también del híbrido producto de su cruce.

Digitized by Google

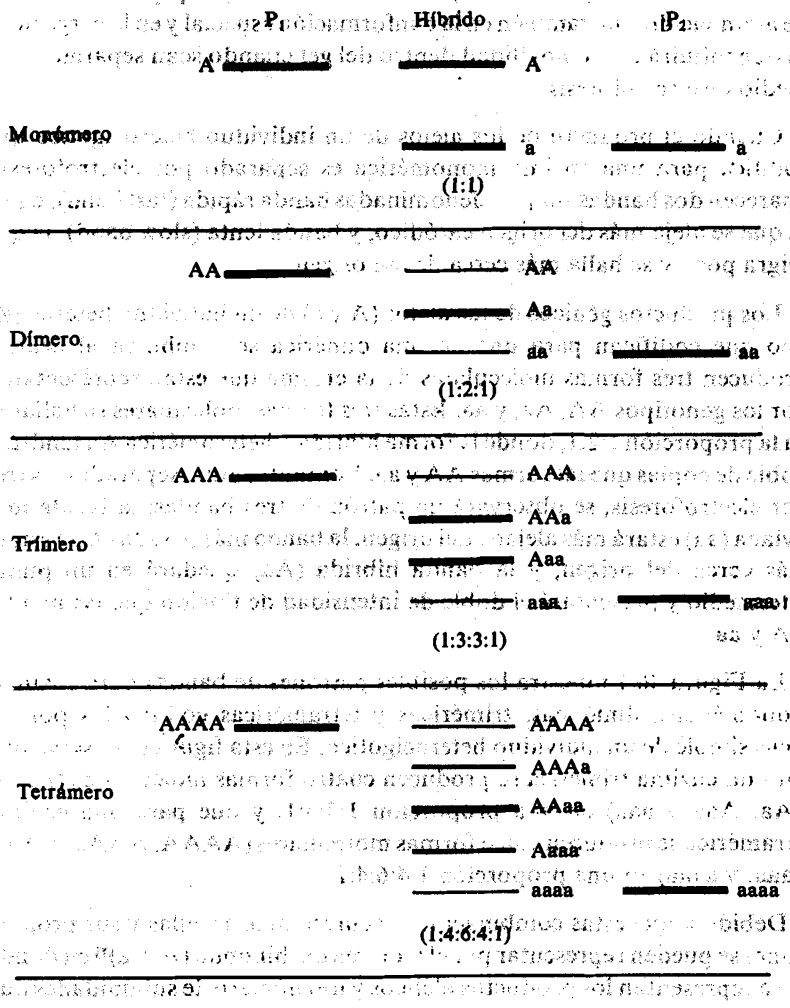


Figura 36.1. Patrón de bandas de un locus con dos alelos (A y a) que codifican para enzimas monoméricas, diméricas, triméricas y tetraméricas. Las proporciones entre paréntesis indican la relación de intensidad de las bandas.

Digitized by Google

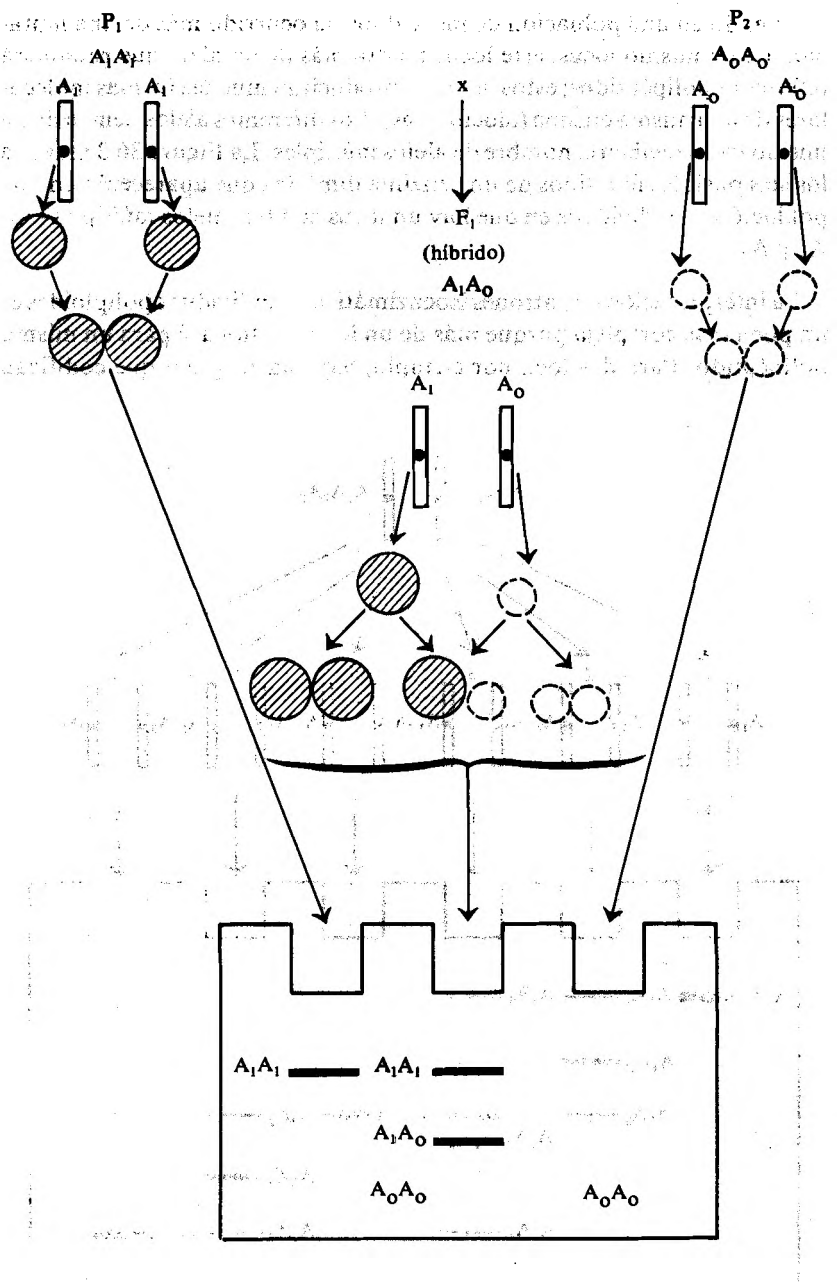


Figura 36.2. Patrón de bandas de un locus con dos alelos que codifican para una enzima dimérica, de dos padres (uno de ellos con alelos nulos), y de un híbrido producto del cruzamiento de éstos.

Digitized by Google

Cuando en una población de individuos ha ocurrido más de una mutación en un mismo locus, este locus tendrá más de un alelo que producirá diferentes polipéptidos; éstos, a su vez producirán muchas formas moleculares de una misma enzima (aloenzimas). Los diferentes alelos dentro de un mismo locus reciben el nombre de alelos múltiples. La Figura 36.3 muestra los seis posibles fenotipos de una enzima dimérica que aparecerán en una población de individuos en que hay un locus con tres alelos múltiples (A_1, A_2 y A_3).

La interpretación de patrones isoenzimático en individuos poliploides es un poco más compleja porque más de un locus codificará para un mismo polipéptido. Para dos loci, por ejemplo, hay cuatro genes que codifican

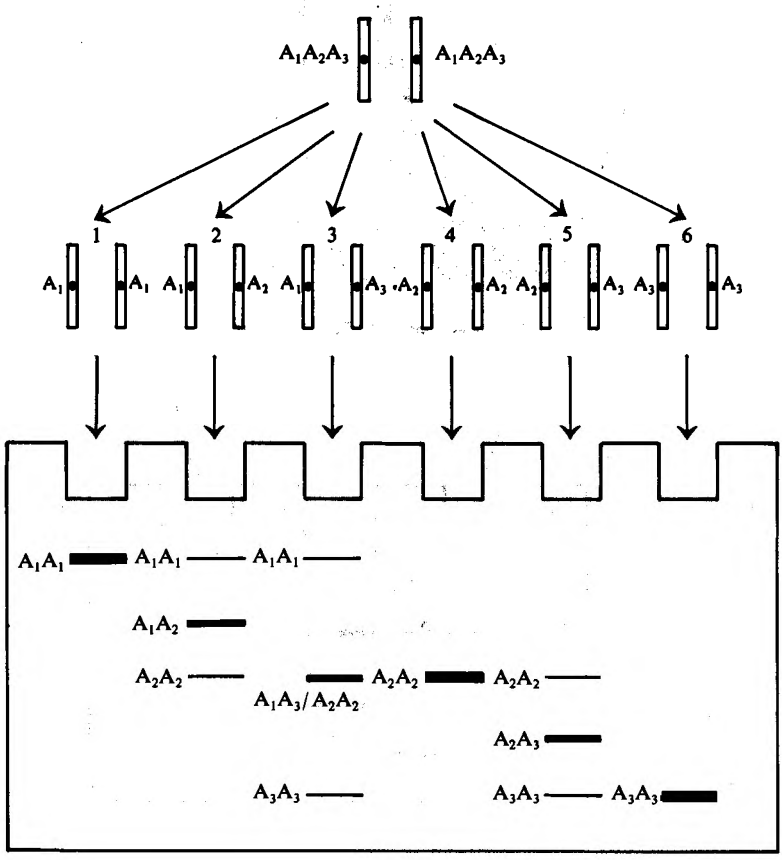


Figura 36.3. Patrón de bandas para una enzima dimérica codificada por tres alelos múltiples en un locus simple.

Digitized by Google

para el mismo polipéptido, y para tres loci, seis genes codifican para el mismo polipéptido. Este hecho puede causar complicaciones en la interpretación de los patrones de bandas después de la electroforesis. Las Figuras 36.4 y 36.5 muestran ejemplos de estos casos; en la primera, posibles patrones de bandas de dos loci comparten los alelos A y a (ambos segregantes) que darán enzimas monomérica, dimérica, trimérica y tetramérica; en la segunda aparecen los posibles patrones de bandas de una enzima dimérica codificada por dos loci: uno de ellos tiene fijo el alelo A, mientras que en el otro ambos alelos segregan.

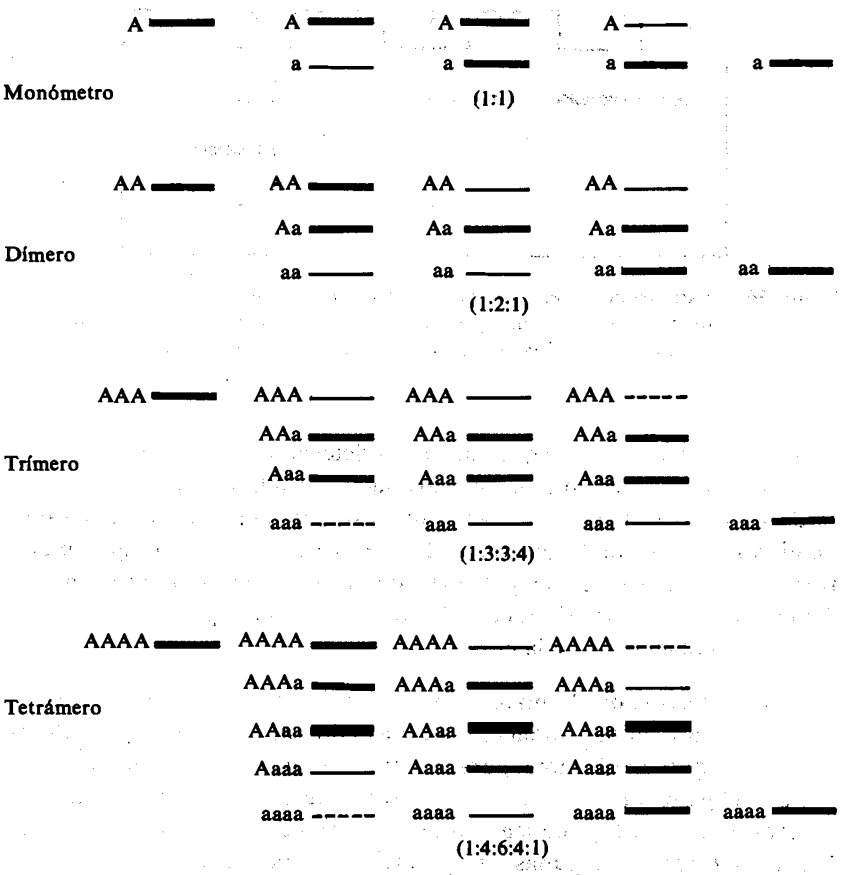


Figura 36.4. Patrones de bandas de dos loci que comparten los alelos A y a; ambos alelos están segregando, y codifican para enzimas monomérica, dimérica, trimérica y tetramérica.

Digitized by Google

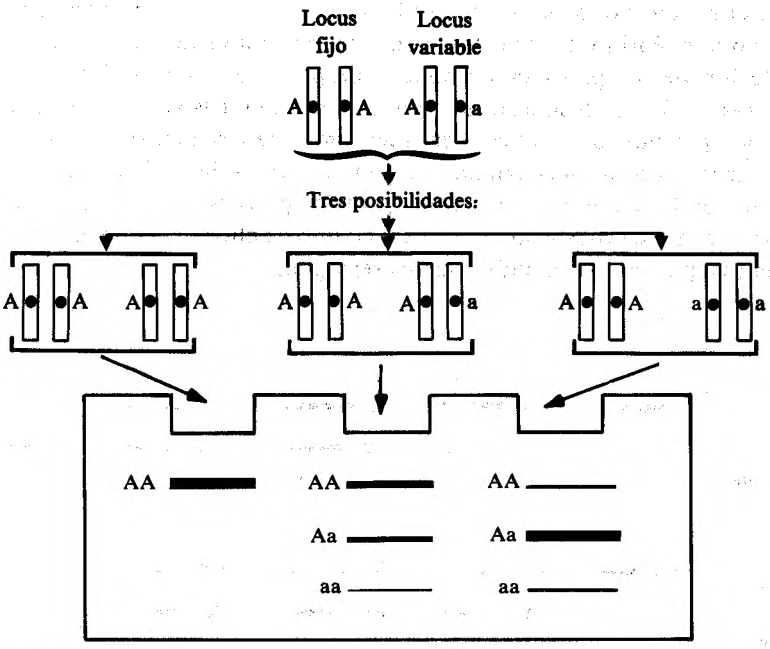


Figura 36.5. Patrones de una enzima dimérica codificada por dos loci; en uno de ellos está fijado el alelo A, mientras que en el otro ambos alelos segregan. Las proporciones y cifras entre paréntesis indican la intensidad de las bandas.

Aunque la metodología general para la detección de patrones electroforéticos de isoenzimas está bien desarrollada y es relativamente sencilla, la interpretación de dichos patrones requiere de conocimientos básicos tanto de bioquímica como de genética y de la especie o cultivo con que se está trabajando; en efecto, esos patrones, como se mencionó anteriormente, dependen del número de loci, del número de alelos por locus, y de la estructura cuaternaria de la enzima.

La caracterización de materiales dentro de una colección de germoplasma se basa en la presencia o ausencia de bandas de los marcadores isoenzimáticos; no obstante, para estudiar la segregación de un marcador —o de su ligamiento— que tenga características de interés agronómico, es necesario conocer la genética y la bioquímica de dichos marcadores. La Figura 36.6 muestra algunas interpretaciones genéticas de las variaciones electroforéticas de patrones isoenzimáticos, y la Figura 36.7 presenta un ejemplo hipotético que ilustra la utilidad de las isoenzimas para discriminar materiales dentro de una colección.

Digitized by Google

El fundamento genético del comportamiento de las isoenzimas da una visión más clara de la aplicabilidad de esta metodología, no sólo como herramienta para caracterizar y evaluar materiales —complementando así las evaluaciones morfológicas y agronómicas— sino también en estudios bioquímicos, fisiológicos, genéticos y evolutivos.

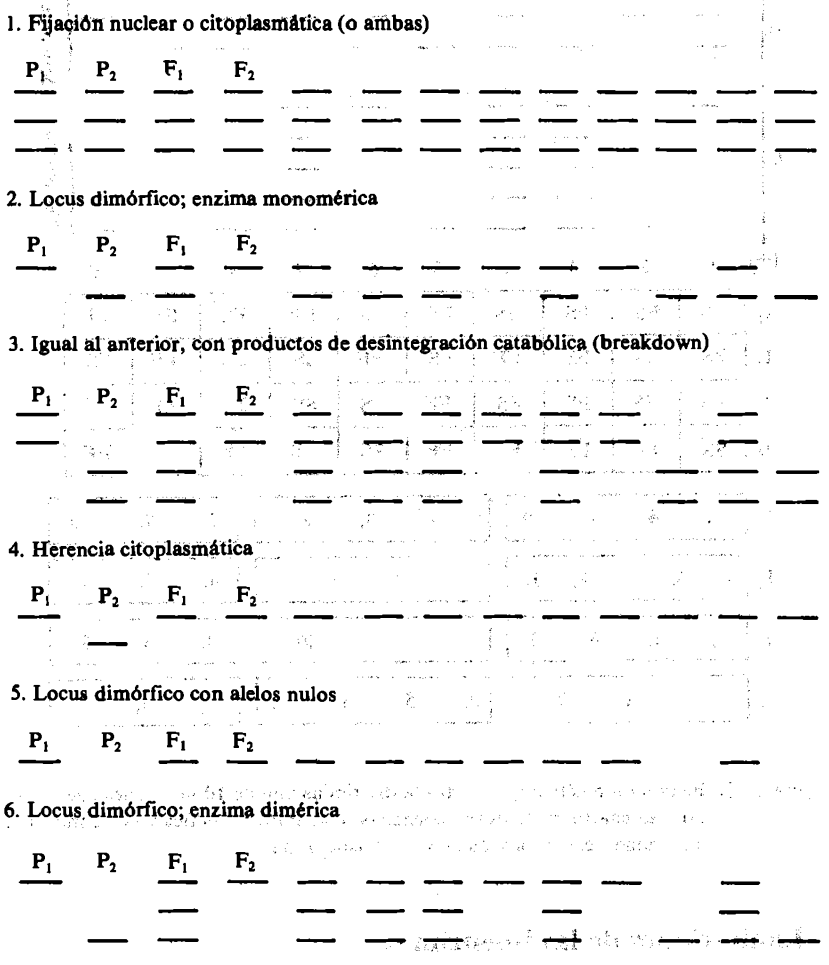


Figura 36.6. Interpretaciones genéticas de variaciones electroforéticas.

FUENTE: Tanksley y Orton, 1983.

Digitized by Google

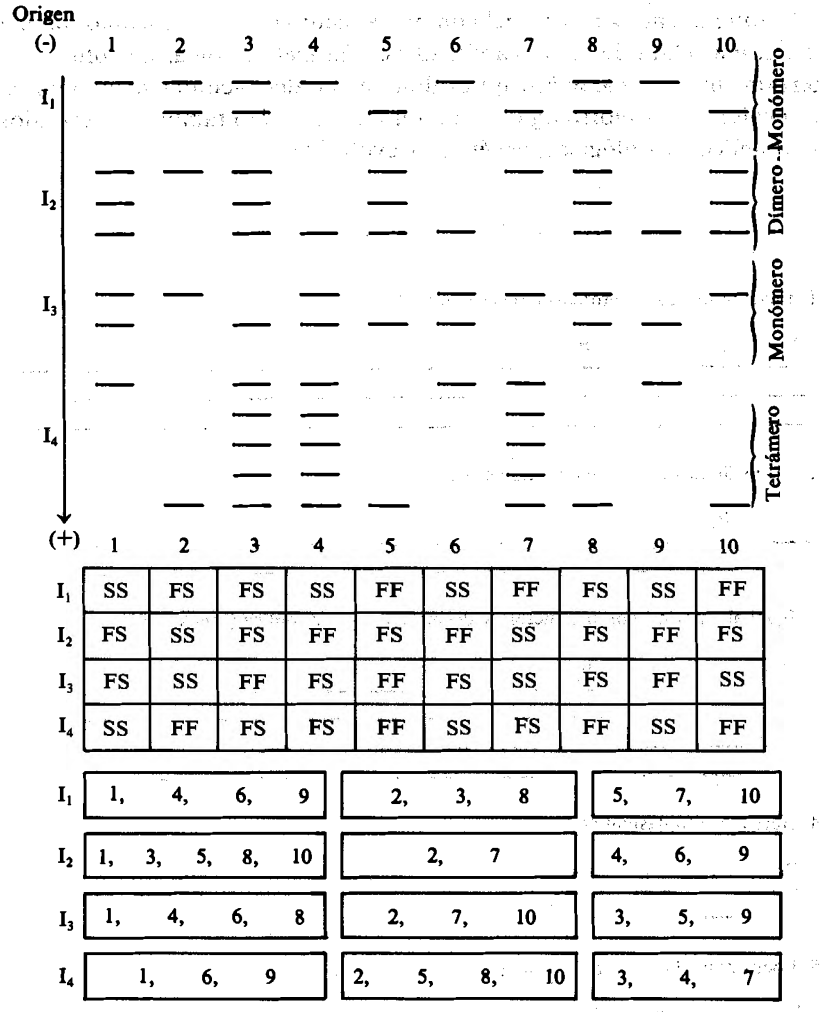


Figura 36.7. Ejemplo hipotético que ilustra la discriminación de 10 materiales cuando se utilizan cuatro marcadores isoenzimáticos. Para simplificar, no se indica la intensidad real de las bandas. I = isoenzima.

Limitaciones de las isoenzimas

Las isoenzimas, no obstante sus aplicaciones biológicas, tienen limitaciones cuando se evalúan materiales muy cercanos genéticamente. Las principales causas de estas limitaciones son:

Digitized by Google

- Las isoenzimas representan sólo un pequeña porción de todo el genoma de la planta.

- La técnica de tinción de isoenzimas no detecta las siguientes especies proteicas:

  a. Las enzimas que están por debajo de los límites de su detección.

  b. Las proteínas estructurales.

  c. Las enzimas que están presentes en el extracto pero no pueden detectarse porque aún se desconoce la forma de teñir sus productos.

  d. Las enzimas que intervienen en muchas vías metabólicas, y que aún se desconocen.

- Las isoenzimas están influenciadas por la edad de la planta, ya que los genes que codifican para ellas sólo se expresan en estadios específicos del desarrollo y en órganos o tejidos específicos.

Lo ideal, por tanto, es evaluar los materiales de una colección analizando directamente su genoma, es decir, mediante la nueva metodología que estudia el polimorfismo en longitud de los fragmentos de restricción del ADN (RFLPs).

Electroforesis de isoenzimas aplicada a la yuca

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz) se propaga tradicionalmente por estacas y no por semilla sexual, dado que es una especie altamente heterocigótica.

La colección de yuca del CIAT consta actualmente de unas 5000 variedades, y aumenta cada año. El banco de germoplasma de yuca se mantiene vivo en el campo y cada año es renovado. En las evaluaciones de rutina se ha observado un alto grado de duplicación morfológica en la colección; por tanto, fue necesario evaluar la colección con las técnicas de electroforesis de isoenzimas para confirmar los duplicados detectados mediante las características morfológicas y para identificar nuevos duplicados.

Esta evaluación se hizo empleando los patrones electroforéticos de la isoenzima alfa-beta-esterasa (Ramírez et al., 1987; Hussain et al., 1988; CIAT, 1988a), ya que este marcador isoenzimático ha mostrado mayor polimorfismo (variaciones en los patrones electroforéticos) en las variedades evaluadas hasta el momento. La metodología seguida para la tinción de la isoenzima alfa-beta-esterasa se esquematiza en la (Figura 36.8).

Digitized by Google

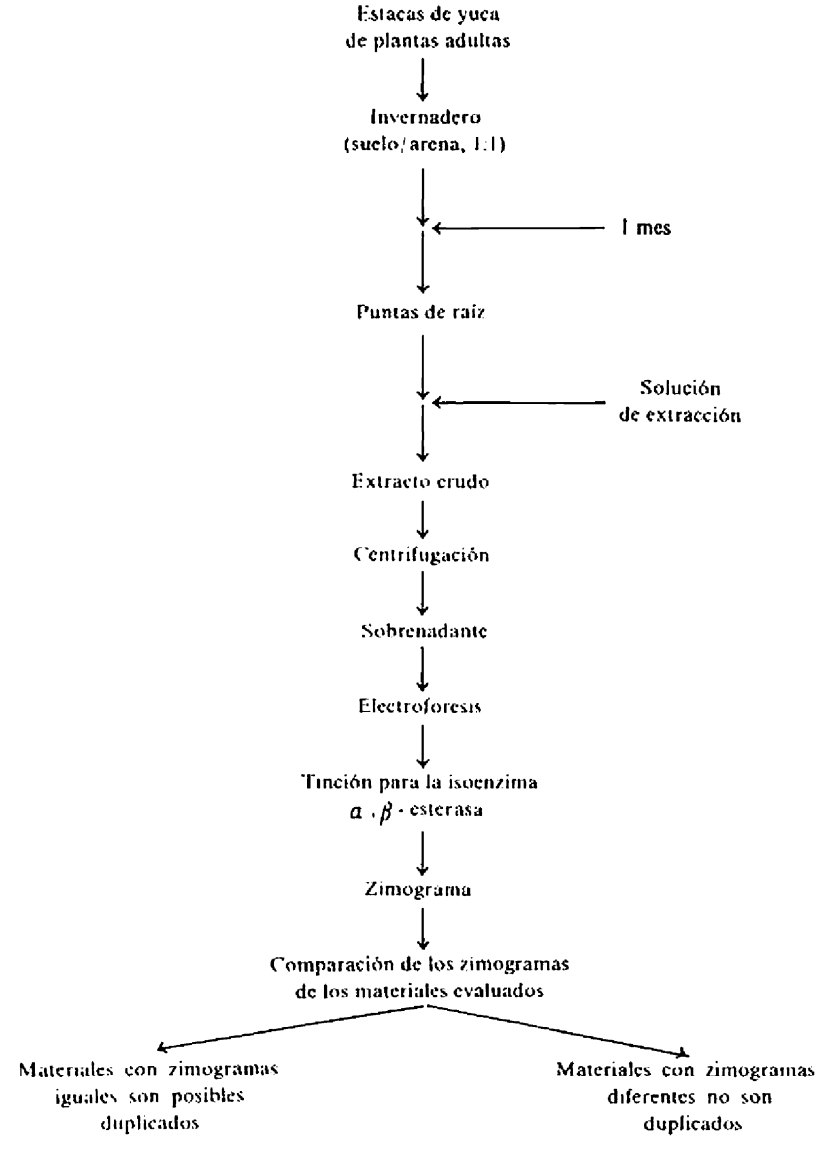


Figura 36.8. Metodología seguida para la tinción de la isoenzima α , β -esterasa.

Digitized by Google

Se seleccionaron 100 clones de yuca con criterios definidos (Chávez et al., 1988) para que representen un acervo genético que cubra gran parte de la varibilidad genética de la colección de yuca mantenida en el CIAT. Por medio del análisis electroforético de la isoenzima alfa-beta-esterasa, se identificaron 16 bandas en esos clones (señaladas con las minúsculas a-p).

También se identificaron las mismas 16 bandas en 1200 clones de yuca evaluados hasta el momento.[3] El patrón electroforético de la isoenzima alfa-beta-esterasa de un individuo puede estar constituido por 5 a 12 bandas de las 16 definidas. Las primeras bandas se identifican fácilmente usando una variedad testigo cuyo patrón de bandas, que es conocido, se corre en cada una de las electroforesis (Figura 36.9). De esta forma, dos individuos serán duplicados posibles cuando presenten las mismas características morfológicas o fisiológicas y el mismo patrón electroforético de la isoenzima alfa-beta-esterasa. Esto no significa que la duplicidad de los dos individuos esté garantizada en un 100%, ya que ésta debe confirmarse con nuevos marcadores isoenzimáticos o con la evaluación directa de sus genomas mediante la técnica de los RFLPs; no obstante, existe una alta probabilidad de que esos materiales sean duplicados.

La determinación de la movilidad electroforética relativa (MER) de cada banda dentro de un zimograma se hace mediante la siguiente relación:

$$MER = (ME_i / ME_r) \times 100$$

Donde: MER = Movilidad electroforética relativa
ME_i = Movilidad electroforética de la banda i (en mm)
ME_r = Movilidad electroforética de la banda de referencia (en mm)
100 = Valor relativo de la banda de referencia

La banda de referencia puede ser la banda de mayor migración de la variedad tomada como testigo (Figura 36.10).

El análisis anterior permite concluir que dos individuos podrían ser duplicados cuando, además de presentar las mismas características morfológicas o fisiológicas, tienen zimogramas con el mismo número de bandas y con las mismas movilidades electroforéticas relativas.

De otra parte, la intensidad de las bandas daría una idea de la concentración y de la actividad catalítica de la enzima en el extracto crudo del tejido.

3. Hershey, C. y Ocampo, C. Comunicación personal.

Digitized by Google

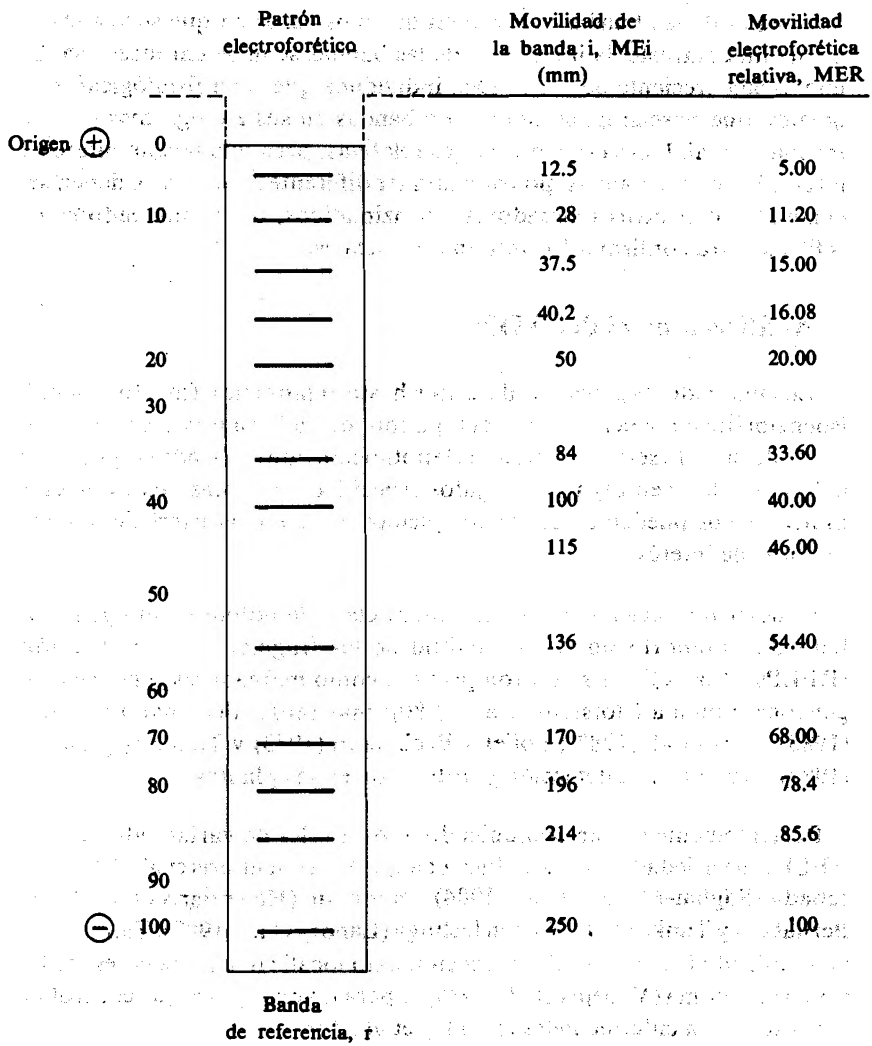


Figura 36.10. Obtención de las movilidades electroforéticas relativas en un patrón de bandas hipotético. Se tomó como banda de referencia la de mayor migración (ver texto), que recibe, por tanto, el valor 100 en una escala arbitraria de 0 a 100. La fórmula, en este ejemplo, será: $MER = (ME_i/250) \times 100$.

La intensidad de las bandas de una misma variedad puede variar de una electroforesis a otra, debido principalmente a efectos ambientales o a efectos del proceso, que consta de varios pasos. Aunque los materiales se evalúan bajo las mismas condiciones ambientales, no se tiene en cuenta la

Digitized by Google

intensidad de las bandas excepto en aquellos casos en que se vea claramente un contraste; la intensidad de las bandas se mide entonces usando una escala creciente de 1 a 5. Dos individuos que sean fisiológicamente iguales, que posean igual número de bandas en sus zimogramas con las mismas movilidades electroforéticas relativas, pero que tengan diferente intensidad en sus bandas, podrían aún ser diferentes; por tanto, deben ser evaluados con otros marcadores isoenzimáticos, o con marcadores de RFLPs, para confirmar los resultados iniciales.

Análisis a nivel del ADN

Los marcadores genéticos descritos hasta el momento (morfológicos e isoenzimáticos) tienen una desventaja: son regulados a través del desarrollo, es decir, sólo serían expresados fenotípicamente en estados específicos del desarrollo y en órganos o tejidos específicos. Además, los caracteres morfológicos pueden tener efectos pleiotrópicos en características agronómicas de interés.

Se describió recientemente una nueva clase de polimorfismo genético llamado polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs). Los RFLPs se usaron primero como marcadores genéticos, en genética humana (Botstein et al., 1980); más tarde, Beckmann y Soller (1983), Burr et al. (1983), Soller y Beckmann (1983) y Tanksley y Orton (1983) estudiaron su detección y utilización en las plantas.

Recientemente se han comunicado altos niveles de variabilidad en los RFLPs en variedades de maíz (Burr et al., 1983; Helentjaris et al., 1986), en cebada (Saghai-Moroof et al., 1984), en tomate (Helentjaris et al., 1986; Bernatzky y Tanksley, 1986) y en lechuga (Landry et al., 1987). También se han utilizado fragmentos de restricción para localizar secuencias específicas en el genoma (Vallejos et al., 1985), y para mapear genes que controlan la resistencia a enfermedades (Landry et al., 1987).

Esta metodología ha sido empleada también para caracterizar genomas simples, como el de la mitocondria y el del cloroplasto. Flavell et al. (1983) encontraron diferencias entre accesiones de maíz de México analizando fragmentos de restricción del ADN de las mitocondrias del maíz. En contraste, los niveles de diversidad del ADN del cloroplasto son mucho menores que los del ADN de la mitocondria. Clegg et al. (1984) analizaron el ADN de cloroplastos de líneas cultivadas y silvestres de cebada, y encontraron mucho menos diversidad entre las líneas cultivadas que entre las silvestres.

Digitized by Google

La metodología para producir los RFLPs se basa en el uso de enzimas de restricción. Las enzimas de restricción reconocen secuencias específicas del ADN y lo cortan en los sitios en que éstas se hallan o en sitios adyacentes. Cuanto más frecuente sea ese sitio de reconocimiento para la enzima, el ADN será cortado con más frecuencia (Figura 36.11). Los fragmentos de ADN producidos de esta manera pueden separarse por medio de la electroforesis, y los fragmentos más pequeños se moverán mas rápidamente en el gel. Cuando el ADN de un organismo superior es digerido por una enzima de restricción, se producen muchos fragmentos de diferentes longitudes que, al separarse a lo largo del gel, formarán una mancha continua, visible cuando el gel se sumerge en una solución de bromuro de etidio y es observado en un transiluminador de luz ultravioleta.

Un fragmento específico sólo puede detectarse con una sonda apropiada, es decir, con un fragmento de ADN que ya ha sido clonado y que sea

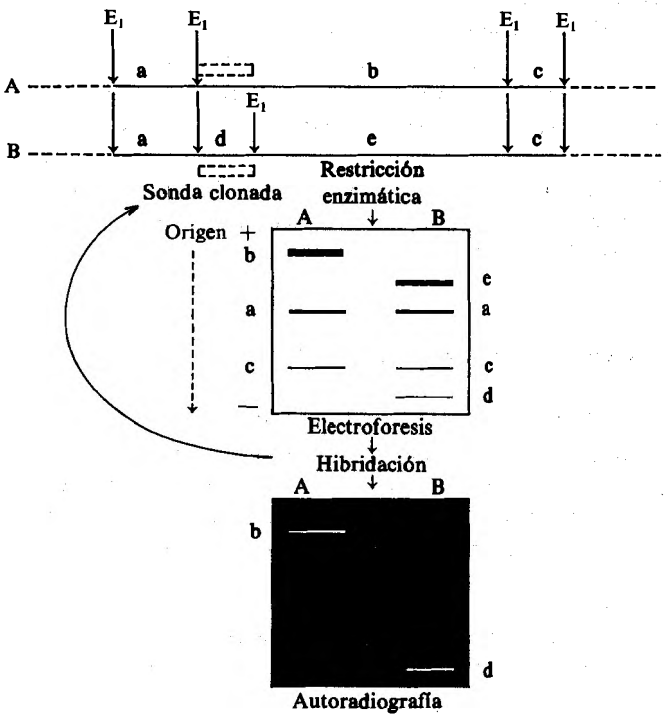


Figura 36.11. Ejemplo hipotético que ilustra el polimorfismo en longitud de los fragmentos de restricción. E_1 = enzima de restricción específica. A, B = fragmentos largos de ADN cromosómico en estudio.

FUENTE: Bernatzky, 1988.

Digitized by Google

homólogo de aquél que se desea visualizar. Los diferentes fragmentos presentes en el gel se deben trasferir a un soporte sólido, donde serán expuestos a una sonda marcada radioactivamente en condiciones que favorezcan la hibridación ADN-ADN. El soporte se usa entonces para exponer una película fotográfica la cual, después de ser revelada, hará visible el fragmento de ADN que se hibridó con la sonda (Figura 36.12). Utilizando este tipo de sonda de ADN único, puede detectarse un fragmento de rara ocurrencia (uno en un millón o menos frecuente). Las sondas de ADN utilizadas para los RFLPs no necesitan ser homólogas de genes conocidos. Cualquier secuencia de ADN puede servir para los RFLPs, siempre y cuando pueda hibridarse con algunos de los fragmentos producidos después del proceso de restricción.

Cualquier cambio ocasionado por mutaciones puntuales en el ADN puede alterar la secuencia de reconocimiento típica de una enzima de restricción, en particular eliminando o creando nuevos sitios de reconocimiento. De manera similar, supresiones o trasposiciones de grandes fragmentos de ADN pueden originar cambios simultáneos en los patrones de restricción de diferentes enzimas. En consecuencia, una enzima de restricción determinada no cortará el ADN de dos individuos por el mismo lugar. Por tanto, se formarán fragmentos de diferente longitud cuando el ADN de los dos individuos sea cortado por la misma enzima. A causa de su diferencia en longitud, esos fragmentos se localizarán en posiciones diferentes una vez concluidas la electroforesis, la hibridación y la autoradiografía (Figuras 36.11 y 36.12).

Aplicaciones y ventajas de los RFLPs

Entre las aplicaciones de los RFLPs se encuentran: a) la caracterización de variedades; b) la identificación de los loci genéticos que afectan las características multigénicas o cuantitativas; y c) el desarrollo de programas de mejoramiento genético mediante evaluación de germoplasma, introgresión, mejoramiento de híbridos comerciales, y selección dentro de las poblaciones.

Los RFLPs ofrecen muchas más ventajas que las isoenzimas y que los métodos de evaluación tradicionales, por las siguientes razones:

- Los RFLPs no están afectados por el medio ambiente.
- Los patrones de RFLPs pueden determinarse en el DNA extraido en cualquier época de la vida del organismo.

Digitized by Google

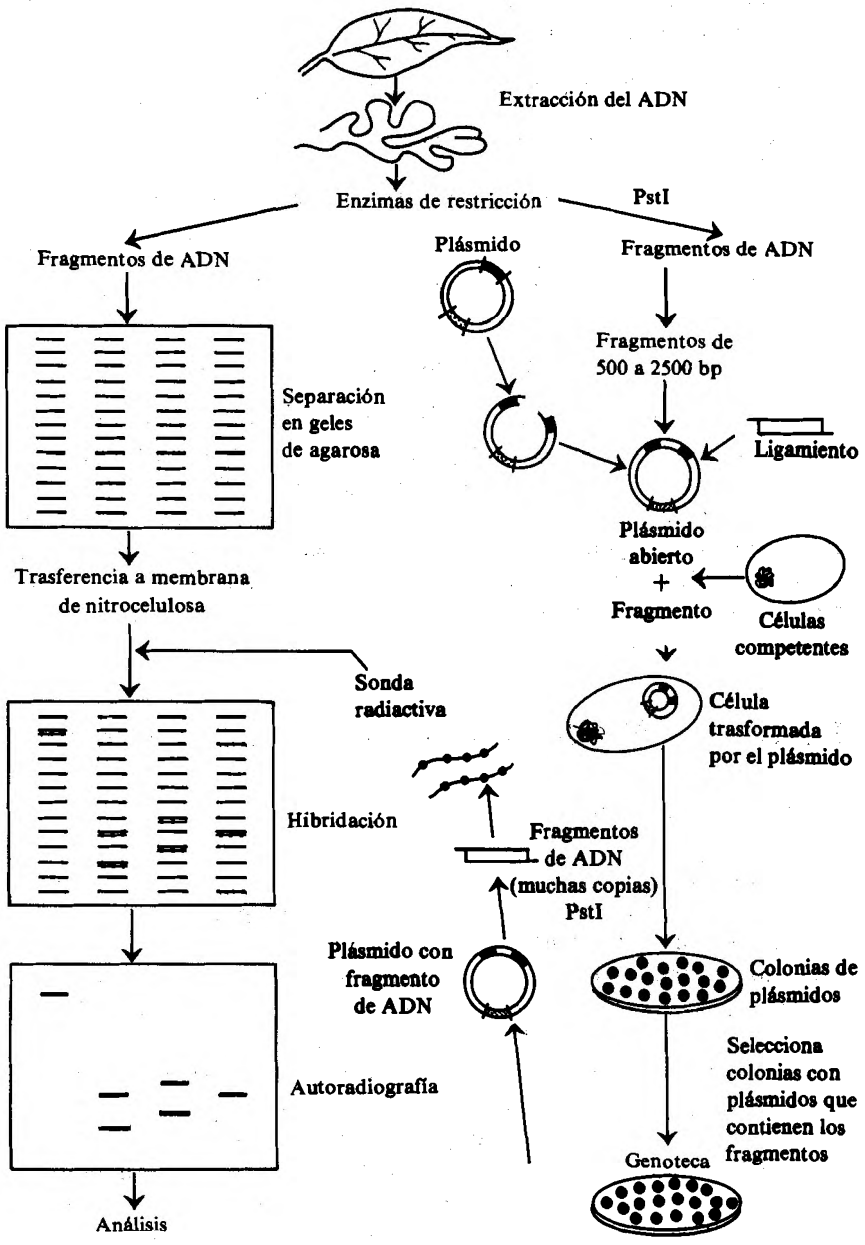


Figura 36.12. Secuencia del proceso de detección de los RFLPs. PstI = endonucleasa de restricción derivada de *Pseudomonas* sp. bp = pares de bases.

Digitized by Google

- El número de marcadores de RFLPs que se pueden estudiar en una simple progenie es bastante grande.
- Con los RFLPs se puede analizar todo el genoma.
- Los RFLPs expresan codominancia.
- Los RFLPs del genoma nuclear siguen una herencia mendeliana simple.
- Los RFLPs de genomas de organelos (mitocondria, cloroplasto) siguen una herencia materna.
- Los RFLPs no tienen efectos pleiotrópicos.

Esta y otras técnicas moleculares han sido de gran valor, no sólo para caracterizar y evaluar materiales, sino también en trabajos de ingeniería genética. En efecto, algunos marcadores (genes específicos), adecuadamente manipulados pueden trasferirse a las plantas mediante técnicas de cultivo de tejidos y trasformación. En consecuencia, la obtención de nuevas variedades aprovechando bien estas nuevas tecnologías, exige una buena coordinación entre los programas de mejoramiento tradicional y los programas de biotecnología.

La Biología Molecular en el Mejoramiento Genético

Mapas genéticos

Se entiende por 'mapeo' genético la ubicación espacial de un gen en una región específica de un cromosoma. Es necesario 'mapear' los marcadores moleculares como los RFLPs, una vez hayan sido identificados. Esta operación es simple cuando se posee material genético especial. Por ejemplo, en maíz se desarolló un mapa con 130 loci (RFLPs) que cubría los 10 cromosomas del maíz y, en ellos, el 50% del mapa genético de esta especie, utilizando líneas monosómicas y análisis de segregantes (Helentjaris et al., 1986). También se pueden hacer mapas genéticos utilizando series de aneuploides, como se hizo en el trigo (García-Olmedo et al., 1982). Otras técnicas de mapeo son las líneas celulares de híbridos somáticos interespecíficos (D'Eustachio y Ruddle, 1983), la hibridación in situ (Harper y Saunders, 1981), y las genotecas de cromosomas particulares (Cavannee et al., 1984). Las técnicas antes mencionadas son obviamente de gran utilidad en los cultivos que disponen de facilidades para estas operaciones genéticas. Sin embargo, cuando no existe ningún material especial —como el

Digitized by Google

antes mencionado— para hacer el mapa genético, éste se puede construir por análisis de segregantes.

Análisis de características multigénicas

Aunque muchas de las características de las especies cultivables —incluyendo la resistencia a las enfermedades— están determinadas por loci que tienen un efecto drástico en el fenotipo, la mayoría de las características de importancia económica, como el rendimiento y la resistencia horizontal al estrés, son de naturaleza cuantitativa. Así pues, habrá variación fenotípica en las características continuas entre un individuo y otro, y una distribución normal de los valores fenotípicos en una población particular. Las diferencias genéticas que afectan las características cuantitativas, ya sea dentro de las poblaciones o entre ellas, están determinadas por un número relativamente grande de loci, cada uno de los cuales aporta una pequeña contribución cuantitativa, sea ésta positiva o negativa, hasta que se obtiene el valor fenotípico final de una característica. Esta clase de loci se denomina 'loci para característica cuantitativa' (Geldermann, 1975), cuyas siglas son QTL (del inglés, quantitative trait loci).

Utilizando diseños experimentales especiales y ciertos análisis de datos, llamados colectivamente genética cuantitativa o biométrica (Falconer, 1981), ha sido posible comprender un poco la arquitectura genética de las características cuantitativas, y utilizar este conocimiento como guía para los programas de mejoramiento genético. Sin embargo, la dificultad para distinguir y manejar, en los programas de mejoramiento, loci individuales que afectan una característica de importancia económica impone una gran limitación a la efectividad de la genética clásica en los procedimientos de mejoramiento. De igual manera, la identificación de los genes que afectan una característica cuantitativa limita su clonamiento y su aplicación en ingeniería genética. En conclusión, los dos métodos disponibles para el mejoramiento genético están más o menos limitados en su capacidad para manejar las características cuantitativas.

Se demostró recientemente que los RFLPs proporcionan un método confiable para trasformar los QTL en entidades mendelianas o cuasimendelianas; unas y otras serían fácilmente manipuladas en los programas de mejoramiento genético y en un futuro podrían usarse para clonamiento en proyectos de ingeniería genética. Utilizando los RFLPs, existen básicamente dos vías para identificar y manipular los QTL: a) determinación del ligamiento entre RFLP y QTL para hacer luego el mapa de evaluación de los efectos de los QTL, y b) identificación y clonamiento de los QTL empleando métodos de mutagénesis por inserción.

Digitized by Google

Paterson et al. (1988) describieron un nuevo método para el análisis de QTL. Se utilizó un mapa genético detallado que, partiendo de los RFLPs, evidenciaba los factores genéticos que afectaban varias características de la fruta del tomate (peso de la fruta, concentración de sólidos solubles, y pH). Este método emplea un mapeo a intervalos que utiliza el método estadístico de máxima probabilidad. El mapeo a intervalos da cuenta de los efectos de cada segmento genómico localizado entre dos loci marcadores, y no de los efectos asociados con loci individuales. Esto reduce las confusiones que se pueden presentar por los efectos de recombinación entre los loci marcadores y los QTL.

Conclusiones

La biología molecular se está convirtiendo en una herramienta poderosa en los programas de mejoramiento. Se están acumulando metodologías para determinar la presencia de marcadores que serán fácilmente detectados y rastreados en los programas de mejoramiento. Estas nuevas tecnologías son complementarias de los métodos tradicionales. En el futuro, serán los programas coordinados que comprendan métodos tradicionales y biotecnología los que producirán las nuevas variedades mejoradas.

Referencias

Beckmann, J. S. y Soller, M. 1983. Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement: Methodologies, mapping and costs. Theor. Appl. Genet. 67:35-43.

Bernatzky, R. 1988. Restriction fragment length polymorphism. En: Plant molecular biology manual. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Bélgica. Cap. 2, p. 1-18.

——— y Tanksley, S. D. 1986. Majority of randon cDNA clones correspond to single loci in the tomato genome. Mol. Gen. Genet. 203:8-14.

Botstein, D.; White, R. L.; Skolnick, M. y Davis, R. W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am. J. Hum. Genet. 32:314-331.

Burr, B.; Evola, S. V.; Burr, F. y Beckmann, J. S. 1983. The application of restriction fragment length polymorphisms to plant breeding. En: Setlow, J. y Hollaender, A. (eds.). Genetic Engineering. Plenum Press, Nueva York. p. 45-59.

Cavannee, W.; Leach, R.; Mohandas T.; Pearson, P. L. y White R. 1984. Isolation and regional localization of DNA segments revealing polymorphic loci from human chromosome 13. Am. J. Hum. Genet. 36:10-24.

Digitized by Google

Chávez, R.; Roca, W. M.; Arias, D. I.; Withers, L. y Williams, J. T. 1988. Cooperative project IBPGR-CIAT to establish a pilot *in vitro* genebank. Diversity 16.

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1988a. Biotechnology Research Unit annual report. Cali, Colombia. 102 p.

———. 1988b. Bean Program annual report 1987. Cali, Colombia. p. 131-143.

Clegg, M. T.; Brown, A. H. D. y Whitfeld, P. R. 1984. Chloroplast DNA diversity in wild and cultivated barley: Implications for genetic conservation. Genet. Res. 43:339-343.

D'Eustachio, P. y Ruddle, P. H. 1983. Somatic cell genetics and gene families. Science 220:919-924.

Falconer, D. S. 1981. Introduction to quantitative genetics. 2nd. edition. The Ronald Press Co., Nueva York.

Flavell, R. B.; Kemble, R. J.; Gunn, R. E.; Abbott, A. y Baulcombe, D. 1983. Applications of molecular biology in plant breeding: The detection of genetic variation and viral pathogens. En: Better crops for food. Ciba Foundation Symposium 97. Pitman, Londres. p. 198-212.

García-Olmedo, F; Carbonero, P. y Jones B. L. 1982. Chromosomal location of genes that control wheat endosperm proteins. Adv. Cercol. Sci. Technol. 5:1-47.

Geldermann, H. 1975. Investigations on inheritance of quantitative characters in animals by gene markers; 1: Methods. Theor. Appl. Genet. 46:319-330.

Gepts, P. y Bliss, F. A. 1985. Phaseolin variability among wild and cultivated common bean (*Phaseolus vulgaris*) from Colombia. Econ. Bot. 40:469-478.

———; Osborn, T. C.; Rashka, K. y Bliss, F. A. 1986. Phaseolin protein variability in wild forms and landraces of the common bean (*Phaseolus vulgaris*): Evidence for multiple centers of domestication. Econ. Bot. 40:451-468.

———. 1988. Phaseolin as an evolutionary marker. En: Gepts, P. (ed.). Genetic resources, domestication and evolution of *Phaseolus* bean. Klumer, Dordrecht, Holanda. p. 215-241.

Harper, M. E. y Saunders G. F. 1981. Localization of single copy DNA sequences on G-banded human chromosomes by using in situ hybridization. Chromosoma 83:431-439.

Helentjaris T.; Slocum, M.; Wright, S.; Schaefer, A. y Nienhuis, J. 1986. Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphisms. Theor. Appl. Genet. 72:761-769.

Digitized by Google

Hussain, A.; Bushuk, W.; Ramírez, H. y Roca, W. M. 1987. Polyacrylamide gel electroforesis procedures for cultivar identification of field bean, cassava and pasture legumes: Working document no. 22. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. 10 p.

———; Ramírez, H. y Roca, W. M. 1986. Manual práctico para la detección electroforética de isoenzimas y otras proteínas. Documento de trabajo no. 19 Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. 60 p.

———; ———; Bushuk, W. y Roca, W. M. 1986. Field bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar identification by electroforegrams of cotyledon storage proteins. Euphytica 35:729-732.

———; ———; ——— y ———. 1988. Interaccession variation of electrophoregrams of cotyledon protein of field bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Euphytica 39:109-111.

Landry, B. S.; Kesseli, R. V.; Farrara, B. y Michelmore, R. W. 1987. A genetic map of lettuce (*Lactuca sativa* L.) with restriction fragment length polymorphism, isozyme, disease resistance and morphological markers. Genetics 116: 331-337.

Maniatis, T; Fritsh, E. F. y Sambrook, J. 1982. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory.

Maquet, A.; Posso, C. E. y Debouck, D. G. 1988. Biochemical evidence for two different gene pools in lima beans. Cartel presentado en el International Workshop on Breeding Dry Beans (*Phaseolus vulgaris* L.), en el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), noviembre 1988. Palmira, Colombia.

Market, C. L. y Moller, F. 1959. Multiple forms of enzymes: Tissue, autogene and species specific patterns. Proc. Nat. Acad. Sci. (E.U.) 45:753-763.

Muñoz, F. L. C. 1985. Problemas en la hibridación interespecífica en el género *Phaseolus*: Ensayo preliminar con cultivo de embriones. Tesis. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional, Palmira, Colombia. 95 p.

Osborn, T. C.; Alexander, D. C.; Sun, S. S.; Cardona, C. y Bliss, F. A. 1988. Insecticidal activity and lectin homology of arcelin seed protein. Science 240:207-210.

Paterson A.; Lander, E. S.; Hewitt, J. D; Paterson, S.; Lincoln S. E. y Tanksley, S. D. 1988. Resolution of quantitative traits into mendelian factors by using a complete linkage map polymorphisms. Nature 335:721-726.

Ramírez, H.; Hussain, A.; Roca, W. M. y Bushuk, W. 1987. Isozyme electrophoregrams of sixteen enzymes in five tissues of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) varieties. Euphytica 36:39-48.

Digitized by Google

Reynolds, M.; Weinhold, A. R. y Morris, T. J. 1983. Comparison of anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* by polyacrylamide gel electrophoresis of soluble proteins. Phytopathol. Z. 20:165-226.

Rider, C. C. y Taylor, C. B. 1980. Isoenzymes. 1980. Chapman and Hall, Nueva York. p. 8.

Saghai-Moroof, M. A.; Soliman, K. M.; Jorgensen, R. A. y Allard R. W. 1984. Ribosomal DNA spacer length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. Proc. Nat. Acad. Sci. (E.U.) 81:8014-8018.

Soller, M. y Beckman, J. S. 1983. Genetic polymorphism in varietal identification and genetic improvement. Theor. Appl. Genet. 67:25-53.

Sprecher, S. L. 1988. New isozyme variants at two NADH diaphorase loci in dry bean: Correlations in gene pools and commercial classes. Ann. Rep. Bean Improv. Coop. 31:92.

Tanksley, S. D. y Orton, T. J. (eds.) 1983. Isozymes in plant genetics and breeding. Partes A y B. Elsevier Sci. Publ., Nueva York.

Thome, J.; Vargas, J.; Roca, W. M. y Debouck, D. G. 1988. Are the Southern Andes a broader area of domestication of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)? Cartel presentado en el International Workshop on Breeding Dry Beans (*Phaseolus vulgaris* L.), en el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), noviembre 1988. Palmira, Colombia.

Triana, M. E.; Debouck, D. G.; Ramírez, H. y Roca, W. M. 1988. Electrophoretic study of phaseolin in African germplasm collections of common bean. Cartel presentado en el International Workshop on Breeding Dry Beans (*Phaseolus vulgaris* L.), en el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), noviembre 1988. Palmira, Colombia.

———. 1988. Estudio electroforético de germoplasma de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en centros secundarios de diversidad genética: El caso de Africa Suroriental. Tesis. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional, Palmira, Colombia.

Vallejos, C. E.; Tanksley, S. D. y Bernatzky, R. 1985. Localization in the tomato genome of DNA restriction fragments containing sequences homologous to the rRNA (45s), the major chlorophyll a/b binding polypeptide, and the ribulose biphosphate carboxylase genes. Genetics 112:93-105.

Vargas, J. 1988. Caracterización de los acervos genéticos de *Phaseolus vulgaris* L. por medio de la electroforesis. Tesis. Facultad de Biología, Universidad del Valle, Cali. 73 p.

Watson, J. D.; Toose, J. y Kurtz, D. T. 1983. Recombinant DNA: A short course. Scientific American Books, Freeman, Nueva York.

Digitized by Google

Capítulo 37

Isoenzimas como marcadores genéticos para identificar híbridos en el cultivo de tejidos

C. F. Quirós*

Agradecimientos

El autor agradece a Raquel Quirós y a Osvaldo Ochoa por la asistencia prestada en la revisión del manuscrito.

* Department of Vegetable Crops, University of California, Davis, California, E. U.

Digitized by Google

Introducción

En el trascurso de las investigaciones dirigidas a la obtención de híbridos, ya sea sexuales o somáticos, es indispensable la presentación de pruebas concluyentes de que el producto obtenido es en realidad un híbrido. En muchos casos, esta prueba se basa en criterios morfológicos, cuando las características de ambos padres son conspicuamente diferentes y permiten su identificación en el híbrido resultante. Por ejemplo, los híbridos obtenidos entre las dos especies de tomate *Lycopersicon esculentum* y *L. pennellii* pueden distinguirse debido a características intermedias evidentes en las hojas, las flores y el polen, y además por la heterosis (Rick, 1960; Quirós, 1975). En otros casos, las características morfológicas no son lo suficientemente diferentes como para permitir esta identificación de manera definitiva; un caso especialmente crítico son los híbridos somáticos, que se obtienen mediante el cultivo de tejidos.

El cultivo de células y tejidos produce con frecuencia mutaciones y aberraciones cromosómicas (ver Capítulos 8 y 13) que modifican en muchos casos el fenotipo de los individuos resultantes, y dan pie a confusión en la identificación precisa y definitiva de los híbridos. En los últimos años se ha hecho énfasis en la obtención de isoenzimas como marcadores genéticos no sólo para el estudio genético de las especies sino para aplicarlos a muchos aspectos de la investigación básica; una de estas aplicaciones es la identificación de híbridos intraespecíficos e interespecíficos.

Isoenzimas como Marcadores Genéticos

Conceptos básicos

El descubrimiento de las isoenzimas ha favorecido la creación de marcadores genéticos más eficientes que los morfológicos ya que, por lo general, permiten distinguir genotipos homocigóticos de los heterocigóticos; en otras palabras, permiten igualar el fenotipo de un individuo con su respectivo genotipo. Antes del advenimiento de esta técnica, la variación genética en una especie o en una población se hacía partiendo de la identificación de mutantes recesivos, los cuales en el estado homocigótico resultan en fenotipos aberrantes. Sin embargo, estos últimos son raros, ya que la mayor parte de las características morfológicas son cuantitativas y, por tanto, están gobernadas por varios pares de genes cuya expresión está afectada por el ambiente.

Digitized by Google

La simplicidad de la técnica utilizada para detectar isoenzimas, denominada electroforesis, ha hecho posible su uso y aplicación en la investigación genética de un gran número de especies vegetales. McMillin (1983) presenta una perspectiva histórica del desarrollo de las isoenzimas. Los principales eventos que marcaron el uso de esta técnica fueron el desarrollo de la electroforesis de almidón por Smithies (1955) y la demostración de que las isoenzimas pueden visualizarse en los geles por medio de tintes histoquímicos (Hunter y Markert, 1957). Estos dos últimos autores propusieron el término 'zimograma' para denominar el patrón de bandas enzimáticas en los geles. El término isoenzima (o isozima) fue propuesto por Markert y Moller (1959) para designar diferentes formas moleculares de enzimas que catalizan un mismo sustrato.

Gottlieb (1971) y Peirce y Brewbaker (1973) presentan un resumen de los conocimientos necesarios para usar las isoenzimas como marcadores genéticos, así como otras aplicaciones de éstas. El uso de las isoenzimas se basa en la existencia de la heterogeneidad enzimática en las plantas; este fenómeno se evidencia cuando las enzimas —según sus cargas eléctricas y por medio de la electroforesis— se separan en sus diferentes formas moleculares. Este efecto permite estudiar la variabilidad genética existente entre individuos a nivel de enzimas o de proteínas. La diferencia de cargas eléctricas entre una enzima y otra es el resultado de cambios en su estructura molecular que pueden consistir, en casos muy sencillos, en simples sustituciones de aminoácidos en la estructura primaria o, en casos más complejos, en que sea diferente el número de polipéptidos que forman parte de cada enzima (cadenas de aminoácidos). Esta variación corresponde, generalmente, a diferencias en la secuencia del genoma, lo que permite caracterizar la variación a nivel molecular.

Aunque las isoenzimas catalizan el mismo sustrato, pueden ser moleculármente muy diferentes porque, por lo regular, son sintetizadas por genes distintos que despliegan su actividad en diferentes tejidos. Además, es posible encontrar variación en las isoenzimas producidas por el mismo gen cuando éstas representan la expresión de alelos diferentes; esta variación alélica es más tenue y casi siempre es efecto de sustituciones simples de uno o pocos aminoácidos. Prakash et al. (1969) acuñaron el término 'aloenzima' ('alozima') para describir las isoenzimas producidas por alelos diferentes del mismo gen.

La técnica de la electroforesis consiste en situar un extracto proteico obtenido del tejido de una planta en un medio de soporte —ya sea un papel de celulosa, o un gel hecho de almidón de papa, de poliacrilamida o de agarosa— y someterlo a un campo eléctrico durante varias horas; el campo

Digitized by Google

hace que las diferentes isoenzimas migren en el medio según sus cargas eléctricas. Después de esta operación, el gel se incuba en una solución que contenga tanto el sustrato sobre el que actúa la enzima que se desea separar, como los cofactores necesarios más un tinte que se acople al producto de la reacción. Las isoenzimas se visualizan como bandas de color que aparecen en el gel.

Para usar las isoenzimas eficazmente como marcadores genéticos es necesario establecer claramente cuántos pares de genes las determinan, la modalidad de herencia, y su tipo de estructura molecular, es decir, si están formadas por un polipéptido (monoméricas), por dos (diméricas), o por más de dos. Estos estudios se hacen mediante pruebas de progenie y cruzamientos entre individuos de fenotipos diferentes caracterizados por zimogramas distintos. En general, las alozimas de los loci isoenzimáticos segregan monogénicamente; sin embargo, en ocasiones, las segregaciones pueden estar distorsionadas por modificaciones postrascripcionales a las que están sujetas algunas enzimas, ya sea por genes modificadores o por artificios de la extracción (Rick et al., 1979). Peirce y Brewbaker (1973) informan sobre tres patrones de bandas básicos que se ajustan al tipo de segregación de las isoenzimas, y que se describen a continuación:

Bandas rápidas y bandas lentas. Este tipo de variación genética en el patrón de bandas es típico de las enzimas monoméricas; en el caso más simple, la proteína que expresa cada alelo de un locus dado se aprecia como una banda que se caracteriza porque tiene una distancia de migración fija en el gel (se asume que la electroforesis se lleva a cabo siempre bajo las mismas condiciones). Si se tiene un individuo heterocigótico, su fenotipo se expresa como un zimograma constituido por dos bandas (una rápida y otra lenta) que representan el genotipo del individuo; la expresión simultánea de ambos alelos en un locus se denomina codominancia. La progenie resultante de la autofecundación de un individuo heterocigótico segregará conforme a la razón mendeliana 1:2:1, donde 1 corresponde a los dos genotipos homocigóticos y 2 al genotipo parental heterocigótico. La codominancia es otra de las grandes ventajas de las isoenzimas que permite la detección de genotipos híbridos (Figuras 37.1, 37.2 y 37.3).

Es muy común la presencia de alelos múltiples en loci enzimáticos. Por ejemplo, en *Lycopersicon* spp. se han reportado 22 alozimas para el locus Adh-1 (Rick, 1983) y en alfalfa (Quirós, 1983) 9 alozimas para el locus Prx-1 (Figura 37.4). En casos más complejos, un alelo puede expresarse como dos bandas o como un grupo de varias bandas, siendo éste el caso de la mayor parte de las peroxidasas en el tomate (Rick et al., 1979) o de las

Digitized by Google

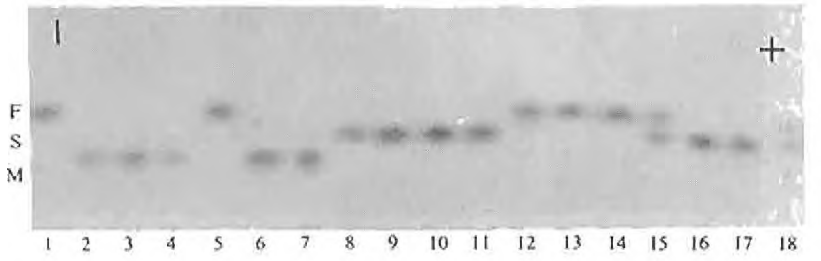


Figura 37.1. Fenotipos de apio para la enzima fosfoglucomutasa, locus Pgm-2. Los individuos en las líneas 15 y 18, contando desde la izquierda, son heterocigóticos para los alelos Pgm-2^F y Pgm-2^M. Las enzimas gobernadas por este locus son monoméricas, ya que los fenotipos heterocigóticos no muestran una banda híbrida de migración intermedia. Los demás individuos son homocigóticos para los tres alelos que se encuentran en el apio. La alozima de menor migración corresponde al alelo Pgm-2^S.

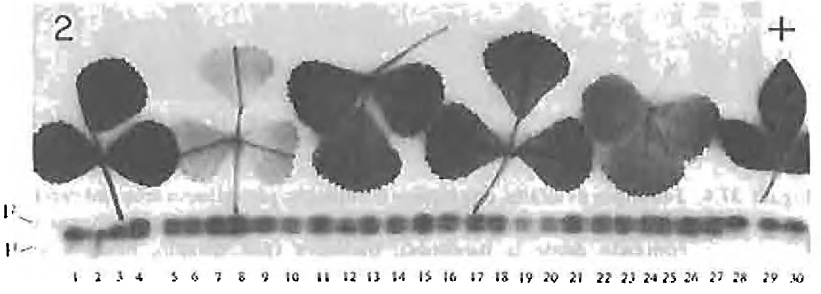


Figura 37.2. Híbridos entre *Medicago turbinata* y *M. truncatula* determinados por el locus monomérico Lap^t-1, origen de la enzima leucina-aminopeptidasa. Los tres primeros individuos, contando desde la izquierda, corresponden a la primera especie, y son homocigóticos para el alelo Lap^t-1^t; los tres últimos individuos corresponden a la segunda especie, siendo homocigóticos para el alelo Lap^t-1^T. Los demás son híbridos entre ambas especies, y heterocigotos para ambos alelos.

Digitized by Google

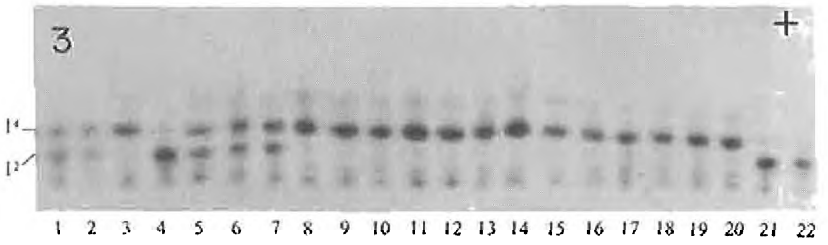


Figura 37.3. Fenotipos de brócoli para el locus monomérico Lap-1. Los individuos en las líneas 1, 2, 5, 6, y 7, contando desde la izquierda, son heterocigóticos para las alozimas Lap-1^2 y Lap-1^4; los individuos en las líneas 4, 21 y 22 son homocigóticos para el último alelo. Las demás plantas son homocigóticas para el primer alelo. Nótese que los fenotipos homocigóticos para ambos alelos muestran una banda secundaria o 'sombra' en la parte superior, que es la de mayor migración; también se observa esta banda en los híbridos. Las bandas más tenues debajo de la alozima Lap-1^4 parecen corresponder a un segundo locus; su herencia aún no ha sido estudiada.

Figura 37.4. Fenotipos de alfalfa, una especie tetraploide, para el locus monomérico Prx-1. En este gel se aprecian individuos heterocigóticos dialélicos (líneas 1 a 5, contando desde la izquierda), trialélicos (por ejemplo, líneas 6 y 9) y tetraalélicos (líneas 11 y 13). Ellos forman parte de la progenie resultante de la autofecundación de una planta tetraalélica.

malatodeshidrogenasas en la papa.[1] Estas bandas no segregan en las progenies de los individuos que las poseen; siempre se trasmiten como un solo grupo (Figura 37.5), lo que puede deberse a posibles duplicaciones

1. Quirós y McHale. Información sin publicar.

Digitized by Google

genéticas porque están tan cerca la una de la otra en el cromosoma que no sufren recombinación. Otra explicación posible de que un alelo se exprese como un grupo de bandas es que la isoenzima sufre una modificación postrascripcional o postraduccional que resulta en 'sombras' o bandas secundarias.

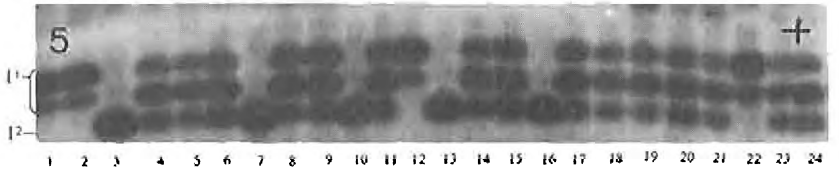


Figura 37.5. Fenotipos de la papa diploide *Solanum phureja* que segrega respecto a las alozimas del locus dimérico Mdh-1, origen de la enzima malato-deshidrogenasa. Individuos homocigóticos para el alelo Mdh-1^1 (por ejemplo, las líneas 1 y 2 contando desde la izquierda) están caracterizados por dos bandas, de las cuales la inferior es una banda 'sombra' cuyo origen se desconoce; en cambio, los homocigóticos para el alelo Mdh-1^2 sólo muestran una banda (por ejemplo, las líneas 3 y 7). Los heterocigóticos muestran tres bandas, y es difícil saber si la banda intermedia es la 'sombra' de la alozima 1^1 o si es una banda híbrida (heterodímero). Sin embargo, la mayor intensidad de la banda intermedia indica que ésta es un heterodímero resultante de la combinación de los polipéptidos producidos por ambos alelos.

Bandas híbridas. Estas bandas se presentan como genotipos heterocigóticos respecto a enzimas de estructura polimérica, es decir, aquellas conformadas por más de una cadena de polipéptidos. En el caso más simple, es decir, el de un individuo heterocigótico para una enzima dimérica y cuyos alelos producen polipéptidos diferentes, estos últimos, además de combinarse entre sí para formar alozimas de tipo parental, se combinan también entre ellos para formar una isoenzima híbrida, que migrará a una posición intermedia entre las dos isoenzimas parentales (Figuras 37.6 y 37.7). La progenie resultante de la autofecundación de este individuo también segregará en la proporción mendeliana 1:2:1.

Alelos nulos. Estos alelos, que son raros, determinan la ausencia de bandas en el gel; el fenómeno puede deberse a polipéptidos defectuosos incapaces de desarrollar actividad enzimática, o a genes represores que actúan sobre loci enzimáticos causando la inactividad de algunos alelos.

Digitized by Google

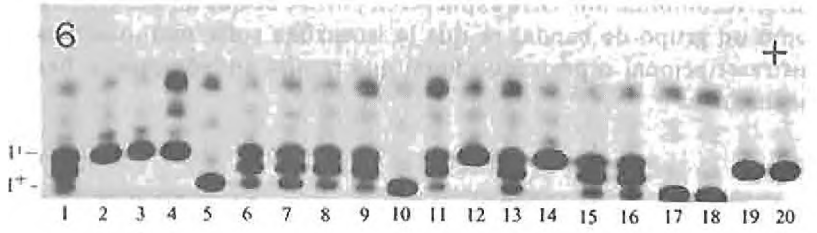


Figura 37.6. Zimogramas del tomate para el locus dimérico Adh-1, origen de la enzima alcohol-deshidrogenasa. Los individuos que representan fenotipos con tres bandas son heterocigóticos para los alelos Adh-1^1 y Adh-1^+ (por ejemplo, las líneas 1, y 6 a 9 contando desde la izquierda).

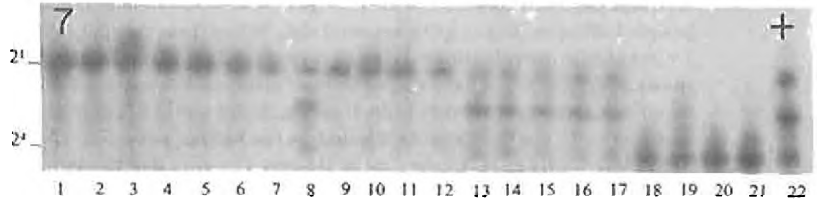


Figura 37.7. Zimogramas del brócoli para el locus dimérico Pgm-2. Los individuos heterocigóticos para los alelos Pgm-2^1 y Pgm-2^4, caracterizados por tres bandas, se muestran en las líneas 8, 13 a 17, y 22, contando desde la izquierda. En este caso se pueden apreciar también bandas 'sombras' producidas por cada alelo, que se hacen evidentes en los híbridos como bandas tenues entre las tres bandas principales de mayor intensidad.

Los alelos nulos se comportan como recesivos, lo que impide detectar individuos heterocigóticos (Figura 37.8); por tanto, un individuo heterocigótico para un alelo nulo, al ser autofecundado, segregará según la razón mendeliana 3:1, 3 para presencia y 1 para ausencia de la alozima (en el recesivo homocigótico). En este caso no se puede igualar el genotipo con el fenotipo, ya que los genotipos homocigóticos dominantes y los heterocigóticos tendrán el mismo fenotipo. Cuando la concentración de la muestra es baja, no se observan bandas en el gel, resultado que se confunde con un fenotipo nulo; en estos casos, es recomendable repetir el ensayo con muestras más concentradas.

Digitized by Google

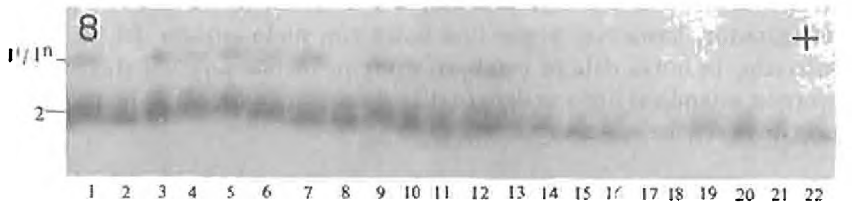


Figura 37.8. Zimogramas de la alfalfa correspondientes a plantas homocigóticas respecto al alelo nulo Lap-1^n (líneas 2, 8, y 13 a 22, contando desde la izquierda). Los demás individuos en este gel son homocigóticos para el alelo Lap-1^1 o heterocigóticos para ambos alelos. La banda inferior, de migración lenta, corresponde a un segundo locus, Lap-2.

Electroforesis horizontal en geles de almidón

Esta es la técnica más versátil, económica y práctica para el estudio de las isoenzimas en plantas y, por tanto, la que se tratará en este capítulo. La resolución de la mayoría de las isoenzimas obtenidas con esta técnica es bastante buena; para algunas enzimas, es mejor aún que en geles de poliacrilamida. La gran ventaja de los geles de almidón es que se cortan en tajadas, cada una de las cuales se puede ensayar en un sistema enzimático diferente; otra de sus ventajas es que en ellos se pueden analizar extractos sin purificar, y una tercera, la inocuidad del almidón porque no posee toxicidad alguna. Los recursos necesarios para desarrollar esta técnica son mínimos; en su mayor parte, el equipo puede construirlo el mismo investigador.

El sistema consta básicamente de los siguientes elementos:

- Un molde para formar el gel.
- Dos depósitos (reservorios), uno en cada extremo del molde, para contener la solución tampón (o 'bófer'); cada depósito está provisto de un electrodo: uno de ellos es el polo positivo o ánodo y el otro el polo negativo o cátodo, en el sistema.
- Dos toallas, esponjas, o cualquier otro material absorbente para poner en contacto la solución tampón con el gel.
- Una unidad de corriente continua, como fuente de poder, capaz de producir 40 watios (400 voltios, 100 mA).

Digitized by Google

El gel y los depósitos se colocan en un refrigerador para llevar a cabo la electroforesis a una temperatura de 2 a 5 °C. Si no se dispone de un refrigerador, basta con poner una bolsa con hielo encima del gel para enfriarlo; la bolsa deberá cambiarse por lo menos una vez durante el proceso, cuando el hielo se derrita. El gel se enfría para evitar la inactivación de las enzimas por el calor.

Los moldes para vaciar los geles son diferentes en uno u otro laboratorio, y su tamaño depende básicamente del número de muestras que se quieren ensayar en cada gel. El grosor de los geles se determina por número de tajadas que se desea obtener de cada uno o, en otras palabras, por el número de sistemas enzimáticos que se quiera ensayar; por lo regular tienen de 6 a 9 mm porque las tajadas que se obtienen son de aproximadamente 1.5 mm. Tanksley (1979), Cardy et al. (1981), Quirós (1981), y Shields et al. (1983) presentan en forma detallada varios diseños para la construcción del equipo de electroforesis en almidón.

Las recetas de geles son también muy variadas, y su elección depende de la especie y de las enzimas que se estudian. La combinación de geles de tris-citrato (pH 7.8) e histidina (pH 5.7) es muy versátil, y se recomienda usarlos primero para ensayar especies que no hayan sido estudiadas antes. Las recetas para prepararlos, así como las soluciones tampones para los depósitos, se muestran en el Cuadro 37.1.

Quirós (1981) describe el procedimiento para la preparación de geles que puede resumirse en las siguientes líneas. Se prepara el volumen necesario de solución tampón según el número de geles que se desee procesar; cada gel tiene, normalmente, un volumen aproximado de 250 ml. Luego se disuelve el almidón en 1/3 de la solución tampón, usando un Erlenmeyer de filtración al vacío (con salida lateral) y con ayuda de un agitador magnético; mientras tanto, se calientan los 2/3 restantes de la solución en un frasco volumétrico hasta el punto de ebullición, y en ese momento se extrae el agitador magnético. Empleando guantes aislantes del calor, se sostiene el Erlenmeyer por el cuello mientras que con la otra mano se introduce el cuello del frasco volumétrico que contiene la solución caliente, invirtiéndolo completamente; durante la maniobra, ambos frascos se mueven rotatoriamente.

La suspensión caliente de almidón se pone en la hornilla durante unos segundos hasta que empiece a hervir; se retira entonces del calor y se cierra el recipiente con un tapón de caucho. La salida lateral del Erlenmeyer que contiene el almidón se conecta a una línea de vacío y se procede a extraer el aire de la suspensión, hasta que las burbujas pequeñas desaparezcan, lo

Digitized by Google

Cuadro 37.1. Composición de las soluciones tampón para preparar tres tipos de geles, y las enzimas que se ensayan en ellos.

Gel	Depósito (solución)	Enzimas[a]
Base Trizma 0.05M Acido cítrico monohídrico 0.004M	Acido bórico 0.3M; ajustar a pH 7.8 con NaOH 1M	PRX, LAP, EST, ADH, CAT, END, GOT, GDH, FGM
L-histidina 0.065M Acido cítrico monohídrico 0.02M, pH 5.7	L-histidina 0.009M Acido cítrico monohídrico 0.003M (dilución 1:6 de la solución usada en el gel), pH 5.7	MDH, 6-FGD, LAP, FAC, FGI, PRX, SDH
Acido bórico 0.19M Hidróxido de litio 0.04M, pH 8.3	9 partes de (Base Trizma 0.05M, ácido cítrico monohídrico 0.007M, pH 8.3) por 1 parte de la solución usada en el gel	DIA, FAL AAT, PRX GDH, END

a. PRX = peroxidasa, LAP = leucina-amino peptidasa, EST = esterasa; ADH = alcohol deshidrogenasa, CAT = catalasa, END = endopeptidasa; GOT = glutamato-oxalacetato transaminasa, GDH = glutamato deshidrogenasa; FGM = fosfoglucomutasa, MDH = malato deshidrogenasa; FAC = fosfatasa ácida, FAL = fosfatasa alcalina, FGI = fosfoglucoisomerasa; DIA = diaforasa, AAT = aspartato-amino transferasa; 6-FGD = 6-glucosa-fosfato deshidrogenasa, SDH = shikimato deshidrogenasa.

FUENTE: Shields et al., 1983.

que toma menos de un minuto. El tapón debe ser suficientemente grande para que la fuerza de succión no lo arrastre por el cuello del Erlenmeyer. Una vez terminada esta operación, se retira el tapón y se vacia el almidón en los moldes, llenándolos hasta el tope; luego se cubren con una plancha limpia de vidrio, haciendo presión hasta que, al rebosar el almidón, queden bien sellados y no se sequen. Los geles se pueden preparar desde el día anterior y se pueden dejar a temperatura ambiente hasta el día siguiente.

La concentración de almidón en el gel es otro factor importante; si ésta es muy baja, el tiempo de electroforesis es menor, pero las bandas tienden a difundirse y las tajadas serán demasiado frágiles para manipularlas; generalmente se usa una concentración de 10% a 12%. Cuando se usan los geles de tris-citrato, se coloca una solución tampón de ácido bórico en las cubetas que produce un frente de migración de borato de una coloración marrón; éste avanza en el gel a medida que el tiempo de electroforesis progresa, y sirve de indicador para fijar el momento en que termina el

Digitized by Google

proceso. Cuando el frente llega a 2 cm del extremo del gel, donde está el ánodo, se desconecta la fuente de poder, y el gel se corta y se ensaya. En los geles de histidina, en cambio, no se ve frente alguno, siendo necesario insertar un papel filtro, como los usados para insertar las muestras, que contiene una solución de azul bromofenol de 0.5 mg/ml. Con ambos tipos de geles la electroforesis dura entre 4 y 5 horas.

Para cortar el gel, se usa una sierra de calar modificada en que se sustituye la hoja aserrada por una cuerda de acero del calibre más fino, como las que se usan en las guitarras. Se puede usar también un trozo de cuerda de nylon para pescar, que se enrolla en los dedos índice de cada mano y se pasa cuidadosamente de un extremo a otro del gel. Para obtener tajadas de igual espesor, es necesario poner a ambos lados del gel unas guías de determinado grosor donde descansa el instrumento cortante; las guías se hacen con varillas de vidrio, o con listones de plástico.

Para la electroforesis de almidón no es necesario purificar las muestras de tejido. Basta con macerar en un mortero el tejido con una gota de solución tampón tris-HCl 0.5 M, pH 7.0, que contenga 1% de glutatión como agente reductor. El líquido resultante se absorbe en un trozo de papel filtro Whatman no. 3 de 10 x 3 mm aproximadamente. Para introducir las muestras en el gel, éste se corta trasversalmente a unos 4 cm del extremo que será conectado al cátodo. Los papeles filtro se insertan en el corte cada 3 mm, aproximadamente, se cierra el corte, se colocan las toallas haciendo contacto en cada extremo del gel con las cubetas respectivas, y se activa la fuente de poder a un voltaje inicial de 150 V, durante 10 min. Esta operación resulta en la trasferencia de las proteínas de los papeles filtro al gel. Se desconecta la fuente de poder y se retiran los papeles de filtro con la ayuda de unas pinzas; se vuelve a cerrar el corte en el gel, y se procede a hacer la electroforesis a 300 V.

Se ensaya rutinariamente la misma muestra en dos geles a un mismo tiempo, porque se obtiene la máxima información cuando se identifica el mayor número posible de enzimas. Se preparan, por tanto, dos de los papeles filtro antes descritos por cada individuo que se muestree; uno de los papeles va a un gel de tris-citrato y el otro a un gel de histidina. Por ejemplo, para *Brassica* sp., en el primer gel se ensayan peroxidasa anódica, fosfoglucomutasa, glutamato-oxaloacetato transaminasa y esterasa, mientras que en el de histidina se ensayan leucina-amino peptidasa, fosfoglucoisomerasa, fosfatasa ácida y malato deshidrogenasa. Los procedimientos de ensayo para estas enzimas, y para muchas otras más, han sido recopiladas por Vallejos (1983).

Digitized by Google

Isoenzimas en la Identificación de Híbridos

Híbridos intraespecíficos e interespecíficos

El uso de las isoenzimas en la identificación de híbridos se basa en la codominancia, una propiedad que las caracteriza y que permite la detección de genotipos heterocigóticos. Por ello, las isoenzimas se usan extensivamente para la detección de híbridos sexuales o somáticos. Es posible que, en híbridos intraespecíficos o interespecíficos, se deba ensayar un número mayor de sistemas enzimáticos para encontrar suficientes isoenzimas que difieran en ambos padres. Esta condición depende, por supuesto, de la variabilidad genética de las especies con que se trabaje. Por ejemplo, si se desea detectar híbridos entre variedades diferentes de tomate (*Lycopersicon esculentum*), una de las pocas enzimas que puede usarse (Figura 37.6) es la alcohol deshidrogenasa (Tanksley y Jones, 1981) ya que la variabilidad respecto a isoenzimas en esta especie es mínima. Por el contrario, si se desea detectar híbridos entre el tomate cultivado y sus especies silvestres, son muchas las enzimas que se pueden usar para este propósito; así por ejemplo, Vallejos y Tanksley (1983) produjeron híbridos entre *L. esculentum* y *L. hirsutum* heterocigotos para 17 loci enzimáticos, mientras que Tanksley et al. (1981) obtuvieron híbridos entre *L. esculentum* y *L. penellii* heterocigotos para 12 loci enzimáticos. Otro ejemplo, también en el género *Lycopersicon*, es la identificación de híbridos somáticos por fusión de protoplastos entre *L. peruvianum* y *L. penellii* partiendo de cinco loci heterocigóticos.[2] En apio (*Apium graveolens*) la variabilidad es muy restringida, y aunque a menudo se observan diferencias entre variedades, el número de alozimas para cada uno de los 10 loci estudiados (Figura 37.1) no es mayor de tres (Orton, 1983). Las diferencias entre el apio y otras umbelíferas son mucho más conspicuas; por ejemplo, Madjarova y Bubarova (1978) identificaron híbridos entre apio y perejil basados en zimogramas de peroxidasas. Estudios hechos en este laboratorio indican que ambas especies se caracterizan por alozimas diferentes para ocho enzimas que fueron ensayadas.[3]

En las coles (*Brassica oleracea*) la variabilidad dentro de las diferentes variedades hortícolas (brócoli, coliflor, repollo y otras) y entre ellas es muy extensa y permite la identificación de híbridos (Figuras 37.3 y 37.7) de manera rutinaria (Arús et al., 1982). Muchas casas productoras de semillas

2. Información sin publicar (Adams y Quirós).
3. Información sin publicar (Quirós).

Digitized by Google

usan isoenzimas para determinar el porcentaje de contaminación, con líneas parentales, de variedades híbridas F_1. Esta técnica puede servir también para identificar las líneas parentales de los híbridos registrados.

En especies tetraploides, como la alfalfa (*Medicago sativa*) y la papa (*Solanum tuberosum*), también es posible identificar híbridos pero empleando geles más complejos, debido a la posibilidad de encontrar plantas tetraalélicas, es decir, heterocigóticas para cuatro alelos en un mismo locus (Figura 37.4). Estas especies se encuentran también como diploides, lo que ha facilitado el estudio de la herencia de varias isoenzimas a este nivel[4] que es mucho menos complejo (Quirós y Morgan, 1981). Además, se han investigado otras especies diploides relacionadas con estos dos cultivos. Por ejemplo, en las especies anuales *Medicago turbinata* y *M. truncatula* los híbridos interespecíficos fueron detectados (Figura 37.2) mediante las isoenzimas de leucina-amino peptidasa (Quirós y Ostafichuk, 1983).

Estos ejemplos indican que el número de sistemas disponibles para el investigador es muy grande, y que fácilmente se hallan suficientes diferencias especialmente en los híbridos interespecíficos.

Híbridos intergenéricos

Es más probable encontrar diferencias enzimáticas entre las especies parentales que forman parte de estos híbridos, los cuales se obtienen casi exclusivamente mediante fusiones de células somáticas. Lo Schiavo et al. (1983) resumen varios casos en los que se han identificado híbridos somáticos entre géneros y especies diferentes (Cuadro 37.2). La interpretación de los zimogramas de estos híbridos es con frecuencia difícil por la falta de integración entre los genomios de las especies parentales, o por la eliminación preferencial de cromosomas de una de las especies. Hay casos en que no se forman heterodímeros o bandas híbridas, quizás por la falta de homología entre los polipéptidos de ambas especies. Otra dificultad de la interpretación puede ser la presencia de bandas inesperadas relacionadas con los genotipos de los padres, sobre todo cuando se analiza tejido proveniente de callos; este fenómeno puede deberse a la expresión de genes que son activos en el callo pero no lo son en los tejidos normales de la planta. Por ejemplo, en papa y en alfalfa, los zimogramas de peroxidasas observados en callos son bastante diferentes de aquellos observados en las raíces de las plantas que los originaron (Figuras 37.9 y 37.10). En estos

4. Información sin publicar (Quirós y McHale).

Digitized by Google

Cuadro 37.2. Enzimas usadas para la identificación de híbridos intergenéricos obtenidos por fusión somática.

Especies hibridadas	Enzimas indicadoras
Nicotiana glauca + *Glycine max*	aspartato-amino transferasa alcohol deshidrogenasa
Petunia hybrida + *Parthenocyssus tricuspidata*	peroxidasa
Daucus carota + *Petroselinum hortense*	esterasa, glutamato-oxalacetato transaminasa, 6-glucosa-fosfato deshidrogenasa
Solanum tuberosum + *Lycopersicon esculentum*	Proteína, fracción I
Arabidopsis thaliana + *Brassica campestris*	esterasa, peroxidasa, alcohol deshidrogenasa, lactato deshidrogenasa

FUENTE: Lo Schiavo et al., 1983

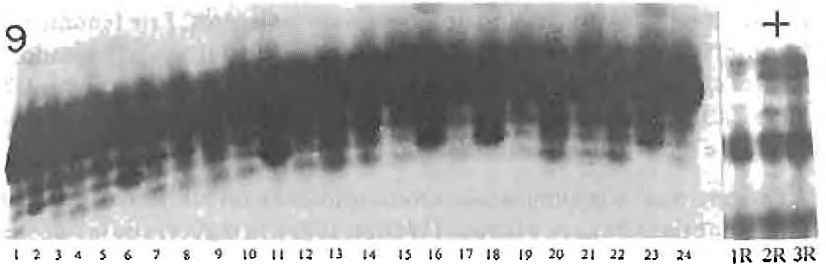


Figura 37.9. Zimogramas de la peroxidasa obtenidos de callos provenientes de una planta de papa. Los callos de las líneas 2, 6, 11, 16, 18 y 23 han perdido la banda de menor migración, por variación somaclonal inducida por el cultivo de estos tejidos durante un período extenso. Las tres últimas líneas representan los zimogramas de la planta madre obtenidos de raíces, como referencia para mostrar las diferencias de expresión genética entre ambos tejidos.

Digitized by Google

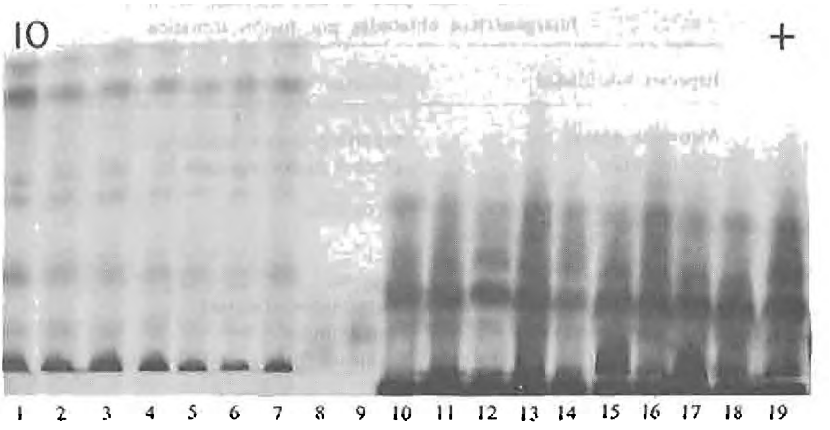


Figura 37.10. Zimogramas de la peroxidasa en alfalfa. Las siete primeras líneas, contando desde la izquierda, corresponden a raíces de plantas con el mismo fenotipo. Las líneas 10 a 19 corresponden a callos obtenidos de una de estas plantas. Son visibles las diferencias de expresión en ambos tejidos.

casos es indispensable usar, como testigos, callos obtenidos de las plantas parentales. Además, cuando los tejidos han pasado por varios ciclos de cultivo, sufren con frecuencia aberraciones cromosómicas y mutaciones que en conjunto se conocen como variación somaclonal; estas alteraciones pueden modificar el genotipo de las plantas resultantes. Este fenómeno se ha observado en apio (Orton, 1983), en papa[5] y en alfalfa[6] y ha causado, en los tres casos, la pérdida de expresión de algunas alozimas. La Figura 37.9 muestra un ejemplo de este fenómeno en callos de papa obtenidos partiendo de protoplastos de mesófilo.

Cuando ocurre la eliminación cromosómica en un híbrido, como en las células híbridas de soya y tabaco (Wetter, 1977), la mayoría de las isoenzimas de estas células son la expresión del genoma de aquel padre del cual se conservan los cromosomas; en el ejemplo citado, los cromosomas de la soya permanecen, pero los del tabaco son eliminados. El fenotipo del producto resultante de esta fusión se acercó mucho al de la soya, y tenía muy pocas isoenzimas del tabaco, que también fueron eliminadas con el trascurso del tiempo. Después de ocho meses de cultivo, de la línea híbrida se obtenían los zimogramas típicos de la soya.

5. Quirós y Jayne. Información sin publicar.
6. Quirós y Schipper. Información sin publicar.

Digitized by Google

En híbridos obtenidos entre especies taxonómicamente tan diferentes como las mencionadas antes se recomienda ensayar el mayor número posible de enzimas, dando preferencia a las monoméricas, para evitar confusiones debidas a la ausencia de heterodímeros en casos de discordancia genética. Siempre se deben incluir en el mismo gel las plantas parentales, como testigos, obteniendo las muestras de un mismo tejido; así se podrá determinar con precisión el fenotipo de los híbridos para facilitar su identificación.

Otras Aplicaciones de las Isoenzimas

Muchos usos se pueden dar a las isoenzimas como marcadores genéticos: así como identifican híbridos, también detectan individuos homocigóticos, una aplicación inmediata en programas dirigidos a la obtención de haploides. Si se parte de plantas heterocigóticas respecto a varios loci de isoenzimas, los haploides que se originen o los diploides doblados a partir de tejidos haploides serán hemicigotos y homocigotos, respectivamente; éstos se expresarán en el gel como fenotipos de una sola banda enzimática. Este procedimiento ha sido usado por Munyón y Tanksley (1984) en *Capsicum* sp.

Las isoenzimas también se usan para identificar poliploides cuando se cruzan plantas de genotipos diferentes. Por ejemplo, si se obtienen tetraploides a partir de una planta diploide que es heterocigótica para cierto locus enzimático, y ésta se cruza luego con individuos diploides que son homocigóticos para un tercer alelo en ese locus, los triploides resultantes se manifestarán mediante un fenotipo trialélico.

El hallazgo de ligamiento entre isoenzimas y genes que gobiernan características cuantitativas ha permitido estimar el número de genes e interacciones genéticas que determinan esas características. Rick (1983) presenta varios ejemplos de esta aplicación en el tomate.

Rick (1983) resume otros usos de las isoenzimas en plantas, tomando como modelo el tomate. Por ejemplo, la selección de plantas resistentes a nematodos se hace partiendo de la enzima fosfatasa ácida: la alozima Aps-1^1 está ligada al gen Mi que confiere resistencia a *Meloidogyne incognita*, de modo que no es necesario inocular las plantas para seleccionar los fenotipos resistentes; basta con muestrear los tejidos de las hojas y obtener sus zimogramas de fosfatasa ácida. Otro ligamiento muy útil se ha encontrado en el tomate entre el locus de peroxidasa, Prx-2, y el gen *ms-10* que confiere esterilidad masculina; en este caso los fenotipos de peroxidasa

Digitized by Google

son el criterio para detectar, antes de la floración, plantas homocigóticas o heterocigóticas para esterilidad masculina.

Las isoenzimas se usan también para determinar porcentajes de polinización cruzada prácticamente en cualquier cultivo; dado que caracteres como ése (isoenzimas) no afectan la morfología de las plantas, éstas no sufren discriminación por parte de los insectos polinizadores.

Esta técnica puede tener muchas otras aplicaciones que estarían limitadas sólo por la imaginación del investigador. En este capítulo no se mencionan los estudios en que se han empleado estos marcadores genéticos para estudiar la dinámica de poblaciones y la evolución en muchas especies de plantas, porque tales trabajos son muy extensos.

Nuevas Técnicas para Desarrollar Marcadores Genéticos

La nueva técnica de los fragmentos de restricción de ADN prueba ser aún más eficaz que la de las isoenzimas, ya que los marcadores genéticos se identifican a nivel del ADN, antes de la trascripción y traducción de éste. En algunos casos, la expresión de estos genes sufre modificaciones postrascripcionales en el proceso, que pueden confundir la lectura de los geles. En otras circunstancias, la expresión de las isoenzimas varía en los diferentes órganos de las plantas, lo que no ocurre con los fragmentos de restricción.

Cuando esta técnica emplea ADN del núcleo celular, equivale a la técnica de las isoenzimas pero con las ventajas ya descritas. Si además se practica con el ADN de cloroplastos y mitocondrias, se puede obtener información precisa sobre la constitución citoplasmática de los híbridos que resultan de las fusiones somáticas. Esta técnica es muy valiosa; sin embargo, es mucho más laboriosa, más costosa, y requiere el manejo de isótopos radioactivos. Beckmann y Soller (1983) consideran el potencial de los fragmentos de restricción del ADN como técnica aplicable a la fitotecnia.

Referencias

Arús, P.; Tanksley, S. D.; Orton, T. J. y Jones, R. A. 1982. Electrophoretic variation as a tool for determining seed purity and for breeding hybrid varieties of *Brassica oleracea*. Euphytica 31:417-428.

Digitized by Google

Beckmann, J. S. y Soller, M. 1983. Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement: Methodologies, mapping and costs. Theor. Appl. Genet. 67:35-43.

Cardy, B. J.; Stuber, C. W. y Goodman, M. M. 1981. Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from maize (*Zea mays* L.). Institute of Statistics. Mimeo Series No. 1317. North Carolina State University, Raleigh, NC, E.U.

Gottlieb, L. D. 1971. Gel electrophoresis: A new approach to the study of evolution. BioSci. 21:939-944.

Hunter, R. L. y Markert, C. L. 1957. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. Science 125:1294-1295.

Lo Schiavo, F.; Mela, L.; Nuti Ronchi, V. y Terzi, M. 1980. Electrophoretic mobility of isozymes from different plant species and its possible use in identifying cell hybrids. Plant Sci. Lett. 18:45-55.

———; Giuliano, G. y Terzi, M. 1983. Identifying natural and parasexual hybrids. En: Tanksley, S. D. y Orton, T. J. (eds.). Isozymes in plant genetics and breeding. Part A. Elsevier, Amsterdam, Holanda. p. 305-312.

Madjarova, D. J. y Bubarova, M. G. 1978. New forms obtained by hybridization of *Apium graveolens* and *Petroselinum hortense*. Acta Horticulturae 73:65-72.

Markert, C. L. y Moller, F. 1959. Multiple form of enzymes: Tissue ontogenetic, and species specific patterns. Proc. Natl. Acad. Sci. (E.U.) 45:753-763.

McMillin, D. E. 1983. Plant isozymes: A historical perspective. En: Tanksley, S. D. y Orton, T. J. (eds.). Isozymes in plant genetics and breeding. Part A. Elsevier, Amsterdam, Holanda. p. 3-13.

Munyón, I. P. y Tanksley, S. D. 1984. Spontaneous and induced variation in diploid and haploid peppers (*Capsicum annuum* L.). HortSci. 19:545.

Orton, T. J. 1983. Celery and celeriac (*Apium graveolens* L.). En: Tanksley, S. D. y Orton, T. J. (eds.). Isozymes in plant genetics and breeding. Part B. Elsevier, Amsterdam, Holanda. p. 351-367.

Peirce, L. C. y Brewbaker, J. L. 1973. Applications of isozyme analysis in horticultural science. HortSci. 8:17-22.

Prakash, S.; Lewontin, R. C. y Hubby, J. L. 1969. A molecular approach to the study of genetic heterozygosity in natural populations; IV: Patterns of genetic variation in central, marginal and isolated populations of *Drosophila pseudoobscura*. Genetics 61:841-858.

Quirós, C. F. 1975. Exine pattern of a hybrid between *Lycopersicon esculentum* and *Solanum pennellii*. J. Hered. 66:45-47.

Digitized by Google

———. 1981. Starch gel electrophoresis technique used with alfalfa and other *Medicago* species. Can. J. Plant Sci. 61:745-749.

———. 1983. Alfalfa, Luzerna. En: Tanksley, S. D. y Orton, T. J. (eds.). Isozymes in plant genetics and breeding. Part B. Elsevier, Amsterdam, Holanda. p. 253-294.

——— y Morgan, K. 1981. Peroxidase and leucine-aminopeptidase in diploid *Medicago* species closely related to alfalfa: Multiple gene loci, multiple allelism and linkage. Theor. Appl. Genet. 60:221-228.

——— y Ostafichuk, L. 1983. Allozymes and genetic variability in *Medicago turbinata*, *M. truncatula*, and their hybrids. Can. J. Genet. Cytol. 25: 286-291.

Rick, C. M. 1960. Hybridization between *Lycopersicon esculentum* and *Solanum pennellii*: Phylogenetic and cytogenetic significance. Proc. Natl. Acad. Sci. (E.U.) 46:78-82.

———. 1983. Tomato. En: Tanksley, S. D. y Orton, T. J. (eds.). Isozymes in plant genetics and breeding. Part B. Elsevier, Amsterdam, Holanda. p. 147-165.

———; Tanksley, S. D. y Fobes, J. F. 1979. A pseudoduplication in *Lycopersicon pimpinellifolium*. Proc. Natl. Acad. Sci. (E.U.) 76:3435-3439.

Shields, C. R.; Orton, T. J. y Stuber, C. W. 1983. An outline of general resource needs and procedures for the electrophoretic separation of active enzymes from plant tissue. En: Tanksley, S. D. y Orton, T. J. (eds.). Isozymes in plant genetics and breeding. Part A. Elsevier, Amsterdam, Holanda. p. 443-468.

Smithies, O. 1955. Zone electrophoresis in starch gels. Biochem. J. 61-629.

Tanksley, S. D. 1979. An efficient and economical design for starch gel electrophoresis. Rept. Tomato Genet. Coop. 29:37-38.

——— y Jones, R. A. 1981. Application of alcohol dehydrogenase allozymes in testing for the genetic purity of F_1 hybrids of tomato. HortSci. 16:179-180.

———; Medina-Filho, H. y Rick, C. M. 1981. The effect of isozyme selection on metric characters in an interspecific backcross of tomato: Basis for an early screening procedure. Theor. Appl. Genet. 60:291-296.

Vallejos, C. E. 1983. Enzyme activity staining. En: Tanksley, S. D. y Orton, T. J. (eds.). Isozymes in plant genetics and breeding. Part A. Elsevier, Amsterdam, Holanda. p. 469-516.

——— y Tanksley, S. D. 1983. Segregation of isozyme markers and cold tolerance in an interspecific backcross of tomato. Theor. Appl. Genet. 66:241-247.

Wetter, L. R. 1977. Isozyme patterns in soybean-*Nicotiana* somatic hybrid cell lines. Molec. Gen. Genet. 150:231-235.

Digitized by Google

Capítulo 38

Detección de viroides y virus con técnicas de ADN recombinante

L. F. Salazar*

* Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú.

Digitized by Google

Introducción

Aun cuando las técnicas inmunológicas (e.g., ELISA) han demostrado alta sensibilidad para el diagnóstico de virus en las plantas, no son aplicables a la detección de viroides o de ciertos virus cuya entidad infectiva ocurre naturalmente como ácido nucleico desprovisto de la cubierta proteínica. Asimismo, la dificultad de producir antisueros para algunos virus —ya sea por la inestabilidad de sus partículas, por su íntima asociación con ciertos tejidos u orgánulos del huésped, o por su baja concentración— limitan el valor de la serología en esos casos.

Recientemente, los avances logrados en la investigación de los ácidos nucleicos han mejorado las técnicas de hibridación de moléculas complementarias ADN-ADN y ARN-ADN. La capacidad de hibridación de los ácidos nucleicos complementarios es la base para desarrollar métodos de diagnóstico de viroides y virus. Para facilitar la aplicación del método, el ácido nucleico que debe detectarse se fija a un soporte sólido (filtro o membrana) para que la sonda ('probe') en solución pueda hibridarse sobre ese ácido nucleico ya fijado en la membrana. Por esta razón la técnica se conoce también como gota adsorbida ('dot blot'). El desarrollo y la aplicación de esta técnica se describen en el presente trabajo.

Detección del PSTV por Hibridación de Acidos Nucleicos

La detección del viroide del tubérculo ahusado de la papa (PSTV) mediante ensayos de infectividad en tomate (Raymer y O'Brien, 1962) o por electroforesis (Morris y Wright, 1975) en geles de poliacrilamida es muy laboriosa, poco sensitiva y costosa; por consiguiente, el diagnóstico del PSTV constituye un ejemplo de la necesidad de aplicar las nuevas técnicas del ADN recombinante. Estas técnicas son de especial valor cuando se aplican a plántulas provenientes del cultivo de tejidos. La técnica, en general, está basada en la hibridación de un ADN complementario del PSTV (PSTVcADN) estando el PSTV adherido a un soporte sólido. Cuando el PSTVcADN es altamente radioactivo, los híbridos ADN-ARN pueden detectarse por autoradiografía (Owens y Diener, 1981). Sin embargo, existe la posibilidad de utilizar un 'marcador' no radioactivo (Langer et al., 1981), aunque los intentos iniciales de usarlo en el CIP no han sido del todo satisfactorios (CIP, 1983).

Digitized by Google

Construcción de sondas PSTVcADN y clonamiento molecular

El clonamiento molecular y la caracterización del PSTVcADN de doble cadena (ds) se hizo más fácil cuando se conoció la secuencia del ARN del PSTV (Gross et al., 1978). Posteriormente, un dsPSTVcADN fue sintetizado e insertado en el sitio específico para la endonucleasa Pst I del plásmido pBR322. Todos los clones recombinantes obtenidos por este sistema contenían una copia incompleta del PSTV (Owens y Cress, 1980). Los análisis en que se empleaban enzimas de restricción sugirieron que dos clones (pDC 22 y pDC 29) tenían secuencias parcialmente traslapadas; por ello fueron combinados para intentar la construcción de un clon que tuviese la longitud total del PSTV. El nuevo fragmento fue clonado en el plásmido pBR322 y los clones resultantes demostraron (Diener et al., 1982) que contenían la longitud y la secuencia del PSTV (dsPSTVcADN). Este ADN se mantiene en el plásmido pBR322, y después de purificarlo de la bacteria *E. coli*, se marca con ^{32}P y se utiliza para detectar el PSTV.

Diagnóstico del PSTV por hibridación de ácidos nucleicos

El procedimiento para el diagnóstico del PSTV en tejido vegetal (Salazar et al., 1983) se ha esquematizado en la Figura 38.1.

Reactivos y materiales. Se necesitan los siguientes elementos:

1. Sonda PSTVcADN marcada con ^{32}P mediante síntesis de reparación; los detalles para la extracción y el marcado de la sonda están ampliamente difundidos (Maniatis et al., 1982).

2. Membranas de nitrocelulosa; ej: BA85 (Schleicher & Schuell, New Hampshire, USA).

3. Reactivos indicados en el procedimiento.

4. Materiales para autoradiografía.

Homogeneización de la muestra. El bófer utilizado tiene, relativamente, una alta concentración iónica que permite la liberación del PSTV-ARN del núcleo, en tanto que el dietilditiocarbamato (DIECA) y el ditiotreitol (DTT) inhiben la oxidación enzimática de los polifenoles. Hay varias alternativas para homogeneizar el tejido; se pueden utilizar homogeneizadores cónicos de vidrio, morteros, o pequeñas bolsas de plástico. Este

Digitized by Google

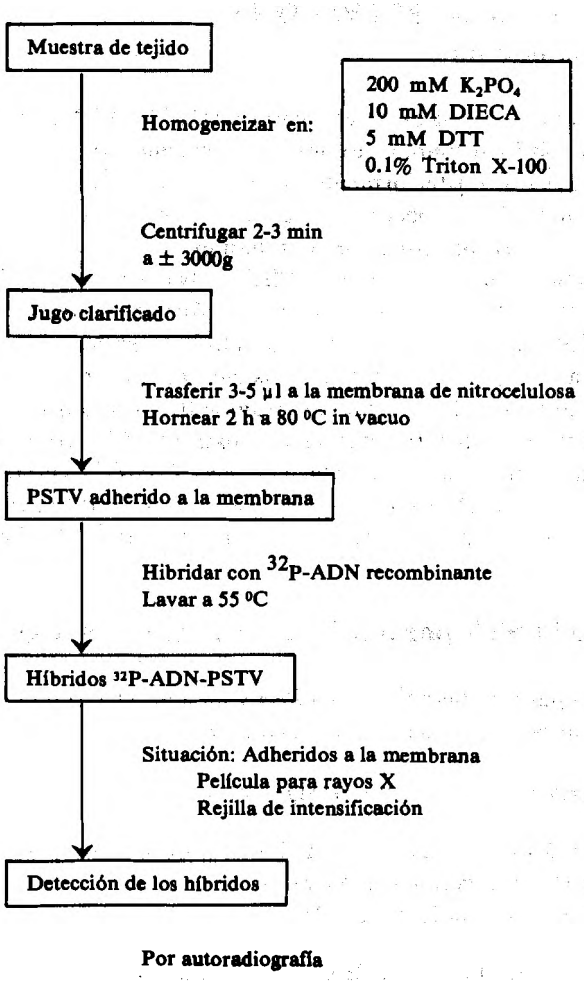


Figura 38.1. Esquema del procedimiento de detección del PSTV por hibridación de ácidos nucleicos.

último recurso, bastante simple, evita el uso de gran cantidad de material de vidrio y, lo que es más importante, reduce la posibilidad de contaminar el tejido.

La cantidad de bófer que se utilizará depende del material que se prueba y de la sensibilidad del sistema, la cual se determina generalmente probando una serie de diluciones. En el CIP se utilizan de 1 a 1.5 ml de buffer

Digitized by Google

por gramo de tejido (hojas, tubérculos o brotes de tubérculos) ó 0.2 ml por cada 20 ó 30 semillas. La clarificación por centrifugación (2000-3000 rpm) es conveniente pero no absolutamente necesaria.

Trasferencia de las muestras a la membrana de nitrocelulosa. De cada muestra, una gota de 3 a 5 µl del extracto se coloca cuidadosamente en la membrana de nitrocelulosa. Para identificar la posición de cada muestra se toma como referencia una de las esquinas de la membrana (un pequeño corte es suficiente). Las membranas que ya contienen las muestras deben secarse en un horno, preferiblemente al vacío, a 80 °C durante 2 horas.

Hibridación. La reacción de hibridación se puede realizar como se describió anteriormente (Wahl et al., 1979). La prehibridación no parece tener un efecto marcado y puede remplazarse por un breve mojado de la membrana en el buffer de hibridación (5-10 min a 20-25 °C). El bófer de hibridación está compuesto de formamida 40% (v/v), NaCl 0.18M, cacodilato de sodio 10 mM, EDTA 1 mM, dodecilsulfato de sodio 0.1%, y 400 µg/ml de ARN de trasferencia obtenido de levadura; el pH del bófer es 7.0. La hibridación tarda 24 horas a 55 °C en el bófer de hibridación que contiene 10% de sulfato de dextrano y PSTVcADN marcado con ^{32}P por medio de síntesis de reparación (1 a 2.5 x 10^6 cpm/ml). La relación entre el volumen del bófer y el área de la membrana es de 1 ml por cada 35 cm^2. El PSTVcADN marcado se desnaturaliza por calentamiento durante 2 min a 100 °C en presencia de 50% de formamida, antes de añadirlo a la reacción de hibridación.

Autoradiografía. Las membranas se lavan a 55 °C con cinco cambios de un tampón de NaCl 0.36 M, Tris-HCl 10 µM (pH 7.5), y dodecilsulfato de sodio 0.1%. Dos lavados adicionales con el mismo tampón diluído 10 veces son también necesarios.

La autoradiografía se genera en un lapso de 24 a 48 hr a -70 °C utilizando película apropiada para autoradiografía, por ejemplo Kodak X-Omat, y rejillas de intensificación como las Dupont Cronex Lightning-Plus. El proceso es muy simple: sólo requiere asegurar la membrana, la rejilla de intensificación y la película, y envolver el conjunto con papel de aluminio.

Lectura e interpretación de los resultados. Los resultados son observables normalmente a simple vista; sin embargo, las muestras que contienen una baja concentración del viroide reaccionan muy levemente. Estas reacciones son más fácilmente distinguibles si se observan los negativos ligeramente inclinados o sobre una mesa iluminada con fondo claro. Bajo las

Digitized by Google

condiciones del CIP y de Beltsville, Estados Unidos, este proceso es altamente sensitivo: hasta 10 veces más, por lo regular, que la electroforesis en geles de poliacrilamida.

En la Figura 38.2 se observa una serie de extractos de semillas infectadas y sanas en las cuales el PSTV ha sido diagnosticado por hibridación de ácidos nucleicos.

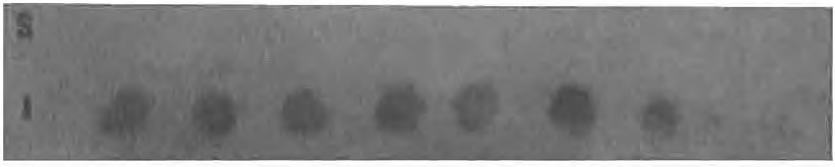


Figura 38.2. Resultados de una prueba típica para la detección del PSTV por hibridación de ácidos nucleicos. S = muestra de semilla botánica de papa libre de PSTV (20 semillas en 0.2 ml de bófer). I = siete lotes de semilla botánica de papa infectada con el PSTV.

Otros Usos Posibles del Método de Hibridación

Este método sería muy útil para diagnosticar, además de los viroides, los virus convencionales para los cuales las pruebas inmunológicas no sean prácticas. Asimismo, los virus con partículas lábiles o aquéllos cuyas cubiertas proteínicas son muy poco antigénicas podrían detectarse fácilmente con este sistema. Evidentemente, no se requiere de una sonda que contenga la secuencia completa del virus que se diagnostica, sino de una que sea suficientemente específica y alcance, por lo menos, la sensibilidad de detección de métodos inmunológicos como ELISA. La ventaja de la aplicación de esta técnica ha sido demostrada con el 'tobacco rattle virus', el cual ocurre a menudo como ácido nucleico sin cubierta proteínica (Harrison y Robinson, 1982). En otros virus, a los cuales los métodos inmunológicos son fácilmente aplicables (Palukaitis y Symons, 1980), este método parece tener un gran valor para identificarlos y para determinar relaciones entre ellos y sus cepas. Sin embargo, no se ha demostrado aún su aceptación como criterio de diferenciación.

La aplicación de esta técnica para evaluar plántulas que posean resistencia a los virus ya ha sido mencionada[1] aunque los detalles del proceso no

1. Flavell, R. B. Trabajo presentado en 'IARC's and Biotechnology', International Rice Research Institute (IRRI), Los Baños, Filipinas, abril 1984

Digitized by Google

han sido revelados. Puesto que el método sólo requiere pequeñas cantidades del tejido que se debe probar, la hibridación de ácidos nucleicos es de un valor incalculable para la detección de viroides y virus en plántulas provenientes del cultivo de tejidos. Es ella especialmente valiosa en el diagnóstico del PSTV tanto antes y después de cortar los meristemas como en plántulas provenientes de ellos durante el proceso de eliminación del viroide por tratamiento en frío (Lizárraga et al., 1980).

La eliminación del PSTV es muy difícil y laboriosa y requiere de un método como el antes descrito, que permita una detección temprana; ahorra también mucho tiempo, y reduce la posibilidad de contaminar tejidos sanos porque facilita la eliminación temprana del material afectado. Su sensibilidad asegura que el material seleccionado no contiene el viroide ni siquiera en concentración baja, condición en que es imposible detectarlo por métodos tradicionales como las plantas indicadoras (el tomate) o la electroforesis.

Diagnóstico de Virus por Determinación de Acidos Nucleicos Virales

El método anteriormente descrito es aplicable a aquellos virus que pueden diagnosticarse construyendo —o de preferencia, clonando— una sonda específica y marcada. El clonamiento es un requisito indispensable para mantener una sonda de dsADN estable y en cantidades ilimitadas.

Hasta hace muy poco tiempo, en el diagnóstico de virus de plantas no se había estudiado el posible valor de los segmentos homogéneos de ARN de doble cadena (dsARN) que corresponden al doble del tamaño del genoma viral (ARN de una sola cadena, ssARN) y que siempre están presentes en plantas infectadas (Jordan y Dodds, 1983). Este dsARN, así como otros de menor tamaño cuya secuencia es homóloga a la del dsARN, son formas replicativas (RF) en el proceso de infección viral (Morris et al., 1983). Estos tipos de dsARN son altamente específicos y, además, no existe en las plantas sanas ningún otro dsARN de alto peso molecular; por tanto, aquéllos resultan de gran valor en el diagnóstico viral.

Para detectar infecciones virales puede aplicarse este método en varias formas:

a. Determinando la presencia del dsARN mediante electroforesis, en geles combinados de agarosa y acrilamida, o por serología.

Digitized by Google

b. Utilizando el dsARN como una sonda de sentido (+) o (-) para detectar el ARN de sentido opuesto (ej: el genoma viral ssARN) por hibridación in situ (en los geles).

c. Usando sondas virales de ssARN (+) para determinar la presencia de cadenas de ARN (-).

d. Construyendo sondas de DNA complementario empleando el dsARN como modelo.

El uso del dsARN como sonda marcada resultaría análogo al proceso de detección del PSTV y tendría gran aplicación especialmente en aquellos virus difíciles de purificar. En virus fácilmente purificables en grandes cantidades, la utilización de sondas de ssARN (viral) podría aplicarse siempre y cuando la purificación del ácido nucleico se realice cuidadosamente. En ambos casos, disponer de grandes cantidades del ácido nucleico para construir las sondas es un requisito indispensable que se puede satisfacer manteniendo hospedantes infectados con el virus que se probará.

Conclusiones

La técnica descrita en este capítulo es aplicable a cualquier situación donde sea necesario detectar agentes virales y subvirales. Por requerir sólo de pequeñas cantidades de tejido vegetal, es de un valor incalculable para eliminar patógenos en varias etapas del cultivo de tejidos.

Esta técnica se utiliza rutinariamente en algunos programas de producción de material vegetal básico libre de virus; sin embargo, las técnicas inmunológicas de uso extendido, especialmente ELISA, ofrecen alta sensibilidad y son fácilmente aplicables para detectar virus en pequeñas cantidades de tejido. Solamente en situaciones en que los virus que se deben detectar no pueden diagnosticarse por serología, las técnicas del DNA recombinante o la detección viral por procedimientos relacionados deberían considerarse y, eventualmente, implementarse.

Referencias

CIP (Centro Internacional de la Papa). 1983. Annual report. Lima, Perú. 164 p.

Diener, T. O.; Salazar, L. F.; Owens, R. A. y Cress, D. E. 1982. New potato spindle tuber test: Implications for the future. Proceedings of the International Congress Research for the Potato in the Year 2000. Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú. p. 71-76.

Digitized by Google

Gross, H. J.; Domdey, H.; Lossow, C.; Jank, P.; Raba, M.; Alberty, H. y Sanger, H. L. 1978. Nucleotide sequence and secondary structure of potato spindle tuber viroid. Nature (Londres) 273:203-208.

Harrison, B. D. y Robinson, D. J. 1982. Use of complementary DNA to detect tobacco rattle virus in potato foliage. Proceedings of the International Congress Research for the Potato in the Year 2000. Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú. p. 93-94.

Jordan, R. L. y Dodds, J. A. 1983. Hybridization of 5'-end-labelled RNA to plant viral RNA in agarose and acrylamide gels. Plant Mol. Biol. Reptr. 1:31-37.

Langer, P. R.; Waldrop, A. A. y Ward, D. C. 1981. Enzymatic synthesis of biotin-labelled polynucleotides: Novel nucleic acid affinity probes. Proc. Natl. Acad. Sci. (E.U.) 78:6633-6637.

Lizárraga, R. L.; Salazar, L. F.; Roca, W. M. y Schilde-Rentschler, L. 1980. Elimination of potato spindle tuber viroid by low temperature and meristem culture. Phytopathology 70:754-755.

Maniatis, T.; Fritsch, E. F. y Sambrook, J. 1982. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York. 545 p.

Morris, y T. J. Wright, N.S. 1975. Detection on polyacrylamide gel of a diagnostic nucleic acid from tissue infected with potato spindle tuber viroid. Am. Potato J. 52:57-63.

——— et al. 1983. Viral specific dsRNA: Diagnostic value for plant virus disease identification. Plant Mol. Biol. Reptr. 1:27-30.

Owens, R. A. y Cress, D. E. 1980. Molecular cloning and characterization of potato spindle tuber viroid cDNA sequences. Proc. Ntl. Acad. Sci. (E.U.) 77:5302-5306.

——— y Diener, T. O. 1981. Sensitive acid rapid diagnosis of potato spindle tuber viroid disease by nucleic acid hybridization. Science 213:670-672.

Palukaitis, P. y Symons, R. M. 1980. Nucleotide sequence homology of thirteen tobamovirus RNAs as determined by hybridization analysis with complementary DNA. Virology 107:354-361.

Raymer, W. B. y O'Brien, M. J. 1962. Transmission of potato spindle tuber viroid to tomato. Am. Potato J. 39:401-408.

Salazar, L. F.; Owens, R. A.; Smith, D. R. y Diener, T. O. 1983. Detection of potato spindle tuber viroid by nucleic acid spot hybridization: Evaluation with tuber sprouts and true potato seed. Am. Potato J. 60:587-597.

Wahl, G. M.; Stern, J. y Stark, G. R. 1979. Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenzyloximethyl paper and rapid hybridization using dextran sulfate. Proc. Natl. Acad. Sci. (E.U.) 76:3683-3687.

Digitized by Google

Parte D

Apéndices

Digitized by Google

Apéndice A

Abreviaturas y acrónimos

ABA	ácido abscísico
AC	agua de coco
AcPh	(= AcP) fosfatasa ácida
AG	ácido giberélico
AIA	ácido indolacético
AIB	ácido indolbutírico
ANA	ácido naftalenacético
ANBS	Asian Network for Biological Sciences
ARS	Agricultural Research Service (E.U.)
ASIC	Association Scientifique International du Café
5-AU	5-aminouracil
AVF	'antiviral factor' (factor antiviral)
AVI	Association Universelle d'Aviculture Scientifique
B5	(ver **Medios de Cultivo...**)
BA	benciladenina
BAP	bencilaminopurina
B_{MS}	sales minerales de Murashige-Skoog
$B_{MS}\frac{1}{2}$	idem, a la mitad de su concentración
$B_{MS}x2$	idem, al doble de su concentración
B_{SH}	sales minerales de Schenck y Hildebrandt
BTOA	ácido benzotiazol-2-oxiacético
BUdR	bromodesoxiuridina
B_W	sales minerales de White
c	complementario (un ácido nucleico, p.e., cADN)
CARDI	Caribbean Agricultural Research and Development Institute (región del Caribe)
CATIE	Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (Costa Rica)
CCC	cloruro de cloro-colina (antigiberelina)
CCP	condensación cromosómica prematura
CEM	células embriogénicas madre (o maternas)
CH	caseína hidrolizada
chlADN	ADN de cloroplastos
CIAT	Centro Internacional de Agricultura Tropical
CIP	Centro Internacional de la Papa (Perú)
CIRAD	Centre de Coopération International en Recherche Agronomique pour le Développement (Francia)
CMI	Commonwealth Mycological Institute (Inglaterra)
CMS	cytoplasmic male sterility (esterilidad masculina citoplasmática)

Digitized by Google

COSTED	Committee on Science and Technology in Developping Countries
CIRAD	Centre de Coopération International en Recherche Agronomique pour le Développement (Francia)
CPD	células proembriogénicas determinadas
cpm	conteos por minuto (radiactividad)
DEAE	dietilaminoetil
DEAE-celulosa	éter de celulosa usado como material aniónico para intercambio iónico
DHA	ácido deshidroascórbico
Dieca, DIECA	dietilditiocarbamato de sodio
DKG	ácido 2,3-dicetoglucónico
DMSO	Dimetilsulfóxido
doct.	doctoral
DOPA	dihidroxifenilalanina
ds	doble cadena (double strand, en ácidos nucleicos)
DTT	ditiotreitol
EDTA	ácido etiléndiamino-tetraacético
e.g.	= por ejemplo (= exempli gratia)
EMBO Journal	European Molecular Biology Journal
EMS	sulfonato de etilmetano
ESAF	embrión somático de alta frecuencia
ESBF	embrión somático de baja frecuencia
FDA	diacetato de fluoresceína
FGI	fosfoglucoisomerasa (= PGI)
FGM	fosfoglucomutasa (= PGM)
FITC	isotiocianato de fluoresceína
Formvar	formaldehído polivinílico
FUdR	fluorodesoxiuridina
G_0	fase especial no operacional del ciclo celular
G_1, G_2	dos fases de crecimiento en el ciclo celular
GDG	grado de determinación genética
g.l., G.L.	grados de libertad
HC	hidrolizado de caseína
hib.	Híbrido
HU	hidroxiurea
IAPTC	International Association for Plant Tissue Culture
IARC	International Agricultural Research Center
IBPGR	International Board for Plant Genetic Resources
ICED	inducción de células embriogénicas determinadas
ICRO	International Cell Research Organization
IEM	inmuno-electromicroscopía
IFAS	Institute of Food and Agricultural Sciences (Florida, E.U.)
IM	índice mitótico
INEAC	Institut National pour l'Etude Agronomique au Congo
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (Argentina)

Digitized by Google

IOCV	International Organization of Citrus Virologists
2-IP	2-isopenteniladenina
IPA	N-6-isopentenilaminopurina
IRCA	Institut de Recherches sur le Caoutchouc (Francia)
IRRI	International Rice Research Institute (Filipinas)
ISEM	immuno-sorbent electron microscopy (microscopía electrónica de absorción conjugada)
ISSCT	International Society for Sugar Cane Technology
KIN	cinetina (= N-6-furfurilaminopurina)
KPT	fosfotungstato de potasio
l, lt	litro
LSU	Louisiana State University
M	fase de división mitótica en el ciclo celular
mamp	miliamperio
MB	medio basal
MD-A	(ver **Medios de Cultivo...**)
MES	ácido 2(N-morfolino)-etanosulfónico
MNNG	N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina
M.O.	materia orgánica
MS	Murashige y Skoog (medio de cultivo)
M.S.	Materia seca
msnm	metros sobre el nivel del mar (altitud)
mtADN	ADN de mitocondrias
NAA	naphtalenacetic acid (ver ANA)
NG	N-etil-N'-nitro-nitrosoguanidina
ng	nanogramo
NL	nitrógeno líquido
PBS	bófer de fosfato (phosphate buffer system)
PEG	polietilenglicol
p.e., p.ej.	por ejemplo
PI	introducción vegetal (en fitomejoramiento)
PLO	poli-L-ornitina
PM	peso molecular
Proc.	Proceedings (memorias)
PVA	alcohol polivinílico
PVC	cloruro de polivinilo
PVP-40	polivinilpirrolidona
p/v	peso respecto a volumen
RFLP	polimorfismo en longitud de los fragmentos de restricción del ADN (restriction fragment length polymorphism)
rpm, RPM	revoluciones por minuto
RRIM	Rubber Research Institute of Malaysia
S	fase del ciclo celular en que ocurre la síntesis del DNA
s, sg	segundo
S.C.	suma de cuadrados
sig.	siguiente(s)

Digitized by Google

ss	cadena simple (simple strand, en ácidos nucleicos)
SSEM	serologically specific electron microscopy (microscopía electrónica serológicamente específica)
SUNY	State University of New York (at Stony Brook, N.Y., E.U.)
TBRI	Taiwan Banana Research Institute (Pingtung, Taiwan)
TE	tejido embriogénico
TLC	cromatografía en capa delgada (thin layer chromatography)
TTC	2,3,5-cloro trifenil tetrazolio
UCLV	Universidad Central de Las Villas (Cuba)
UIB	Unidad de Investigación en Biotecnología (CIAT)
UPA	'upper amazonian' (cacao forastero del grupo alto amazónico)
USDA	United States Department of Agriculture
USTL	Université de Sciences et Techniques du Languedoc (Montpellier, Francia)
v/v	volumen respecto a volumen
ZEA	zeatina

Digitized by Google

Apéndice B

Unidades de medida y notación decimal

Símbolo	Unidad
bp	pares de bases ('base pairs')
BTU	British Thermal Unit (calor)
cc, cm^3	centímetro cúbico
cm	centímetro
dalton	unidad de masa atómica = 1/12 de la masa del ^{12}C (= 1.67×10^{-24} g)
g	gramo
g	gravedad de la Tierra
h	hora
kg	kilogramo
klx	(klux) kilolux (= mil lux)
kr	kilorad (radiación)
l, lt	litro
lx	lux (intensidad de iluminación, lm/m^2)
M	molar, molaridad (concentración)
mamp	miliamperio
mg	miligramo
ml	mililitro
mM	milimolar
μ	micra, micrón (= 10^{-6} m)
μE	microeinstein (energía)
	$\mu E/m^2$ por sg = flujo de energía lumínica
	(1 μE = 1 μmol de quanta)
μM	micromolar (concentración)
N	normal, normalidad (concentración)
nm	nanómetro = 10 angstrom, Å (= 10^{-9} m)
plg	pulgada
psi	libras por pulgada cuadrada
r	rad (radiación)
s, sg	segundo
Wm^{-2}	watios por m^2

Notación decimal

- punto decimal: 0.65, 0.02
- unidad de mil: antes de mil, sin signo: 6450; 1220
  después de 9999, con coma: 10,454
  124,380

micro = 10^{-6} nano = 10^{-9} pico = 10^{-12}

Digitized by Google

Apéndice C

Acrónimos de virus y otros patógenos

ACMV	African cassava mosaic virus
AMV	Abacá mosaic virus
APLV	Andean potato latent virus
ASBV	Avocado sun blotch viroid
Bunchy top	Banana bunchy top disease (sin clasificar)
CaERV	Carnation etched ring virus
CaLV	Carnation latent virus
CaMV	Carnation mottle virus
CaRSV	Carnation ringspot virus
CaVMV	Carnation vein mottle virus
CCMV	Cowpea chlorotic mottle virus
CLSV	Chlorotic leaf spot virus
CMD	Caribbean mosaic disease
CMV	Cucumber mosaic virus
CMV-CFS	Raza (CFS) del CMV
CPMV	Cowpea mosaic virus
CsXV	Cassava X virus
CTV	Citrus 'tristeza' virus
ChCMV	Chrysanthemum chlorotic mottle viroid
ChLRV	Cherry leafroll virus
ChMV	Chrysanthemum mosaic virus
ChSV	Chrysanthemum stunt viroid
ChTAV	Tomato aspermy virus, raza Chrysanthemum
ChVB	Chrysanthemum virus B
DMV	Dasheen mosaic virus
EMC	Encephalomyocarditis virus
FSD	Frog sking disease
GFLV	Grape fanleaf virus
GYSV	Garlic yellow stripe virus
HBV	Hoja blanca virus
NRSV	Necrotic ring spot virus
PDB	Bacteria de la enfermedad de Pierce, en la vid
PDV	Prune dwarf virus
PLPV	Plum line pattern virus
PLRV	Potato leafroll virus
PPV	Plum pox virus
PRSV	Papaya ringspot virus
PSTV	Potato spindle tuber viroid
PVA	Potato virus A
PVM	Potato virus M

Digitized by Google

PVS	Potato virus S
PVT	Potato virus T
PVX	Potato virus X
PVY	Potato virus Y
S. citri	*Spyroplasma citri*
SCV	Strawberry crinkle virus
SLCV	Strawberry latent "C" virus
SMV	Strawberry mottle virus
SMYV	Strawberry mild yellow-edge virus
SPFMV	Sweet potato feathery mottle virus
SPV-A	Sweet potato virus A
SPV-B	Sweet potato virus B
SPVMV	Sweet potato vein mosaic virus
SuCMV	Sugar cane mosaic virus
SVBV	Strawberry veinbanding virus
tipo Ilar	Del grupo Ilarvirus, p.e., el virus PDV
TMV	Tobacco mosaic virus
TRV	Tobacco rattle virus
YCSV	Virus cuero de sapo de la yuca (clasificación antigua)
YMCV	Virus del mosaico caribeño de la yuca (sin clasificar)

Digitized by Google

Apéndice D

Terminología técnica más usada en el cultivo de tejidos

Aberración cromosómica

En el sentido más amplio, es un cambio ya sea en la estructura de un cromosoma o en el número de cromosomas.

ADN complementario (cADN)

Es el ADN que complementa una secuencia de ARN. El ADN complementario es sintetizado por la trascriptasa inversa, o retrotrascriptasa ('reverse transcriptase'), enzima que es una polimerasa de ADN y utiliza ARN como cebador. La molécula de ADN de cadena simple, producida por esa enzima, se convierte en una de doble cadena por medio de la polimerasa de ADN normal (que utiliza ARN como cebador). La doble cadena de ADN producida de esta manera puede insertarse dentro de un vector de clonamiento para producir un clon de ADN complementario. El ADN complementario es una copia de una molécula de ARN procesado y no lleva, por tanto, ningún intrón que actúe como barrera para la expresión del código contenido en ese cADN.

ADN recombinante (rADN)

Molécula de ADN en la cual ciertas secuencias, que no se presentan ordinariamente en la naturaleza, se colocan una al lado de la otra mediante manipulaciones hechas in vitro. Estas secuencias heterólogas en una molécula de ADN recombinante provienen, generalmente, de organismos totalmente diferentes.

FUENTES:
- Müller, L. 1986. Glosario de cultivo de tejidos. CATIE, Turrialba, Costa Rica. (Mecanografiado.)
- McGraw-Hill dictionary of scientific and technical terms. 1989. Parker, S. (ed.). McGraw-Hill, Nueva York. 2088 p.
- Rieger, R.; Michaelis, A. y Green, M. M. 1982. Diccionario de genética y citogenética. Alhambra, Madrid. 530 p.
- Glossary; Bean Program introductory course to RFLPs isozymes and transformation. Compilado y adaptado por A. Calderón, D. I. Arias y J. Tohme, Documento Interno. Unidad de Investigación en Biotecnología (UIB), CIAT, Cali, Colombia. (Multicopiado.)

Digitized by Google

Aloploide
Planta o individuo obtenido por cruzamiento de dos o más especies o géneros; si hay un solo juego de cromosomas (genoma) el individuo será alodiploide, y si hay varios juegos, será alopoliploide.

Alozima
Sinónimo: Aloenzima
Diferentes formas de una enzima que resultan de diferentes alelos de un mismo locus.

Androgénesis
Partenogénesis masculina, es decir, desarrollo haploide de una plántula o de sus partes a partir de un núcleo masculino (gameto). La androgénesis anteral ocurre a partir de un grano de polen, ya sea en la antera completa o en un grano aislado de ella.

Androhaploide
Célula u organismo haploide que se formó a partir de un núcleo masculino sin que hubiera fertilización (p.e., un grano de polen).

Aneuploide
Cualidad del núcleo que no posee un número básico fijo de cromosomas sino múltiplos exactos del número básico (desviación de x). Aberración numérica respecto a los cromosomas caracterizada porque falta o sobra, una o más veces, un cromosoma en relación con los demás.

Antisentido (ARN)
Molécula ARN de cadena simple que se hibrida con otro ácido nucleico (ARN o ADN) inhibiendo la función o culminación de la síntesis de éste. Ej: el ARN antisentido se llama micARN si el ARN hibridado (el 'blanco') es un mARN.

Apomixis
Formación de un embrión sin fertilización previa, a partir de una sola célula o de un conjunto de células. Hay dos formas: la partenocarpia y la apogamia.

ARN mensajero (mRNA)
ARN trascrito a partir de un gen que codifica para una proteína. La información codificada en la molécula del ARN mensajero es traducida en los ribosomas hasta polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos específica. En organismos eucarióticos, los ARN mensajeros trasfieren la información genética desde los genes, que están en el núcleo, hasta los ribosomas, en el citoplasma.

Digitized by Google

Autopoliploide

Células (individuos) con juegos homólogos de cromosomas de los padres, que forman parejas perfectas durante la meiosis; la célula será, p.e., autodiploide, autotriploide o autotetraploide si posee dos, tres o cuatro juegos completos de cromosomas homólogos, respectivamente. En general, los autopoliploides difieren fenotípicamente apenas en algunos aspectos cuantitativos de sus padres diploides.

Autoradiografía

Método para localizar radioisótopos en un tejido, célula o molécula; la muestra se coloca en contacto con una emulsión fotográfica (generalmente, una película para rayos X). En ingeniería genética se usa, comúnmente, para detectar la hibridación de una sonda molecular radiactiva con ADN desnaturalizado.

Autótrofo(a)

Planta (u otro organismo) que puede sintetizar su propia sustancia orgánica, a partir de componentes químicos inorgánicos simples, mediante fotosíntesis o quimiosíntesis.

Auxótrofo

Célula (u organismo) cuyo crecimiento y desarrollo dependen de la presencia, en el medio de cultivo, de suplementos al medio mínimo, porque no pueden sintetizar cierto(s) metabolito(s) necesario(s) para su crecimiento normal. El auxótrofo se origina por mutación, con bloqueo genético, de ciertos procesos metabólicos que se hallan intactos en el tipo primitivo o silvestre (protótrofo).

Axeno

Cultivo que está completamente libre de una asociación con cualquier otro organismo, ya sea éste virus, bacteria, micoplasma, hongo u otro semejante. A veces se usa como sinónimo de aséptico. (Sustituye a 'axénico'.)

Banco genético

Colección de moléculas de ADN recombinante en las cuales hay inserciones que representan el genoma completo de un organismo.

Biotrasformación

Trasformación química de una sustancia, cuando ésta se agrega a un medio, por causa del metabolismo del cultivo.

Bófer

Tecnicismo que españoliza en esta obra el término inglés 'buffer' (sustancia tampón o controladora de cambios del pH).

Digitized by Google

Bordes parejos ('blunt ends')
Algunas enzimas de restricción generan fragmentos de ADN en los cuales las cadenas homólogas están apareadas de principio a fin. Se dice entonces que estos fragmentos tienen sus bordes parejos puesto que no poseen extensiones de cadena simple en ninguno de sus dos extremos.

Bromodesoxiuridina (BuDR)
Base artificial (o análogo de bases) análoga a la timina; cuando se incorpora, en lugar de ésta, en la molécula de ADN o de ARN se producen aberraciones genéticas (mutaciones).

Bromuro de etidio
Agente químico que se intercala en la doble cadena del ácido nucleico para que éste pueda visualizarse en los geles de agarosa. El complejo [cido nucleico-bromuro de etidio] es fluorescente cuando se expone a la luz ultravioleta.

Callo clon
Plántulas (variantes clonales) derivadas en forma clonal a partir de un callo. También, plantas derivadas del cultivo de un callo mutado.

Callo nodriza
Callo con crecimiento activo que se coloca sobre una placa de agar para estimular el desarrollo de un cultivo de células de baja densidad (o sea, por debajo de la densidad crítica) o de un explante muy pequeño.

Cápsida
Cubierta proteica de una partícula vírica o virión; puede ser helicoidal o isométrica según las subunidades proteicas que la formen.

Carbón activado (CA)
Carbón vegetal que se utiliza para decolorar soluciones en los medios de cultivo, y para la adsorción de sustancias potencialmente dañinas como los fenoles y los polifenoles oxidados.

Casaminoácidos
Nombre comercial de una sustancia orgánica compleja, obtenida por hidrólisis enzimática o ácida de la caseína; se emplea, en la nutrición, como fuente de algunos aminoácidos o de nitrógeno reducido.

Célula competente
Aquella célula capaz de tomar moléculas de ácido nucleico. Estas células se presentan en forma natural cuando se hallan en ciertos estados de desarrollo (como en *Bacillus subtilis*), o pueden ser inducidas mediante iones calcio a 0 °C (como en *E. coli*) o por medio de iones litio

Digitized by Google

(como en *Saccharomyces cerevisiae*). Las células competentes pueden congelarse a -80 °C sumergiéndolas en glicerol, para mantener su viabilidad durante muchos años.

Célula nodriza

Células que por causa de un tratamiento (p.e., con rayos X) no pueden dividirse más. Estas células se adicionan a un medio en que prospera un cultivo de otras células de baja densidad (debajo de la densidad crítica) para que produzcan, durante su metabolismo, sustancias nodrizas que permitan el desarrollo del cultivo de baja densidad.

Cíbrido

Híbrido celular viable, originado por la fusión del citoplasma de una célula con otra célula distinta.

Clon

Población de moléculas de ADN recombinante que presenten la misma secuencia. También, población de células u organismos de genotipo idéntico. El sentido más usado, sin embargo, es el de colonia de microorganismos que hospedan fragmentos de ADN específico insertos en una molécula vectora.

Clonar

Se refiere al uso de técnicas de recombinación in vitro con las cuales se inserta un gen específico o una secuencia de ADN en una molécula vectora.

Cocultivo

Dos cultivos que se desarrollan en un solo recipiente. Cultivo simultáneo de dos o más especies diferentes; p.e., de bacteria y planta en la trasformación de plantas. En fitopatología, dícese de un patógeno que crece junto al cultivo de tejidos del hospedante.

Codón

Sinónimo: Triplete de nucleótidos

Conjunto de tres bases seguidas (triplete de nucleótidos) en la molécula de mARN que corresponden a determinado aminoácido; el aminoácido se incorpora a la macromolécula que se está formando gracias al reconocimiento del codón por el anticodón correspondiente colocado en el extremo del tARN que trasporta el aminoácido específico. El término codón puede también especificar la terminación de la cadena molecular.

Digitized by Google

Conjugación

Trasferencia de un plásmido bacteriano de una célula a otra; el plásmido codifica las funciones necesarias para lograr esa trasferencia.

Corte y marcación ('Nick translation')

Técnica para marcar radiactivamente una molécula de ADN que se usará como sonda en las técnicas de hibridación. Se hacen inicialmente cortes en una de las cadenas de la molécula en doble hélice del ADN con una enzima llamada ADNasa; estos cortes son identificados por la polimerasa-I del ADN, que aplica su función de exonucleasa en la dirección 5' a 3'.

Al tiempo que la actividad de la exonucleasa elimina los nucleótidos de la posición 5', su actividad de polimerasa coloca nuevos nucleótidos que se encuentran presentes en el medio. Algunos nucleótidos se han adicionado al medio con un átomo de fósforo radiactivo en la posición alfa; así se garantiza que la nueva molécula de ADN que se está sintetizando sea altamente radiactiva.

Cultivo en gota

Cultivo de protoplastos, células, y cuerpos semejantes en una o varias gotas (generalmente colgantes) del medio nutritivo, que se mantienen en pequeñas cámaras de vidrio o de plástico trasparente.

Cultivo en suspensión

Cultivo de células individuales, agregados o tejidos en medio líquido y sin adición de agar (o con una concentración tan baja de éste que no gelifica); normalmente requiere agitación para gozar de aireación adecuada.

Cultivo primario

Cultivo obtenido directamente de partes de tejidos o de órganos (células y protoplastos) de la planta donadora (planta madre); debe considerarse como tal hasta el primer subcultivo, después del cual da lugar a un linaje (cultivo secundario).

Densidad crítica de células

Representa el inóculo más pequeño del cual puede desarrollarse, en forma reproducible, un nuevo cultivo en suspensión; se expresa como el número de células por unidad de volumen.

Densidad de cultivo

En una suspensión (p.e., de células o protoplastos) es el número de unidades por mililitro de medio.

Digitized by Google

Dormencia
Tecnicismo (por calco no admitido del inglés 'dormancy') para indicar latencia u otro estado de quiescencia fisiológica.

Eficiencia de aplicación en placa absoluta
Número de colonias formadas (CF) por número de células aplicadas (CA), multiplicado por cien: (CF/CA) x 100.

Elemento trasponible
Segmento de ADN que puede moverse, en el genoma, de un locus a otro.

Embriogénesis
Sinónimo: Embrionía
Proceso de iniciación y desarrollo de un embrión. Puede ser sexual, por fusión de dos gametos (embrión cigótico), o asexual, formado a partir de células de tejido adulto (embrión somático); este último da lugar a un embrioide en una serie de pasos que semejan la formación de un embrión cigótico.

Enzimas de restricción
Endonucleasas que reconocen secuencias específicas de bases en la doble cadena del ADN. Las enzimas de restricción se han agrupado en tres tipos: a) tipo I, que se unen a un sitio de reconocimiento específico pero que cortan la molécula de ADN en sitios aleatorios cercanos al sitio de reconocimiento; b) tipo II, que se unen a una molécula de ADN en el mismo sitio en que la cortan; este es el tipo de enzimas utilizadas en ingeniería genética; y c) tipo III, que reconocen una secuencia y cortan en la vecindad de ésta.

Epigenético
Alteración estable en la expresión del genoma, es decir, un cambio en la regulación de la expresión de los genes que persistiría indefinidamente en las divisiones celulares subsiguientes después de remover las condiciones de inducción. Variación dirigida, estable a nivel celular, potencialmente reversible, restringida al potencial genético de la célula (como la habituación), y que no es trasmitida por la semilla o por otro medio.

Estado estacionario
Situación de un cultivo continuo abierto en el cual ocurre un crecimiento balanceado en un ambiente sin alteraciones: $\mu x = (dx/dt)$, donde x = concentración de la biomasa, μ = tasa específica de crecimiento, y t = tiempo.

Digitized by Google

Exón

Diferentes partes de un gen fragmentado que son trascritas y luego traducidas hasta la obtención de una proteína.

Extremos cohesivos

Terminaciones de ADN de cadena simple, con 2 a 5 nucleótidos, que dejan algunas enzimas de restricción de tipo II. Estas terminaciones pueden hibridarse con terminaciones complementarias presentes en otras moléculas de ADN, un paso muy frecuente durante el proceso de clonaje de genes.

Fase exponencial (del crecimiento)

Sinónimo: Fase logarítmica

Período definido de tiempo durante el cual la tasa de aumento de biomasa por unidad de concentración de biomasa (tasa específica de crecimiento) es constante y puede medirse.

Gametoclonal

Relativo a la propagación clonal de gametos (polen, óvulos), a diferencia de la somaclonal (propagación de células somáticas).

Gemación

Forma de reproducción asexual en que se produce un individuo joven como excrecencia de otro más viejo. Liberación de un virus de la célula en que ocurrió su replicación (fenómeno común en virus animales recubiertos).

Gen estructural

Gen que, a diferencia de uno regulador, tiene la codificación para la molécula de ARN que dará un producto proteico.

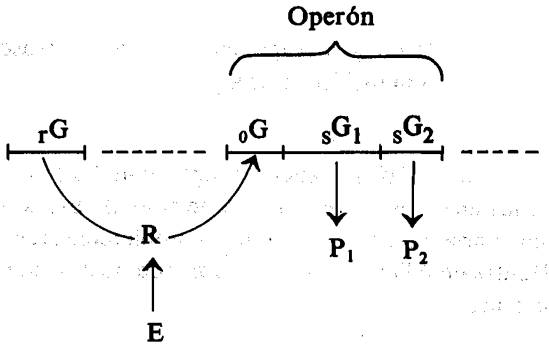
Gen marcador

Gen que expresa ciertas características o diferencias fenotípicas muy notorias, lo que permite establecer su presencia en el genoma y facilita la detección de eventos de recombinación.

Gen regulador

Gen que controla la tasa de síntesis de los productos de otros genes distantes de él. Un gen regulador ($_rG$), p.e., controla la síntesis de un represor proteínico (R), el cual inhibe la acción de un gen operador ($_0G$) y, de este modo, activa el operón (genes estructurales sG_1, sG_2, etc.) que controla.

Digitized by Google



Gen supresor
Gen que codifica para un ARN de trascripción (tARN) y que lee el codón mutado en el mismo sentido del codón original, o como un sustituto aceptable para el significado original.

Genoteca
Colección de fragmentos de ADN amplificados en vectores de clonamiento (pBR322). Los fragmentos clonados pueden provenir de ADN genómico o de ADN complementario (cDNA).

Hibridación
Formación de duplex estables entre dos cadenas de nucleótidos complementarias, según el apareamiento propuesto por Watson-Crick; la eficiencia de la hibridación es una prueba de la homología que existe entre secuencias. (En genética clásica y en mejoramiento, hibridación es la formación de un nuevo organismo diploide, ya sea por un proceso sexual normal o por fusión de protoplastos.)

Hibridación celular somática
Acción de fusionar protoplastos derivados de células somáticas que difieren genéticamente, o sea, que provienen de dos linajes (especies) sin parentesco, para producir células híbridas que contienen uno o más cromosomas de cada especie y que son capaces de desarrollarse en un cultivo.

Hibridación distante
Hibridación entre plantas de poco o ningún parentesco, como la que arroja híbridos interespecíficos o intergenéricos; frecuentemente, estos híbridos sólo son posibles mediante fusión somática.

Digitized by Google

Hidrolizado de caseína (CH, Cs, AHCH, EHCH)

Sustancia químicamente indefinida y compleja, obtenida por hidrólisis enzimática (EHCH) o ácida (AHCH) de la caseína; se utiliza para proporcionar, en el medio de cultivo, una mezcla natural de aminoácidos para la nutrición nitrogenada, y se considera como fuente no específica de nitrógeno reducido.

Indice mitótico

Es la suma de diferentes fases de la mitosis en relación con el porcentaje de las células analizadas; sirve para determinar la duración relativa de la interfase o de fases separadas de la mitosis, y en combinación con el conocimiento que se tenga de un cultivo, permite calcular la duración absoluta de las fases del ciclo de crecimiento. Su valor en una población de células en crecimiento es de 3 a 5. Se calcula mediante la expresión:

$$IM = \frac{\text{Núcleos en mitosis (no.)}}{\text{Núcleos observados (no.)}} \times 100$$

Intrón

Secuencia (de ADN) dentro de un gen eucariótico que no se expresa en el producto proteínico de ese gen. Las secuencias intrones son trascritas en el ARN pero deben eliminarse, y el ARN se une nuevamente antes de que pueda ser traducido; este proceso se conoce como eliminación de intrones (intron splicing). Algunos genes de eucariontes superiores contienen un número considerable de intrones conformados por una gran parte del total de las moléculas de ADN. También se encuentran intrones en genes cuyo ARN, aunque trascrito, no se traduce, como el ARN ribosomal (rARN) y el ARN de trasferencia (tARN) de los genes eucarióticos; en estos casos la secuencia intrón no aparece en la molécula funcional de ARN.

Isoenzima

Sinónimo: Isozima

Cualquiera de las formas electroforéticamente distintas que toma una enzima dentro de una célula (o de una especie); representan diferentes estados poliméricos que tienen la misma función, y se detectan mediante tinción.

Kilobase (kb)

Conjunto de 1000 bases o pares de bases. El tamaño de la molécula de ADN se expresa en kb.

Digitized by Google

Liposoma
Vesícula artificial de fosfolípidos, rodeada de una membrana doble; permite la introducción de partículas de alguna sustancia al interior de una célula.

Lisozima
Sinónimo: Lisoenzima
Enzima que puede digerir la pared celular de una bacteria.

Locus (plural: loci)
Posición específica en un cromosoma en la cual está ubicado el gen que controla una determinada característica; el locus puede estar ocupado por cualquiera de los alelomorfos del gen.

Lux (lx)
Unidad de medición de la luz incidente que, irradiada por un ángulo sólido de una bujía patrón, ilumina una superficie de 1 m^2 situada a una distancia de 1 m.

Mapa
En inglés tiene dos acepciones, una como verbo (to map) y otra como sustantivo (map). En español, la primera se traduciría con el tecnicismo 'mapear', que significa determinar la posición relativa de los genes, o de los sitios de restricción, en una molécula de ADN. El 'mapeo' genético (acción verbal) se hace con experimentos de cruzamiento en que se determina la relación de ligamiento y la frecuencia de recombinación entre dos genes dados. Cuanto más alejados estén los dos genes en un cromosoma, más grande será la frecuencia de recombinación entre ellos; si están en diferentes cromosomas, es decir, si no están ligados, la máxima frecuencia de recombinación será del 50%.

El mapeo físico se hace mediante digestiones del ADN con diferentes enzimas de restricción, digestiones que pueden hacerse con una o dos enzimas a la vez. La segunda acepción (sustantivo) se traduce como mapa, es decir, un diagrama que muestra la posición relativa de dos genes o sitios de reconocimiento para enzimas de restricción, y la distancia que los separa.

Mapa de ligamiento
Diagrama que representa un cromosoma con el orden lineal de los genes asociados con él.

Mapeo (ver Mapa)

Digitized by Google

Marcador
Mutación ocurrida en un gen que facilita el estudio de su herencia.

Monosómico
Célula u organismo diploide que ha perdido un cromosoma de sus juegos cromosómicos (2n-1); durante la meiosis aparecerá un cromosoma univalente, no emparejado. La existencia de uno solamente de cada par de cromosomas homólogos.

Movilización
Trasferencia, entre una bacteria y otra, de un plásmido no conjugativo llevada a cabo por un plásmido conjugativo. Al igual que aquél, los genes cromosómicos —o, en general, los fragmentos de ADN— pueden ser trasferidos por este sistema.

N-Z Amine
Nombre comercial de un hidrolizado pancreático de la caseína, que sirve de fuente de nitrógeno reducido (aminoácidos) en los medios de cultivo.

Nick translation (ver Corte y marcación)

Operón
Grupo de genes funcionalmente coordinado. Unidad completa de la expresión de los genes y de su regulación, que incluye genes estructurales, gen(es) regulador(es); y elementos de control de gen(es) regulador(es).

Par de bases (bp)
Par de nucleótidos unidos por puentes de hidrógeno que se encuentran en ácidos nucleicos de doble cadena; el tamaño de una molécula de ADN se estima, a menudo, por el número de pares de bases que ella contiene.

Patrón de restricción
Presentación del resultado de la caracterización de la molécula de ADN después de fragmentarla con enzimas de restricción.

Picogramo
Unidad empleada para medir el contenido de ADN por célula; equivale a 10^{-12} g (una billonésima de gramo).

Plaquear
Tecnicismo por 'aplicar en placa', es decir, esparcir células sobre la superficie de un medio gelificado. n. Plaqueo.

Digitized by Google

Plásmido

Elemento genético (es una molécula de ADN) situado dentro de la célula huésped, que se replica independientemente de los cromosomas del huésped. Los plásmidos varían en tamaño desde menos de 1 kb (mil bases) hasta 300 kb, y varían también en el número de copias suyas por célula del huésped (desde 1 hasta más de 100). La mayoría de los vectores de clonamiento utilizados en ingeniería genética se basan en plásmidos naturales que han sido manipulados para que introduzcan en otras células características como la resistencia a los antibióticos y los sitios exclusivos que sólo reconocen las enzimas de restricción. Casi todos los plásmidos son moléculas de ADN circular de doble cadena.

Plásmido bifuncional (ver Vector)

Promotor

Región ubicada hacia el extremo 5' del codón de iniciación de un gen cualquiera. En esta región la polimerasa del ARN se une al ADN y, después de trasladarse hasta el codón de iniciación, empieza la trascripción en el sitio correcto.

Recombinante

Término usado en genética clásica para denominar un organismo que contiene una combinación diferente de los alelos provenientes de sus progenitores. Tal organismo puede resultar de un evento de entrecruzamiento o de un rearreglo independiente de los diferentes cromosomas durante la meiosis. En genética molecular, este término se refiere a una molécula conformada por nuevas combinaciones de secuencias de ADN. También se usa como adjetivo (molécula de ADN recombinante).

Retrocruce

Cruce de un hijo (p.e., un híbrido) con un individuo que tiene el genoma parental de uno u otro de sus progenitores. Cruce de un genotipo desconocido con un homocigoto recesivo de modo que los fenotipos de las progenies correspondan directamente a los cromosomas del padre del genotipo desconocido.

Retrofusión

Proceso de fusionar células de un híbrido somático con células de una de las líneas parentales del híbrido.

Secuencia CAAT

Secuencia muy conservada que se encuentra en la región promotora de los genes que codifican para proteínas, en los organismos eucarióticos.

Digitized by Google

Secuencia de ADN de copia única
: La secuencia que sólo se encuentra presente una vez en el genoma de un organismo.

Secuencia de ADN repetida
: Se refiere a una secuencia de nucleótidos que se presenta más de una vez en el genoma de un organismo, en el cual puede haber desde unas pocas copias de estas secuencias repetidas hasta millones de ellas.

Secuencia TATA
: Secuencia rica en adenina y timina que se encuentra aproximadamente a 25 pares de bases antes del sitio en que se inicia la trascripción de los genes en los organismos eucarióticos. Esta secuencia se conserva bien, y se asocia con el sitio de reconocimiento de la polimerasa del ARN.

Sitio de reconocimiento
: Secuencia de nucleótidos a la cual se une, en primera instancia, una enzima de restricción. En las enzimas de restricción de tipo II —las que se usan en ingeniería genética— el sitio de reconocimiento es, al mismo tiempo, el sitio por donde la enzima corta la molécula de ADN. Las enzimas de tipo I, en cambio, tienen un sitio de reconocimiento pero el sitio en que cortan la molécula de ADN ocurre al azar y a cierta distancia del primero.

Sonda
: Molécula de ARN o de ADN con una secuencia específica de nucleótidos, que ha sido marcada radiactivamente. Las sondas se utilizan para detectar secuencias complementarias en las técnicas de hibridación.

Tasa de mutación
: Probabilidad con que ocurre un evento particular de mutación en una entidad biológica (virus, células, etc.) por generación, es decir, durante el período de un ciclo reproductivo.

Tasa específica de crecimiento
: Es la tasa de crecimiento (μ) de la biomasa de una población celular por unidad de concentración de la biomasa del cultivo, según la expresión:

$$\mu = (\log 2\ 2)/g = 0.693/g$$

g = tiempo de generación promedio (o sea, tiempo de duplicación del número de células, t_d).

Tipo silvestre
: Gen u organismo normal que no ha mutado. Este término fue acuñado originalmente para denotar el organismo que se encontraba presente en

Digitized by Google

la naturaleza de manera regular; actualmente, su significado es más especializado. Por tipo silvestre se entiende la constitución genética de un organismo al comienzo de un experimento de mutagénesis. Por consiguiente, ese organismo puede contener, para un genetista, cierto número de mutaciones o marcadores genéticos antes de que él introduzca otros cambios cuando haga experimentos de mutagénesis.

Trasferencia Southern

Técnica que combina el poder de resolución de la electroforesis en geles de agarosa con la alta sensibilidad de la hibridación de los ácidos nucleicos. Los fragmentos de ADN, separados mediante electroforesis en un gel de agarosa, son desnaturalizados *in situ* para trasferirlos, generalmente por capilaridad, a una hoja de nitrocelulosa, de nylon o de otra matriz que sirva como soporte sólido. El ADN de cadena simple se une covalentemente a la matriz, quedando así disponible para ser hibridado con una sonda, es decir, con otra cadena simple de ADN que ha sido marcada radiactivamente. La hibridación se detecta por el método de la autoradiografía. El nombre de esta técnica se debe al investigador que la desarrolló: E. M. Southern. Cuando se trasfiere ARN a una matriz sólida empleando la misma técnica, ésta se denomina trasferencia Northern, y cuando se trasfieren así proteínas, se denomina trasferencia Western. La denominación de estas técnicas es arbitraria y obedece simplemente a una idea de continuidad después de que Southern desarrolló la primera de ellas.

Trasformación

Introducción de moléculas de ADN dentro de las células de un organismo por métodos diferentes al entrecruzamiento ('crossingover') sexual convencional. Por ejemplo, los plásmidos pueden ser trasformados dentro de células bacterianas cuando atraviesan la pared y las membranas celulares de éstas.

Trasposón

Elemento genético (moléculas de ADN) capaz de cambiar su posición de un cromosoma a otro.

Trisómico

Núcleo (o célula) diploide que tiene, en relación con el número básico, n, un cromosoma adicional (2n+1) que es homólogo de un par cromosómico normalmente presente.

Tween

Nombre químico: polioxietilensorbitan-monolaureato. Detergente no iónico, muy usado en la preparación de explantes —p.e., durante el

Digitized by Google

proceso de esterilización superficial— para reducir la tensión superficial de los líquidos.

Vector

Se llama así a la molécula de ADN derivada de un plásmido o bacteriófago en la cual pueden insertarse o clonarse otros fragmentos de ADN. Un vector debe tener uno o varios sitios únicos de reconocimiento para ciertas enzimas de restricción, y un origen de replicación autónomo que pueda ser reconocido por la maquinaria de la célula huésped con el fin de que la secuencia introducida pueda ser reproducida. Asimismo, el vector debe conferir un fenotipo definido al organismo hospedante de tal modo que éste pueda seleccionarse (por resistencia a los antibióticos) o detectarse fácilmente (por formación de colonias).

Vector bifuncional

Molécula de ADN capaz de replicarse en dos organismos diferentes, p. ej., en *E. coli* y en una levadura; generalmente, la molécula se multiplica en *E. coli* para que sea trasformada luego en el segundo huésped.

Zimograma

Esquema del patrón de bandas enzimático visualizado después de hacer la electroforesis.

Digitized by Google

Apéndice E

Costo mínimo de un laboratorio de cultivo de tejidos vegetales

W. M. Roca*
G. Mafla*
R. J. Segovia**

Se cotiza aquí, a modo de ejemplo, el valor mínimo de un laboratorio de cultivo de tejidos instalado en Palmira, Colombia. El cambio oficial cuando se estimó este valor (noviembre 1988) era de Col$326 por US$1.00.

Laboratorio de Cultivo de Tejidos

A. Instalaciones

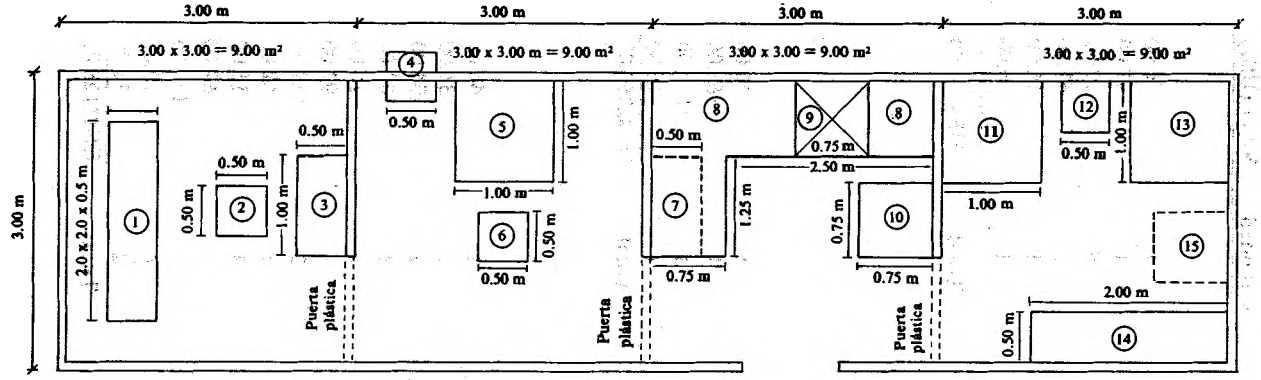
El área del laboratorio (Figura E.1) contiene cuatro espacios:

Cuarto de trasferencia:	3m x 3m = 9 m²
Cuarto de crecimiento:	3m x 3m = 9 m²
Cuarto de preparación de medios:	3m x 3m = 9 m²
Cuarto de autoclave:	3m x 3m = 9 m²
Area total:	36 m²
Costo estimado:	US$4417.00

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

** Unidad de Servicios a la Investigación (USI), Administración de Invernaderos, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia.

Digitized by Google



Cuarto de crecimiento (CC)
1. Estantería
2. Butaco
3. Mesa

Cuarto de trasferencia (CT)
4. Aire acondicionado
5. Cámara de flujo laminar
6. Butaco

Cuarto de preparación de medios (CPM)
7. Vitrina adosada
8. Mesa
9. Lavadero
10. Refrigerador pequeño

Cuarto de autoclave (CA)
11. Destilador
12. Estufa
13. Autoclave
14. Vitrina
15. Cámara de termoterapia

Escala: 1:50
Area total: 4 x 9 m = 36 m².
Costo estimado:
Por m²: US$122.70
Total: 36 m² x 122.70 = US$4417.00

Figura E.1. Plano de un laboratorio de micropropagación diseñado en la UIB del CIAT, en el que aparecen dimensiones y un número mínimo de elementos de trabajo. En el CC caben dos estanterías adicionales; en el CT hay espacio para dos cámaras de flujo laminar.

Digitized by Google

B. Equipo y elementos

	Cantidad	Valor (US$)
1. Cuarto de crecimiento		
Iluminación (red instalada)	1	46.00
Estantería metálica	1	97.00
Lámparas para la estantería	5	77.00
Mesa (2 m)	1	62.00
Butaco	1	16.00
Termómetro (máxima y mínima)	1	16.00
	Total	US$314.00
2. Cuarto de trasferencia		
Iluminación (red instalada)	1	46.00
Aire acondicionado (14,000 BTU)	1	766.00
Cámara de flujo laminar	1	1532.00
Butaco	1	16.00
	Total	US$2360.00
3. Cuarto de preparación de medios		
Iluminación (red instalada)	1	46.00
Estufa	1	31.00
Refrigerador pequeño	1	154.00
Balanza	1	307.00
Cinta para medir pH (rollos)	20	16.00
Lavadero sencillo	1	92.00
Vitrina adosada	2	184.00
Mesa (2 m)	1	62.00
Butaco	1	16.00
Extinguidor pequeño	1	62.00
Carro de laboratorio	1	123.00
Bandejas plásticas	6	19.00
Bandejas metálicas	2	16.00
	Total	US$1128.00

Digitized by Google

	Cantidad	Valor (US$)
4. Cuarto de autoclave (bodega)		
Iluminación (red instalada)	1	46.00
Estantería	1	98.00
Vitrina	1	92.00
Extractor	1	153.00
Cámara de termoterapia	1	919.00
Autoclave	1	154.00
Destilador	1	766.00
	Total	US$2228.00

C. Cristalería

Probeta de 100 ml	1	5.00
Probeta de 1000 ml	1	17.00
Pipeta graduada de 5 ml	1	3.00
Frascos para alimentos (7 x 4 cm)	2000	81.00
Frascos grandes	1000	54.00
Cajas Petri (15 x 100 mm)	50	10.00
	Total	US$170.00

D. Reactivos

NH_4NO_3	1000 g	25.00
KNO_3	500 g	14.00
KH_2PO_4	500 g	18.00
$MgSO_4.7H_2O$	500 g	10.00
H_3BO_3	500 g	18.00
$MnSO_4.H_2O$	500 g	30.00
$ZnSO_4.7H_2O$	500 g	25.00
$Na_2MoO_4.2H_2O$	500 g	101.00
$CuSO_4.5H_2O$	500 g	38.00
$CoCl_2.H_2O$	125 g	25.00
KI	500 g	43.00

(Continúa)

Digitized by Google

(Continuación)

	Cantidad	Valor (US$)
$CaCl_2.2H_2O$	500 g	12.00
Na_2EDTA	125 g	34.00
$FeSO_4.7H_2O$	500 g	38.00
Tiamina-HCl	100 g	20.00
Mioinositol	100 g	20.00
Acido naftalenacético	100 g	26.00
Acido giberélico	5 g	55.00
Bencilaminopurina (BAP)	5 g	30.00
Azúcar	3 kg	5.00
Bacto Agar	2 lb	98.00
Hipoclorito de calcio	5 kg	15.00
Alcohol (96%)	20 lt	10.00
Tampón o 'bófer'	500 g	15.00
	Total	US$725.00

E. Instrumental

Mangos para bisturí	2	15.00
Tijeras pequeñas	2	12.00
Cuchillas para bisturí no. 10	1 pq/50	30.00
Pinzas cortas	2	15.00
Pinzas largas	2	30.00
	Total	US$102.00

F. Materiales

Mechero de alcohol	1	5.00
Rollo de algodón	5	6.00
Gasa	1	6.00
Papel aluminio	5	15.00
Papel para envolver	2	6.00
Papel filtro (9 cm)	5	15.00

(Continúa)

Digitized by Google

(Continuación)	Cantidad	Valor (US$)
Cinta (Handy Plastic)	3	37.00
Espátula	1	6.00
Mascarillas	1 pq/100	6.00
Detergente	—	6.00
Cepillos para limpiar tubos	—	6.00
Botellón plástico	1	15.00
Tarro de basura	1	15.00
Bolsas plásticas para basura	—	15.00
Marcadores	3	6.00
	Total	US$165.00

G. Equipo opcional

Si hay suficiente presupuesto, puede adquirirse el siguiente equipo:

Estereoscopio	1	459.00
Lupa grande	1	153.00
Equipo de medición de pH	1	306.00
Aire acondicionado	1	765.00
	Total	US$1683.00

H. Costo global estimado

	Valor (US$)
Instalación del laboratorio	4,421.00
Equipos	6,030.00
Cristalería	170.00
Reactivos	725.00
Instrumental	102.00
Materiales	165.00
Total	11,613.00
Imprevistos (30%)	3,484.00
Costo global	US$15,097.00

Digitized by Google

Ejemplo 1
Laboratorio para micropropagación de yuca

Equipo para producir 100,000 plantas al año:

	Cantidad	Valor (US$)
Tubos de ensayo (no. 18)	2000	380.00
Agar (kg)	4	400.00
Mecheros de alcohol	2	10.00
Mangos para bisturí	4	31.00
Tijeras pequeñas	4	24.00
Cuchillas para bisturí (no. 11)	200	111.00
Pinzas punta fina	4	30.00
Pinzas largas	4	60.00
Rollos de algodón	20	24.00
Rollos de parafilm	6	130.00
Cajas Petri (100 x 15 mm)	72	181.00
Cámara de flujo laminar doble	1	3500.00
	Total	US$4881.00

Personal: dos empleados permanentes.

Ejemplo 2
Laboratorio para cultivo de anteras de arroz

Equipo para producir 2000 líneas de arroz al año:

	Cantidad	Valor (US$)
Frascos:		
de 7 x 4 cm (inducción)	3000	200.00
de 10 x 10 cm (regeneración)	5000	250.00
Mecheros de alcohol	2	10.00
Mangos para bisturí	4	31.00
Cuchillas para bisturí (no. 10)	100	56.00
Pinzas de punta gruesa (medianas)	4	15.00
Pinzas de punta gruesa (largas)	2	10.00
Rollos de algodón	20	24.00
Cajas Petri (150 x 20 mm)	48	176.00
Cámara de flujo laminar doble	1	3500.00
Carmín (frasco de 1 g)	25	84.00
Acido acético (frasco de 1 lt)	1	37.00
Etanol	20 lt	11.00
	Total	US$4404.00

Personal: dos empleados permanentes.

Digitized by Google

Implementos comunes a los ejemplos 1 y 2

La actividad desarrollada tanto en el laboratorio de yuca como en el de arroz requiere además los siguientes elementos:

	Cantidad	Valor (US$)
Balanzas:		
para cantidades pequeñas	1	1,825.00
para cantidades grandes	1	1,995.00
Plato agitador-calentador	1	138.00
Barras agitadoras magnéticas:		
grandes	3	8.00
medianas	3	9.00
pequeñas	3	13.00
Autoclave	1	2,000.00
Carros de laboratorio	2	224.00
Potenciómetro (medidor de pH)	1	950.00
Refrigerador	1	1,050.00
Bandejas plásticas	6	15.00
Bandejas metálicas	4	30.00
Estereoscopio binocular	1	800.00
Microscopio de contraste de fase	1	1,500.00
Portaobjetos y cubreobjetos	—	120.00
Pipetas graduadas:		
1 ml	5	59.00
2 ml	5	59.00
5 ml	5	62.00
10 ml	5	66.00
Vasos gruaduados:		
100 ml	12	25.00
250 ml	12	24.00
500 ml	6	18.00
1000 ml	6	34.00
Frascos lavadores plásticos de 250 ml	4	10.00
Probetas:		
25 ml	4	45.00
50 ml	4	46.00
100 ml	4	55.00
500 ml	2	53.00
1000 ml	2	74.00

(Continúa)

Digitized by Google

Apéndice F

Medios de cultivo más usados

1. **Medio de Knop** (Gautheret, 1959)

$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	500 mg/litro
KNO_3	125 mg/litro
$MgSO_4.7H_2O$	125 mg/litro
KH_2PO_4	125 mg/litro

2. **Medio de Heller** (Gautheret, 1959)

$ZnSO_4.7H_2O$	1.00 mg/litro
H_3BO_3	1.00 mg/litro
$MnSO_4.4H_2O$	0.10 mg/litro
$CuSO_4.5H_2O$	0.03 mg/litro
$AlCl_3$	0.03 mg/litro
$NiCl_2.6H_2O$	0.03 mg/litro
KI	0.01 mg/litro

3. **Vitaminas de Miller** (1967)

Mionositol	100 mg/litro
Tiamina-HCl	0.1 mg/litro
Acido nicotínico	0.5 mg/litro
Piridoxina-HCl	0.5 mg/litro

4. **Medio nutritivo MI116** (Mosella, 1979)

NH_4NO_3	1500.0	mg/litro	$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	500.0	mg/litro
KNO_3	1050.0	mg/litro	KH_2PO_4	300.0	mg/litro
$MgSO_4.7H_2O$	71.5	mg/litro	KCl	35.0	mg/litro
$MnSO_4.4H_2O$	14.0	mg/litro	$ZnSO_4.7H_2O$	3.8	mg/litro
H_3BO_3	1.6	mg/litro	KI	0.8	mg/litro
$Cu(NO_3)_2.3H_2O$	0.35	mg/litro			
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$	0.2	mg/litro	Na_2EDTA2	14.0	mg/litro
$FeSO_4$	26.0	mg/litro	Mioinositol	100.0	mg/litro
Acido nicotínico	0.5	mg/litro	Piridoxina	0.3	mg/litro
Tiamina	0.1	mg/litro	Acido ascórbico	10.0	mg/litro
Glicina	0.2	mg/litro			

pH del medio: 5.7

Digitized by Google

5. Medio MS-A

Sales MS		
Vitaminas B5:	tiamina-HCl	1 mg/litro
	mioinositol	100 mg/litro
	(Gamborg et al., 1968)	
Sacarosa	2%	
ANA	0.5 mg/litro	
BAP	0.5 mg/litro	
Agar	0.8%	

6. Medio MS-B

Sales MS		
Vitaminas B5:	tiamina-HCl	1 mg litro
	mioinositol	100 mg/litro
Sacarosa	2%	
BAP	1 mg/litro	
Agar Difco	0.7% (para solidificar)	

7. Medio MD-A

Sales MS		
Vitaminas B5:	tiamina-HCl	1 mg/litro
	mioinositol	100 mg/litro
Sacarosa	2%	
ANA	1 mg/litro	
BAP	1 mg/litro	
Agar Difco	0.7% (para solidificar)	

8. Medio D2a

Medio VK-M	1 mg/litro
ANA	1 mg/litro
2,4-D	0.2 mg/litro
ZEA	0.5 mg/litro

9. Medio B5 (Gamborg et al., 1968)

Para suspensiones celulares. El hierro proviene de Sequestrene-330 Fe (Geigy Agricultural Chemicals, Adsley, N.Y.).

$NaH_2PO_4.H_2O$	150 mg/litro	(1.1 mM)
KNO_3	2500 mg/litro	(25.0 mM)
$(NH_4)_2SO_4$	134 mg/litro	(1.0 mM)
$MgSO_4.7H_2O$	250 mg/litro	(1.0 mM)
$CaCl_2.2H_2O$	150 mg/litro	(1.0 mM)
Hierro	28 mg/litro	
$MnSO_4.H_2O$	10 mg/litro	

(Continúa)

Digitized by Google

(Continuación)

H_3BO_3	3 mg/litro
$ZnSO_4.7H_2O$	2 mg/litro
$Na_2MoO_4.2H_2O$	250 µg/litro
$CuSO_4$	25 µg/litro
$CoCl_2.6H_2O$	25 µg/litro
KI	750 µg/litro
Acido nicotínico	1 mg/litro
Tiamina-HCl	10 mg/litro
Piridoxina HCl	1 mg/litro
m-Inositol	100 mg/litro
Sacarosa	20 g/litro
2,4-D	2 mg/litro

pH: 5.5

Nota: KNO_3 y $MgSO_4$ se calcularon en un principio como 30 mM y 2.0 mM, respectivamente.

10. Medio E-10

Sales B5	
2,4-D	1.0 mg/litro
BAP	0.5 mg/litro
AIA	0.5 mg/litro
Glucosa	0.5%
Azúcar	2.0%

11. Medio G-4

Sales B5	
2,4-D	1.0 mg/litro
BAP	0.5 mg/litro
AIA	0.5 mg/litro
Sacarosa	2.0%

FUENTE: International Symposium on Plant Tissue Culture, Rep. Pop. de China, 1981.

12. Medio E-24

Sales B5	
BAP	0.5 mg/litro
ANA	1.0 mg/litro
2,4-D	1.0 mg/litro
m-Inositol	160 mg/litro
Sacarosa	20 g/litro
Agar	8 g/litro

pH: 5.6

Digitized by Google

13. Medio J-19

Sales B5	
Cinetina	1.0 mg/litro
ANA	1.0 mg/litro
m-Inositol	160 mg/litro
Sacarosa	20 g/litro

pH:5.6

14. Medio N-19

MS modificado así:	ANA	1 mg/litro
	Cinetina	1 mg/litro
	Sacarosa	3%

15. Medio para propagar aráceas comestibles
(Ver: Salazar, S., Cap. 20, p. 474)

16. Medios para el cultivo de anteras
(Ver: Roca, W. M. et al., Cap. 11, p. 279)

17. Medio líquido para tejidos de banano
(Ver: Angarita y Perea, Cap. 22, p. 506)

18. Medio de Kao para cultivo de protoplastos
(Ver: Szabados, L., Cap. 10, p. 255)

FUENTES: Gamborg, O. L.; Miller, R. A. y Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50:151-158.

Gautheret, R. J. 1959. La culture des tissus végétaux; techniques et réalisations. Masson, París. 863 p.

Institute of Genetics-Academia Sinica e IRRI (International Rice Research Institute). Cell and tissue culture techniques for cereal crops improvement. 1983. Memorias de un taller. IRRI, Manila, Filipinas.

Miller, C. 1967. Cytokinins in *Zea mays*. Ann. N.Y. Acad. Sci. 144:250-257.

Mosella, L. 1979. L'utilization de l'apex caulinaire comme moyen d'élimination de deux types de virions chez le pêcher (*Prunus persica* Batsch). Tesis (Doct.). USTL, Montpellier, Francia. 215 p.

Digitized by Google

Apéndice G

Casa de malla de tipo II para adaptación de las plantas

R. J. Segovia*
D. R. Laing**

El mayor porcentaje de pérdidas de plántulas ocurre en su fase de trasferencia al suelo cuando deben adaptarse a las nuevas condiciones del ambiente edáfico. Este hecho fue destacado durante el curso internacional 'Actualización en Cultivo de Tejidos' celebrado en septiembre de 1988 en el CIAT, en Cali, Colombia, y su importancia es decisiva para el especialista en cultivo de tejidos.

Casi todo el esfuerzo investigativo invertido en el cultivo de tejidos se perdería si las plantas que se regeneren de esos tejidos mueren cuando intenten desarrollarse en un ambiente que, en un comienzo, les resulta desfavorable.

Cuando esas plántulas provienen de un laboratorio de biotecnología, la mayor parte de los investigadores prefieren utilizar instalaciones climatizadas en que se controlen los componentes climáticos (temperatura, luminosidad, humedad relativa, ventilación). Estas instalaciones, sin embargo, así como su mantenimiento, son muy costosas, y muchos investigadores de los países en desarrollo no disponen de ellas. Hay algunas en instituciones científicas de América Latina, pero generalmente carecen de mantenimiento adecuado y no cumplen con los requisitos mínimos de un invernadero; por consiguiente, su microclima, sus zonas de contraste y sus gradientes son perjudiciales para las plántulas.

* Unidad de Servicios a la Investigación (USI), Administración de Invernaderos, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia.
** Director General Adjunto, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia.

Digitized by Google

Desarrollo

En la década de los 80, el CIAT diseñó y desarrolló una casa de malla de tipo II que permite obtener una climatización natural (CN), mejorada ésta, en algunos casos, por la humidificación del piso y por el sombreamiento con mallas debajo del techo. La CN es muy económica, si se la compara con los altos costos de los invernaderos climatizados; es además muy funcional y de una gran flexibilidad ya que ha podido adecuarse a la mayoría de las investigaciones realizadas en el CIAT.

Se espera que, con algunas modificaciones complementarias, la casa de malla de tipo II pueda adaptarse a varios pisos térmicos y a investigaciones diferentes de las que se realizan en el CIAT. Su orientación debe ser siempre óptima respecto a los vientos normales dominantes, principalmente, y al sol. Asimismo, debe estudiarse su ubicación en relación con otras instalaciones.

Las modificaciones y adaptaciones que se hagan a esta casa de malla deben responder a su caracterización climática en determinado tiempo y espacio, y a las exigencias específicas de la investigación que se planea.

Aspectos Generales

La casa de malla de tipo II se ha diseñado en forma modular. Su longitud, por tanto, depende del presupuesto y de las necesidades del investigador; su anchura no debe sobrepasar los 6 m para evitar incrementos de temperatura significativos en su interior.

Dimensiones

Longitud	26 m
Anchura	6 m
Altura de la columna	3 m
Flecha del techo	0.50 m
Flecha del sobretecho	0.50 m
Altura máxima	4 m
Area total	26 x 6 = 156 m^2
Area de la antecámara	2 x 6 = 12 m^2
Area útil	24 x 6 = 144 m^2

Digitized by Google

Drenaje

Para evitar encharcamientos, se instalan tres tuberías cribadas de 4" de diámetro a lo largo de la casa, y se cubren con grava de 1" de diámetro.

Sistema eléctrico

Es opcional.

Sistema hidráulico

Pueden instalarse de 2 a 6 grifos.

Estructura

En tubería galvanizada.

Cerramiento

Según la investigación que se haga, se emplean diferentes tipos de malla. Para estudios de fotoperíodo se usa una malla de polipropileno con un sombreamiento de 100% y recubierta por la parte exterior con malla de aluminio; para trabajos de virología, se utiliza una malla anti-insectos; para otras investigaciones, hay un rango de sombreamiento que va del 30% al 90%.

Techo

Se hace con láminas de fibra de vidrio. Se pueden usar láminas de plástico, pero su duración es de sólo 12 a 24 meses.

Mesas

Las mesas son de hierro y su tapa es de malla metálica pintada de blanco. Estas mesas permiten una mejor circulación, entre las plantas, del aire fresco ascendente, es decir, del que sube desde el piso hasta el techo.

Digitized by Google

Zona verde

Es indispensable instalar grama alrededor de la casa de malla (una franja de 6 m de anchura), con el fin de amortiguar la radiación solar que se refleja hacia las paredes de la casa.

Ganchos (opcionales)

Se instala un sistema de ganchos y líneas de alambre a una altura de 3 m, para colocar hilos que servirán de tutores a ciertas especies de plantas.

Sistema de climatización

A fin de permitir la renovación natural del volumen interior de aire, la casa de malla de tipo II se diseñó con un sobretecho que ocupa la mitad de su ancho total. Cuando el aire interior se calienta, tiende a subir y escapa por las aberturas hechas entre los dos techos; lo ayuda a salir el paso natural de los vientos normales dominantes, el cual atraviesa trasversalmente la casa de malla. Este sistema es la CN mencionada antes.

Un complemento opcional de la CN es la humidificación del piso de la casa de malla con microaspersores; éstos son controlados ya sea manualmente o ya automáticamente mediante un termostato, un reloj de control y una válvula solenoide. Un segundo complemento de la CN es el sombreamiento producido por una malla tendida en la parte exterior, o en la interior, del techo, y a una distancia mínima de 0.50 m.

Microclima interior

Todos los componentes climáticos son interdependientes. La relación más crítica en esta clase de instalaciones se establece entre luz y temperatura, siendo esta última la mayor limitante.

En una casa de malla de tipo II sin modificar, la temperatura máxima en las horas pico (de 1 p.m. a 2 p.m.), al nivel de las mesas, puede estar entre 3 y 6 °C por encima de la temperatura exterior. Si la casa de malla ha sido modificada —mediante aspersión al piso o sombreamiento, o de ambos modos— la temperatura, al nivel de las mesas, será igual o superior en 3 °C a la temperatura exterior (Cuadro G.1).

Digitized by Google

Los datos anteriores dependen de varios factores: el piso térmico, la orientación respecto a los vientos dominantes normales, la ubicación de la casa de malla con relación a otras instalaciones, la especie vegetal que se aclimata, el tipo de mesa empleado, los sistemas de climatización adoptados, la malla empleada, el tipo de piso de la casa, y la anchura de la zona verde exterior.

Cuadro G.1. Temperatura promedio al nivel de las mesas en dos casas de malla de tipo II (una con humidificación y otra sin ella), comparada con la temperatura exterior promedio.[a]

Sitio	Temperaturas	
	Máxima, prom.	Mínima, prom.
Casa de malla II		
Sin humidificación	33.1	21.2
Con humidificación	29.4	19.9
Ambiente exterior	29.1	19.5

a. Datos tomados en las horas pico (1 a 2 p.m.) de los días de junio de 1989, en el CIAT, en Palmira, Colombia (latitud N: 3° 3'; longitud O: 76° 19'; altitud: 965 msnm); prom. = promedio.

Planos

Se han levantado 14 planos para este proyecto que contienen desde la localización general de la casa hasta la descripción de los materiales empleados. Tres de ellos acompañan este apéndice: el plano de fachadas (Figura G.1), la fachada ampliada (Figura G.2), y el plano de isometría para colocar la tubería (Figura G.3.). Mayores detalles y copias de los planos pueden solicitarse a la Unidad de Servicios a la Investigación, Administración de Invernaderos, CIAT, Apartado 6713, Cali, Colombia.

Digitized by Google

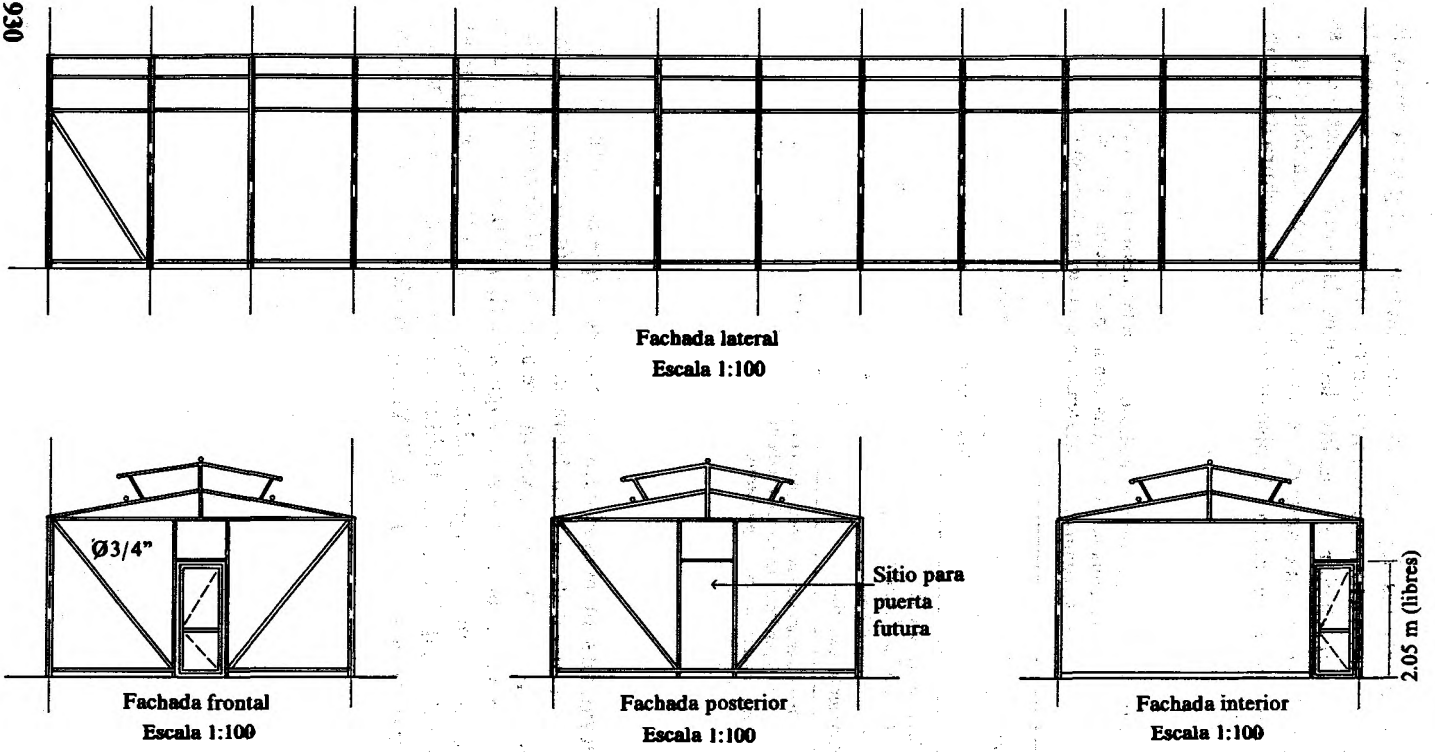


Figura G.1. Plano de fachadas de la casa de malla de tipo II; detalles constructivos. Diseño: D. R. Laing y R. J. Segovia. Julio 1988.

Digitized by Google

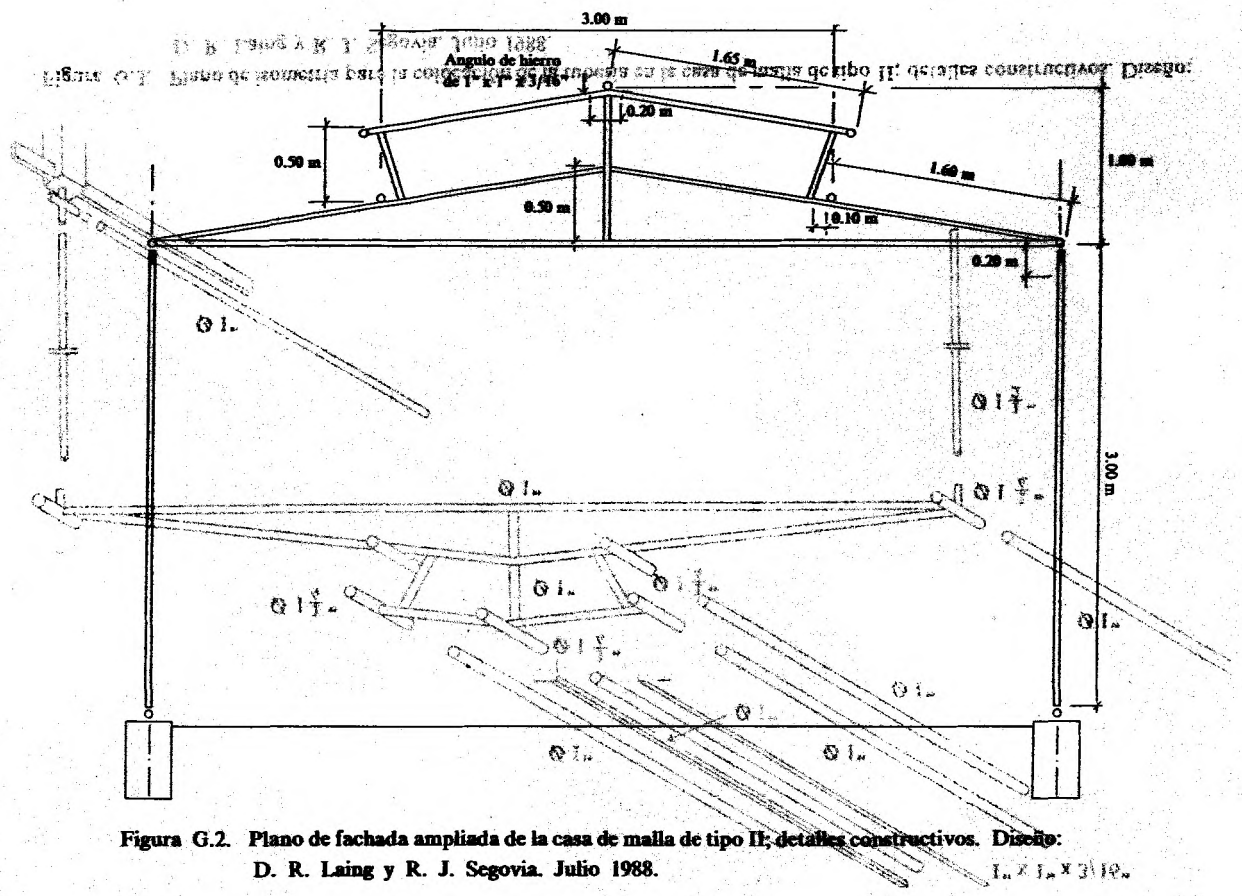


Figura G.2. Plano de fachada ampliada de la casa de malla de tipo II; detalles constructivos. Diseño: D. R. Laing y R. J. Segovia. Julio 1988.

Digitized by Google

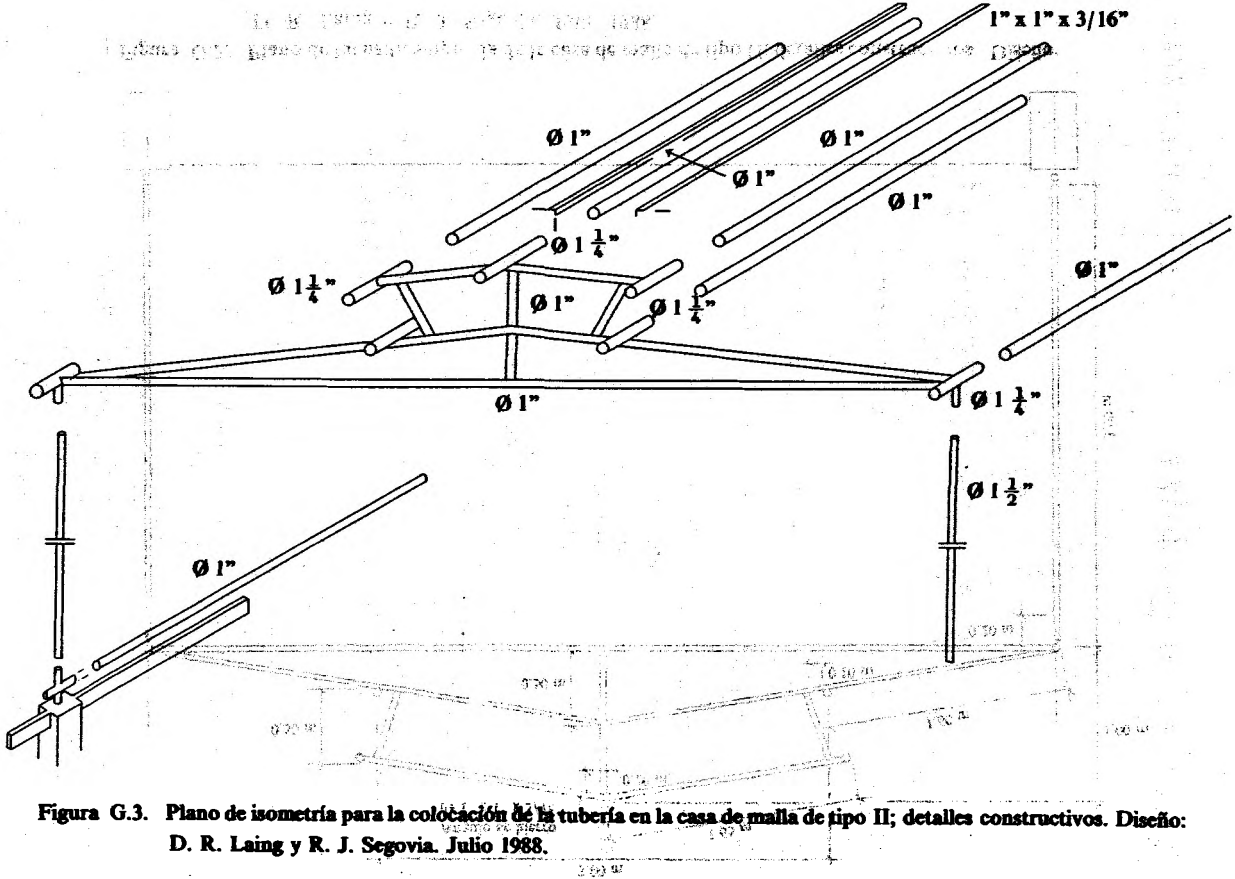


Figura G.3. Plano de isometría para la colocación de la tubería en la casa de malla de tipo II; detalles constructivos. Diseño: D. R. Laing y R. J. Segovia. Julio 1988.

Digitized by Google

Apéndice H

Breve cronología de la biotecnología molecular

1866 Gregorio Mendel descubre las primeras leyes de la herencia.

1902 W. Sutton desarrolla una teoría cromosómica de la herencia.

1902 G. F. J. Haberlandt hace una tentativa de cultivar in vitro células vegetales.

1909 Se introduce el término gen (gene) para describir la unidad de herencia.

1921 Se obtiene el primer maíz híbrido comercial.

1934 P. White cultiva in vitro raíces de tomate.

1939 P. White, R. J. Gautheret y P. Nobécourt cultivan in vitro callos de tabaco y zanahoria.

1940 Beadle y Tatum proponen esta hipótesis: un gen individual da origen a una enzima.

1941 Van Overbeek y sus colaboradores descubren que el agua de coco estimula el desarrollo embrional y la formación de callo en plantas del género *Datura*.

1944 Avery, MacLeod y McCarty establecen que el ADN es el material genético investigando la trasformación de las bacterias.

1946 E. Ball obtiene plantas completas de *Lupinus* y *Tropaeolum* partiendo de cultivos in vitro de ápices.

1952 Morel y Martin obtienen plantas de dalia libres de virus mediante el cultivo de ápices in vitro.

1953 Watson, Crick y Wilkins establecen la estructura molecular de doble hélice del ADN. Por este trabajo reciben el Premio Nobel en 1962.

1953 Sanger establece la secuencia de aminoácidos de la insulina y confirma así la relación existente entre un gen y la secuencia de aminoácidos para la cual éste codifica.

Digitized by Google

1957 F. Skoog y C. O. Miller demuestran la interacción auxina/citocinina en la formación de órganos vegetales en los callos de tabaco.

1960 E. C. Cocking obtiene protoplastos de raíces empleando celulasa.

1960 Morel observa que el cultivo de puntas de brotes es un método promisorio para la propagación vegetativa rápida de las orquídeas.

1966 S. Guha, S. C. Maheshwari y J. P. Nitsch obtienen plantas haploides mediante el cultivo de anteras de *Datura* y de tabaco.

1970 G. Labib y G. Melchers regeneran plantas de tabaco a partir de cultivos de protoplastos.

1970 Se aisla la primera enzima de restricción que corta el ADN en puntos específicos.

1971 Se construyen las primeras moléculas de ADN recombinante.

1971 Se establece la primera empresa dedicada a la Ingeniería Genética.

1971 Científicos del Instituto Nacional de Salud (NIH), de Estados Unidos, comprueban la universalidad del código genético demostrando que las células humanas pueden incorporar en ellas, y procesarlo, el material genético de algunas bacterias.

1972 Jackson, Symons y Berg publican detalles de las técnicas requeridas por el empalme de genes, el cual consiste en cortar, en dos organismos diferentes, fragmentos de ADN y recombinarlos luego para obtener un ADN híbrido biológicamente activo.

1972 Sanger desarrolla un método para trazar el mapa de la secuencia de nucleótidos del ADN.

1973 Se introduce ADN exógeno en algunos plásmidos y éstos se reintroducen en *E. coli.*

1975 Se establece la primera empresa de Biotecnología dedicada a la agricultura.

1976 Se logra el clonaje de los genes 'nif' (para fijación de nitrógeno).

1976 Se desarrollan técnicas para hacer secuencias de ADN.

1976 El Instituto Nacional de Salud (NIH) de Estados Unidos publica la 'Guía para la Investigación del ADN recombinante'.

Digitized by Google

1977 Khorana (del MIT, Estados Unidos) construye el primer gen 'completo', es decir, con los codones inicial y terminal.

1980 Se construyen sondas moleculares (cADN) con genes de plantas.

1980 La Corte Suprema de Estados Unidos establece que las nuevas formas de vida que se creen pueden patentarse. La compañía General Electric llevó a la Corte este caso decisivo.

1980 La Oficina de Patentes de Estados Unidos emite una patente, muy extensa, para proteger el método de recombinación y clonamiento de genes desarrollado por las Universidades de Stanford y de California (patente Cohen-Boyer).

1981 Se desarrolla la máquina que construirá secuencias específicas de nucleótidos.

1981 Se comprueba que los genes introducidos por medio de *Agrobacterium* se heredan en la siguiente generación.

1981 Siete compañías han comprado la licencia para aplicar la técnica de recombinación de genes de la Universidad de Stanford.

1982 Se aislan clones genómicos completos de genes nucleares de plantas.

1983 Se hace la trasferencia de un gen bacteriano a una célula vegetal.

1983 Se logra la expresión, en las plantas, de genes exógenos introducidos por medio de plásmidos recombinantes.

1983 Se obtiene la expresión de los genes que codifican para la proteína del frijol en las células del girasol.

1983 Se da aprobación a las pruebas de campo con bacterias genéticamente modificadas.

1983 Se hacen pruebas de campo con tomate que ha sido sometido a procesos biotecnológicos.

1984 Se avanza en los métodos para trasferir genes usando a *Agrobacterium* como vector.

1985 Se logra la expresión exacta (en qué órgano, en qué momento, etc.) de los genes que codifican para la proteína del frijol, en una planta de tabaco.

Digitized by Google

1985 Se obtiene la expresión de los genes para tolerancia a los antibióticos después de incorporar esos genes directamente en los protoplastos de tabaco.

1985 Se desarrolla en la Universidad de Cornell la pistola genética para introducir genes en plantas.

1986 La corporación Du Pont adquiere los derechos de propiedad de la pistola genética desarrollada en la Universidad de Cornell.

1988 Se obtiene la primera planta trasgénica (en soya) aplicando el principio de la pistola genética.

1990 Serán liberadas comercialmente las primeras plantas trasgénicas.

Digitized by Google

Apéndice I

Desarrollo de la biotecnología agrícola en América Latina y el Caribe

W. M. Roca*
M. C. Amézquita*
V. M. Villalobos**
L. Mroginski***

Situación

En los últimos 10 a 15 años, la biología ha evolucionado rápidamente hacia el estudio de los niveles celular, subcelular y molecular de los organismos. Este conocimiento trae consigo metodologías nuevas capaces de mejorar las plantas y los animales. La clonación de células y tejidos in vitro y algunas técnicas del ADN recombinante (rADN) pueden utilizarse ya en diversas áreas del mejoramiento. Otros adelantos de la biotecnología permitirán en el futuro variar el número de copias de un gen, inhibir o activar selectivamente los genes, y trasferir genes seleccionados de una planta a otra o de un animal a otro.

Las técnicas del cultivo de tejidos in vitro para la micropropagación, la eliminación de enfermedades, y la conservación e intercambio de germoplasma se aplican ya a muchas especies vegetales. Se espera también que las aplicaciones de la biotecnología al fitomejoramiento den como resultado productos revolucionarios. Sin embargo, las ganancias inmediatas serán las aplicaciones que aceleren o amplíen las técnicas ya establecidas y que provean apoyo a los programas existentes de mejoramiento; el cultivo de anteras para la obtención rápida de homocigosis, y la selección in vitro de somaclones y líneas mutantes son algunas de estas aplicaciones.

* Unidad de Investigación en Biotecnología (UIB), y Sección de Biometría/Unidad de Servicio de Datos, respectivamente, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia.
** Centro de Genética, Colegio de Posgraduados, Chapingo, México. Actualmente en: Programa de Mejoramiento de Cultivos Vegetales, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba, Costa Rica.
*** Facultad de Ciencias Agrarias, Instituto de Botánica del Nordeste, Corrientes, Argentina.

Digitized by Google

La mayor limitación que experimenta la ingeniería genética de plantas reside en la falta de conocimientos sobre la genética molecular de los caracteres económicamente importantes. Las técnicas actuales de manipulación del ADN pueden usarse para modificar caracteres de control genético simple. La resistencia a los herbicidas, el mejoramiento de la calidad de las proteínas, la resistencia a los virus y a los insectos son caracteres de importancia económica con los cuales se experimenta actualmente en la ingeniería genética. Por otro lado, el rADN servirá, a mediano plazo, para la construcción de marcadores moleculares y mapas genéticos de ligamiento en las especies cultivadas, para la detección de virus y viroides en las plantas, y para la caracterización del germoplasma. Estos avances tecnológicos han originado hechos importantes para la investigación agrícola, como los siguientes:

A. El sector privado está adquiriendo preponderancia en el desarrollo de la nueva biotecnología en los países desarrollados, y ha recibido por ello el estímulo de las disposiciones legales sobre derechos de protección de plantas y sobre nuevas formas de vida (Hansen et al., 1986). En los últimos años se han establecido 135 empresas de biotecnología dedicadas al mercado agrícola en 18 países desarrollados de América, Europa y Asia, aunque se estima que, para el año 2000, sólo 10 a 20 compañías grandes, verticalmente integradas, dominarán este mercado a nivel mundial (Kidd y Teweles, 1986).

B. Aunque la mayor parte del financiamiento para la investigación básica en biotecnología continuará emanando del sector público, hay una tendencia hacia la vinculación de la inversión privada a estos proyectos en las universidades de los países desarrollados. Por ejemplo, mientras que la mitad de las empresas de biotecnología de Estados Unidos financiaron investigaciones en las universidades de ese país por un total de 120 millones de dólares en 1984, el apoyo estatal llegó a 500 millones de dólares (Blumenthal et al., 1986). Los fondos públicos para investigación biotecnológica en esas universidades se asignan principalmente a proyectos de largo plazo, mientras que la inversión privada se destina a proyectos de corta duración y, por ende, de carácter aplicado. Esta consideración es relevante para la agricultura de los países en desarrollo.

C. Se estima que los cambios que producirá la biotecnología en los países en desarrollo serán tan profundos como los que ha causado en los industrializados (Buttel et al., 1985). Sin embargo, los objetivos de las numerosas firmas de biotecnología son, en general, diferentes de aquéllos de los países tropicales (Elkington, 1986). En cuanto a los cultivos, el interés de esas compañías se centra mayormente en maíz, trigo, tomate,

Digitized by Google

soya, sorgo y otras especies comerciales. Por otro lado, la mayoría de esas firmas no enfocan el problema del rendimiento directamente sino mediante el aumento del valor agregado de los productos agrícolas; en otras palabras, la semilla para las firmas de biotecnología es mucho más importante como un vehículo que como un producto final per se.

D. Para su aplicación en la agricultura tropical, las tecnologías nuevas deberán integrarse a estrategias específicas de mejoramiento. Por tal razón, es necesario que tales tecnologías se ajusten a la realidad y a las necesidades de cada país y región. Esta tarea requiere cooperación interinstitucional en investigación, capacitación y comercio.

Los estudios sobre la situación de la nueva biotecnología, en general, y sobre la agrícola, en particular, contribuirán a la prospección y al establecimiento de programas de cooperación regional e internacional. Ya se han realizado conferencias regionales sobre el tema (Sawyer, 1984; Poltronieri, 1986); además, un primer directorio latinoamericano (Roca, 1985) y prospectos y catálogos para algunos países de la región han sido publicados (COSNET, 1984; Robert y Loyola, 1985; Quintero, 1984).

Este artículo discute brevemente los resultados de un estudio sobre la situación de la biotecnología agrícola en América Latina y el Caribe (Roca et al., 1988) con el propósito de evaluar los recursos físicos y humanos, los proyectos de investigación, las necesidades de capacitación, y los planes futuros en este campo. Se resumen también los resultados obtenidos en biotecnología en 107 instituciones de 23 países de la región.

Tecnologías Actuales

En la región latinoamericana hay preferencia notoria por las tecnologías celulares como el cultivo de tejidos (90% de las instituciones encuestadas), sobre todo en las universidades y en los institutos nacionales de investigación agrícola. Se confirma así la opinión de que las tecnologías más extendidas en los países de la región están asociadas con su aplicación a corto plazo y con bajas inversiones. Por consiguiente, las tecnologías que requieren mayor inversión y especialización, como las moleculares son, actualmente, las de menor empleo en la región (sólo en 24% de las instituciones).

Considerando las especies agrícolas y los microorganismos que se han hecho objeto de estudio biotecnológico (Cuadro I.1), las raíces y tubérculos (papa, camote, yuca y especies de *Dioscorea*) son los cultivos más

Digitized by Google

Cuadro 1.1. Especies agrícolas y microorganismos en los cuales se estudia y emplea con más frecuencia la biotecnología en América Latina y el Caribe, en 1986.

Especie agrícola o microorganismo	Instituciones que lo estudian[a]	
	Número	Porcentaje
Raíces y tubérculos	40	42
Papa		
Camote		
Yuca		
Dioscorea (ñame)		
Industriales	33	35
Caña de azúcar		
Café		
Soya		
Palma de aceite		
Cacao		
Frutales tropicales	28	29
Plátano y banano		
Cítricos		
Papaya		
Leguminosas de grano	25	26
Frijol		
Cereales	24	25
Trigo		
Maíz		
Arroz		
Cebada		
Bacterias	21	22
Rhizobium spp.		
E. coli		
Hortalizas	18	19
Tomate		
Hongos	14	15
Neurospora spp.		
Ornamentales	14	15
Clavel		
Forestales	14	15
Eucalipto		
Pino		
Virus	13	14
Medicinales	7	7
Catharanthus sp.		

(Continúa)

Digitized by Google

Cuadro I.1. Continuación.

Especie agrícola o microorganismo	Instituciones que lo estudian[a]	
	Número	Porcentaje
Frutales templados	7	7
Pastos y forrajes *Stylosanthes* sp.	6	6
Especias	2	2

a. En la muestra encuestada, n = 95.

estudiados (en 42% de las instituciones); los siguen los cultivos industriales (café, caña de azúcar, soya, palma de aceite y cacao) destinados generalmente a la exportación. La tendencia observada obedecería a la importancia agrícola de ciertos cultivos en la región, y al hecho de que las tecnologías que más se usan están disponibles y ofrecen generalmente resultados rápidos con tales especies. Es notoria, en cambio, la dificultad de aplicación de la biotecnología en otras especies importantes como las forestales (sólo en 15% de las instituciones). El empleo de las técnicas moleculares, principalmente en la investigación de microorganismos, en los países de la región refleja lo que ocurre en la investigación biotecnológica de los países desarrollados: aquí y allá la manipulación genética con los microorganismos es muy dinámica a nivel del ADN.

De un total de 460 estudios relacionados con biotecnología en la región, el 80% está iniciándose a nivel del laboratorio y sólo algunos se usan corrientemente en programas de investigación.

Recursos Disponibles para la Biotecnología

Recursos humanos

Del personal adscrito actualmente a biotecnología en la región, el 63% no tiene preparación académica de posgrado. Más del 70% del personal total labora en las universidades y en los institutos nacionales de investigación agrícola; dentro de éstos, aproximadamente el 40% se halla a nivel de posgrado.

Respecto a la capacitación en esta ciencia, de todas las personas que se capacitan en diferentes áreas de biotecnología (179) más del 50% adelantan

Digitized by Google

programas de posgrado y la otra mitad cursos cortos de capacitación en servicio (Cuadro I.2). Es importante señalar que las universidades de los países de la región capacitan en posgrado sólo al 46% de los interesados; el resto estudia en universidades de fuera de la región en las cuales, si pertenecen a países desarrollados, la dificultad para lograr el financiamiento de estudios de posgrado es cada vez mayor.

Cuadro I.2. Recurso humano de la región latinoamericana que se halla en capacitación en distintas áreas de la biotecnología, en 1986.

Tipo de institución que ofrece capacitación	Capacitación ofrecida				Total
	Programas de posgrado		En servicio[a]		
	Número	Porcentaje	Número	Porcentaje	
Universidad nacional	44	46	56	65	100
Universidad extranjera	49	53	19	22	68
Otra (nacional)	—	—	1	1	1
Otra (extranjera)	1	1	9	10	10
Total	94	100	85	100	179

a. Recibiendo adiestramiento en servicio o práctica profesionales.

Recursos físicos

De las instituciones de la región, 88 cuentan con instalaciones que cumplen el papel de un laboratorio. El término laboratorio incluye diversas instalaciones cuyo número y área son extremadamente grandes; este hecho sugiere que el recurso físico ha experimentado un desarrollo desigual en la región.

Recursos financieros

El desarrollo adecuado de la biotecnología exige recursos financieros para equipamiento y operaciones. El 30% de las instituciones estudiadas han hecho una inversión en equipo y otros elementos de capital superior a los 100,000 dólares; el 25% de las instituciones tienen un presupuesto de operaciones para 1986 superior a 50,000 dólares, y el 45% restante sólo cuenta con menos de 20,000 por año. Esta cantidad parecería insuficiente para instituciones que aspiren a tener recursos físicos adecuados y personal capacitado.

Digitized by Google

Planes Futuros

Las tendencias futuras de la investigación biotecnológica en la región latinoamericana indican que el área celular seguirá siendo prioritaria en los próximos cinco años (Cuadro I.3). Otro cambio significativo en el futuro próximo serán las áreas de investigación bioquímica y molecular, segundas en prioridad de acuerdo con la encuesta; además, el incremento de esta investigación demandará mayor especialización del personal científico de la región.

La necesidad de personal durante el quinquenio 1987-1992 en las 107 instituciones estudiadas se satisfaría contratando cerca de 500 personas distribuidas de la siguiente manera: más del 40% con nivel de posgrado, 23% con nivel universitario, y el resto como personal de apoyo no profesional. Se requerirán por tanto 214 investigadores con posgrado, de los cuales aproximadamente la mitad deberá tener grado doctoral; estos últimos representan, respecto al total del personal actual con posgrado, un 31% (Cuadro I.4).

Cuadro I.3. Areas de investigación y biotecnologías consideradas prioritarias para el quinquenio 1987-1992, en la región latinoamericana.

Area de investigación y tecnologías	Instituciones estudiadas	
	Número	Porcentaje[a]
Celular	46	48
Cultivos de meristemas y ápices	29	
Cultivos celulares	27	
Cultivo o fusión de protoplastos	12	
Cultivo de anteras o microsporas	11	
Cultivo de ovarios y óvulos	8	
Bioquímica	20	21
Purificación y separación de proteínas	10	
Biosíntesis y metabolitos secundarios	9	
Molecular	20	21
ADN recombinante	50	
Aislamiento y clonaje de genes	7	
Trasferencia de genes	5	
Regulación y expresión de genes	4	
Inmunológica	12	13
Pruebas de diagnóstico	7	
Anticuerpos monoclonales	6	

a. Respecto al total encuestado (n = 95).

Digitized by Google

Cuadro I.4. Necesidad de recurso humano calificado en biotecnología para el quinquenio 1987-1992, en la región latinoamericana.[a]

Nivel académico	Recurso humano capacitado	
	Actual (no.)	Quinquenio 87-92 (no.)
Doctorado	175	106 (31)
Maestría	168	108 (39)

a. En la muestra encuestada, n = 95. Las cifras entre paréntesis indican porcentajes respecto al personal total actual.

Conclusiones

En los países de América Latina y el Caribe hay instituciones con el escenario propicio para desarrollar las aplicaciones agrícolas de la biotecnología. Para lograr este objetivo, urge obtener la colaboración interinstitucional en biotecnología, tanto en investigación como en capacitación. Asimismo, los sectores de investigación, desarrollo y producción agrícolas necesitan integrarse en proyectos acordes con las necesidades reales de cada cultivo.

Las tecnologías que más se emplean actualmente en la región son las de mayor potencial de aplicación a corto o mediano plazo (como el cultivo de tejidos), y las especies vegetales estudiadas con mayor frecuencia son, a su vez, las de mayor importancia para la agricultura de la región.

La mayor parte de las biotecnologías se emplean en programas de investigación a nivel del laboratorio. Es necesario, por tanto, estimular las tecnologías aplicables en el campo.

Un porcentaje considerable del personal asignado a biotecnología en las instituciones estudiadas en este trabajo posee grados académicos avanzados y se dedica, en un alto porcentaje, a la investigación en el área celular. Cerca del 50% del personal que se halla en capacitación está realizando estudios de posgrado (doctorado o maestría). Las universidades de los países de la región, por su parte, están captando en grado creciente la capacitación de posgrado.

La posición de las instituciones según el monto de los recursos financieros invertidos en biotecnología es muy variable, como era de esperarse.

Digitized by Google

El área de investigación celular se mantendrá prioritaria en el período 1987-1992 y, en comparación con la situación actual, la biología molecular adquirirá gran preponderancia. En ese lapso, además, habrá necesidad de incorporar cerca de 500 personas al caudal de investigadores en biotecnología de la región; de ellas, más del 40% deberá tener preparación de posgrado equivalente al doctorado o a la maestría.

Referencias

Blumenthal, D.; Gluck, M.; Seashore, L. K.; Stoto, M. A. y Wise, D. 1986. Industrial support of university research in biotechnology. Science 231: 242-246.

Buttel, F. H.; Kenney, M. y Kloppenburg Jr., J. 1985. From green revolution to biorevolution: Some observations on the changing technological bases of economic transformation in the Third World. Econ. Develop. Cult. Change 34(1):31-55.

COSNET (Consejo del Sistema Nacional de Educación Tecnológica). 1984. Potencial para el desarrollo de la ingeniería genética: Recursos en biología molecular. Catálogo 1984. SEP/COSNET, México, D.F. 361 p.

Elkington, J. 1986. Double dividends? U.S. biotechnology and third world development. Paper no. 2. World Resources Institute (WRI). 50 p.

Hansen, M.; Busch, L.; Burkhandt, J. y Lacy, L. R. 1986. Plant breeding and biotechnology: New technologies raise important social questions. Bioscience 36(1):29-39.

Kidd, G. H. y Teweles, W. L. 1986. Reestructuring the international seed and plant biotechnology industries. Seedmen's Digest (E.U.) 37:44-47.

Poltronieri, H. M. (ed.). 1986. Biotechnology in the Americas; II: Applications in tropical agriculture. Interciencia Association y Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT), Costa Rica. 94 p.

Quintero, R. 1984. Prospectiva de la biotecnología en México. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México. 499 p.

Robert, M. y Loyola, V. M. 1985. El cultivo de tejidos vegetales en México. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México. 167 p.

Roca, W. M. 1985. Directorio latinoamericano de biotecnología agrícola. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. 110 p.

Digitized by Google

———; Amézquita, M. C. y Villalobos, V. M. 1988. Estado actual y perspectivas de la biotecnología agrícola en América Latina y el Caribe: Encuesta 1986. En: Amaya, S. (ed.). Temas prioritarios y mecanismos de cooperación en investigación agropecuaria en América Latina y el Caribe. Memorias. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. p. 187-215.

Sawyer, W. D. (ed.). 1984. Biotechnology in the Americas: Prospects for developing countries. Interciencia Association, Washington, D.C. 79 p.

Sterling, J. (ed.). 1986. Fifth annual guide to biotechnology companies. Genet. Eng. Newsl. 6(10):13-40.

Digitized by Google

Apéndice J

Investigadores que contribuyen a esta obra

M. C. Amézquita	Unidad de Servicio de Datos, CIAT, Apartado 6713, Cali, Colombia.
A. Angarita	Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, A.A. 057303, Bogotá, Colombia.
D. I. Arias	Unidad de Investigación en Biotecnología (UIB), CIAT, Apartado 6713, Cali, Colombia.
L. Ascui M.	Escuela de Agronomía, Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Chile.
A. Calderón	Unidad de Investigación en Biotecnología (UIB), CIAT, Apartado 6713, Cali, Colombia.
F. L. Chandler	CARDI, Cave Hill Campus, P.O. Box 64, Barbados, West Indies.
R. Chávez	Agrupación Rosa Ara Ter., Etapa E1, Tacna, Perú.
P. Dublin	CIRAD, Avenue du Val de Montferrand, B.P. 5035-34032, Montpellier Cédex, France.
H. A. Escobar A.	Instituto de Agronomía, Universidad de Tarapacá, Arica, Chile.
A. L. Fuentes K.	Department of Plant Science, University of British Columbia, 660 N.W. Marine Drive, Vancourer, B.C. 1X2, Canada.
S. Q. Hague	Dept. of Plant Biology, University of Birmingham, P.O. Box 365, B1S 2TT, Birmingham, England.
J. A. Izquierdo	Producción Vegetal, FAO/RLAC, Av. Santa María 6700, Casilla 10095, Santiago, Chile.
R. L. Jarret	University of Florida, IFAS (Institute of Food and Agricultural Sciences), Tropical Research and Education Center, 18905 S.W. 280th Street, Homestead, Florida 33031, U.S.A.

Digitized by Google

J. Jaynes — Louisiana State University, 322 Choppin Hall, Baton Rouge, Louisiana 70803-1806, U.S.A.

K. K. Kartha — National Research Council of Canada, Plant Biotechnology Institute, 110 Gymnasium Road, Saskatoon, Saskatchewan, S7N 0W9 Canada.

A. D. Krikorian — Department of Biochemistry, State University of New York at Stony Brook (SUNY), New York 11794-5215, U.S.A.

L. Lago Castro — Instituto de Biotecnología de Plantas, CIGB, Casilla de Correo 6162, La Habana, Cuba.

D. R. Laing — Dirección General, CIAT, Apartado 6713, Cali, Colombia.

L. W. Levy — Productora y Exportadora (INEXA, Industria Extractora C. A.), P.O. Box 497-A, Quito, Ecuador.

P. E. Levy — Productora y Exportadora (INEXA, Industria Extractora C. A.), P.O. Box 497-A, Quito, Ecuador.

R. E. Litz — University of Florida, IFAS (Institute of Food and Agricultural Sciences), Tropical Research and Education Center, 18905 S.W. 280th Street, Homestead, Florida 33031, U.S.A.

Y. López F. — Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, Palmira, Colombia.

V. M. Loyola — Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C., km 7 antigua carretera a Progreso, Ex-Hacienda Xcumpich, A.A. 924, Mérida, Yucatán, México.

G. Mafla — Unidad de Investigación en Biotecnología (UIB), CIAT, Apartado 6713, Cali, Colombia.

S. H. Mantell — Department of Horticulture, Wye College, London University, England.

J. A. Mariotti — Facultad de Agronomía y Zootecnia, Universidad Nacional de Tucumán, Av. Roca 1900, San Miguel de Tucumán 4000, Argentina.

Digitized by Google

J. M. Mejía M.	Laboratorio de Biotecnología, Centro de Genética, Colegio de Posgraduados, Chapingo, México.
S. T. Mercy	International Rice Research Institute (IRRI), P.O. Box 933, Manila, Philippines.
K. Mornan	ADO/USAID, RP413, Ndjanema, Tehad, Africa Central.
L. C. Mosella Ch.	Dirección de Extensión Académica, Universidad de Talca, 2 Norte 685, Casilla 747-721, Talca, Chile.
L. A. Mroginski	Facultad de Ciencias Agrarias de la UNNE, Instituto de Botánica del Nordeste, Sargento Cabral 2131 (C.C. 209), Corrientes 3400, Argentina.
L. Müller	Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba, Costa Rica.
T. Nakamura	DNA Plant Technology Corporation, 2611 Branch Pike, Cinnaminson, New Jersey 08077, U.S.A.
B. Nolt	Programa de Frijol, CIAT, Apartado 6713, Cali, Colombia.
S. F. Nome	Instituto de Fitovirología, INTA, Arturo M. Bas 276, Córdoba 5000, Argentina.
V. M. Núñez	Dept. of Agronomy and Plant Genetics, 411 Borlang Hall, 1991 Buford Circle, St. Paul, Minnesota 55108, U.S.A.
J. Pachón	Programa de Arroz, CIAT, Apartado 6713, Cali, Colombia.
M. Perea	Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, A.A. 057303, Bogotá, Colombia.
J. Pérez Ponce	Universidad Central, Las Villas, Cuba.
C. F. Quirós	Department of Vegetable Crops, University of California, Davis, California 95616, U.S.A.
H. Ramírez	Unidad de Investigación en Biotecnología (UIB), CIAT, Apartado 6713, Cali, Colombia.

Digitized by Google

J. Reyes	Departamento de Química Orgánica, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Apartado Postal 87, Cordomex 97310, Yucatán, México.
R. Reyes	Unidad de Recursos Genéticos (URG), CIAT, Apartado 6713, Cali, Colombia.
J. Roa	Unidad de Recursos Genéticos (URG), CIAT, Apartado 6713, Cali, Colombia.
M. L. Robert	Departamento de Genética y Fisiología, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Apartado Postal 87, Cordomex 97310, Yucatán, México.
W. M. Roca	Unidad de Investigación en Biotecnología (UIB), CIAT, Apartado 6713, Cali, Colombia.
R. O. Romero	International Rice Research Institute (IRRI), P.O. Box 933, Manila, Philippines.
L. F. Salazar	Centro Internacional de la Papa (CIP), Apartado 5969, Lima, Perú.
S. Salazar S.	Dept. of Plant Biology, The University of Birmingham, P.O. Box 365, B15 2TT Birmingham, England.
R. J. Segovia	Administración de Invernaderos, CIAT, Apartado 6713, Cali, Colombia.
W. R. Sharp	DNA Plant Technology Corporation, 2611 Branch Pike, Cinnaminson, New Jersey 08077, U.S.A.
M. R. Sondahl	DNA Plant Technology Corporation, 2611 Branch Pike, Cinnaminson, New Jersey 08077, U.S.A.
L. Szabados	Biological Research Center, Institute of Plant Physiology, H-6701 Szeged, P.O. Box 521, Hungary.
E. Tabares	Unidad de Investigación en Biotecnología (UIB), CIAT, Apartado 6713, Cali, Colombia.
L. M. Tello	Flores del Cauca, Cra. 1, no. 24-56, Of. 412, Apartado 10387, Cali, Colombia.

Digitized by Google

T. A. Thorpe	Department of Biology, University of Calgary, Calgary, Alberta, T2N 1N4 Canada.
L. B. Torrizo	International Rice Research Institute (IRRI), P.O. Box 933, Manila, Philippines.
V. M. Villalobos	Unidad de Recursos Fitogenéticos, CATIE, 7170 Turrialba, Costa Rica.
F. J. Zapata	International Rice Research Institute (IRRI), P.O. Box 933, Manila, Philippines.

Digitized by Google

Indice[1]

ABA (ver Acido abscísico)

Aberración cromosómica, 323, 326
  inversiones, 315, 546
  deleciones, 546
  eliminación, 272

AC (ver Agua de coco)

Acido abscísico, ABA, 430
  en medio de cultivo, 434

Acido giberélico, AG (ver Reguladores del crecimiento)

Acido indolacético, AIA (ver Reguladores del crecimiento)

Acido indolbutírico, AIB (ver Reguladores del crecimiento)

Acido naftalenacético, ANA (ver Reguladores del crecimiento)

Acidos nucleicos, 878
  autoradiografía, 881
  determinación de ARN, 883, 884
  hibridación de, 878
    ADN-ARN, 878
    PSTVcADN, 878, 882
    'dot blot', 878
  sondas, 878, 879
    construcción de sonda PSTVcADN, 879
    hibridación de, 879, 881
    marcación radiactiva, 879
  en virus, 817
    bloqueo de reduplicación, 818
    extremo 5', 818
    protección en cápside, 818

Aditivos naturales, 53

ADN, 182
  análisis a nivel de, 846
  de microorganismos, 941
  de plástidos, 275
  electroforesis de, 829
  recombinante, 314, 939

AG (ver Reguladores del crecimiento)

Agar, 405, 413
  difusión doble en, 671-673

Agave sp., 644, 647
  enraizamiento, 649
  establecimiento en suelo, 649
  micropropagación de yemas laterales, 647
    desinfección, 648
    medio de cultivo, 648
    rendimiento, 648
  micropropagación del cambium vascular, 648
    callo y explantes, 648
    proliferación, 649
  propagación clonal de, 647

Agentes gelatinizadores, 80, 83, 84, 89, 90
  agar, 80, 83
    concentración de, 92
    Difco, 82
  agarosa, 80, 83, 85, 87, 88, 90
  alginato, 80
  Bacto-agar, 83, 85
  gelrita, 80, 83, 85, 87, 88, 90, 92
  para anteras de arroz, 279

Agrobacterium sp., 776
  esferoplastos de *Agrobacterium tumefaciens*, 776
  plásmidos Ti de *Agrobacterium* sp., 777, 778

Agua de coco (AC), 43, 45, 46, 47, 69, 145, 298
  como inductor de división celular, 49, 50, 53, 65, 67
  componentes del, 51
    compuestos nitrogenados, 52
    inositol, 46
    reguladores del crecimiento, 63

1. Elaborado por Diana Isabel Arias, Marta Cataño, Rodrigo Sarria, Hernando Ramírez, Graciela Mafla, Fernando Tenjo y Eddy Tabares, investigadores de la UIB, CIAT.

Digitized by Google

en protoplastos de camote, 428
preparación, 54

Agua destilada, 3, 4

Al^{+++} en callos (ver Tratamientos)

Albinismo (en arroz), 275, 277

Alelos recesivos, 290
en yuca, 287

Algodón, 13, 80
esterilización, 13
soporte del medio líquido, 80, 90, 91, 92

Alternancia de generaciones, 272, 273
esporofítica, 272
gametofítica, 272

Aminoácidos, 55
aromáticos, 57
con azufre, 57
de Reinert y White, 58
en la caseína hidrolizada, 58

Amorphophallus rivieri, 470

ANA (ver Acido naftalenacético)

Análisis de híbridos somáticos, 766, 768
cromosómico, 767, 768
de ADN nuclear, 768, 769
isoenzimático, 767
morfológico, 767

Análisis de regresión (ver Tratamientos)

Análisis isoenzimático, 327, 767

Androgénesis, 272, 288
en cultivo de anteras, 272, 274
de arroz, 274, 281, 282, 283, 289
en fitomejoramiento, 285
medio de cultivo, 279, 283, 284
nivel de ploidía, 288
de *Brassica*, 274
de cebada, 274, 281, 288
de colza oleaginosa, 274
de maíz, 274, 280, 281, 290
de papa, 274
de tabaco, 274, 281, 289
de trigo, 274, 281, 282, 288, 289
de yuca, 286, 287
inducción de callo, 274, 275, 279
regeneración de plantas, 274, 275, 279
núcleo generativo en, 272

Aneuploidía (ver Ploidía)

Antisuero, 670, 671, 688, 690
determinación del título, 671, 688
purificación de gammaglobulina, 673, 690

Apice meristemático, 484, 517
diferenciación de, 485

Arabusta (ver Café)

Aráceas comestibles, 470
cultivo de ápices, 475, 477, 478
cultivo de meristemas, 473, 476
libres de virus, 470

Area de preparación, 3, 7
equipos en, 7

ARN de doble cadena (dsRNA), 883, 884
determinación para diagnóstico, 884

ARN ribosomal (plastidios), 275

Arroz (*Oryza sativa*), 80, 89, 535
cultivo de anteras, 82, 535
desarrollo del polen, 535
pretratamiento con temperatura, 277, 536
inducción del callo, 90
agente gelatinizador en, 90, 91
efecto del genotipo, 90
medio para, 83, 537
regeneración de plantas, 90
agente gelatinizador en, 90, 91
efecto del genotipo, 90
medios para, 538

Asepsia, 2, 11, 12, 26
con antibióticos, 27
con compuestos químicos, 27
condiciones para, 27
gabinete de flujo laminar para, 5, 7
procedimientos de, 27, 28, 29

Autoclave (ver Esterilización)

Autofecundación (ver Endogamia)

Autoincompatibilidad, 304

Digitized by Google

Auxinas, 192
exógenas, 130
para diferenciar embriones, 135
intracelulares, 192
sintéticas, 192, 199

Axénico (ver Cultivo áxeno)

Bacterias, 11, 13, 15

Balance hormonal, 128, 130

Bandeo cromosómico, 326

Base de datos, 703, 710

Batata (ver *Ipomoea* sp.)

Bencilaminopurina, BAP (ver Reguladores del crecimiento)

Bicloruro de mercurio ($HgCl_2$), 12, 13

Biología molecular, 850
análisis de características multigénicas, 851
QTL's, 851, 852
en mejoramiento de plantas, 850
mapas genéticos, 850

Biorreactores, 225
diseño para cultivo vegetal, 225
factores para uso, 225

Biotecnología, 938
colaboración interinstitucional en, 946
empresas privadas de, 939, 941
en países en desarrollo, 231, 232
integrada a mejoramiento, 941
de raíces y tubérculos, 939, 940
investigación en, 941
con fondos públicos, 941
en área celular, 944, 945
en universidades, 941
personal dedicado a, 943, 944
con posgrado, 943, 946
recursos para, 941, 942

Bunchy Top (ver Musáceas)

Cacao (*Theobroma cacao*), 604
enraizamiento y trasferencia al suelo, 612
contenido de sacarosa, 613
presencia de AIB, 612
multiplicación in vitro, 607
auxinas en, 610
carbón activado en, 609
citocininas en, 610
estrategia para, 607
factores físicos en, 608
giberelina en, 611
intercambio gaseoso en, 608
macroelementos en, 609
medios para, 609
posición explantes en, 611
poblaciones, 604
cultivo de tejidos en, 606
heterosis de grupo, 605
micropropagación de, 606
selección clonal de, 605
selección sexual de, 605
tipo amelonado, 604
tipo trinitario, 604

Café, 580, 595, 622
brote nodal de *Arabusta*, 630
Coffea arabica, 580, 622
Coffea arabusta, 583, 584
Coffea canephora, 580, 581, 622
costo de producción, 622
desinfección de brotes, 630
desinfección de hojas, 624
embriogénesis somática, 594, 622, 624, 625
de alta frecuencia (ESAF), 622
activación con KIN y 2,4-D, 637
aproximación secuencial en, 623
factores de control, 623
medio para, 624, 626
de baja frecuencia (ESBF), 627, 637, 638
de explante foliar, 634
en propagación, 624
técnicas para, 584
esqueje, 583
etapa de diferenciación, 585
etapa de inducción, 585
explante foliar de, 626
en hoja cotiledonar, 628
microesquejes, 587, 592
desinfección, 589
medio para cultivo de, 588
tipo de explante, 588, 589

Digitized by Google

multiplicación in vitro, 584
multiplicación vegetativa, 583
plántulas fortalecidas, 627
producción mundial, 622
variedad Colombia, 581
yemas, 629
axilares, 629
ortótropas, 629, 630
inactivas nodales, 625, 631
plagiótropas, 629
primarias, 631
secundarias, 632

Callos, 175, 314, 547
en brotes adventicios, 135
en micropropagación, 130
endurecimiento, 131
formación, 130
friables, 175
habituación, 135
variación en, 130

Cámara de crecimiento, 5, 378
equipos, 7
gases en, 379
humedad en, 378
luz en, 378
gradientes de, 396
tamaño de, 379

Cámara humidificadora, 130

Cambio epigenético, 315, 327

Cambio genético, 315

Camote (*Ipomoea batatas*), 422
cultivo de anteras en, 432
cultivo de protoplastos en, 427
embriones somáticos, 426, 436, 441
esquejes, 425
fosfatasas en, 435
fosfoglucoisomerasa (PGI) en, 425
meristemas, 423, 424, 438
nitratoreductasa en, 435
organogénesis, 429, 437, 440
protoplastos, 427, 428
espermina y espermidina en, 429
putrecina en, 429
variantes somaclonales, 437
virus SPV-A y SPV-N, 425

Caña de azúcar (*Saccharum officinale*), 544
contenido de sacarosa, 365, 366, 371
cultivo de anteras, 562
cultivo de células, 555
cultivo de protoplastos, 564
fragmentación de cromosomas en, 546
inducción de enraizamiento, 558
micropropagación, 553
resistencia a enfermedades, 566
Saccharum sp., 700
conservación in vitro, 701
subclones, 365, 366
suspensión celular de, 561

Cariotipo, 314, 324, 327

Casa de malla, 926
características, 926, 928
modificaciones, 925
planos, 929, 933

Caseína hidrolizada (CH), 43, 45
aminoácidos en, 58
nitrógeno reducido en, 45

Catharantus roseus, 47, 48, 213
vincoleucoblastina en, 213, 214
vincristina en, 214

Células,
citodiferenciación, 635
embriogénicas maternas (CEM), 623, 633, 634, 639
determinadas en subcultivo, 636, 637
en callo de café, 638
en suspensión, 135, 319
libres, 314
proembriogénicas determinadas (CPD), 633, 634, 639
somáticas, 240
tipo Q, 179

Celulasa, 175
en protoplastos de camote, 427

CH (ver Caseína hidrolizada)

Chrysanthemum cinerariaefolium (ver Piretro)

Ciclo celular, 182
fase G_1, 182, 186, 189, 190

Digitized by Google

fase G_2, 182, 190
fase M, 182
fase S, 182, 186, 190
inhibidores del, 186
catrina, 190, 191
colchicina, 190
sincronización del, 186, 188

Clon, 97
efecto clonal, 363
historia, 96, 98
homogeneidad genotípica, 98
limpieza de, 6
origen de población, 98

CMV, 500 (ver Apéndice C)
detección por serología, 503
albúmina en, 503
extracción del virus, 503
patógeno del género *Musa*, 500
plantas indicadoras de, 501, 503

Coco (*Cocos nucifera*), 49

Coeficiente de regresión b, 399

Coeficiente de variación (CV), 366
fenotípico, 370
para estimar GDG, 366

Coffea spp. (ver Café)

Colchicina, 548
en duplicación de cromosomas, 540
en haploides duplicados, 282

Colocasia esculenta, 470, 477

Comparación múltiple, 393
con testigo, 395
diferencia de Tukey (HSD), 394
para intervalos de confianza, 394
DMS de Fisher, 393
ventajas, 394
factores cualitativos y, 396
método de Scheffé, 394
precisión de, 396
rango de Newman-Keuls, 394
rango múltiple de Duncan, 395

Conservación de germoplasma, 716
bancos de semillas, 716
colección activa, 407
colección de base, 407
colecciones vivas, 716
in vitro, 698, 699
base de datos, 703, 710
crecimiento mínimo, 704, 711
concentración de nutrimentos, 704
concentración osmótica, 705
reguladores del crecimiento, 705
temperatura, 704
estabilidad genética, 699, 701, 703, 705
electroforesis, 708
en cultivos de meristemas, 703
en micropropagación nodal, 703
en protoplastos, 703
evaluación de, 708
supresión del crecimiento, 705

Contaminación, 9, 11
antibióticos contra, 9
con hongos, 11, 13, 15
en área de trabajo, 11
en instrumentos, 11
en tejidos, 9
temperatura contra, 9

Cormos, 470, 472, 478
cormelos, 475, 476

Crioconservación, 407, 717
almacenaje, 723
congelamiento en, 721
escalonado, 723
glicerol en, 721
lento, 722
rápido, 722
crioprotectantes, 709
DMSO, 709
sorbitol, 709
de *Fragaria* x *ananassa*, 725
de papa, 453
de suspensiones celulares, 184
de yuca, 708, 710
descongelamiento, 723
pretratamiento para, 717
pruebas de viabilidad, 723

Criogenia, 326

Cruzamientos, 296
interespecíficos, 297
intergenéricos, 297

Digitized by Google

Cultivo aséptico, 128
de células y órganos, 128
de tejidos, 128, 138

Cultivo áxeno, 12

Cultivo de anteras, 80, 280, 534
con agente gelatinizador, 80
choque osmótico en, 277
de arroz, 535
de camote, 432
en fitomejoramiento, 272, 281, 282, 285
gametocidas en pretratamiento, 277
genotipo, 289, 539
de polen donado, 274
recalcitrante, 277
ósmosis en medio para, 279
rendimiento de arroz y, 289
resistencia a piricularia en, 286
sacarosa en, 279

Cultivo de embriones, 111, 112, 272, 296, 297 (ver Embrión)
androgénesis en, 112
de papaya, 299
división clonal en, 111
en *Musa* sp., 508
fuentes de nutrimentos para, 111
ginogénesis en, 112
medio de cultivo para, 298
por desarrollo in vitro de semillas, 112

Cultivo de esporas, 111, 272
en helechos, 112

Cultivo de meristemas, 80, 628 (ver Meristemas)
con agente gelatinizador, 80
de ápices (directo), 523
de puntas de brotes, 99, 102
en camote, 423, 438, 439
usos de, 99, 102

Cultivo de óvulos, 296, 300
de papaya, 302
en ginogénesis, 272
de yuca, 287
ovarios cultivados, 272
fertilización in vitro, 272, 296, 304
placenta en, 301

Cultivo de protoplastos (ver Protoplastos)

Cultivo de tejidos, 20, 212
a gran escala, 223
con células inmovilizadas, 224
aplicaciones en otras ciencias, 20, 939
comercial, 939, 940
crecimiento y acumulación de, 220
de musáceas, 499
polifenoles en, 500
de secciones nodales, 630
contaminación, 630, 631
frecuencia de desarrollo, 632
DHA en, 436 (ver Apendice A)
DKG en, 436
diferenciación celular en, 2, 128
en agitación, 5
en líneas de alto rendimiento, 227
en producción de químicos in vitro, 228
establecimiento de, 20
factores, 20
técnicas, 20
factores físicos en, 221, 222
factores nutricionales, 220, 221
inoculación de, 5
líneas trasformadas en, 219
población fenotípica múltiple en, 635
primario, 623
producción de metabolitos secundarios, 218, 219
de furanoterpenos, 435
reguladores en, 222, 223
respuestas morfogenéticas en, 21
callos, 22
vástagos múltiples, 22
secundario, 623, 626
diferenciación morfogenética, 627
trasferencias, 631
usos del, 128

Cultivo in vitro (ver Cultivo de tejidos)

Cymbidium spp., 99

Datura sanguinea, 659
alcaloides en, 659
cultivo in vitro, 660, 661
para propagación masiva, 660, 662
escopolamina en, 659
propagación convencional, 660

Deplasmólisis celular, 723

Digitized by Google

Determinación genética, 362
grado de (GDG), 364, 365, 366, 367, 369

Diacetato de fluoresceína, 724

Digitalis purpurea, 213
digitoxina en, 213

Dioscorea composita, 213
diosgenina en, 213

Diploide (ver Ploidía)

Diseño experimental, 377
aleatorización en, 380
control local (bloques) en, 380
de parcelas divididas, 397
experimentos en, 381
manejo, 381
objetivos, 381, 383, 384
sesgo, 381
validez, 382
variables, 384
factorial, 380, 386, 387
en tratamiento, 392
incompleta, 390
hipótesis en, 381
prueba por ANOVA, 382

Diversidad genética, 716

División celular, 62
BTOA, 65, 69 (ver Apéndice A)
citocininas en, 66
kinetina en, 66
pirimidinas en, 62, 63
purinas en, 62, 63
sustancias polifenólicas en, 68

DMSO (dimetil-sulfóxido), 709, 721, 725

Efecto C (ver Clon)

Efectos genéticos, 363
aditivos, 363
de dominancia, 280, 363
epistáticos, 363
estables, 363

ELISA, 674, 675, 688, 692 (ver Apéndice A)
anticuerpos (sandwich), 674
aplicaciones, 688, 692
en papa, 451
enzimas usadas, 675
metodología, 674

Emasculación (en cebada), 303

Embriogénesis in vitro, 633
ciclo celular en, 635
directa, 633
indirecta, 633
reguladores del crecimiento en, 635

Embriogénesis somática, 144, 152, 296, 317, 702, 703
a partir de nucelas, 305
adventicia, 145
agua de coco (AC) en, 145
anormalidades en, 145
aplicaciones, 105
auxina en, 146, 149
carbón activado en, 149
desarrollo, 104
directa, 105, 317
en camote, 426, 436, 441
en *Musa*, 509
estados de desarrollo, 318, 322
explante en, 147, 148
factores para,
carbón activado, 149
en *Daucus carota*, 149, 151
explante, 147, 148
medio de cultivo, 148
sacarosa, 149
indirecta, 104, 105, 317
inducción de, 145

Embrión, 135
actividad de peroxidasa en, 637
adventicio, 145
del esporofito, 135
del gametofito, 135
diferenciación de, 639
encapsulación de, 414
globular, 638
híbrido, 296
rescate de, 296-299
incubación de, 300
partenogénico, 272
rescate de, 623
somático aislado, 627

EMS, 328 (ver Apéndice A)

Digitized by Google

Endogamia, 272
  depresión por (en yuca), 287
  estabilidad genética de, 287

Endomitosis, 547

Endosperma, 296
  extracto de, 298

Erosión genética, 716

Error experimental, 376, 380
  de tipo I en Duncan, 395
  efecto del gradiente en, 381, 382
  estimador de, 377
  sistemático, 381

Escopolamina (ver *Datura sanguinea*)

Espermidina y espermina (ver Camote)

Esterasa, 550

Esterilidad masculina (EMC), 290

Esterilización, 3, 4, 12
  con bromuro de metilo, 476
  con calor húmedo, 14
    método de Koch, 15
  con calor seco, 13
  en autoclave, 4, 7, 13
  equipo para, 7
  factores de, 13
  filtración en, 15, 478
  intermitente, 14

Euploide (ver Ploidía)

Evaluación estadística, 376
  de experimentos in vitro, 382
    con polinomios ortogonales, 393
    matemática, 393
    por comparación múltiple, 393

Excisión, 5

Explante, 2, 80, 130, 132
  de anteras, 25
  de brotes adventicios, 137
  de dicotiledóneas herbáceas, 23, 24
  definición, 20
  desinfección de, 129
  elección, 22
    criterios, 24, 25, 26
    según edad, 25, 26
    según genotipo, 25
    según tamaño, 26
  esterilización de, 12
  estrés por separación, 130
  para micropropagación, 132

Extracto de malta, 60, 61

Factor antiviral (AVF), 818
  efecto en ATP, 819
  en síntesis proteica, 819
  similitud con interferón, 819

Fotoperíodo, 82
  en cultivo de meristemas, 82
  en plantas donantes de polen, 276

Gametogénesis, 272
  en microsporas, 272, 277
    endoreduplicación mitótica de, 284
    gametos no reducidos en, 284, 288

Genética molecular, 939

Genotecas, 669

Giberelinas (ver Reguladores del crecimiento)

Guanto (ver *Datura sanguinea*)

Haploides, 272, 280 (ver Ploidía)
  duplicados, 272, 287, 290
    duplicación espontánea de cromosomas, 274, 284
    en arroz, 284, 288
  eliminación de cromosomas en, 272
  en cebada, 304
  esporofíticos, 272
    dihaploides en yuca, 287
  estériles, 274

Heredabilidad en sentido amplio (h^2), 364

Heterocigosis, 404
  residual, 288

Heterosis, 290
  de arroz, 282
    en cruzamientos simples, 276
    en cruzamientos triples, 276
    en híbridos, 275, 276
  de yuca, 280, 287

Digitized by Google

Hevea brasiliensis, 595
cultivo in vitro de, 597
carbón activado en, 598
embriogénesis somática en, 600
enraizamiento de tallos, 599
inducción de callos en, 601
medios de inducción para, 602
esqueje de, 597
injertos en, 596, 597
trasplante a tierra de, 599

Híbridos, 272, 764
de arroz (F_1 ó F_2), 284
en cultivo de anteras, 280, 288
interespecíficos, 272, 770
en yuca, 287
intergenéricos, 272, 770
en yuca, 287
información genética en, 781
marcadores selectivos de, 765
mutantes en selección de, 766
regeneración de, 770, 779
selección mecánica de, 764, 765
selección por complementación, 765, 766
somáticos, 781, 782

Hipoclorito de sodio (NaOCl), 12

Homocigosis, 287, 290
en anteras de arroz, 539

Hormonas (ver Reguladores del crecimiento)

Indice de heterogeneidad, 397

Indice mitótico, 177, 179, 190

Indización, 406, 664
virológica, 524

Ingeniería genética, 734, 735
aplicaciones agrícolas de, 778, 780, 783
captación de ADN por protoplastos, 775
enzimas de restricción en, 735, 736
manipulación genética en, 756, 757
pasos de, 756, 757
plásmidos en, 736
pBR322 (genealogía), 737
propiedades de, 736
Ti, 740
trasferencia de orgánulos en protoplastos, 774, 775
trasformación con esferoplastos, 776
trasformación con liposomas, 775, 776
trasformación con plásmidos Ti de *Agrobacterium* sp., 777, 778
trasformación genética en protoplastos, 774
vectores moleculares en, 777, 778

Inositol, 46, 413

Intercambio de germoplasma, 410 (ver *Manihot*)
fuente del material, 411
manejo del material, 411

Invernaderos, 6 (ver Casa de malla)

Ipomoea sp., 422, 699 (ver Camote)
conservación in vitro, 699, 701

Isoenzimas, 550, 827
alfa-beta-esterasa de yuca, 841-843
aloenzima, 859
aplicaciones, 841, 873
en identificación de haploides, 873
en identificación de poliploides, 873
en ligamiento agronómico, 873
en polinización cruzada, 874
bandas de, 860
alelos múltiples, 860
alelos nulos, 863, 864
híbridas, 863
rápidas y lentas, 860
base genética de, 832, 833
alelos múltiples, 836
alelos nulos, 833
como marcadores, 831, 858, 859, 860
de variabilidad genética, 831, 832
caracterización de materiales, 838
correlación con patógenos, 832
diversidad genética de, 827
interpretación genética, 839, 840
para identificar híbridos, 869
intergenéricos o somáticos, 870, 873
intraespecíficos e interespecíficos, 869
en alfalfa y papa, 870
en apio, 869
en coles, 869
en tomate, 869

Digitized by Google

limitaciones, 840, 841
metodología, 859, 860
colocación de la muestra, 868
electroforesis, 865-868
geles de almidón, 866, 868
tinción, 831

KIN (ver Reguladores del crecimiento)

Laboratorio de tejidos, 7
costo de equipos, 914, 920
costo de instalaciones, 912, 914
en América Latina, 943
equipo opcional, 9
infraestructura, 7
material de vidrio en, 15
limpieza de, 16
microscopios, 5, 9

Latencia de semillas, 296, 298

Látex sensibilizado (ver Virus, detección)

Leucoantocianinas, 68, 69

Levadura, 60, 61
extracto de, 547

Linamarina, 287

Líneas,
celulares, 326
homocigotas, 272, 280, 290
de yuca, 287
poliploides, 315

Lupinus sp., 217

Macerozimas, 183
en protoplastos de camote, 428

Maíz (*Zea mays*), 50

Malta (extracto de), 60, 61

Manihot spp., 698 (ver Yuca)
conservación convencional, 706
conservación in vitro de germoplasma, 698, 699, 701, 706, 711
crioconservación de, 708
cultivo in vitro, 698
intercambio internacional de, 711
medios de cultivo para, 707

Manitol, 569

Marcadores genéticos (en yuca), 287

Marcadores moleculares, 831

Media poblacional, 363
desvío de, 363, 367
esperada, 371

Medios de cultivo, 30, 42, 43, 44, 47, 80, 83
Abo El-Nil y Zettler, 474
basal, 45
Braun, 47, 48
componentes de, 30-32, 474, 476, 477
condiciones ambientales para, 35
de acondicionamiento, 623, 626
reguladores en, 636
de establecimiento, 631
de inducción, 623, 624, 626
de brotes múltiples, 628
de brotes ortótropos, 630
en micropropagación, 134
para diferenciación de brotes, 137
fórmulas, 921, 924
fuente de carbono, 45, 50, 63
in vitro, 220
inositol en, 45, 46
Knop, 47, 298
m-inositol en, 82
macroelementos en, 44
microelementos en, 44, 48, 49
de Heller, 49
Murashige y Skoog, 46, 48, 81-83, 405, 473, 476-479
en papa, 456-457, 459
para anteras de arroz, 284, 583
para enraizamiento, 130
para meristemas de *Ipomoea*, 423
quelato de hierro en, 45
nitrógeno y carbohidratos en, 42
N reducido, 45, 46, 58, 60
Nitsch, 47
para aráceas, 473
para papa, 456, 457
Knop, 458, 459, 461
Murashige y Skoog, 456
para producción de metabolitos, 220-223
pH de, 70
polaridad en, 430
preparación de, 33, 34
sacarosa en, 82, 83, 405, 413

Digitized by Google

sales minerales en, 45, 63
fórmulas, 44, 45, 48
sulfato de adenina en, 430, 431
tiamina en, 82
vitaminas B5, 81
vitaminas en, 45, 46, 51, 60, 61, 63
ácido nicotínico, 46, 60, 62
piridoxina, 46, 60
tiamina HCl, 46, 60
White, 46, 48, 56
en camote, 429
en cultivo de embriones, 300

Menta (*Mentha piperita*), 48

Meristemas, 5, 716
apicales, 628 (ver Apice meristemático)
del género *Musa*, 499, 500
adaptación, 507
brotes múltiples, 506, 509
colección del material, 505
cultivo de, 505
dominancia apical en, 414
en micropropagación, 508

Meristemoides, 154
en organogénesis, 160
periféricos, 155

Metabolitos secundarios, 215, 231
cultivo in vitro para, 228-230
manipulación genética para, 217, 218
obtención de precursores, 230
producción, 216
shikonina in vitro, 229
síntesis de, 215

Método científico, 381

Microinjerto, 108
en organización de proembriones, 108
in vitro, 514
protocolo clásico, 515, 519
protocolo modificado, 519, 521
in vivo, 521
metodología, 521, 523

Microprecipitación, 673

Micropropagación, 80, 115, 116, 128, 130, 138, 406, 412
brote múltiple, 414
clonal, 115
con agente gelatinizador, 80
de especies herbáceas, 133, 135
brotes adventicios, 133
estructuras unipolares en, 133
por embriogénesis somática, 135
por yemas axilares, 133
de especies leñosas, 135, 136
brotes adventicios, 136, 137
variación genética, 137
de un solo nudo, 413
de varias especies, 129, 130
embriogénesis somática y, 414
factores de, 131
cultivo aséptico, 129
enraizamiento de brotes, 130, 137
explante, 132
luz y temperatura, 132, 137
medio de cultivo, 133
multiplicación del inóculo, 129
origen de explante, 131, 137
pasos en, 129
trasplante, 130, 137
sin cultivo aséptico, 116

Microscopía electrónica, 675, 680
cortes ultrafinos para, 680
en detección viral, 677
inmuno-electromicroscopía, 679, 680
método de inmersión (dips), 677, 678

Mixoploides, 323, 548

Modelo biométrico, 362, 363
confiabilidad en, 373
de tipo II, 363
efectos aleatorios en, 363

Mosaico caribeño (virus), 415

Mosaicos cromosómicos, 362

Musáceas, 496
Bunchy Top (patógeno) en, 499, 500
conservación in vitro, 701
cultivo de tejidos, 499, 502
evaluación agronómica, 504
evaluación fitosanitaria, 500
Fusarium oxysporum L. en, 497, 508
mejoramiento, 497
método Barker, 498
Musa sp., 699
polifenoles en cultivo, 500

Digitized by Google

Pseudomonas solanacearum en, 497
partenocarpia en, 498
propagación vegetativa, 498
sigatoka negra en, 496, 498

Mutaciones, 314, 340, 341, 546
causas de, 316
en homocigotos, 342
inducidas, 340
en *Musa*, 508
por deleciones, 546
puntuales, 547, 550
simples, 342

Mutagénesis, 290
en arroz, 288
en yuca, 287

Mutagénicos, 548
físicos, 548, 549, 569
químicos, 550

Mycosphaerella sp. (ver Musáceas, sigatoka)

Nicotiana plumbaginifolia, 757
aislamiento de mutantes, 759
auxótrofos, 758
aislamiento de protoplastos haploides, 757
inducción de mutagénesis en, 758
irradiación de protoplastos de, 758, 759

Nucelas, 296, 297

Nucleasas, 808
inhibición de, 809

Nutrición de tejidos vegetales, 42
autótrofa, 42
heterótrofa, 42
mineral, 44
en polen, 276, 277
orgánica, 42

Ñame (*Dioscorea* sp.), 482, 494
condiciones ambientales en, 486, 487
cultivo de tejidos de, 485, 488
establecimiento de plántulas, 487, 489
medios en, 486
micropropagación, 485, 486
enfermedades en almacenamiento del, 484
nematodos en, 483, 489
propagación de, 484, 490
rendimiento, 493
virus en, 483, 489, 492
eliminación, 491
tipos, 483

Opio, 212
opiáceos sintéticos, 212

Opuntia amyclaea T., 644
enraizamiento de, 649
establecimiento en suelo, 649
micropropagación por cladodio, 646
desinfección, 645
multiplicación, 645
rizogénesis, 645
yemas laterales, 645
propagación de, 644

Organogénesis, 152, 316
adventicia, 322
caseína hidrolizada en, 153
de novo, 154
directa, 102
en cultivo de camote, 429, 440
en *Nicotiana tabacum*, 160
explante en, 155
tamaño del, 156
fenilalanina en, 157
fotoperíodo, 159
indirecta, 316
aplicaciones de, 103, 104
citocininas en, 103
método, 102
sistema abierto en, 104
meristemoides en, 160
mitosis en, 154
sacarosa en, 157
tirosina en, 157

Organos de perennidad, 107, 108

Osmolaridad, 299, 301

Oxido de cromo, 177

Papa (*Solanum tuberosum*), 83, 272
en cultivo de anteras, 274
en cultivo de meristemas, 456
en cultivo de tejidos, 452, 453, 464
en medios de cultivo, 279, 284

Digitized by Google

esquejes de, 449, 450
micropropagación de, 458, 460
multiplicación rápida de, 450
nivel de ploidía en, 288
polen de, 272
quimioterapia en, 450
semillas de, 448
básica, 448-452
tasa de multiplicación, 449
tubérculos de, 456, 458

Papaver somniferum, 214

Patógenos vasculares, 682
detección en *Dieffenbachia picta*, 683
medios de cultivo para, 683

Pectinasas, 175, 177, 183

PEG, 721 (ver Apéndice A)

Penicilina, 9

Permeabilización celular, 223
en cultivos in vitro, 225

Peroxidasa, 550, 552

Piretro (*Chrysanthemum cinerariaefolium*), 652
cultivo in vitro, 654, 658, 661
producción masiva, 654, 655, 659, 662
fuente de insecticida, 652
piretrinas en, 652, 659
piretroides sintéticos, 653

Plagiotropismo, 327

Plaqueo, 80
con agente gelatinizador, 80, 81
eficiencia de, 92, 183, 184

Plictran (cihexatin), 508

PLO, 804 (ver Apéndice A)

Ploidía, 182
aneuploidía, 182, 315, 323, 342
determinación en arroz, 539
diploide, 323, 548
en camote, 422
en *Citrus* spp., 296
cigoto, 296
diploides y tetraploides, 296
en el género *Musa*, 496
endopoliploidización, 323
euploides, 323
halopoliploides en yuca, 287
nivel de, 284
poliploidía, 182, 342, 404, 544, 546, 548
variabilidad, 288

Polen, 272, 274
dimorfismo en, 276, 277
efecto de temperatura, 276
microesporogénesis, 277, 278
androgénesis en, 277
desarrollo embriogénico, 277
formación de proembriones, 277

Poliembrionía, 301, 305

Polinización cruzada, 280

Polisomas, 182, 315, 323

Principios activos de plantas, 213
extracción de, 214
síntesis orgánica de, 213

Procesos morfogenéticos, 133

Prolina, 721

Propagación clonal, 2, 98, 117
estrategias adicionales, 116
etapas in vitro, 113
método general para, 99

Propagación vegetativa, 113, 116
en reproducción clonal, 114
micropropagación y, 114, 115

Proteínas, 827
análisis electroforético de, 827, 829, 830
arcelina, 830
faseolina, 830

Protoplastos, 80, 240, 314, 329, 756, 757, 802
agente gelatinizador y, 80
aislamiento de, 240, 242-244, 246, 249, 251, 257, 260
aplicaciones de, 240, 250
captación de ADN por, 775
características de, 240, 247
citoplastos y, 773
colonias de, 240, 253, 257
concentración de, 808

Digitized by Google

cultivo de, 250, 252, 256
en virología, 802
luz en, 810
medio para, 810
de mesófilo foliar, 803
enzimas proteolíticas, 803
enzimas para aislamiento de, 244, 245
fusión de, 759, 760
calcio en, 760
ciclo celular en, 763
citoplastos, 773
dielectroforesis y electro fusión, 762
en monocapa, 760
esferoplasto-protoplasto, 764
frecuencia de, 762
genética citoplásmica en, 770, 773
heterocarionte planta-animal, 763, 764
híbridos somáticos en, 766, 769
pasos de, 760, 761, 762
polietilenglicol en, 760
protocolo experimental, 784, 785
temperatura en, 763
variabilidad genética en, 769
haploides de *Nicotiana*, 757
inducción de mutaciones en, 757, 758
infección con virus, 804
con policationes, 804, 808
con PEG, 805, 806
eficiencia con TMV, 804, 805
osmolaridad en, 807
tampón de inoculación, 805
medios para, 253, 254, 255
métodos alternos, 254, 258
métodos citológicos, 785, 786
mutantes auxótrofos y, 758, 765
mutantes bioquímicos y, 757
PEG y PVP en trasferencia de, 774, 775
reduplicación viral de, 810
con anticuerpos fluorescentes, 811
con sondas moleculares, 811
del CMV, 813
del CPMV, 812
en gradiente de sacarosa, 812
en microscopio electrónico, 811
método ELISA en, 811
resistencia a antibióticos en, 759
soluciones para aislamiento de, 244
trasferencia de orgánulos de, 774, 775
trasformación genética, 774
liposomas para, 775, 776, 809
vectores moleculares para, 777, 778

Prueba y error (método), 376

Punta meristemática (ver Apice meristemático)

PVP (ver Apéndice A)
en cultivo de protoplastos, 429
en detección de CMV, 503

Quimeras, 97, 323

Quina (*Cinchona ledgeriana*), 212, 214
quinina, 214

Radiación ultravioleta, 550

Recultivo, 725

Regeneración de plantas, 240, 259
de embriogénesis somática, 702, 703
de híbridos somáticos, 769, 770

Reguladores del crecimiento, 45, 63, 83
ácido giberélico (AG), 67, 405, 414
AG_3, 82
en entrenudos del brote, 631
giberelinas, 67
auxinas, 45, 47, 64
AIA, 47, 64, 66, 68, 69
exógenas, 130
para diferenciar embriones, 135
intracelulares, 192
sintéticas, 64
AIB, 64
ANA, 47, 50, 64, 65, 69, 81-83, 405, 413
2,4-D, 47, 50, 64, 65, 69, 82, 89, 414, 546, 547
BAP, 66, 67, 81, 82
cinetina, KIN, 66, 67, 83
citocininas, 45, 65, 130, 192
en ciclo celular, 636, 637
en diferenciación de raíces, 130
en inducción del embrión, 150
en yemas de café, 631
en cultivo de anteras, 279
en cultivo de óvulos, 302
en embriogénesis somática, 638
en regulación de células mixtas, 636
inhibidores, 298

Digitized by Google

relación auxina/citocinina, 623
zeatina, 66, 67

Repetición (estadística), 377
costo, 380
distribución, 382
en biotecnología, 378
cálculo de, 379, 380
en experimento agrícola, 378
número de, 379

Reproducción agámica, 362

RFLP's, 846 (ver Apéndice A)
aplicaciones, 848
como marcadores, 874
metodología, 847, 848
ventajas, 848, 850

Saintpaulia sp., 102

Segregación, 280, 314

Selección, 314
de recombinantes, 280
diferencial de (S), 367, 369, 370
in vitro, 566
intensidad de (i), 370, 371
presión de, 314, 370, 371, 372
progreso esperado en, 371, 372
respecto al testigo, 372
respuesta esperada a, 368, 369, 370, 371
visual, 665, 669
en el diagnóstico viral, 665, 669

Semilla artificial, 414

Solanum spp. in vitro, 698, 699, 701

Stylosanthes guianensis, 80-83, 90, 343, 347, 352
antracnosis de, 343, 344
cultivo de callos, 83
cultivo de protoplastos, 81
plaqueo, 85, 87
cultivo de tejidos de, 345
subcultivo y ploidía, 346
cultivo en suspensiones celulares, 81
plaqueo, 85, 86
mejoramiento de, 344
evaluación de progenies, 346, 349, 351
regeneración de, 81
inducción de callo, 83
plantas regeneradas, 85

Suspensiones celulares, 80, 81, 174, 242, 243, 248, 250
anomalías cromosómicas en, 182
biosíntesis en, 195
ciclos de crecimiento en, 175
composición de, 175
con agente gelatinizador, 80
continuas abiertas, 176
continuas cerradas, 175, 176
crecimiento de, 176, 177, 180, 182
desaceleración progresiva, 178
estacionario, 175, 178, 181, 182
exponencial logarítmico, 178, 179, 180
lineal, 179
métodos de medición, 176, 177
retraso en, 178, 179
tasa específica de, 178, 179
criopreservación de, 184
en apio, 182
en camote, 434, 437
en *Nicotiana*, 182
en remolacha azucarera, 180
iniciación de, 174, 175, 179
mantenimiento de, 175
medios de cultivo para, 174
sincronización de, 186, 188
con FUdR, 194
sistemas de, 175
viabilidad de, 184

Suspensor embrionario, 296

Tabaco (*Nicotiana tabacum*), 48

Tejido embriogénico (TE), 623, 633
células periféricas, 633
desarrollo de, 636
diferenciado del callo, 638
en ESAF, 627
en mutantes de café, 628
organogénesis en, 639

Termoterapia, 484
en aráceas, 472
en camote, 424
en micropropagación de *Musa*, 500
en papa, 450

Theobroma sp., 604, 699 (ver Cacao)

Tiamina, 405, 413

Digitized by Google

Totipotencialidad, 144
  celular, 128
  en *Daucus carota*, 145

Toxinas, 566

Transposones, 315

Trasferencia, 5
  de genes, 290
    cocultivo, 290
    electroporación, 290
    introgresión, 290
    microinyección, 290
  de plántulas al suelo, 925
  equipos para, 7

Trasformación genética, 738
  aminoácidos esenciales y, 748
  calidad nutricional de cultivos y, 747
  con *Bacillus thuringiensis*, 745
  directa, 739, 740
  infecciones virales y, 742
    ARN de antisentido, 744
    protección cruzada, 742, 743
  inhibidores de proteasas y, 745
  mediada por *Agrobacterium*, 740
    T-DNA, 741
    con vector binario, 741
    con vectores cointegrantes, 741
  resistencia a herbicidas y, 747
  tolerancia a insectos y, 745

Trasformación 'Z', 372

Traslocación, 315, 546

Tratamientos, 377
  Al^{+++} en callos de alfalfa, 383, 385
  dosis óptima, 383
    relación dosis-respuesta, 384, 390, 391, 392
  efecto de, 384, 386, 390
    estimador del, 384, 392
    valor F de, 390
  factores en, 381, 383
    cualitativos y cuantitativos, 392, 396
  grados de libertad en, 392
  niveles de, 389, 393
  suma de cuadrados de, 392, 396

TTC, 724 (ver Apéndice A)

Unidad experimental (en biología), 378
  número de, 376, 379
  sensibilidad de, 378
  tamaño de, 379

Variabilidad, 547
  del material biológico, 376, 380
    coeficientes de, 380
  distribución de, 384, 392
    cuadrática, 384, 385
    lineal, 384, 385, 388, 390, 398
  en biotecnología, 378, 379, 382
    en cuarto de cultivo, 397
    por ambiente, 396, 399
  en invernadero, 379
  factores de, 548
  fenotípica, 376
  genética
    ambiental no seleccionable, 364
    en caña de azúcar, 365
    en híbridos somáticos, 768
    fenotípica seleccionable, 362, 371
    in vitro, 362
    por agentes mutagénicos, 769
    por eliminación cromosómica, 768, 769
    por recombinación cromosómica, 769
  medida de, 376, 377, 388
    por ANOVA, 397
    por regresión lineal, 398

Variación, 314 (ver Varianza)
  espontánea, 328, 364
  fenotípica, 340
  gametoclonal, 288, 290
  genética, 340, 341, 343
  protoclonal, 780
    importancia agronómica, 780, 781
  residual, 367, 371
  selección de, 342
  somaclonal, 315, 328, 340, 546
    causas epigenéticas, 340
    causas genéticas, 340
    en arroz, 353-355
    en camote, 437
    en *Stylosanthes guianensis*, 344
    genes somáticos, 315
    mecanismos de, 341
    origen de, 341

Digitized by Google

Varianza, 367, 398
ambiental, 364, 366
fenotípica, 363, 366
genética, 365
total, 366

Vermiculita, 300

Vigor híbrido (en yuca), 287

Vinca rosea L. (ver *Catharanthus roseus*)

Virus, 404, 802
AMV en *Musa* sp., 499, 500
detección de, 406, 665
aplicaciones, 683, 692
de la papa
con anticuerpos monoclonales, 451
ELISA, 451, 452
microscopía electrónica, 452
de PSTV, 878
construcción de sondas, 879
diagnóstico viral, 879, 882
hibridación, 881, 882
materiales necesarios, 879
resultados, 881, 882
sonda PSTVcADN para, 878
dsRNA y, 406
electroforesis y, 681, 682
ELISA y, 406
injertos en, 407
inoculación en, 407
métodos serológicos, 670, 675
de doble difusión, 503
difusión en agar, 671, 673
ELISA, 674, 675, 688, 692
floculación de látex, 673, 674, 685, 688
microprecipitación, 673
serodiagnóstico, 670
microscopía de luz, 680, 681
microscopía electrónica, 675, 679
plantas indicadoras en, 669, 670
pruebas electroforéticas, 681, 682
pruebas inmunológicas, 670, 674
selección visual en, 665, 669
eliminación, 404
por termoterapia, 405
HBV en arroz, 286
hipersensibilidad a, 813, 816
con proteínas foliares, 816
inclusiones virales, 680
infección viral, 404
por multiplicación vegetativa, 404
multiparticulados, 804
pinocitosis de, 805
reduplicación de, 810
resistencia a, 802, 813
ausencia de síntomas, 813
con nucleasas de célula, 817
con oligosacarina de pared celular, 815
en receptores de membrana, 817
por bloqueo de traducción de ARN, 818
por factor antiviral (AVF), 818
por menor movilidad de virus, 816
trasmisión por vector, 814

Xanthosoma sagittifolium, 470, 476

Yemas axilares, 413, 629

Yuca (*Manihot esculenta*), 80, 404
cianogénesis en, 287
cultivo de meristemas, 82, 87, 88
embriogénesis somática, 82, 89
medio de inducción para, 82
micropropagación de, 82, 88
medio para, 82
rendimiento de, 404

Zanahoria (*Daucus carota*), 47, 48, 49, 53

Digitized by Google

(Continuación)	Cantidad	Valor (US$)
Frascos Erlenmeyer:		
125 ml	12	74.00
250 ml	12	77.00
500 ml	6	50.00
1000 ml	6	82.00
	Subtotal	US$11,590.00
Reactivos:		
NH_4NO_3	1 kg	45.00
KNO_3	500 g	14.00
$(NH_4)_2SO_4$	1 kg	35.00
KH_2PO_4	500 g	18.00
$MgSO_4.7H_2O$	500 g	10.00
KCl	500 g	22.00
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	500 g	27.00
H_3BO_3	500 g	18.00
$MnSO_4.H_2O$	500 g	30.00
$ZnSO_4.7H_2O$	500 g	25.00
$NaMoO_4.2H_2O$	500 g	101.00
$CuSO_4.5H_2O$	500 g	38.00
$CoCl_2.H_2O$	125 g	25.00
KI	500 g	43.00
$CaCl_2.2H_2O$	500 g	12.00
Na_2EDTA	125 g	34.00
$FeSO_4.7H_2O$	500 g	38.00
Tiamina-HCl	100 g	20.00
Glicina	250 g	17.00
Acido nicotínico	100 g	22.00
Mioinositol	100 g	20.00
Acido naftalenacético	100 g	26.00
Cinetina	100 g	48.00
Azúcar	5 kg	9.00
Acido giberélico	5 g	55.00
Acido indolacético	10 g	28.00
Bencilaminopurina (BAP)	5 g	30.00
	Subtotal	US$810.00
	Total	US$21,686.00

Digitized by Google

Parte D

Apéndices

Digitized by Google

Apéndice A

Abreviaturas y acrónimos

ABA	ácido abscísico
AC	agua de coco
AcPh	(= AcP) fosfatasa ácida
AG	ácido giberélico
AIA	ácido indolacético
AIB	ácido indolbutírico
ANA	ácido naftalenacético
ANBS	Asian Network for Biological Sciences
ARS	Agricultural Research Service (E.U.)
ASIC	Association Scientifique International du Café
5-AU	5-aminouracil
AVF	'antiviral factor' (factor antiviral)
AVI	Association Universelle d'Aviculture Scientifique
B5	(ver **Medios de Cultivo...**)
BA	benciladenina
BAP	bencilaminopurina
B_{MS}	sales minerales de Murashige-Skoog
$B_{MS\frac{1}{2}}$	idem, a la mitad de su concentración
$B_{MS}x2$	idem, al doble de su concentración
B_{SH}	sales minerales de Schenck y Hildebrandt
BTOA	ácido benzotiazol-2-oxiacético
BUdR	bromodesoxiuridina
B_W	sales minerales de White
c	complementario (un ácido nucleico, p.e., cADN)
CARDI	Caribbean Agricultural Research and Development Institute (región del Caribe)
CATIE	Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (Costa Rica)
CCC	cloruro de cloro-colina (antigiberelina)
CCP	condensación cromosómica prematura
CEM	células embriogénicas madre (o maternas)
CH	caseína hidrolizada
chlADN	ADN de cloroplastos
CIAT	Centro Internacional de Agricultura Tropical
CIP	Centro Internacional de la Papa (Perú)
CIRAD	Centre de Coopération International en Recherche Agronomique pour le Développement (Francia)
CMI	Commonwealth Mycological Institute (Inglaterra)
CMS	cytoplasmic male sterility (esterilidad masculina citoplasmática)

Digitized by Google

COSTED	Committee on Science and Technology in Developping Countries
CIRAD	Centre de Coopération International en Recherche Agronomique pour le Développement (Francia)
CPD	células proembriogénicas determinadas
cpm	conteos por minuto (radiactividad)
DEAE	dietilaminoetil
DEAE-celulosa	éter de celulosa usado como material aniónico para intercambio iónico
DHA	ácido deshidroascórbico
Dieca, DIECA	dietilditiocarbamato de sodio
DKG	ácido 2,3-dicetoglucónico
DMSO	Dimetilsulfóxido
doct.	doctoral
DOPA	dihidroxifenilalanina
ds	doble cadena (double strand, en ácidos nucleicos)
DTT	ditiotreitol
EDTA	ácido etiléndiamino-tetraacético
e.g.	= por ejemplo (= exempli gratia)
EMBO Journal	European Molecular Biology Journal
EMS	sulfonato de etilmetano
ESAF	embrión somático de alta frecuencia
ESBF	embrión somático de baja frecuencia
FDA	diacetato de fluoresceína
FGI	fosfoglucoisomerasa (= PGI)
FGM	fosfoglucomutasa (= PGM)
FITC	isotiocianato de fluoresceína
Formvar	formaldehído polivinílico
FUdR	fluorodesoxiuridina
G_0	fase especial no operacional del ciclo celular
G_1, G_2	dos fases de crecimiento en el ciclo celular
GDG	grado de determinación genética
g.l., G.L.	grados de libertad
HC	hidrolizado de caseína
hib.	Híbrido
HU	hidroxiurea
IAPTC	International Association for Plant Tissue Culture
IARC	International Agricultural Research Center
IBPGR	International Board for Plant Genetic Resources
ICED	inducción de células embriogénicas determinadas
ICRO	International Cell Research Organization
IEM	inmuno-electromicroscopía
IFAS	Institute of Food and Agricultural Sciences (Florida, E.U.)
IM	índice mitótico
INEAC	Institut National pour l'Etude Agronomique au Congo
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (Argentina)

Digitized by Google

IOCV	International Organization of Citrus Virologists
2-IP	2-isopenteniladenina
IPA	N-6-isopentenilaminopurina
IRCA	Institut de Recherches sur le Caoutchouc (Francia)
IRRI	International Rice Research Institute (Filipinas)
ISEM	immuno-sorbent electron microscopy (microscopía electrónica de absorción conjugada)
ISSCT	International Society for Sugar Cane Technology
KIN	cinetina (= N-6-furfurilaminopurina)
KPT	fosfotungstato de potasio
l, lt	litro
LSU	Louisiana State University
M	fase de división mitótica en el ciclo celular
mamp	miliamperio
MB	medio basal
MD-A	(ver **Medios de Cultivo...**)
MES	ácido 2(N-morfolino)-etanosulfónico
MNNG	N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina
M.O.	materia orgánica
MS	Murashige y Skoog (medio de cultivo)
M.S.	Materia seca
msnm	metros sobre el nivel del mar (altitud)
mtADN	ADN de mitocondrias
NAA	naphtalenacetic acid (ver ANA)
NG	N-etil-N'-nitro-nitrosoguanidina
ng	nanogramo
NL	nitrógeno líquido
PBS	bófer de fosfato (phosphate buffer system)
PEG	polietilenglicol
p.e., p.ej.	por ejemplo
PI	introducción vegetal (en fitomejoramiento)
PLO	poli-L-ornitina
PM	peso molecular
Proc.	Proceedings (memorias)
PVA	alcohol polivinílico
PVC	cloruro de polivinilo
PVP-40	polivinilpirrolidona
p/v	peso respecto a volumen
RFLP	polimorfismo en longitud de los fragmentos de restricción del ADN (restriction fragment length polymorphism)
rpm, RPM	revoluciones por minuto
RRIM	Rubber Research Institute of Malaysia
S	fase del ciclo celular en que ocurre la síntesis del DNA
s, sg	segundo
S.C.	suma de cuadrados
sig.	siguiente(s)

Digitized by Google

ss	cadena simple (simple strand, en ácidos nucleicos)
SSEM	serologically specific electron microscopy (microscopía electrónica serológicamente específica)
SUNY	State University of New York (at Stony Brook, N.Y., E.U.)
TBRI	Taiwan Banana Research Institute (Pingtung, Taiwan)
TE	tejido embriogénico
TLC	cromatografía en capa delgada (thin layer chromatography)
TTC	2,3,5-cloro trifenil tetrazolio
UCLV	Universidad Central de Las Villas (Cuba)
UIB	Unidad de Investigación en Biotecnología (CIAT)
UPA	'upper amazonian' (cacao forastero del grupo alto amazónico)
USDA	United States Department of Agriculture
USTL	Université de Sciences et Techniques du Languedoc (Montpellier, Francia)
v/v	volumen respecto a volumen
ZEA	zeatina

Digitized by Google

Apéndice B

Unidades de medida y notación decimal

Símbolo	Unidad
bp	pares de bases ('base pairs')
BTU	British Thermal Unit (calor)
cc, cm^3	centímetro cúbico
cm	centímetro
dalton	unidad de masa atómica = 1/12 de la masa del ^{12}C (= 1.67×10^{-24} g)
g	gramo
g	gravedad de la Tierra
h	hora
kg	kilogramo
klx	(klux) kilolux (= mil lux)
kr	kilorad (radiación)
l, lt	litro
lx	lux (intensidad de iluminación, lm/m^2)
M	molar, molaridad (concentración)
mamp	miliamperio
mg	miligramo
ml	mililitro
mM	milimolar
μ	micra, micrón (= 10^{-6} m)
μE	microeinstein (energía)
	$\mu E/m^2$ por sg = flujo de energía lumínica
	(1 μE = 1 μmol de quanta)
μM	micromolar (concentración)
N	normal, normalidad (concentración)
nm	nanómetro = 10 angstrom, Å (= 10^{-9} m)
plg	pulgada
psi	libras por pulgada cuadrada
r	rad (radiación)
s, sg	segundo
Wm^{-2}	watios por m^2

Notación decimal

- punto decimal: 0.65, 0.02
- unidad de mil: antes de mil, sin signo: 6450; 1220
  después de 9999, con coma: 10,454
  124,380

micro = 10^{-6} nano = 10^{-9} pico = 10^{-12}

Digitized by Google

Apéndice C

Acrónimos de virus y otros patógenos

ACMV	African cassava mosaic virus
AMV	Abacá mosaic virus
APLV	Andean potato latent virus
ASBV	Avocado sun blotch viroid
Bunchy top	Banana bunchy top disease (sin clasificar)
CaERV	Carnation etched ring virus
CaLV	Carnation latent virus
CaMV	Carnation mottle virus
CaRSV	Carnation ringspot virus
CaVMV	Carnation vein mottle virus
CCMV	Cowpea chlorotic mottle virus
CLSV	Chlorotic leaf spot virus
CMD	Caribbean mosaic disease
CMV	Cucumber mosaic virus
CMV-CFS	Raza (CFS) del CMV
CPMV	Cowpea mosaic virus
CsXV	Cassava X virus
CTV	Citrus 'tristeza' virus
ChCMV	Chrysanthemum chlorotic mottle viroid
ChLRV	Cherry leafroll virus
ChMV	Chrysanthemum mosaic virus
ChSV	Chrysanthemum stunt viroid
ChTAV	Tomato aspermy virus, raza Chrysanthemum
ChVB	Chrysanthemum virus B
DMV	Dasheen mosaic virus
EMC	Encephalomyocarditis virus
FSD	Frog sking disease
GFLV	Grape fanleaf virus
GYSV	Garlic yellow stripe virus
HBV	Hoja blanca virus
NRSV	Necrotic ring spot virus
PDB	Bacteria de la enfermedad de Pierce, en la vid
PDV	Prune dwarf virus
PLPV	Plum line pattern virus
PLRV	Potato leafroll virus
PPV	Plum pox virus
PRSV	Papaya ringspot virus
PSTV	Potato spindle tuber viroid
PVA	Potato virus A
PVM	Potato virus M

Digitized by Google

PVS	Potato virus S
PVT	Potato virus T
PVX	Potato virus X
PVY	Potato virus Y
S. citri	*Spyroplasma citri*
SCV	Strawberry crinkle virus
SLCV	Strawberry latent "C" virus
SMV	Strawberry mottle virus
SMYV	Strawberry mild yellow-edge virus
SPFMV	Sweet potato feathery mottle virus
SPV-A	Sweet potato virus A
SPV-B	Sweet potato virus B
SPVMV	Sweet potato vein mosaic virus
SuCMV	Sugar cane mosaic virus
SVBV	Strawberry veinbanding virus
tipo Ilar	Del grupo Ilarvirus, p.e., el virus PDV
TMV	Tobacco mosaic virus
TRV	Tobacco rattle virus
YCSV	Virus cuero de sapo de la yuca (clasificación antigua)
YMCV	Virus del mosaico caribeño de la yuca (sin clasificar)

Digitized by Google

Apéndice D

Terminología técnica más usada en el cultivo de tejidos

Aberración cromosómica
: En el sentido más amplio, es un cambio ya sea en la estructura de un cromosoma o en el número de cromosomas.

ADN complementario (cADN)
: Es el ADN que complementa una secuencia de ARN. El ADN complementario es sintetizado por la trascriptasa inversa, o retrotrascriptasa ('reverse transcriptase'), enzima que es una polimerasa de ADN y utiliza ARN como cebador. La molécula de ADN de cadena simple, producida por esa enzima, se convierte en una de doble cadena por medio de la polimerasa de ADN normal (que utiliza ARN como cebador). La doble cadena de ADN producida de esta manera puede insertarse dentro de un vector de clonamiento para producir un clon de ADN complementario. El ADN complementario es una copia de una molécula de ARN procesado y no lleva, por tanto, ningún intrón que actúe como barrera para la expresión del código contenido en ese cADN.

ADN recombinante (rADN)
: Molécula de ADN en la cual ciertas secuencias, que no se presentan ordinariamente en la naturaleza, se colocan una al lado de la otra mediante manipulaciones hechas in vitro. Estas secuencias heterólogas en una molécula de ADN recombinante provienen, generalmente, de organismos totalmente diferentes.

FUENTES:
- Müller, L. 1986. Glosario de cultivo de tejidos. CATIE, Turrialba, Costa Rica. (Mecanografiado.)
- McGraw-Hill dictionary of scientific and technical terms. 1989. Parker, S. (ed.). McGraw-Hill, Nueva York. 2088 p.
- Rieger, R.; Michaelis, A. y Green, M. M. 1982. Diccionario de genética y citogenética. Alhambra, Madrid. 530 p.
- Glossary; Bean Program introductory course to RFLPs isozymes and transformation. Compilado y adaptado por A. Calderón, D. I. Arias y J. Tohme, Documento Interno. Unidad de Investigación en Biotecnología (UIB), CIAT, Cali, Colombia. (Multicopiado.)

Digitized by Google

Aloploide
Planta o individuo obtenido por cruzamiento de dos o más especies o géneros; si hay un solo juego de cromosomas (genoma) el individuo será alodiploide, y si hay varios juegos, será alopoliploide.

Alozima
Sinónimo: Aloenzima
Diferentes formas de una enzima que resultan de diferentes alelos de un mismo locus.

Androgénesis
Partenogénesis masculina, es decir, desarrollo haploide de una plántula o de sus partes a partir de un núcleo masculino (gameto). La androgénesis anteral ocurre a partir de un grano de polen, ya sea en la antera completa o en un grano aislado de ella.

Androhaploide
Célula u organismo haploide que se formó a partir de un núcleo masculino sin que hubiera fertilización (p.e., un grano de polen).

Aneuploide
Cualidad del núcleo que no posee un número básico fijo de cromosomas sino múltiplos exactos del número básico (desviación de x). Aberración numérica respecto a los cromosomas caracterizada porque falta o sobra, una o más veces, un cromosoma en relación con los demás.

Antisentido (ARN)
Molécula ARN de cadena simple que se hibrida con otro ácido nucleico (ARN o ADN) inhibiendo la función o culminación de la síntesis de éste. Ej: el ARN antisentido se llama micARN si el ARN hibridado (el 'blanco') es un mARN.

Apomixis
Formación de un embrión sin fertilización previa, a partir de una sola célula o de un conjunto de células. Hay dos formas: la partenocarpia y la apogamia.

ARN mensajero (mRNA)
ARN trascrito a partir de un gen que codifica para una proteína. La información codificada en la molécula del ARN mensajero es traducida en los ribosomas hasta polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos específica. En organismos eucarióticos, los ARN mensajeros trasfieren la información genética desde los genes, que están en el núcleo, hasta los ribosomas, en el citoplasma.

Digitized by Google

Autopoliploide

Células (individuos) con juegos homólogos de cromosomas de los padres, que forman parejas perfectas durante la meiosis; la célula será, p.e., autodiploide, autotriploide o autotetraploide si posee dos, tres o cuatro juegos completos de cromosomas homólogos, respectivamente. En general, los autopoliploides difieren fenotípicamente apenas en algunos aspectos cuantitativos de sus padres diploides.

Autoradiografía

Método para localizar radioisótopos en un tejido, célula o molécula; la muestra se coloca en contacto con una emulsión fotográfica (generalmente, una película para rayos X). En ingeniería genética se usa, comúnmente, para detectar la hibridación de una sonda molecular radiactiva con ADN desnaturalizado.

Autótrofo(a)

Planta (u otro organismo) que puede sintetizar su propia sustancia orgánica, a partir de componentes químicos inorgánicos simples, mediante fotosíntesis o quimiosíntesis.

Auxótrofo

Célula (u organismo) cuyo crecimiento y desarrollo dependen de la presencia, en el medio de cultivo, de suplementos al medio mínimo, porque no pueden sintetizar cierto(s) metabolito(s) necesario(s) para su crecimiento normal. El auxótrofo se origina por mutación, con bloqueo genético, de ciertos procesos metabólicos que se hallan intactos en el tipo primitivo o silvestre (protótrofo).

Axeno

Cultivo que está completamente libre de una asociación con cualquier otro organismo, ya sea éste virus, bacteria, micoplasma, hongo u otro semejante. A veces se usa como sinónimo de aséptico. (Sustituye a 'axénico'.)

Banco genético

Colección de moléculas de ADN recombinante en las cuales hay inserciones que representan el genoma completo de un organismo.

Biotrasformación

Trasformación química de una sustancia, cuando ésta se agrega a un medio, por causa del metabolismo del cultivo.

Bófer

Tecnicismo que españoliza en esta obra el término inglés 'buffer' (sustancia tampón o controladora de cambios del pH).

Digitized by Google

Bordes parejos ('blunt ends')
Algunas enzimas de restricción generan fragmentos de ADN en los cuales las cadenas homólogas están apareadas de principio a fin. Se dice entonces que estos fragmentos tienen sus bordes parejos puesto que no poseen extensiones de cadena simple en ninguno de sus dos extremos.

Bromodesoxiuridina (BuDR)
Base artificial (o análogo de bases) análoga a la timina; cuando se incorpora, en lugar de ésta, en la molécula de ADN o de ARN se producen aberraciones genéticas (mutaciones).

Bromuro de etidio
Agente químico que se intercala en la doble cadena del ácido nucleico para que éste pueda visualizarse en los geles de agarosa. El complejo [cido nucleico-bromuro de etidio] es fluorescente cuando se expone a la luz ultravioleta.

Callo clon
Plántulas (variantes clonales) derivadas en forma clonal a partir de un callo. También, plantas derivadas del cultivo de un callo mutado.

Callo nodriza
Callo con crecimiento activo que se coloca sobre una placa de agar para estimular el desarrollo de un cultivo de células de baja densidad (o sea, por debajo de la densidad crítica) o de un explante muy pequeño.

Cápsida
Cubierta proteica de una partícula vírica o virión; puede ser helicoidal o isométrica según las subunidades proteicas que la formen.

Carbón activado (CA)
Carbón vegetal que se utiliza para decolorar soluciones en los medios de cultivo, y para la adsorción de sustancias potencialmente dañinas como los fenoles y los polifenoles oxidados.

Casaminoácidos
Nombre comercial de una sustancia orgánica compleja, obtenida por hidrólisis enzimática o ácida de la caseína; se emplea, en la nutrición, como fuente de algunos aminoácidos o de nitrógeno reducido.

Célula competente
Aquella célula capaz de tomar moléculas de ácido nucleico. Estas células se presentan en forma natural cuando se hallan en ciertos estados de desarrollo (como en *Bacillus subtilis*), o pueden ser inducidas mediante iones calcio a 0 °C (como en *E. coli*) o por medio de iones litio

Digitized by Google

(como en *Saccharomyces cerevisiae*). Las células competentes pueden congelarse a -80 °C sumergiéndolas en glicerol, para mantener su viabilidad durante muchos años.

Célula nodriza

Células que por causa de un tratamiento (p.e., con rayos X) no pueden dividirse más. Estas células se adicionan a un medio en que prospera un cultivo de otras células de baja densidad (debajo de la densidad crítica) para que produzcan, durante su metabolismo, sustancias nodrizas que permitan el desarrollo del cultivo de baja densidad.

Cíbrido

Híbrido celular viable, originado por la fusión del citoplasma de una célula con otra célula distinta.

Clon

Población de moléculas de ADN recombinante que presenten la misma secuencia. También, población de células u organismos de genotipo idéntico. El sentido más usado, sin embargo, es el de colonia de microorganismos que hospedan fragmentos de ADN específico insertos en una molécula vectora.

Clonar

Se refiere al uso de técnicas de recombinación in vitro con las cuales se inserta un gen específico o una secuencia de ADN en una molécula vectora.

Cocultivo

Dos cultivos que se desarrollan en un solo recipiente. Cultivo simultáneo de dos o más especies diferentes; p.e., de bacteria y planta en la trasformación de plantas. En fitopatología, dícese de un patógeno que crece junto al cultivo de tejidos del hospedante.

Codón

Sinónimo: Triplete de nucleótidos

Conjunto de tres bases seguidas (triplete de nucleótidos) en la molécula de mARN que corresponden a determinado aminoácido; el aminoácido se incorpora a la macromolécula que se está formando gracias al reconocimiento del codón por el anticodón correspondiente colocado en el extremo del tARN que trasporta el aminoácido específico. El término codón puede también especificar la terminación de la cadena molecular.

Digitized by Google

Conjugación

Trasferencia de un plásmido bacteriano de una célula a otra; el plásmido codifica las funciones necesarias para lograr esa trasferencia.

Corte y marcación ('Nick translation')

Técnica para marcar radiactivamente una molécula de ADN que se usará como sonda en las técnicas de hibridación. Se hacen inicialmente cortes en una de las cadenas de la molécula en doble hélice del ADN con una enzima llamada ADNasa; estos cortes son identificados por la polimerasa-I del ADN, que aplica su función de exonucleasa en la dirección 5' a 3'.

Al tiempo que la actividad de la exonucleasa elimina los nucleótidos de la posición 5', su actividad de polimerasa coloca nuevos nucleótidos que se encuentran presentes en el medio. Algunos nucleótidos se han adicionado al medio con un átomo de fósforo radiactivo en la posición alfa; así se garantiza que la nueva molécula de ADN que se está sintetizando sea altamente radiactiva.

Cultivo en gota

Cultivo de protoplastos, células, y cuerpos semejantes en una o varias gotas (generalmente colgantes) del medio nutritivo, que se mantienen en pequeñas cámaras de vidrio o de plástico trasparente.

Cultivo en suspensión

Cultivo de células individuales, agregados o tejidos en medio líquido y sin adición de agar (o con una concentración tan baja de éste que no gelifica); normalmente requiere agitación para gozar de aireación adecuada.

Cultivo primario

Cultivo obtenido directamente de partes de tejidos o de órganos (células y protoplastos) de la planta donadora (planta madre); debe considerarse como tal hasta el primer subcultivo, después del cual da lugar a un linaje (cultivo secundario).

Densidad crítica de células

Representa el inóculo más pequeño del cual puede desarrollarse, en forma reproducible, un nuevo cultivo en suspensión; se expresa como el número de células por unidad de volumen.

Densidad de cultivo

En una suspensión (p.e., de células o protoplastos) es el número de unidades por mililitro de medio.

Digitized by Google

Dormencia

Tecnicismo (por calco no admitido del inglés 'dormancy') para indicar latencia u otro estado de quiescencia fisiológica.

Eficiencia de aplicación en placa absoluta

Número de colonias formadas (CF) por número de células aplicadas (CA), multiplicado por cien: (CF/CA) x 100.

Elemento trasponible

Segmento de ADN que puede moverse, en el genoma, de un locus a otro.

Embriogénesis

Sinónimo: Embrionía

Proceso de iniciación y desarrollo de un embrión. Puede ser sexual, por fusión de dos gametos (embrión cigótico), o asexual, formado a partir de células de tejido adulto (embrión somático); este último da lugar a un embrioide en una serie de pasos que semejan la formación de un embrión cigótico.

Enzimas de restricción

Endonucleasas que reconocen secuencias específicas de bases en la doble cadena del ADN. Las enzimas de restricción se han agrupado en tres tipos: a) tipo I, que se unen a un sitio de reconocimiento específico pero que cortan la molécula de ADN en sitios aleatorios cercanos al sitio de reconocimiento; b) tipo II, que se unen a una molécula de ADN en el mismo sitio en que la cortan; este es el tipo de enzimas utilizadas en ingeniería genética; y c) tipo III, que reconocen una secuencia y cortan en la vecindad de ésta.

Epigenético

Alteración estable en la expresión del genoma, es decir, un cambio en la regulación de la expresión de los genes que persistiría indefinidamente en las divisiones celulares subsiguientes después de remover las condiciones de inducción. Variación dirigida, estable a nivel celular, potencialmente reversible, restringida al potencial genético de la célula (como la habituación), y que no es trasmitida por la semilla o por otro medio.

Estado estacionario

Situación de un cultivo continuo abierto en el cual ocurre un crecimiento balanceado en un ambiente sin alteraciones: $\mu x = (dx/dt)$, donde x = concentración de la biomasa, μ = tasa específica de crecimiento, y t = tiempo.

Digitized by Google

Exón

Diferentes partes de un gen fragmentado que son trascritas y luego traducidas hasta la obtención de una proteína.

Extremos cohesivos

Terminaciones de ADN de cadena simple, con 2 a 5 nucleótidos, que dejan algunas enzimas de restricción de tipo II. Estas terminaciones pueden hibridarse con terminaciones complementarias presentes en otras moléculas de ADN, un paso muy frecuente durante el proceso de clonaje de genes.

Fase exponencial (del crecimiento)

Sinónimo: Fase logarítmica

Período definido de tiempo durante el cual la tasa de aumento de biomasa por unidad de concentración de biomasa (tasa específica de crecimiento) es constante y puede medirse.

Gametoclonal

Relativo a la propagación clonal de gametos (polen, óvulos), a diferencia de la somaclonal (propagación de células somáticas).

Gemación

Forma de reproducción asexual en que se produce un individuo joven como excrecencia de otro más viejo. Liberación de un virus de la célula en que ocurrió su replicación (fenómeno común en virus animales recubiertos).

Gen estructural

Gen que, a diferencia de uno regulador, tiene la codificación para la molécula de ARN que dará un producto proteico.

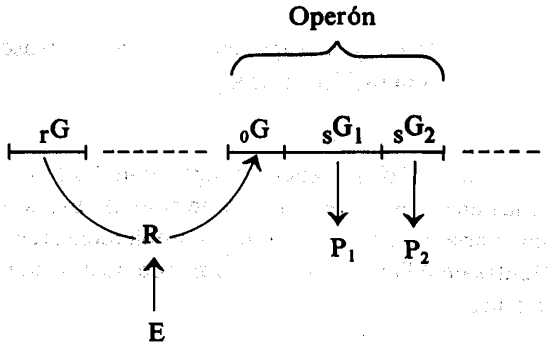
Gen marcador

Gen que expresa ciertas características o diferencias fenotípicas muy notorias, lo que permite establecer su presencia en el genoma y facilita la detección de eventos de recombinación.

Gen regulador

Gen que controla la tasa de síntesis de los productos de otros genes distantes de él. Un gen regulador ($_rG$), p.e., controla la síntesis de un represor proteínico (R), el cual inhibe la acción de un gen operador ($_0G$) y, de este modo, activa el operón (genes estructurales sG_1, sG_2, etc.) que controla.

Digitized by Google



Gen supresor
Gen que codifica para un ARN de trascripción (tARN) y que lee el codón mutado en el mismo sentido del codón original, o como un sustituto aceptable para el significado original.

Genoteca
Colección de fragmentos de ADN amplificados en vectores de clonamiento (pBR322). Los fragmentos clonados pueden provenir de ADN genómico o de ADN complementario (cDNA).

Hibridación
Formación de duplex estables entre dos cadenas de nucleótidos complementarias, según el apareamiento propuesto por Watson-Crick; la eficiencia de la hibridación es una prueba de la homología que existe entre secuencias. (En genética clásica y en mejoramiento, hibridación es la formación de un nuevo organismo diploide, ya sea por un proceso sexual normal o por fusión de protoplastos.)

Hibridación celular somática
Acción de fusionar protoplastos derivados de células somáticas que difieren genéticamente, o sea, que provienen de dos linajes (especies) sin parentesco, para producir células híbridas que contienen uno o más cromosomas de cada especie y que son capaces de desarrollarse en un cultivo.

Hibridación distante
Hibridación entre plantas de poco o ningún parentesco, como la que arroja híbridos interespecíficos o intergenéricos; frecuentemente, estos híbridos sólo son posibles mediante fusión somática.

Digitized by Google

Hidrolizado de caseína (CH, Cs, AHCH, EHCH)

Sustancia químicamente indefinida y compleja, obtenida por hidrólisis enzimática (EHCH) o ácida (AHCH) de la caseína; se utiliza para proporcionar, en el medio de cultivo, una mezcla natural de aminoácidos para la nutrición nitrogenada, y se considera como fuente no específica de nitrógeno reducido.

Indice mitótico

Es la suma de diferentes fases de la mitosis en relación con el porcentaje de las células analizadas; sirve para determinar la duración relativa de la interfase o de fases separadas de la mitosis, y en combinación con el conocimiento que se tenga de un cultivo, permite calcular la duración absoluta de las fases del ciclo de crecimiento. Su valor en una población de células en crecimiento es de 3 a 5. Se calcula mediante la expresión:

$$IM = \frac{\text{Núcleos en mitosis (no.)}}{\text{Núcleos observados (no.)}} \times 100$$

Intrón

Secuencia (de ADN) dentro de un gen eucariótico que no se expresa en el producto proteínico de ese gen. Las secuencias intrones son trascritas en el ARN pero deben eliminarse, y el ARN se une nuevamente antes de que pueda ser traducido; este proceso se conoce como eliminación de intrones (intron splicing). Algunos genes de eucariontes superiores contienen un número considerable de intrones conformados por una gran parte del total de las moléculas de ADN. También se encuentran intrones en genes cuyo ARN, aunque trascrito, no se traduce, como el ARN ribosomal (rARN) y el ARN de trasferencia (tARN) de los genes eucarióticos; en estos casos la secuencia intrón no aparece en la molécula funcional de ARN.

Isoenzima

Sinónimo: Isozima

Cualquiera de las formas electroforéticamente distintas que toma una enzima dentro de una célula (o de una especie); representan diferentes estados poliméricos que tienen la misma función, y se detectan mediante tinción.

Kilobase (kb)

Conjunto de 1000 bases o pares de bases. El tamaño de la molécula de ADN se expresa en kb.

Digitized by Google

Liposoma
Vesícula artificial de fosfolípidos, rodeada de una membrana doble; permite la introducción de partículas de alguna sustancia al interior de una célula.

Lisozima
Sinónimo: Lisoenzima
Enzima que puede digerir la pared celular de una bacteria.

Locus (plural: loci)
Posición específica en un cromosoma en la cual está ubicado el gen que controla una determinada característica; el locus puede estar ocupado por cualquiera de los alelomorfos del gen.

Lux (lx)
Unidad de medición de la luz incidente que, irradiada por un ángulo sólido de una bujía patrón, ilumina una superficie de 1 m^2 situada a una distancia de 1 m.

Mapa
En inglés tiene dos acepciones, una como verbo (to map) y otra como sustantivo (map). En español, la primera se traduciría con el tecnicismo 'mapear', que significa determinar la posición relativa de los genes, o de los sitios de restricción, en una molécula de ADN. El 'mapeo' genético (acción verbal) se hace con experimentos de cruzamiento en que se determina la relación de ligamiento y la frecuencia de recombinación entre dos genes dados. Cuanto más alejados estén los dos genes en un cromosoma, más grande será la frecuencia de recombinación entre ellos; si están en diferentes cromosomas, es decir, si no están ligados, la máxima frecuencia de recombinación será del 50%.

El mapeo físico se hace mediante digestiones del ADN con diferentes enzimas de restricción, digestiones que pueden hacerse con una o dos enzimas a la vez. La segunda acepción (sustantivo) se traduce como mapa, es decir, un diagrama que muestra la posición relativa de dos genes o sitios de reconocimiento para enzimas de restricción, y la distancia que los separa.

Mapa de ligamiento
Diagrama que representa un cromosoma con el orden lineal de los genes asociados con él.

Mapeo (ver Mapa)

Digitized by Google

Marcador
Mutación ocurrida en un gen que facilita el estudio de su herencia.

Monosómico
Célula u organismo diploide que ha perdido un cromosoma de sus juegos cromosómicos (2n-1); durante la meiosis aparecerá un cromosoma univalente, no emparejado. La existencia de uno solamente de cada par de cromosomas homólogos.

Movilización
Trasferencia, entre una bacteria y otra, de un plásmido no conjugativo llevada a cabo por un plásmido conjugativo. Al igual que aquél, los genes cromosómicos —o, en general, los fragmentos de ADN— pueden ser trasferidos por este sistema.

N-Z Amine
Nombre comercial de un hidrolizado pancreático de la caseína, que sirve de fuente de nitrógeno reducido (aminoácidos) en los medios de cultivo.

Nick translation (ver Corte y marcación)

Operón
Grupo de genes funcionalmente coordinado. Unidad completa de la expresión de los genes y de su regulación, que incluye genes estructurales, gen(es) regulador(es); y elementos de control de gen(es) regulador(es).

Par de bases (bp)
Par de nucleótidos unidos por puentes de hidrógeno que se encuentran en ácidos nucleicos de doble cadena; el tamaño de una molécula de ADN se estima, a menudo, por el número de pares de bases que ella contiene.

Patrón de restricción
Presentación del resultado de la caracterización de la molécula de ADN después de fragmentarla con enzimas de restricción.

Picogramo
Unidad empleada para medir el contenido de ADN por célula; equivale a 10^{-12} g (una billonésima de gramo).

Plaquear
Tecnicismo por 'aplicar en placa', es decir, esparcir células sobre la superficie de un medio gelificado. n. Plaqueo.

Digitized by Google

Plásmido

Elemento genético (es una molécula de ADN) situado dentro de la célula huésped, que se replica independientemente de los cromosomas del huésped. Los plásmidos varían en tamaño desde menos de 1 kb (mil bases) hasta 300 kb, y varían también en el número de copias suyas por célula del huésped (desde 1 hasta más de 100). La mayoría de los vectores de clonamiento utilizados en ingeniería genética se basan en plásmidos naturales que han sido manipulados para que introduzcan en otras células características como la resistencia a los antibióticos y los sitios exclusivos que sólo reconocen las enzimas de restricción. Casi todos los plásmidos son moléculas de ADN circular de doble cadena.

Plásmido bifuncional (ver Vector)

Promotor

Región ubicada hacia el extremo 5' del codón de iniciación de un gen cualquiera. En esta región la polimerasa del ARN se une al ADN y, después de trasladarse hasta el codón de iniciación, empieza la trascripción en el sitio correcto.

Recombinante

Término usado en genética clásica para denominar un organismo que contiene una combinación diferente de los alelos provenientes de sus progenitores. Tal organismo puede resultar de un evento de entrecruzamiento o de un rearreglo independiente de los diferentes cromosomas durante la meiosis. En genética molecular, este término se refiere a una molécula conformada por nuevas combinaciones de secuencias de ADN. También se usa como adjetivo (molécula de ADN recombinante).

Retrocruce

Cruce de un hijo (p.e., un híbrido) con un individuo que tiene el genoma parental de uno u otro de sus progenitores. Cruce de un genotipo desconocido con un homocigoto recesivo de modo que los fenotipos de las progenies correspondan directamente a los cromosomas del padre del genotipo desconocido.

Retrofusión

Proceso de fusionar células de un híbrido somático con células de una de las líneas parentales del híbrido.

Secuencia CAAT

Secuencia muy conservada que se encuentra en la región promotora de los genes que codifican para proteínas, en los organismos eucarióticos.

Digitized by Google

Secuencia de ADN de copia única
La secuencia que sólo se encuentra presente una vez en el genoma de un organismo.

Secuencia de ADN repetida
Se refiere a una secuencia de nucleótidos que se presenta más de una vez en el genoma de un organismo, en el cual puede haber desde unas pocas copias de estas secuencias repetidas hasta millones de ellas.

Secuencia TATA
Secuencia rica en adenina y timina que se encuentra aproximadamente a 25 pares de bases antes del sitio en que se inicia la trascripción de los genes en los organismos eucarióticos. Esta secuencia se conserva bien, y se asocia con el sitio de reconocimiento de la polimerasa del ARN.

Sitio de reconocimiento
Secuencia de nucleótidos a la cual se une, en primera instancia, una enzima de restricción. En las enzimas de restricción de tipo II —las que se usan en ingeniería genética— el sitio de reconocimiento es, al mismo tiempo, el sitio por donde la enzima corta la molécula de ADN. Las enzimas de tipo I, en cambio, tienen un sitio de reconocimiento pero el sitio en que cortan la molécula de ADN ocurre al azar y a cierta distancia del primero.

Sonda
Molécula de ARN o de ADN con una secuencia específica de nucleótidos, que ha sido marcada radiactivamente. Las sondas se utilizan para detectar secuencias complementarias en las técnicas de hibridación.

Tasa de mutación
Probabilidad con que ocurre un evento particular de mutación en una entidad biológica (virus, células, etc.) por generación, es decir, durante el período de un ciclo reproductivo.

Tasa específica de crecimiento
Es la tasa de crecimiento (μ) de la biomasa de una población celular por unidad de concentración de la biomasa del cultivo, según la expresión:

$$\mu = (\log 2\ 2)/g = 0.693/g$$

g = tiempo de generación promedio (o sea, tiempo de duplicación del número de células, t_d).

Tipo silvestre
Gen u organismo normal que no ha mutado. Este término fue acuñado originalmente para denotar el organismo que se encontraba presente en

Digitized by Google

la naturaleza de manera regular; actualmente, su significado es más especializado. Por tipo silvestre se entiende la constitución genética de un organismo al comienzo de un experimento de mutagénesis. Por consiguiente, ese organismo puede contener, para un genetista, cierto número de mutaciones o marcadores genéticos antes de que él introduzca otros cambios cuando haga experimentos de mutagénesis.

Trasferencia Southern

Técnica que combina el poder de resolución de la electroforesis en geles de agarosa con la alta sensibilidad de la hibridación de los ácidos nucleicos. Los fragmentos de ADN, separados mediante electroforesis en un gel de agarosa, son desnaturalizados *in situ* para trasferirlos, generalmente por capilaridad, a una hoja de nitrocelulosa, de nylon o de otra matriz que sirva como soporte sólido. El ADN de cadena simple se une covalentemente a la matriz, quedando así disponible para ser hibridado con una sonda, es decir, con otra cadena simple de ADN que ha sido marcada radiactivamente. La hibridación se detecta por el método de la autoradiografía. El nombre de esta técnica se debe al investigador que la desarrolló: E. M. Southern. Cuando se trasfiere ARN a una matriz sólida empleando la misma técnica, ésta se denomina trasferencia Northern, y cuando se trasfieren así proteínas, se denomina trasferencia Western. La denominación de estas técnicas es arbitraria y obedece simplemente a una idea de continuidad después de que Southern desarrolló la primera de ellas.

Trasformación

Introducción de moléculas de ADN dentro de las células de un organismo por métodos diferentes al entrecruzamiento ('crossingover') sexual convencional. Por ejemplo, los plásmidos pueden ser trasformados dentro de células bacterianas cuando atraviesan la pared y las membranas celulares de éstas.

Trasposón

Elemento genético (moléculas de ADN) capaz de cambiar su posición de un cromosoma a otro.

Trisómico

Núcleo (o célula) diploide que tiene, en relación con el número básico, n, un cromosoma adicional (2n+1) que es homólogo de un par cromosómico normalmente presente.

Tween

Nombre químico: polioxietilensorbitan-monolaureato. Detergente no iónico, muy usado en la preparación de explantes —p.e., durante el

Digitized by Google

proceso de esterilización superficial— para reducir la tensión superficial de los líquidos.

Vector

Se llama así a la molécula de ADN derivada de un plásmido o bacteriófago en la cual pueden insertarse o clonarse otros fragmentos de ADN. Un vector debe tener uno o varios sitios únicos de reconocimiento para ciertas enzimas de restricción, y un origen de replicación autónomo que pueda ser reconocido por la maquinaria de la célula huésped con el fin de que la secuencia introducida pueda ser reproducida. Asimismo, el vector debe conferir un fenotipo definido al organismo hospedante de tal modo que éste pueda seleccionarse (por resistencia a los antibióticos) o detectarse fácilmente (por formación de colonias).

Vector bifuncional

Molécula de ADN capaz de replicarse en dos organismos diferentes, p. ej., en *E. coli* y en una levadura; generalmente, la molécula se multiplica en *E. coli* para que sea trasformada luego en el segundo huésped.

Zimograma

Esquema del patrón de bandas enzimático visualizado después de hacer la electroforesis.

Digitized by Google

Apéndice E

Costo mínimo de un laboratorio de cultivo de tejidos vegetales

W. M. Roca*
G. Mafla*
R. J. Segovia**

Se cotiza aquí, a modo de ejemplo, el valor mínimo de un laboratorio de cultivo de tejidos instalado en Palmira, Colombia. El cambio oficial cuando se estimó este valor (noviembre 1988) era de Col$326 por US$1.00.

Laboratorio de Cultivo de Tejidos

A. Instalaciones

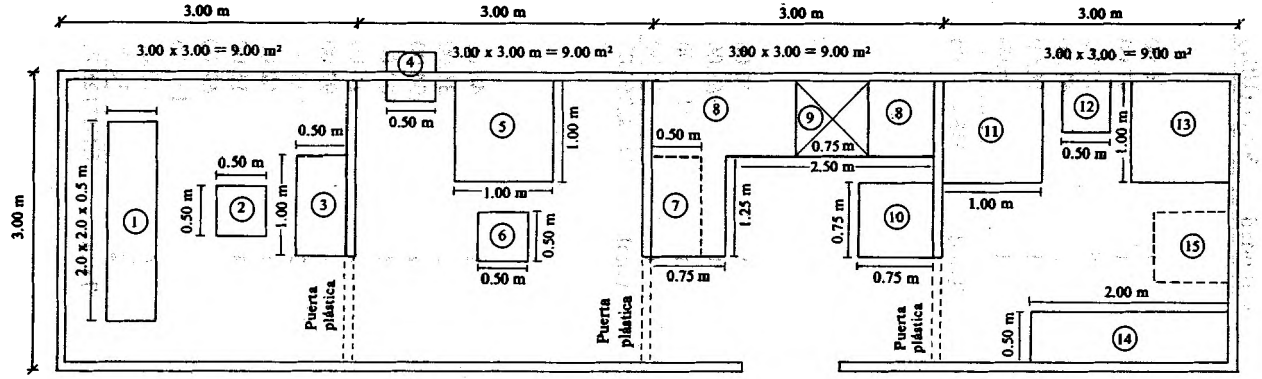
El área del laboratorio (Figura E.1) contiene cuatro espacios:

Cuarto de trasferencia:	3m x 3m = 9 m²
Cuarto de crecimiento:	3m x 3m = 9 m²
Cuarto de preparación de medios:	3m x 3m = 9 m²
Cuarto de autoclave:	3m x 3m = 9 m²
Area total:	36 m²
Costo estimado:	US$4417.00

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

** Unidad de Servicios a la Investigación (USI), Administración de Invernaderos, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia.

Digitized by Google



Cuarto de crecimiento (CC)
1. Estantería
2. Butaco
3. Mesa

Cuarto de trasferencia (CT)
4. Aire acondicionado
5. Cámara de flujo laminar
6. Butaco

Cuarto de preparación de medios (CPM)
7. Vitrina adosada
8. Mesa
9. Lavadero
10. Refrigerador pequeño

Cuarto de autoclave (CA)
11. Destilador
12. Estufa
13. Autoclave
14. Vitrina
15. Cámara de termoterapia

Escala: 1:50
Area total: 4 x 9 m = 36 m².
Costo estimado:
Por m²: US$122.70
Total: 36 m² x 122.70 = US$4417.00

Figura E.1. Plano de un laboratorio de micropropagación diseñado en la UIB del CIAT, en el que aparecen dimensiones y un número mínimo de elementos de trabajo. En el CC caben dos estanterías adicionales; en el CT hay espacio para dos cámaras de flujo laminar.

Digitized by Google

B. Equipo y elementos

	Cantidad	Valor (US$)
1. Cuarto de crecimiento		
Iluminación (red instalada)	1	46.00
Estantería metálica	1	97.00
Lámparas para la estantería	5	77.00
Mesa (2 m)	1	62.00
Butaco	1	16.00
Termómetro (máxima y mínima)	1	16.00
	Total	US$314.00
2. Cuarto de trasferencia		
Iluminación (red instalada)	1	46.00
Aire acondicionado (14,000 BTU)	1	766.00
Cámara de flujo laminar	1	1532.00
Butaco	1	16.00
	Total	US$2360.00
3. Cuarto de preparación de medios		
Iluminación (red instalada)	1	46.00
Estufa	1	31.00
Refrigerador pequeño	1	154.00
Balanza	1	307.00
Cinta para medir pH (rollos)	20	16.00
Lavadero sencillo	1	92.00
Vitrina adosada	2	184.00
Mesa (2 m)	1	62.00
Butaco	1	16.00
Extinguidor pequeño	1	62.00
Carro de laboratorio	1	123.00
Bandejas plásticas	6	19.00
Bandejas metálicas	2	16.00
	Total	US$1128.00

Digitized by Google

	Cantidad	Valor (US$)
4. Cuarto de autoclave (bodega)		
Iluminación (red instalada)	1	46.00
Estantería	1	98.00
Vitrina	1	92.00
Extractor	1	153.00
Cámara de termoterapia	1	919.00
Autoclave	1	154.00
Destilador	1	766.00
	Total	US$2228.00

C. Cristalería

Probeta de 100 ml	1	5.00
Probeta de 1000 ml	1	17.00
Pipeta graduada de 5 ml	1	3.00
Frascos para alimentos (7 x 4 cm)	2000	81.00
Frascos grandes	1000	54.00
Cajas Petri (15 x 100 mm)	50	10.00
	Total	US$170.00

D. Reactivos

NH_4NO_3	1000 g	25.00
KNO_3	500 g	14.00
KH_2PO_4	500 g	18.00
$MgSO_4.7H_2O$	500 g	10.00
H_3BO_3	500 g	18.00
$MnSO_4.H_2O$	500 g	30.00
$ZnSO_4.7H_2O$	500 g	25.00
$Na_2MoO_4.2H_2O$	500 g	101.00
$CuSO_4.5H_2O$	500 g	38.00
$CoCl_2.H_2O$	125 g	25.00
KI	500 g	43.00

(Continúa)

Digitized by Google

(Continuación)

	Cantidad	Valor (US$)
$CaCl_2.2H_2O$	500 g	12.00
Na_2EDTA	125 g	34.00
$FeSO_4.7H_2O$	500 g	38.00
Tiamina-HCl	100 g	20.00
Mioinositol	100 g	20.00
Acido naftalenacético	100 g	26.00
Acido giberélico	5 g	55.00
Bencilaminopurina (BAP)	5 g	30.00
Azúcar	3 kg	5.00
Bacto Agar	2 lb	98.00
Hipoclorito de calcio	5 kg	15.00
Alcohol (96%)	20 lt	10.00
Tampón o 'bófer'	500 g	15.00
	Total	US$725.00

E. Instrumental

Mangos para bisturí	2	15.00
Tijeras pequeñas	2	12.00
Cuchillas para bisturí no. 10	1 pq/50	30.00
Pinzas cortas	2	15.00
Pinzas largas	2	30.00
	Total	US$102.00

F. Materiales

Mechero de alcohol	1	5.00
Rollo de algodón	5	6.00
Gasa	1	6.00
Papel aluminio	5	15.00
Papel para envolver	2	6.00
Papel filtro (9 cm)	5	15.00

(Continúa)

Digitized by Google

(Continuación)	Cantidad	Valor (US$)
Cinta (Handy Plastic)	3	37.00
Espátula	1	6.00
Mascarillas	1 pq/100	6.00
Detergente	—	6.00
Cepillos para limpiar tubos	—	6.00
Botellón plástico	1	15.00
Tarro de basura	1	15.00
Bolsas plásticas para basura	—	15.00
Marcadores	3	6.00
	Total	US$165.00

G. Equipo opcional

Si hay suficiente presupuesto, puede adquirirse el siguiente equipo:

Estereoscopio	1	459.00
Lupa grande	1	153.00
Equipo de medición de pH	1	306.00
Aire acondicionado	1	765.00
	Total	US$1683.00

H. Costo global estimado

	Valor (US$)
Instalación del laboratorio	4,421.00
Equipos	6,030.00
Cristalería	170.00
Reactivos	725.00
Instrumental	102.00
Materiales	165.00
Total	11,613.00
Imprevistos (30%)	3,484.00
Costo global	US$15,097.00

Digitized by Google

Ejemplo 1
Laboratorio para micropropagación de yuca

Equipo para producir 100,000 plantas al año:

	Cantidad	Valor (US$)
Tubos de ensayo (no. 18)	2000	380.00
Agar (kg)	4	400.00
Mecheros de alcohol	2	10.00
Mangos para bisturí	4	31.00
Tijeras pequeñas	4	24.00
Cuchillas para bisturí (no. 11)	200	111.00
Pinzas punta fina	4	30.00
Pinzas largas	4	60.00
Rollos de algodón	20	24.00
Rollos de parafilm	6	130.00
Cajas Petri (100 x 15 mm)	72	181.00
Cámara de flujo laminar doble	1	3500.00
	Total	US$4881.00

Personal: dos empleados permanentes.

Ejemplo 2
Laboratorio para cultivo de anteras de arroz

Equipo para producir 2000 líneas de arroz al año:

	Cantidad	Valor (US$)
Frascos:		
de 7 x 4 cm (inducción)	3000	200.00
de 10 x 10 cm (regeneración)	5000	250.00
Mecheros de alcohol	2	10.00
Mangos para bisturí	4	31.00
Cuchillas para bisturí (no. 10)	100	56.00
Pinzas de punta gruesa (medianas)	4	15.00
Pinzas de punta gruesa (largas)	2	10.00
Rollos de algodón	20	24.00
Cajas Petri (150 x 20 mm)	48	176.00
Cámara de flujo laminar doble	1	3500.00
Carmín (frasco de 1 g)	25	84.00
Acido acético (frasco de 1 lt)	1	37.00
Etanol	20 lt	11.00
	Total	US$4404.00

Personal: dos empleados permanentes.

Digitized by Google

Implementos comunes a los ejemplos 1 y 2

La actividad desarrollada tanto en el laboratorio de yuca como en el de arroz requiere además los siguientes elementos:

	Cantidad	Valor (US$)
Balanzas:		
para cantidades pequeñas	1	1,825.00
para cantidades grandes	1	1,995.00
Plato agitador-calentador	1	138.00
Barras agitadoras magnéticas:		
grandes	3	8.00
medianas	3	9.00
pequeñas	3	13.00
Autoclave	1	2,000.00
Carros de laboratorio	2	224.00
Potenciómetro (medidor de pH)	1	950.00
Refrigerador	1	1,050.00
Bandejas plásticas	6	15.00
Bandejas metálicas	4	30.00
Estereoscopio binocular	1	800.00
Microscopio de contraste de fase	1	1,500.00
Portaobjetos y cubreobjetos	—	120.00
Pipetas graduadas:		
1 ml	5	59.00
2 ml	5	59.00
5 ml	5	62.00
10 ml	5	66.00
Vasos gruaduados:		
100 ml	12	25.00
250 ml	12	24.00
500 ml	6	18.00
1000 ml	6	34.00
Frascos lavadores plásticos de 250 ml	4	10.00
Probetas:		
25 ml	4	45.00
50 ml	4	46.00
100 ml	4	55.00
500 ml	2	53.00
1000 ml	2	74.00

(Continúa)

Digitized by Google

(Continuación)	Cantidad	Valor (US$)
Frascos Erlenmeyer:		
125 ml	12	74.00
250 ml	12	77.00
500 ml	6	50.00
1000 ml	6	82.00
	Subtotal	US$11,590.00
Reactivos:		
NH_4NO_3	1 kg	45.00
KNO_3	500 g	14.00
$(NH_4)_2SO_4$	1 kg	35.00
KH_2PO_4	500 g	18.00
$MgSO_4.7H_2O$	500 g	10.00
KCl	500 g	22.00
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	500 g	27.00
H_3BO_3	500 g	18.00
$MnSO_4.H_2O$	500 g	30.00
$ZnSO_4.7H_2O$	500 g	25.00
$NaMoO_4.2H_2O$	500 g	101.00
$CuSO_4.5H_2O$	500 g	38.00
$CoCl_2.H_2O$	125 g	25.00
KI	500 g	43.00
$CaCl_2.2H_2O$	500 g	12.00
Na_2EDTA	125 g	34.00
$FeSO_4.7H_2O$	500 g	38.00
Tiamina-HCl	100 g	20.00
Glicina	250 g	17.00
Acido nicotínico	100 g	22.00
Mioinositol	100 g	20.00
Acido naftalenacético	100 g	26.00
Cinetina	100 g	48.00
Azúcar	5 kg	9.00
Acido giberélico	5 g	55.00
Acido indolacético	10 g	28.00
Bencilaminopurina (BAP)	5 g	30.00
	Subtotal	US$810.00
	Total	US$21,686.00

Digitized by Google

Apéndice F

Medios de cultivo más usados

1. **Medio de Knop** (Gautheret, 1959)

$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	500 mg/litro
KNO_3	125 mg/litro
$MgSO_4.7H_2O$	125 mg/litro
KH_2PO_4	125 mg/litro

2. **Medio de Heller** (Gautheret, 1959)

$ZnSO_4.7H_2O$	1.00 mg/litro
H_3BO_3	1.00 mg/litro
$MnSO_4.4H_2O$	0.10 mg/litro
$CuSO_4.5H_2O$	0.03 mg/litro
$AlCl_3$	0.03 mg/litro
$NiCl_2.6H_2O$	0.03 mg/litro
KI	0.01 mg/litro

3. **Vitaminas de Miller** (1967)

Mionositol	100 mg/litro
Tiamina-HCl	0.1 mg/litro
Acido nicotínico	0.5 mg/litro
Piridoxina-HCl	0.5 mg/litro

4. **Medio nutritivo MI116** (Mosella, 1979)

NH_4NO_3	1500.0	mg/litro	$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	500.0	mg/litro
KNO_3	1050.0	mg/litro	KH_2PO_4	300.0	mg/litro
$MgSO_4.7H_2O$	71.5	mg/litro	KCl	35.0	mg/litro
$MnSO_4.4H_2O$	14.0	mg/litro	$ZnSO_4.7H_2O$	3.8	mg/litro
H_3BO_3	1.6	mg/litro	KI	0.8	mg/litro
$Cu(NO_3)_2.3H_2O$	0.35	mg/litro			
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$	0.2	mg/litro	Na_2EDTA2	14.0	mg/litro
$FeSO_4$	26.0	mg/litro	Mioinositol	100.0	mg/litro
Acido nicotínico	0.5	mg/litro	Piridoxina	0.3	mg/litro
Tiamina	0.1	mg/litro	Acido ascórbico	10.0	mg/litro
Glicina	0.2	mg/litro			

pH del medio: 5.7

Digitized by Google

5. Medio MS-A

Sales MS		
Vitaminas B5:	tiamina-HCl	1 mg/litro
	mioinositol	100 mg/litro
	(Gamborg et al., 1968)	
Sacarosa	2%	
ANA	0.5 mg/litro	
BAP	0.5 mg/litro	
Agar	0.8%	

6. Medio MS-B

Sales MS		
Vitaminas B5:	tiamina-HCl	1 mg litro
	mioinositol	100 mg/litro
Sacarosa	2%	
BAP	1 mg/litro	
Agar Difco	0.7% (para solidificar)	

7. Medio MD-A

Sales MS		
Vitaminas B5:	tiamina-HCl	1 mg/litro
	mioinositol	100 mg/litro
Sacarosa	2%	
ANA	1 mg/litro	
BAP	1 mg/litro	
Agar Difco	0.7% (para solidificar)	

8. Medio D2a

Medio VK-M	1 mg/litro
ANA	1 mg/litro
2,4-D	0.2 mg/litro
ZEA	0.5 mg/litro

9. Medio B5 (Gamborg et al., 1968)

Para suspensiones celulares. El hierro proviene de Sequestrene-330 Fe (Geigy Agricultural Chemicals, Adsley, N.Y.).

$NaH_2PO_4.H_2O$	150 mg/litro	(1.1 mM)
KNO_3	2500 mg/litro	(25.0 mM)
$(NH_4)_2SO_4$	134 mg/litro	(1.0 mM)
$MgSO_4.7H_2O$	250 mg/litro	(1.0 mM)
$CaCl_2.2H_2O$	150 mg/litro	(1.0 mM)
Hierro	28 mg/litro	
$MnSO_4.H_2O$	10 mg/litro	

(Continúa)

Digitized by Google

(Continuación)

H_3BO_3	3 mg/litro
$ZnSO_4.7H_2O$	2 mg/litro
$Na_2MoO_4.2H_2O$	250 µg/litro
$CuSO_4$	25 µg/litro
$CoCl_2.6H_2O$	25 µg/litro
KI	750 µg/litro
Acido nicotínico	1 mg/litro
Tiamina-HCl	10 mg/litro
Piridoxina HCl	1 mg/litro
m-Inositol	100 mg/litro
Sacarosa	20 g/litro
2,4-D	2 mg/litro

pH: 5.5

Nota: KNO_3 y $MgSO_4$ se calcularon en un principio como 30 mM y 2.0 mM, respectivamente.

10. Medio E-10

Sales B5	
2,4-D	1.0 mg/litro
BAP	0.5 mg/litro
AIA	0.5 mg/litro
Glucosa	0.5%
Azúcar	2.0%

11. Medio G-4

Sales B5	
2,4-D	1.0 mg/litro
BAP	0.5 mg/litro
AIA	0.5 mg/litro
Sacarosa	2.0%

FUENTE: International Symposium on Plant Tissue Culture, Rep. Pop. de China, 1981.

12. Medio E-24

Sales B5	
BAP	0.5 mg/litro
ANA	1.0 mg/litro
2,4-D	1.0 mg/litro
m-Inositol	160 mg/litro
Sacarosa	20 g/litro
Agar	8 g/litro

pH: 5.6

Digitized by Google

13. **Medio J-19**

Sales B5	
Cinetina	1.0 mg/litro
ANA	1.0 mg/litro
m-Inositol	160 mg/litro
Sacarosa	20 g/litro

pH: 5.6

14. **Medio N-19**

MS modificado así:	ANA	1 mg/litro
	Cinetina	1 mg/litro
	Sacarosa	3%

15. Medio para propagar aráceas comestibles
(Ver: Salazar, S., Cap. 20, p. 474)

16. Medios para el cultivo de anteras
(Ver: Roca, W. M. et al., Cap. 11, p. 279)

17. Medio líquido para tejidos de banano
(Ver: Angarita y Perea, Cap. 22, p. 506)

18. Medio de Kao para cultivo de protoplastos
(Ver: Szabados, L., Cap. 10, p. 255)

FUENTES: Gamborg, O. L.; Miller, R. A. y Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50:151-158.

Gautheret, R. J. 1959. La culture des tissus végétaux; techniques et réalisations. Masson, París. 863 p.

Institute of Genetics-Academia Sinica e IRRI (International Rice Research Institute). Cell and tissue culture techniques for cereal crops improvement. 1983. Memorias de un taller. IRRI, Manila, Filipinas.

Miller, C. 1967. Cytokinins in *Zea mays*. Ann. N.Y. Acad. Sci. 144:250-257.

Mosella, L. 1979. L'utilization de l'apex caulinaire comme moyen d'élimination de deux types de virions chez le pêcher (*Prunus persica* Batsch). Tesis (Doct.). USTL, Montpellier, Francia. 215 p.

Digitized by Google

(Continuación)

H_3BO_3	3 mg/litro
$ZnSO_4.7H_2O$	2 mg/litro
$Na_2MoO_4.2H_2O$	250 µg/litro
$CuSO_4$	25 µg/litro
$CoCl_2.6H_2O$	25 µg/litro
KI	750 µg/litro
Acido nicotínico	1 mg/litro
Tiamina-HCl	10 mg/litro
Piridoxina HCl	1 mg/litro
m-Inositol	100 mg/litro
Sacarosa	20 g/litro
2,4-D	2 mg/litro

pH: 5.5

Nota: KNO_3 y $MgSO_4$ se calcularon en un principio como 30 mM y 2.0 mM, respectivamente.

10. Medio E-10

Sales B5	
2,4-D	1.0 mg/litro
BAP	0.5 mg/litro
AIA	0.5 mg/litro
Glucosa	0.5%
Azúcar	2.0%

11. Medio G-4

Sales B5	
2,4-D	1.0 mg/litro
BAP	0.5 mg/litro
AIA	0.5 mg/litro
Sacarosa	2.0%

FUENTE: International Symposium on Plant Tissue Culture, Rep. Pop. de China, 1981.

12. Medio E-24

Sales B5	
BAP	0.5 mg/litro
ANA	1.0 mg/litro
2,4-D	1.0 mg/litro
m-Inositol	160 mg/litro
Sacarosa	20 g/litro
Agar	8 g/litro

pH: 5.6

Digitized by Google

Apéndice G

Casa de malla de tipo II para adaptación de las plantas

R. J. Segovia*
D. R. Laing**

El mayor porcentaje de pérdidas de plántulas ocurre en su fase de trasferencia al suelo cuando deben adaptarse a las nuevas condiciones del ambiente edáfico. Este hecho fue destacado durante el curso internacional 'Actualización en Cultivo de Tejidos' celebrado en septiembre de 1988 en el CIAT, en Cali, Colombia, y su importancia es decisiva para el especialista en cultivo de tejidos.

Casi todo el esfuerzo investigativo invertido en el cultivo de tejidos se perdería si las plantas que se regeneren de esos tejidos mueren cuando intenten desarrollarse en un ambiente que, en un comienzo, les resulta desfavorable.

Cuando esas plántulas provienen de un laboratorio de biotecnología, la mayor parte de los investigadores prefieren utilizar instalaciones climatizadas en que se controlen los componentes climáticos (temperatura, luminosidad, humedad relativa, ventilación). Estas instalaciones, sin embargo, así como su mantenimiento, son muy costosas, y muchos investigadores de los países en desarrollo no disponen de ellas. Hay algunas en instituciones científicas de América Latina, pero generalmente carecen de mantenimiento adecuado y no cumplen con los requisitos mínimos de un invernadero; por consiguiente, su microclima, sus zonas de contraste y sus gradientes son perjudiciales para las plántulas.

* Unidad de Servicios a la Investigación (USI), Administración de Invernaderos, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia.
** Director General Adjunto, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia.

Digitized by Google

Desarrollo

En la década de los 80, el CIAT diseñó y desarrolló una casa de malla de tipo II que permite obtener una climatización natural (CN), mejorada ésta, en algunos casos, por la humidificación del piso y por el sombreamiento con mallas debajo del techo. La CN es muy económica, si se la compara con los altos costos de los invernaderos climatizados; es además muy funcional y de una gran flexibilidad ya que ha podido adecuarse a la mayoría de las investigaciones realizadas en el CIAT.

Se espera que, con algunas modificaciones complementarias, la casa de malla de tipo II pueda adaptarse a varios pisos térmicos y a investigaciones diferentes de las que se realizan en el CIAT. Su orientación debe ser siempre óptima respecto a los vientos normales dominantes, principalmente, y al sol. Asimismo, debe estudiarse su ubicación en relación con otras instalaciones.

Las modificaciones y adaptaciones que se hagan a esta casa de malla deben responder a su caracterización climática en determinado tiempo y espacio, y a las exigencias específicas de la investigación que se planea.

Aspectos Generales

La casa de malla de tipo II se ha diseñado en forma modular. Su longitud, por tanto, depende del presupuesto y de las necesidades del investigador; su anchura no debe sobrepasar los 6 m para evitar incrementos de temperatura significativos en su interior.

Dimensiones

Longitud	26 m
Anchura	6 m
Altura de la columna	3 m
Flecha del techo	0.50 m
Flecha del sobretecho	0.50 m
Altura máxima	4 m
Area total	26 x 6 = 156 m^2
Area de la antecámara	2 x 6 = 12 m^2
Area útil	24 x 6 = 144 m^2

Digitized by Google

Drenaje

Para evitar encharcamientos, se instalan tres tuberías cribadas de 4" de diámetro a lo largo de la casa, y se cubren con grava de 1" de diámetro.

Sistema eléctrico

Es opcional.

Sistema hidráulico

Pueden instalarse de 2 a 6 grifos.

Estructura

En tubería galvanizada.

Cerramiento

Según la investigación que se haga, se emplean diferentes tipos de malla. Para estudios de fotoperíodo se usa una malla de polipropileno con un sombreamiento de 100% y recubierta por la parte exterior con malla de aluminio; para trabajos de virología, se utiliza una malla anti-insectos; para otras investigaciones, hay un rango de sombreamiento que va del 30% al 90%.

Techo

Se hace con láminas de fibra de vidrio. Se pueden usar láminas de plástico, pero su duración es de sólo 12 a 24 meses.

Mesas

Las mesas son de hierro y su tapa es de malla metálica pintada de blanco. Estas mesas permiten una mejor circulación, entre las plantas, del aire fresco ascendente, es decir, del que sube desde el piso hasta el techo.

Digitized by Google

Zona verde

Es indispensable instalar grama alrededor de la casa de malla (una franja de 6 m de anchura), con el fin de amortiguar la radiación solar que se refleja hacia las paredes de la casa.

Ganchos (opcionales)

Se instala un sistema de ganchos y líneas de alambre a una altura de 3 m, para colocar hilos que servirán de tutores a ciertas especies de plantas.

Sistema de climatización

A fin de permitir la renovación natural del volumen interior de aire, la casa de malla de tipo II se diseñó con un sobretecho que ocupa la mitad de su ancho total. Cuando el aire interior se calienta, tiende a subir y escapa por las aberturas hechas entre los dos techos; lo ayuda a salir el paso natural de los vientos normales dominantes, el cual atraviesa trasversalmente la casa de malla. Este sistema es la CN mencionada antes.

Un complemento opcional de la CN es la humidificación del piso de la casa de malla con microaspersores; éstos son controlados ya sea manualmente o ya automáticamente mediante un termostato, un reloj de control y una válvula solenoide. Un segundo complemento de la CN es el sombreamiento producido por una malla tendida en la parte exterior, o en la interior, del techo, y a una distancia mínima de 0.50 m.

Microclima interior

Todos los componentes climáticos son interdependientes. La relación más crítica en esta clase de instalaciones se establece entre luz y temperatura, siendo esta última la mayor limitante.

En una casa de malla de tipo II sin modificar, la temperatura máxima en las horas pico (de 1 p.m. a 2 p.m.), al nivel de las mesas, puede estar entre 3 y 6 °C por encima de la temperatura exterior. Si la casa de malla ha sido modificada —mediante aspersión al piso o sombreamiento, o de ambos modos— la temperatura, al nivel de las mesas, será igual o superior en 3 °C a la temperatura exterior (Cuadro G.1).

Digitized by Google

Los datos anteriores dependen de varios factores: el piso térmico, la orientación respecto a los vientos dominantes normales, la ubicación de la casa de malla con relación a otras instalaciones, la especie vegetal que se aclimata, el tipo de mesa empleado, los sistemas de climatización adoptados, la malla empleada, el tipo de piso de la casa, y la anchura de la zona verde exterior.

Cuadro G.1. Temperatura promedio al nivel de las mesas en dos casas de malla de tipo II (una con humidificación y otra sin ella), comparada con la temperatura exterior promedio.[a]

Sitio	Temperaturas	
	Máxima, prom.	Mínima, prom.
Casa de malla II		
Sin humidificación	33.1	21.2
Con humidificación	29.4	19.9
Ambiente exterior	29.1	19.5

a. Datos tomados en las horas pico (1 a 2 p.m.) de los días de junio de 1989, en el CIAT, en Palmira, Colombia (latitud N: 3º 3'; longitud O: 76º 19'; altitud: 965 msnm); prom. = promedio.

Planos

Se han levantado 14 planos para este proyecto que contienen desde la localización general de la casa hasta la descripción de los materiales empleados. Tres de ellos acompañan este apéndice: el plano de fachadas (Figura G.1), la fachada ampliada (Figura G.2), y el plano de isometría para colocar la tubería (Figura G.3.). Mayores detalles y copias de los planos pueden solicitarse a la Unidad de Servicios a la Investigación, Administración de Invernaderos, CIAT, Apartado 6713, Cali, Colombia.

Digitized by Google

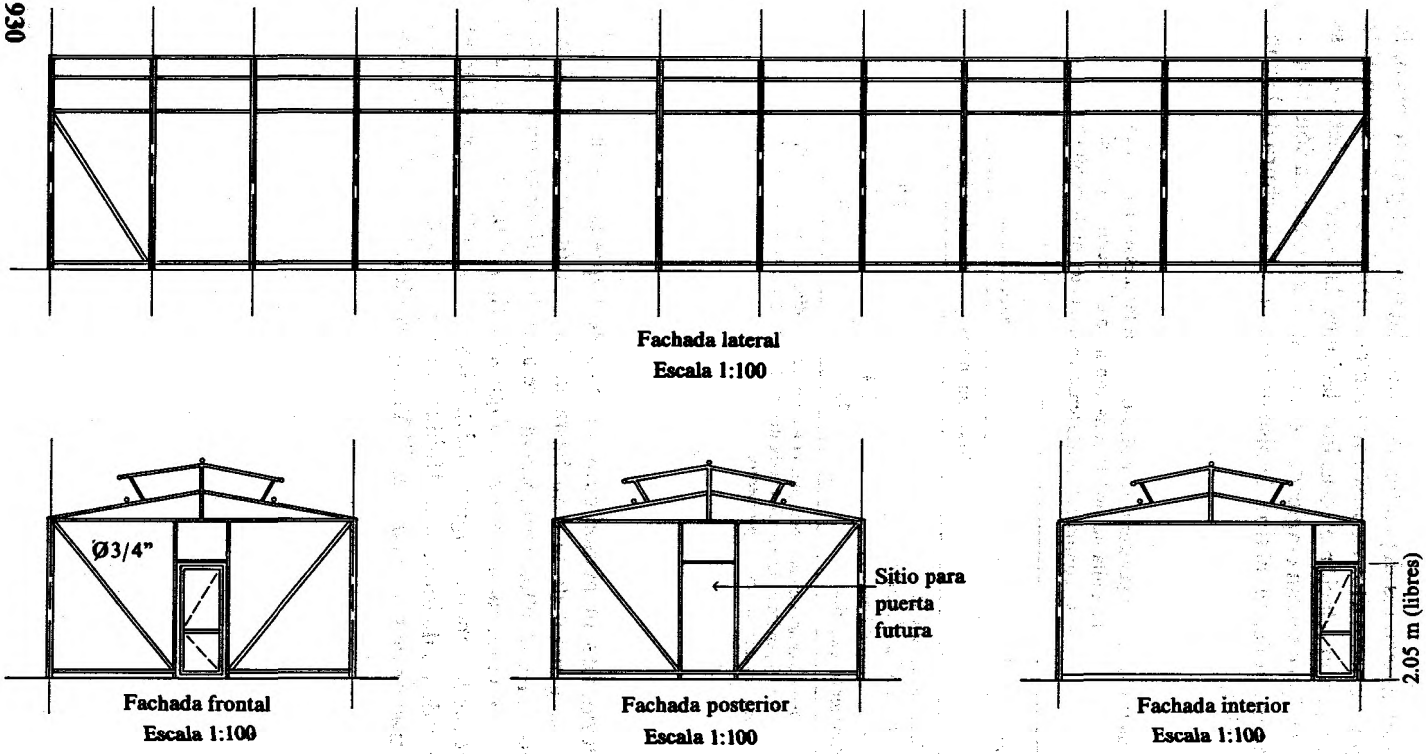


Figura G.1. Plano de fachadas de la casa de malla de tipo II; detalles constructivos. Diseño: D. R. Laing y R. J. Segovia. Julio 1988.

Digitized by Google

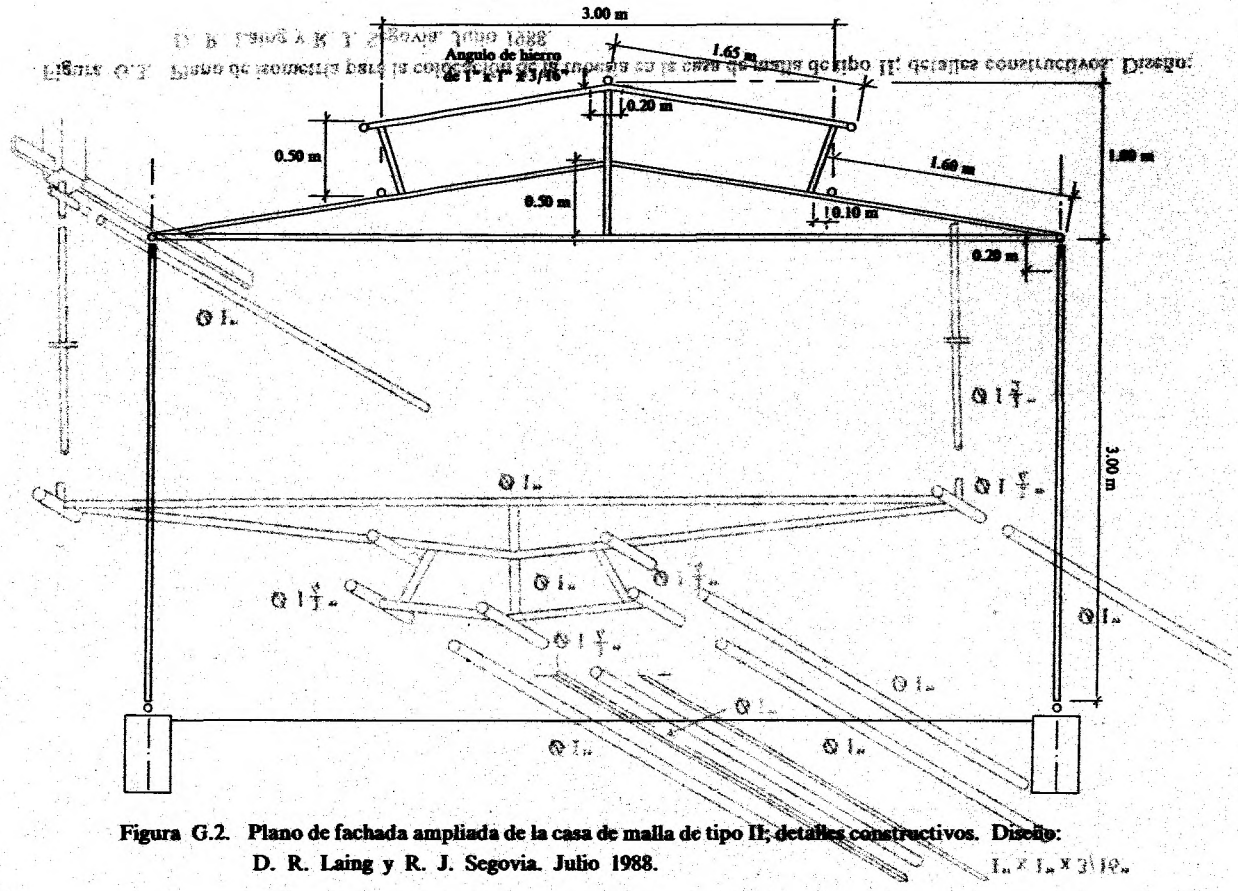


Figura G.2. Plano de fachada ampliada de la casa de malla de tipo II; detalles constructivos. Diseño: D. R. Laing y R. J. Segovia. Julio 1988.

Digitized by Google

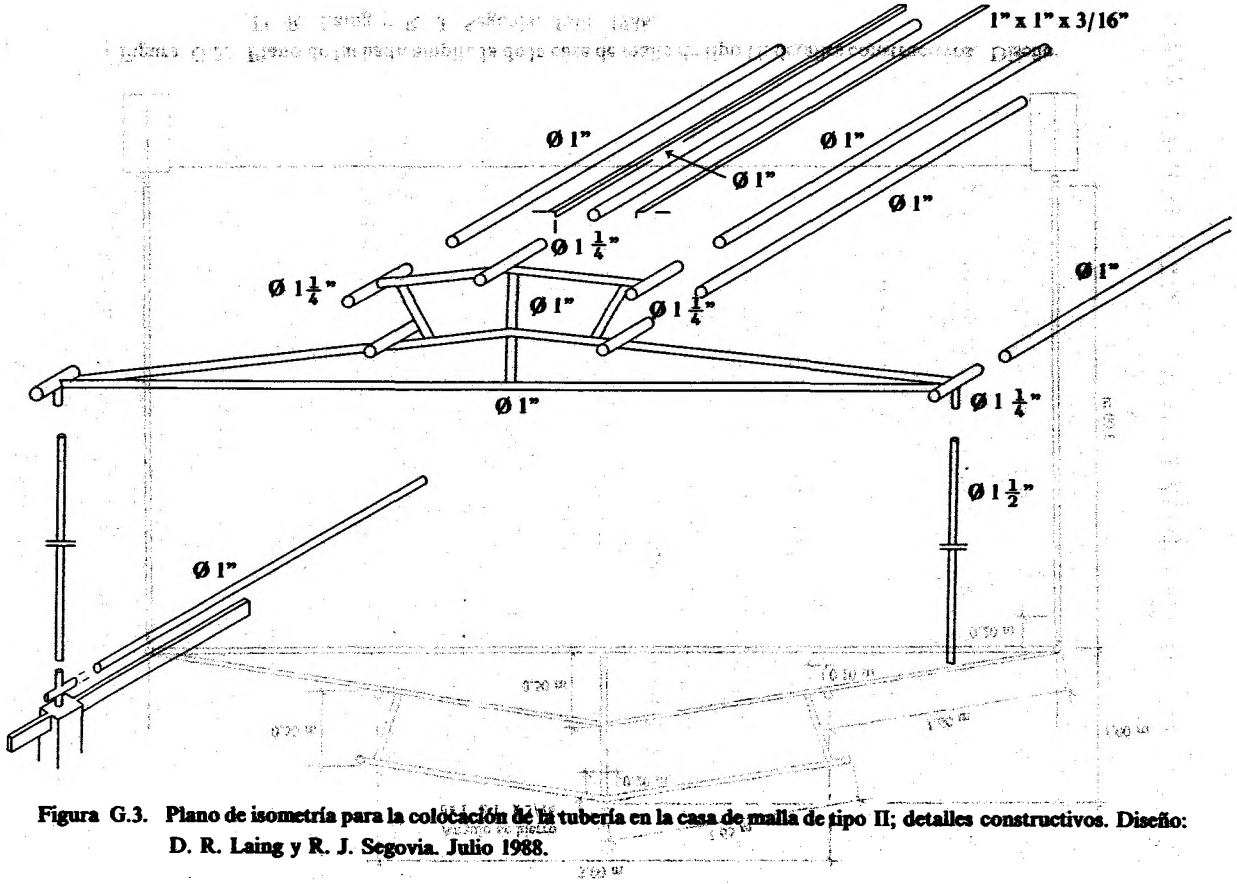


Figura G.3. Plano de isometría para la colocación de la tubería en la casa de malla de tipo II; detalles constructivos. Diseño: D. R. Laing y R. J. Segovia. Julio 1988.

Digitized by Google

Apéndice H

Breve cronología de la biotecnología molecular

1866 Gregorio Mendel descubre las primeras leyes de la herencia.

1902 W. Sutton desarrolla una teoría cromosómica de la herencia.

1902 G. F. J. Haberlandt hace una tentativa de cultivar in vitro células vegetales.

1909 Se introduce el término gen (gene) para describir la unidad de herencia.

1921 Se obtiene el primer maíz híbrido comercial.

1934 P. White cultiva in vitro raíces de tomate.

1939 P. White, R. J. Gautheret y P. Nobécourt cultivan in vitro callos de tabaco y zanahoria.

1940 Beadle y Tatum proponen esta hipótesis: un gen individual da origen a una enzima.

1941 Van Overbeek y sus colaboradores descubren que el agua de coco estimula el desarrollo embrional y la formación de callo en plantas del género *Datura*.

1944 Avery, MacLeod y McCarty establecen que el ADN es el material genético investigando la trasformación de las bacterias.

1946 E. Ball obtiene plantas completas de *Lupinus* y *Tropaeolum* partiendo de cultivos in vitro de ápices.

1952 Morel y Martin obtienen plantas de dalia libres de virus mediante el cultivo de ápices in vitro.

1953 Watson, Crick y Wilkins establecen la estructura molecular de doble hélice del ADN. Por este trabajo reciben el Premio Nobel en 1962.

1953 Sanger establece la secuencia de aminoácidos de la insulina y confirma así la relación existente entre un gen y la secuencia de aminoácidos para la cual éste codifica.

Digitized by Google

1957 F. Skoog y C. O. Miller demuestran la interacción auxina/citocinina en la formación de órganos vegetales en los callos de tabaco.

1960 E. C. Cocking obtiene protoplastos de raíces empleando celulasa.

1960 Morel observa que el cultivo de puntas de brotes es un método promisorio para la propagación vegetativa rápida de las orquídeas.

1966 S. Guha, S. C. Maheshwari y J. P. Nitsch obtienen plantas haploides mediante el cultivo de anteras de *Datura* y de tabaco.

1970 G. Labib y G. Melchers regeneran plantas de tabaco a partir de cultivos de protoplastos.

1970 Se aisla la primera enzima de restricción que corta el ADN en puntos específicos.

1971 Se construyen las primeras moléculas de ADN recombinante.

1971 Se establece la primera empresa dedicada a la Ingeniería Genética.

1971 Científicos del Instituto Nacional de Salud (NIH), de Estados Unidos, comprueban la universalidad del código genético demostrando que las células humanas pueden incorporar en ellas, y procesarlo, el material genético de algunas bacterias.

1972 Jackson, Symons y Berg publican detalles de las técnicas requeridas por el empalme de genes, el cual consiste en cortar, en dos organismos diferentes, fragmentos de ADN y recombinarlos luego para obtener un ADN híbrido biológicamente activo.

1972 Sanger desarrolla un método para trazar el mapa de la secuencia de nucleótidos del ADN.

1973 Se introduce ADN exógeno en algunos plásmidos y éstos se reintroducen en *E. coli.*

1975 Se establece la primera empresa de Biotecnología dedicada a la agricultura.

1976 Se logra el clonaje de los genes 'nif' (para fijación de nitrógeno).

1976 Se desarrollan técnicas para hacer secuencias de ADN.

1976 El Instituto Nacional de Salud (NIH) de Estados Unidos publica la 'Guía para la Investigación del ADN recombinante'.

Digitized by Google

1977 Khorana (del MIT, Estados Unidos) construye el primer gen 'completo', es decir, con los codones inicial y terminal.

1980 Se construyen sondas moleculares (cADN) con genes de plantas.

1980 La Corte Suprema de Estados Unidos establece que las nuevas formas de vida que se creen pueden patentarse. La compañía General Electric llevó a la Corte este caso decisivo.

1980 La Oficina de Patentes de Estados Unidos emite una patente, muy extensa, para proteger el método de recombinación y clonamiento de genes desarrollado por las Universidades de Stanford y de California (patente Cohen-Boyer).

1981 Se desarrolla la máquina que construirá secuencias específicas de nucleótidos.

1981 Se comprueba que los genes introducidos por medio de *Agrobacterium* se heredan en la siguiente generación.

1981 Siete compañías han comprado la licencia para aplicar la técnica de recombinación de genes de la Universidad de Stanford.

1982 Se aislan clones genómicos completos de genes nucleares de plantas.

1983 Se hace la trasferencia de un gen bacteriano a una célula vegetal.

1983 Se logra la expresión, en las plantas, de genes exógenos introducidos por medio de plásmidos recombinantes.

1983 Se obtiene la expresión de los genes que codifican para la proteína del frijol en las células del girasol.

1983 Se da aprobación a las pruebas de campo con bacterias genéticamente modificadas.

1983 Se hacen pruebas de campo con tomate que ha sido sometido a procesos biotecnológicos.

1984 Se avanza en los métodos para trasferir genes usando a *Agrobacterium* como vector.

1985 Se logra la expresión exacta (en qué órgano, en qué momento, etc.) de los genes que codifican para la proteína del frijol, en una planta de tabaco.

Digitized by Google

1985 Se obtiene la expresión de los genes para tolerancia a los antibióticos después de incorporar esos genes directamente en los protoplastos de tabaco.

1985 Se desarrolla en la Universidad de Cornell la pistola genética para introducir genes en plantas.

1986 La corporación Du Pont adquiere los derechos de propiedad de la pistola genética desarrollada en la Universidad de Cornell.

1988 Se obtiene la primera planta trasgénica (en soya) aplicando el principio de la pistola genética.

1990 Serán liberadas comercialmente las primeras plantas trasgénicas.

Digitized by Google

Apéndice I

Desarrollo de la biotecnología agrícola en América Latina y el Caribe

W. M. Roca*
M. C. Amézquita*
V. M. Villalobos**
L. Mroginski***

Situación

En los últimos 10 a 15 años, la biología ha evolucionado rápidamente hacia el estudio de los niveles celular, subcelular y molecular de los organismos. Este conocimiento trae consigo metodologías nuevas capaces de mejorar las plantas y los animales. La clonación de células y tejidos in vitro y algunas técnicas del ADN recombinante (rADN) pueden utilizarse ya en diversas áreas del mejoramiento. Otros adelantos de la biotecnología permitirán en el futuro variar el número de copias de un gen, inhibir o activar selectivamente los genes, y trasferir genes seleccionados de una planta a otra o de un animal a otro.

Las técnicas del cultivo de tejidos in vitro para la micropropagación, la eliminación de enfermedades, y la conservación e intercambio de germoplasma se aplican ya a muchas especies vegetales. Se espera también que las aplicaciones de la biotecnología al fitomejoramiento den como resultado productos revolucionarios. Sin embargo, las ganancias inmediatas serán las aplicaciones que aceleren o amplíen las técnicas ya establecidas y que provean apoyo a los programas existentes de mejoramiento; el cultivo de anteras para la obtención rápida de homocigosis, y la selección in vitro de somaclones y líneas mutantes son algunas de estas aplicaciones.

* Unidad de Investigación en Biotecnología (UIB), y Sección de Biometría/Unidad de Servicio de Datos, respectivamente, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia.
** Centro de Genética, Colegio de Posgraduados, Chapingo, México. Actualmente en: Programa de Mejoramiento de Cultivos Vegetales, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba, Costa Rica.
*** Facultad de Ciencias Agrarias, Instituto de Botánica del Nordeste, Corrientes, Argentina.

Digitized by Google

La mayor limitación que experimenta la ingeniería genética de plantas reside en la falta de conocimientos sobre la genética molecular de los caracteres económicamente importantes. Las técnicas actuales de manipulación del ADN pueden usarse para modificar caracteres de control genético simple. La resistencia a los herbicidas, el mejoramiento de la calidad de las proteínas, la resistencia a los virus y a los insectos son caracteres de importancia económica con los cuales se experimenta actualmente en la ingeniería genética. Por otro lado, el rADN servirá, a mediano plazo, para la construcción de marcadores moleculares y mapas genéticos de ligamiento en las especies cultivadas, para la detección de virus y viroides en las plantas, y para la caracterización del germoplasma. Estos avances tecnológicos han originado hechos importantes para la investigación agrícola, como los siguientes:

A. El sector privado está adquiriendo preponderancia en el desarrollo de la nueva biotecnología en los países desarrollados, y ha recibido por ello el estímulo de las disposiciones legales sobre derechos de protección de plantas y sobre nuevas formas de vida (Hansen et al., 1986). En los últimos años se han establecido 135 empresas de biotecnología dedicadas al mercado agrícola en 18 países desarrollados de América, Europa y Asia, aunque se estima que, para el año 2000, sólo 10 a 20 compañías grandes, verticalmente integradas, dominarán este mercado a nivel mundial (Kidd y Teweles, 1986).

B. Aunque la mayor parte del financiamiento para la investigación básica en biotecnología continuará emanando del sector público, hay una tendencia hacia la vinculación de la inversión privada a estos proyectos en las universidades de los países desarrollados. Por ejemplo, mientras que la mitad de las empresas de biotecnología de Estados Unidos financiaron investigaciones en las universidades de ese país por un total de 120 millones de dólares en 1984, el apoyo estatal llegó a 500 millones de dólares (Blumenthal et al., 1986). Los fondos públicos para investigación biotecnológica en esas universidades se asignan principalmente a proyectos de largo plazo, mientras que la inversión privada se destina a proyectos de corta duración y, por ende, de carácter aplicado. Esta consideración es relevante para la agricultura de los países en desarrollo.

C. Se estima que los cambios que producirá la biotecnología en los países en desarrollo serán tan profundos como los que ha causado en los industrializados (Buttel et al., 1985). Sin embargo, los objetivos de las numerosas firmas de biotecnología son, en general, diferentes de aquéllos de los países tropicales (Elkington, 1986). En cuanto a los cultivos, el interés de esas compañías se centra mayormente en maíz, trigo, tomate,

Digitized by Google

soya, sorgo y otras especies comerciales. Por otro lado, la mayoría de esas firmas no enfocan el problema del rendimiento directamente sino mediante el aumento del valor agregado de los productos agrícolas; en otras palabras, la semilla para las firmas de biotecnología es mucho más importante como un vehículo que como un producto final per se.

D. Para su aplicación en la agricultura tropical, las tecnologías nuevas deberán integrarse a estrategias específicas de mejoramiento. Por tal razón, es necesario que tales tecnologías se ajusten a la realidad y a las necesidades de cada país y región. Esta tarea requiere cooperación interinstitucional en investigación, capacitación y comercio.

Los estudios sobre la situación de la nueva biotecnología, en general, y sobre la agrícola, en particular, contribuirán a la prospección y al establecimiento de programas de cooperación regional e internacional. Ya se han realizado conferencias regionales sobre el tema (Sawyer, 1984; Poltronieri, 1986); además, un primer directorio latinoamericano (Roca, 1985) y prospectos y catálogos para algunos países de la región han sido publicados (COSNET, 1984; Robert y Loyola, 1985; Quintero, 1984).

Este artículo discute brevemente los resultados de un estudio sobre la situación de la biotecnología agrícola en América Latina y el Caribe (Roca et al., 1988) con el propósito de evaluar los recursos físicos y humanos, los proyectos de investigación, las necesidades de capacitación, y los planes futuros en este campo. Se resumen también los resultados obtenidos en biotecnología en 107 instituciones de 23 países de la región.

Tecnologías Actuales

En la región latinoamericana hay preferencia notoria por las tecnologías celulares como el cultivo de tejidos (90% de las instituciones encuestadas), sobre todo en las universidades y en los institutos nacionales de investigación agrícola. Se confirma así la opinión de que las tecnologías más extendidas en los países de la región están asociadas con su aplicación a corto plazo y con bajas inversiones. Por consiguiente, las tecnologías que requieren mayor inversión y especialización, como las moleculares son, actualmente, las de menor empleo en la región (sólo en 24% de las instituciones).

Considerando las especies agrícolas y los microorganismos que se han hecho objeto de estudio biotecnológico (Cuadro I.1), las raíces y tubérculos (papa, camote, yuca y especies de *Dioscorea*) son los cultivos más

Digitized by Google

Cuadro 1.1a Especies agrícolas y microorganismos en los cuales se estudia y emplea con más frecuencia la biotecnología en América Latina y el Caribe, en 1986.

Especie agrícola o microorganismo	Instituciones que lo estudian[a]	
	Número	Porcentaje
Raíces y tubérculos	40	42
Papa		
Camote		
Yuca		
Dioscorea (ñame)		
Industriales	33	35
Caña de azúcar		
Café		
Soya		
Palma de aceite		
Cacao		
Frutales tropicales	28	29
Plátano y banano		
Cítricos		
Papaya		
Leguminosas de grano	25	26
Frijol		
Cereales	24	25
Trigo		
Maíz		
Arroz		
Cebada		
Bacterias	21	22
Rhizobium spp.		
E. coli		
Hortalizas	18	19
Tomate		
Hongos	14	15
Neurospora spp.		
Ornamentales	14	15
Clavel		
Forestales	14	15
Eucalipto		
Pino		
Virus	13	14
Medicinales	7	7
Catharanthus sp.		

(Continúa)

Digitized by Google

Cuadro I.1. Continuación.

Especie agrícola o microorganismo	Instituciones que lo estudian[a]	
	Número	Porcentaje
Frutales templados	7	7
Pastos y forrajes *Stylosanthes* sp.	6	6
Especias	2	2

a. En la muestra encuestada, n = 95.

estudiados (en 42% de las instituciones); los siguen los cultivos industriales (café, caña de azúcar, soya, palma de aceite y cacao) destinados generalmente a la exportación. La tendencia observada obedecería a la importancia agrícola de ciertos cultivos en la región, y al hecho de que las tecnologías que más se usan están disponibles y ofrecen generalmente resultados rápidos con tales especies. Es notoria, en cambio, la dificultad de aplicación de la biotecnología en otras especies importantes como las forestales (sólo en 15% de las instituciones). El empleo de las técnicas moleculares, principalmente en la investigación de microorganismos, en los países de la región refleja lo que ocurre en la investigación biotecnológica de los países desarrollados: aquí y allá la manipulación genética con los microorganismos es muy dinámica a nivel del ADN.

De un total de 460 estudios relacionados con biotecnología en la región, el 80% está iniciándose a nivel del laboratorio y sólo algunos se usan corrientemente en programas de investigación.

Recursos Disponibles para la Biotecnología

Recursos humanos

Del personal adscrito actualmente a biotecnología en la región, el 63% no tiene preparación académica de posgrado. Más del 70% del personal total labora en las universidades y en los institutos nacionales de investigación agrícola; dentro de éstos, aproximadamente el 40% se halla a nivel de posgrado.

Respecto a la capacitación en esta ciencia, de todas las personas que se capacitan en diferentes áreas de biotecnología (179) más del 50% adelantan

Digitized by Google

programas de posgrado y la otra mitad cursos cortos de capacitación en servicio (Cuadro I.2). Es importante señalar que las universidades de los países de la región capacitan en posgrado sólo al 46% de los interesados; el resto estudia en universidades de fuera de la región en las cuales, si pertenecen a países desarrollados, la dificultad para lograr el financiamiento de estudios de posgrado es cada vez mayor.

Cuadro I.2. Recurso humano de la región latinoamericana que se halla en capacitación en distintas áreas de la biotecnología, en 1986.

Tipo de institución que ofrece capacitación	Capacitación ofrecida				Total
	Programas de posgrado		En servicio[a]		
	Número	Porcentaje	Número	Porcentaje	
Universidad nacional	44	46	56	65	100
Universidad extranjera	49	53	19	22	68
Otra (nacional)	—	—	1	1	1
Otra (extranjera)	1	1	9	10	10
Total	94	100	85	100	179

a. Recibiendo adiestramiento en servicio o práctica profesionales.

Recursos físicos

De las instituciones de la región, 88 cuentan con instalaciones que cumplen el papel de un laboratorio. El término laboratorio incluye diversas instalaciones cuyo número y área son extremadamente grandes; este hecho sugiere que el recurso físico ha experimentado un desarrollo desigual en la región.

Recursos financieros

El desarrollo adecuado de la biotecnología exige recursos financieros para equipamiento y operaciones. El 30% de las instituciones estudiadas han hecho una inversión en equipo y otros elementos de capital superior a los 100,000 dólares; el 25% de las instituciones tienen un presupuesto de operaciones para 1986 superior a 50,000 dólares, y el 45% restante sólo cuenta con menos de 20,000 por año. Esta cantidad parecería insuficiente para instituciones que aspiren a tener recursos físicos adecuados y personal capacitado.

Digitized by Google

Planes Futuros

Las tendencias futuras de la investigación biotecnológica en la región latinoamericana indican que el área celular seguirá siendo prioritaria en los próximos cinco años (Cuadro I.3). Otro cambio significativo en el futuro próximo serán las áreas de investigación bioquímica y molecular, segundas en prioridad de acuerdo con la encuesta; además, el incremento de esta investigación demandará mayor especialización del personal científico de la región.

La necesidad de personal durante el quinquenio 1987-1992 en las 107 instituciones estudiadas se satisfaría contratando cerca de 500 personas distribuidas de la siguiente manera: más del 40% con nivel de posgrado, 23% con nivel universitario, y el resto como personal de apoyo no profesional. Se requerirán por tanto 214 investigadores con posgrado, de los cuales aproximadamente la mitad deberá tener grado doctoral; estos últimos representan, respecto al total del personal actual con posgrado, un 31% (Cuadro I.4).

Cuadro I.3. Areas de investigación y biotecnologías consideradas prioritarias para el quinquenio 1987-1992, en la región latinoamericana.

Area de investigación y tecnologías	Instituciones estudiadas	
	Número	Porcentaje[a]
Celular	46	48
Cultivos de meristemas y ápices	29	
Cultivos celulares	27	
Cultivo o fusión de protoplastos	12	
Cultivo de anteras o microsporas	11	
Cultivo de ovarios y óvulos	8	
Bioquímica	20	21
Purificación y separación de proteínas	10	
Biosíntesis y metabolitos secundarios	9	
Molecular	20	21
ADN recombinante	50	
Aislamiento y clonaje de genes	7	
Trasferencia de genes	5	
Regulación y expresión de genes	4	
Inmunológica	12	13
Pruebas de diagnóstico	7	
Anticuerpos monoclonales	6	

a. Respecto al total encuestado (n = 95).

Digitized by Google

Cuadro I.4. Necesidad de recurso humano calificado en biotecnología para el quinquenio 1987-1992, en la región latinoamericana.[a]

Nivel académico	Recurso humano capacitado	
	Actual (no.)	Quinquenio 87-92 (no.)
Doctorado	175	106 (31)
Maestría	168	108 (39)

a. En la muestra encuestada, n = 95. Las cifras entre paréntesis indican porcentajes respecto al personal total actual.

Conclusiones

En los países de América Latina y el Caribe hay instituciones con el escenario propicio para desarrollar las aplicaciones agrícolas de la biotecnología. Para lograr este objetivo, urge obtener la colaboración interinstitucional en biotecnología, tanto en investigación como en capacitación. Asimismo, los sectores de investigación, desarrollo y producción agrícolas necesitan integrarse en proyectos acordes con las necesidades reales de cada cultivo.

Las tecnologías que más se emplean actualmente en la región son las de mayor potencial de aplicación a corto o mediano plazo (como el cultivo de tejidos), y las especies vegetales estudiadas con mayor frecuencia son, a su vez, las de mayor importancia para la agricultura de la región.

La mayor parte de las biotecnologías se emplean en programas de investigación a nivel del laboratorio. Es necesario, por tanto, estimular las tecnologías aplicables en el campo.

Un porcentaje considerable del personal asignado a biotecnología en las instituciones estudiadas en este trabajo posee grados académicos avanzados y se dedica, en un alto porcentaje, a la investigación en el área celular. Cerca del 50% del personal que se halla en capacitación está realizando estudios de posgrado (doctorado o maestría). Las universidades de los países de la región, por su parte, están captando en grado creciente la capacitación de posgrado.

La posición de las instituciones según el monto de los recursos financieros invertidos en biotecnología es muy variable, como era de esperarse.

Digitized by Google

El área de investigación celular se mantendrá prioritaria en el período 1987-1992 y, en comparación con la situación actual, la biología molecular adquirirá gran preponderancia. En ese lapso, además, habrá necesidad de incorporar cerca de 500 personas al caudal de investigadores en biotecnología de la región; de ellas, más del 40% deberá tener preparación de posgrado equivalente al doctorado o a la maestría.

Referencias

Blumenthal, D.; Gluck, M.; Seashore, L. K.; Stoto, M. A. y Wise, D. 1986. Industrial support of university research in biotechnology. Science 231: 242-246.

Buttel, F. H.; Kenney, M. y Kloppenburg Jr., J. 1985. From green revolution to biorevolution: Some observations on the changing technological bases of economic transformation in the Third World. Econ. Develop. Cult. Change 34(1):31-55.

COSNET (Consejo del Sistema Nacional de Educación Tecnológica). 1984. Potencial para el desarrollo de la ingeniería genética: Recursos en biología molecular. Catálogo 1984. SEP/COSNET, México, D.F. 361 p.

Elkington, J. 1986. Double dividends? U.S. biotechnology and third world development. Paper no. 2. World Resources Institute (WRI). 50 p.

Hansen, M.; Busch, L.; Burkhandt, J. y Lacy, L. R. 1986. Plant breeding and biotechnology: New technologies raise important social questions. Bioscience 36(1):29-39.

Kidd, G. H. y Teweles, W. L. 1986. Reestructuring the international seed and plant biotechnology industries. Seedmen's Digest (E.U.) 37:44-47.

Poltronieri, H. M. (ed.). 1986. Biotechnology in the Americas; II: Applications in tropical agriculture. Interciencia Association y Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT), Costa Rica. 94 p.

Quintero, R. 1984. Prospectiva de la biotecnología en México. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México. 499 p.

Robert, M. y Loyola, V. M. 1985. El cultivo de tejidos vegetales en México. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México. 167 p.

Roca, W. M. 1985. Directorio latinoamericano de biotecnología agrícola. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. 110 p.

Digitized by Google

——; Amézquita, M. C. y Villalobos, V. M. 1988. Estado actual y perspectivas de la biotecnología agrícola en América Latina y el Caribe: Encuesta 1986. En: Amaya, S. (ed.). Temas prioritarios y mecanismos de cooperación en investigación agropecuaria en América Latina y el Caribe. Memorias. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. p. 187-215.

Sawyer, W. D. (ed.). 1984. Biotechnology in the Americas: Prospects for developing countries. Interciencia Association, Washington, D.C. 79 p.

Sterling, J. (ed.). 1986. Fifth annual guide to biotechnology companies. Genet. Eng. Newsl. 6(10):13-40.

Digitized by Google

Apéndice J

Investigadores que contribuyen a esta obra

M. C. Amézquita	Unidad de Servicio de Datos, CIAT, Apartado 6713, Cali, Colombia.
A. Angarita	Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, A.A. 057303, Bogotá, Colombia.
D. I. Arias	Unidad de Investigación en Biotecnología (UIB), CIAT, Apartado 6713, Cali, Colombia.
L. Ascui M.	Escuela de Agronomía, Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Chile.
A. Calderón	Unidad de Investigación en Biotecnología (UIB), CIAT, Apartado 6713, Cali, Colombia.
F. L. Chandler	CARDI, Cave Hill Campus, P.O. Box 64, Barbados, West Indies.
R. Chávez	Agrupación Rosa Ara Ter., Etapa E1, Tacna, Perú.
P. Dublin	CIRAD, Avenue du Val de Montferrand, B.P. 5035-34032, Montpellier Cédex, France.
H. A. Escobar A.	Instituto de Agronomía, Universidad de Tarapacá, Arica, Chile.
A. L. Fuentes K.	Department of Plant Science, University of British Columbia, 660 N.W. Marine Drive, Vancourer, B.C. 1X2, Canada.
S. Q. Hague	Dept. of Plant Biology, University of Birmingham, P.O. Box 365, B1S 2TT, Birmingham, England.
J. A. Izquierdo	Producción Vegetal, FAO/RLAC, Av. Santa María 6700, Casilla 10095, Santiago, Chile.
R. L. Jarret	University of Florida, IFAS (Institute of Food and Agricultural Sciences), Tropical Research and Education Center, 18905 S.W. 280th Street, Homestead, Florida 33031, U.S.A.

Digitized by Google

J. Jaynes	Louisiana State University, 322 Choppin Hall, Baton Rouge, Louisiana 70803-1806, U.S.A.
K. K. Kartha	National Research Council of Canada, Plant Biotechnology Institute, 110 Gymnasium Road, Saskatoon, Saskatchewan, S7N 0W9 Canada.
A. D. Krikorian	Department of Biochemistry, State University of New York at Stony Brook (SUNY), New York 11794-5215, U.S.A.
L. Lago Castro	Instituto de Biotecnología de Plantas, CIGB, Casilla de Correo 6162, La Habana, Cuba.
D. R. Laing	Dirección General, CIAT, Apartado 6713, Cali, Colombia.
L. W. Levy	Productora y Exportadora (INEXA, Industria Extractora C. A.), P.O. Box 497-A, Quito, Ecuador.
P. E. Levy	Productora y Exportadora (INEXA, Industria Extractora C. A.), P.O. Box 497-A, Quito, Ecuador.
R. E. Litz	University of Florida, IFAS (Institute of Food and Agricultural Sciences), Tropical Research and Education Center, 18905 S.W. 280th Street, Homestead, Florida 33031, U.S.A.
Y. López F.	Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, Palmira, Colombia.
V. M. Loyola	Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C., km 7 antigua carretera a Progreso, Ex-Hacienda Xcumpich, A.A. 924, Mérida, Yucatán, México.
G. Mafla	Unidad de Investigación en Biotecnología (UIB), CIAT, Apartado 6713, Cali, Colombia.
S. H. Mantell	Department of Horticulture, Wye College, London University, England.
J. A. Mariotti	Facultad de Agronomía y Zootecnia, Universidad Nacional de Tucumán, Av. Roca 1900, San Miguel de Tucumán 4000, Argentina.

Digitized by Google

J. M. Mejía M.	Laboratorio de Biotecnología, Centro de Genética, Colegio de Posgraduados, Chapingo, México.
S. T. Mercy	International Rice Research Institute (IRRI), P.O. Box 933, Manila, Philippines.
K. Mornan	ADO/USAID, RP413, Ndjanema, Tehad, Africa Central.
L. C. Mosella Ch.	Dirección de Extensión Académica, Universidad de Talca, 2 Norte 685, Casilla 747-721, Talca, Chile.
L. A. Mroginski	Facultad de Ciencias Agrarias de la UNNE, Instituto de Botánica del Nordeste, Sargento Cabral 2131 (C.C. 209), Corrientes 3400, Argentina.
L. Müller	Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba, Costa Rica.
T. Nakamura	DNA Plant Technology Corporation, 2611 Branch Pike, Cinnaminson, New Jersey 08077, U.S.A.
B. Nolt	Programa de Frijol, CIAT, Apartado 6713, Cali, Colombia.
S. F. Nome	Instituto de Fitovirología, INTA, Arturo M. Bas 276, Córdoba 5000, Argentina.
V. M. Núñez	Dept. of Agronomy and Plant Genetics, 411 Borlang Hall, 1991 Buford Circle, St. Paul, Minnesota 55108, U.S.A.
J. Pachón	Programa de Arroz, CIAT, Apartado 6713, Cali, Colombia.
M. Perea	Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, A.A. 057303, Bogotá, Colombia.
J. Pérez Ponce	Universidad Central, Las Villas, Cuba.
C. F. Quirós	Department of Vegetable Crops, University of California, Davis, California 95616, U.S.A.
H. Ramírez	Unidad de Investigación en Biotecnología (UIB), CIAT, Apartado 6713, Cali, Colombia.

Digitized by Google

J. Reyes	Departamento de Química Orgánica, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Apartado Postal 87, Cordomex 97310, Yucatán, México.
R. Reyes	Unidad de Recursos Genéticos (URG), CIAT, Apartado 6713, Cali, Colombia.
J. Roa	Unidad de Recursos Genéticos (URG), CIAT, Apartado 6713, Cali, Colombia.
M. L. Robert	Departamento de Genética y Fisiología, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Apartado Postal 87, Cordomex 97310, Yucatán, México.
W. M. Roca	Unidad de Investigación en Biotecnología (UIB), CIAT, Apartado 6713, Cali, Colombia.
R. O. Romero	International Rice Research Institute (IRRI), P.O. Box 933, Manila, Philippines.
L. F. Salazar	Centro Internacional de la Papa (CIP), Apartado 5969, Lima, Perú.
S. Salazar S.	Dept. of Plant Biology, The University of Birmingham, P.O. Box 365, B15 2TT Birmingham, England.
R. J. Segovia	Administración de Invernaderos, CIAT, Apartado 6713, Cali, Colombia.
W. R. Sharp	DNA Plant Technology Corporation, 2611 Branch Pike, Cinnaminson, New Jersey 08077, U.S.A.
M. R. Sondahl	DNA Plant Technology Corporation, 2611 Branch Pike, Cinnaminson, New Jersey 08077, U.S.A.
L. Szabados	Biological Research Center, Institute of Plant Physiology, H-6701 Szeged, P.O. Box 521, Hungary.
E. Tabares	Unidad de Investigación en Biotecnología (UIB), CIAT, Apartado 6713, Cali, Colombia.
L. M. Tello	Flores del Cauca, Cra. 1, no. 24-56, Of. 412, Apartado 10387, Cali, Colombia.

Digitized by Google

T. A. Thorpe	Department of Biology, University of Calgary, Calgary, Alberta, T2N 1N4 Canada.
L. B. Torrizo	International Rice Research Institute (IRRI), P.O. Box 933, Manila, Philippines.
V. M. Villalobos	Unidad de Recursos Fitogenéticos, CATIE, 7170 Turrialba, Costa Rica.
F. J. Zapata	International Rice Research Institute (IRRI), P.O. Box 933, Manila, Philippines.

Digitized by Google

Indice[1]

ABA (ver Acido abscísico)

Aberración cromosómica, 323, 326
  inversiones, 315, 546
  deleciones, 546
  eliminación, 272

AC (ver Agua de coco)

Acido abscísico, ABA, 430
  en medio de cultivo, 434

Acido giberélico, AG (ver Reguladores del crecimiento)

Acido indolacético, AIA (ver Reguladores del crecimiento)

Acido indolbutírico, AIB (ver Reguladores del crecimiento)

Acido naftalenacético, ANA (ver Reguladores del crecimiento)

Acidos nucleicos, 878
  autoradiografía, 881
  determinación de ARN, 883, 884
  hibridación de, 878
    ADN-ARN, 878
    PSTVcADN, 878, 882
    'dot blot', 878
  sondas, 878, 879
    construcción de sonda PSTVcADN, 879
    hibridación de, 879, 881
    marcación radiactiva, 879
  en virus, 817
    bloqueo de reduplicación, 818
    extremo 5', 818
    protección en cápside, 818

Aditivos naturales, 53

ADN, 182
  análisis a nivel de, 846
  de microorganismos, 941
  de plástidos, 275
  electroforesis de, 829
  recombinante, 314, 939

AG (ver Reguladores del crecimiento)

Agar, 405, 413
  difusión doble en, 671-673

Agave sp., 644, 647
  enraizamiento, 649
  establecimiento en suelo, 649
  micropropagación de yemas laterales, 647
    desinfección, 648
    medio de cultivo, 648
    rendimiento, 648
  micropropagación del cambium vascular, 648
    callo y explantes, 648
    proliferación, 649
  propagación clonal de, 647

Agentes gelatinizadores, 80, 83, 84, 89, 90
  agar, 80, 83
    concentración de, 92
    Difco, 82
  agarosa, 80, 83, 85, 87, 88, 90
  alginato, 80
  Bacto-agar, 83, 85
  gelrita, 80, 83, 85, 87, 88, 90, 92
  para anteras de arroz, 279

Agrobacterium sp., 776
  esferoplastos de *Agrobacterium tumefaciens*, 776
  plásmidos Ti de *Agrobacterium* sp., 777, 778

Agua de coco (AC), 43, 45, 46, 47, 69, 145, 298
  como inductor de división celular, 49, 50, 53, 65, 67
  componentes del, 51
    compuestos nitrogenados, 52
    inositol, 46
    reguladores del crecimiento, 63

1. Elaborado por Diana Isabel Arias, Marta Cataño, Rodrigo Sarria, Hernando Ramírez, Graciela Mafla, Fernando Tenjo y Eddy Tabares, investigadores de la UIB, CIAT.

Digitized by Google

en protoplastos de camote, 428
preparación, 54

Agua destilada, 3, 4

Al^{+++} en callos (ver Tratamientos)

Albinismo (en arroz), 275, 277

Alelos recesivos, 290
en yuca, 287

Algodón, 13, 80
esterilización, 13
soporte del medio líquido, 80, 90, 91, 92

Alternancia de generaciones, 272, 273
esporofítica, 272
gametofítica, 272

Aminoácidos, 55
aromáticos, 57
con azufre, 57
de Reinert y White, 58
en la caseína hidrolizada, 58

Amorphophallus rivieri, 470

ANA (ver Acido naftalenacético)

Análisis de híbridos somáticos, 766, 768
cromosómico, 767, 768
de ADN nuclear, 768, 769
isoenzimático, 767
morfológico, 767

Análisis de regresión (ver Tratamientos)

Análisis isoenzimático, 327, 767

Androgénesis, 272, 288
en cultivo de anteras, 272, 274
de arroz, 274, 281, 282, 283, 289
en fitomejoramiento, 285
medio de cultivo, 279, 283, 284
nivel de ploidía, 288
de *Brassica*, 274
de cebada, 274, 281, 288
de colza oleaginosa, 274
de maíz, 274, 280, 281, 290
de papa, 274
de tabaco, 274, 281, 289
de trigo, 274, 281, 282, 288, 289
de yuca, 286, 287
inducción de callo, 274, 275, 279
regeneración de plantas, 274, 275, 279
núcleo generativo en, 272

Aneuploidía (ver Ploidía)

Antisuero, 670, 671, 688, 690
determinación del título, 671, 688
purificación de gammaglobulina, 673, 690

Apice meristemático, 484, 517
diferenciación de, 485

Arabusta (ver Café)

Aráceas comestibles, 470
cultivo de ápices, 475, 477, 478
cultivo de meristemas, 473, 476
libres de virus, 470

Area de preparación, 3, 7
equipos en, 7

ARN de doble cadena (dsRNA), 883, 884
determinación para diagnóstico, 884

ARN ribosomal (plastidios), 275

Arroz (*Oryza sativa*), 80, 89, 535
cultivo de anteras, 82, 535
desarrollo del polen, 535
pretratamiento con temperatura, 277, 536
inducción del callo, 90
agente gelatinizador en, 90, 91
efecto del genotipo, 90
medio para, 83, 537
regeneración de plantas, 90
agente gelatinizador en, 90, 91
efecto del genotipo, 90
medios para, 538

Asepsia, 2, 11, 12, 26
con antibióticos, 27
con compuestos químicos, 27
condiciones para, 27
gabinete de flujo laminar para, 5, 7
procedimientos de, 27, 28, 29

Autoclave (ver Esterilización)

Autofecundación (ver Endogamia)

Autoincompatibilidad, 304

Digitized by Google

en protoplastos de camote, 428
preparación, 54

Agua destilada, 3, 4

Al^{+++} en callos (ver Tratamientos)

Albinismo (en arroz), 275, 277

Alelos recesivos, 290
en yuca, 287

Algodón, 13, 80
esterilización, 13
soporte del medio líquido, 80, 90, 91, 92

Alternancia de generaciones, 272, 273
esporofítica, 272
gametofítica, 272

Aminoácidos, 55
aromáticos, 57
con azufre, 57
de Reinert y White, 58
en la caseína hidrolizada, 58

Amorphophallus rivieri, 470

ANA (ver Acido naftalenacético)

Análisis de híbridos somáticos, 766, 768
cromosómico, 767, 768
de ADN nuclear, 768, 769
isoenzimático, 767
morfológico, 767

Análisis de regresión (ver Tratamientos)

Análisis isoenzimático, 327, 767

Androgénesis, 272, 288
en cultivo de anteras, 272, 274
de arroz, 274, 281, 282, 283, 289
en fitomejoramiento, 285
medio de cultivo, 279, 283, 284
nivel de ploidía, 288
de *Brassica*, 274
de cebada, 274, 281, 288
de colza oleaginosa, 274
de maíz, 274, 280, 281, 290
de papa, 274
de tabaco, 274, 281, 289
de trigo, 274, 281, 282, 288, 289
de yuca, 286, 287
inducción de callo, 274, 275, 279
regeneración de plantas, 274, 275, 279
núcleo generativo en, 272

Aneuploidía (ver Ploidía)

Antisuero, 670, 671, 688, 690
determinación del título, 671, 688
purificación de gammaglobulina, 673, 690

Apice meristemático, 484, 517
diferenciación de, 485

Arabusta (ver Café)

Aráceas comestibles, 470
cultivo de ápices, 475, 477, 478
cultivo de meristemas, 473, 476
libres de virus, 470

Area de preparación, 3, 7
equipos en, 7

ARN de doble cadena (dsRNA), 883, 884
determinación para diagnóstico, 884

ARN ribosomal (plastidios), 275

Arroz (*Oryza sativa*), 80, 89, 535
cultivo de anteras, 82, 535
desarrollo del polen, 535
pretratamiento con temperatura, 277, 536
inducción del callo, 90
agente gelatinizador en, 90, 91
efecto del genotipo, 90
medio para, 83, 537
regeneración de plantas, 90
agente gelatinizador en, 90, 91
efecto del genotipo, 90
medios para, 538

Asepsia, 2, 11, 12, 26
con antibióticos, 27
con compuestos químicos, 27
condiciones para, 27
gabinete de flujo laminar para, 5, 7
procedimientos de, 27, 28, 29

Autoclave (ver Esterilización)

Autofecundación (ver Endogamia)

Autoincompatibilidad, 304

Digitized by Google

Auxinas, 192
exógenas, 130
para diferenciar embriones, 135
intracelulares, 192
sintéticas, 192, 199

Axénico (ver Cultivo áxeno)

Bacterias, 11, 13, 15

Balance hormonal, 128, 130

Bandeo cromosómico, 326

Base de datos, 703, 710

Batata (ver *Ipomoea* sp.)

Bencilaminopurina, BAP (ver Reguladores del crecimiento)

Bicloruro de mercurio ($HgCl_2$), 12, 13

Biología molecular, 850
análisis de características multigénicas, 851
QTL's, 851, 852
en mejoramiento de plantas, 850
mapas genéticos, 850

Biorreactores, 225
diseño para cultivo vegetal, 225
factores para uso, 225

Biotecnología, 938
colaboración interinstitucional en, 946
empresas privadas de, 939, 941
en países en desarrollo, 231, 232
integrada a mejoramiento, 941
de raíces y tubérculos, 939, 940
investigación en, 941
con fondos públicos, 941
en área celular, 944, 945
en universidades, 941
personal dedicado a, 943, 944
con posgrado, 943, 946
recursos para, 941, 942

Bunchy Top (ver Musáceas)

Cacao (*Theobroma cacao*), 604
enraizamiento y trasferencia al suelo, 612
contenido de sacarosa, 613
presencia de AIB, 612
multiplicación in vitro, 607
auxinas en, 610
carbón activado en, 609
citocininas en, 610
estrategia para, 607
factores físicos en, 608
giberelina en, 611
intercambio gaseoso en, 608
macroelementos en, 609
medios para, 609
posición explantes en, 611
poblaciones, 604
cultivo de tejidos en, 606
heterosis de grupo, 605
micropropagación de, 606
selección clonal de, 605
selección sexual de, 605
tipo amelonado, 604
tipo trinitario, 604

Café, 580, 595, 622
brote nodal de *Arabusta*, 630
Coffea arabica, 580, 622
Coffea arabusta, 583, 584
Coffea canephora, 580, 581, 622
costo de producción, 622
desinfección de brotes, 630
desinfección de hojas, 624
embriogénesis somática, 594, 622, 624, 625
de alta frecuencia (ESAF), 622
activación con KIN y 2,4-D, 637
aproximación secuencial en, 623
factores de control, 623
medio para, 624, 626
de baja frecuencia (ESBF), 627, 637, 638
de explante foliar, 634
en propagación, 624
técnicas para, 584
esqueje, 583
etapa de diferenciación, 585
etapa de inducción, 585
explante foliar de, 626
en hoja cotiledonar, 628
microesquejes, 587, 592
desinfección, 589
medio para cultivo de, 588
tipo de explante, 588, 589

Digitized by Google

multiplicación in vitro, 584
multiplicación vegetativa, 583
plántulas fortalecidas, 627
producción mundial, 622
variedad Colombia, 581
yemas, 629
axilares, 629
ortótropas, 629, 630
inactivas nodales, 625, 631
plagiótropas, 629
primarias, 631
secundarias, 632

Callos, 175, 314, 547
en brotes adventicios, 135
en micropropagación, 130
endurecimiento, 131
formación, 130
friables, 175
habituación, 135
variación en, 130

Cámara de crecimiento, 5, 378
equipos, 7
gases en, 379
humedad en, 378
luz en, 378
gradientes de, 396
tamaño de, 379

Cámara humidificadora, 130

Cambio epigenético, 315, 327

Cambio genético, 315

Camote (*Ipomoea batatas*), 422
cultivo de anteras en, 432
cultivo de protoplastos en, 427
embriones somáticos, 426, 436, 441
esquejes, 425
fosfatasas en, 435
fosfoglucoisomerasa (PGI) en, 425
meristemas, 423, 424, 438
nitratoreductasa en, 435
organogénesis, 429, 437, 440
protoplastos, 427, 428
espermina y espermidina en, 429
putrecina en, 429
variantes somaclonales, 437
virus SPV-A y SPV-N, 425

Caña de azúcar (*Saccharum officinale*), 544
contenido de sacarosa, 365, 366, 371
cultivo de anteras, 562
cultivo de células, 555
cultivo de protoplastos, 564
fragmentación de cromosomas en, 546
inducción de enraizamiento, 558
micropropagación, 553
resistencia a enfermedades, 566
Saccharum sp., 700
conservación in vitro, 701
subclones, 365, 366
suspensión celular de, 561

Cariotipo, 314, 324, 327

Casa de malla, 926
características, 926, 928
modificaciones, 925
planos, 929, 933

Caseína hidrolizada (CH), 43, 45
aminoácidos en, 58
nitrógeno reducido en, 45

Catharantus roseus, 47, 48, 213
vincoleucoblastina en, 213, 214
vincristina en, 214

Células,
citodiferenciación, 635
embriogénicas maternas (CEM), 623, 633, 634, 639
determinadas en subcultivo, 636, 637
en callo de café, 638
en suspensión, 135, 319
libres, 314
proembriogénicas determinadas (CPD), 633, 634, 639
somáticas, 240
tipo Q, 179

Celulasa, 175
en protoplastos de camote, 427

CH (ver Caseína hidrolizada)

Chrysanthemum cinerariaefolium (ver Piretro)

Ciclo celular, 182
fase G_1, 182, 186, 189, 190

Digitized by Google

fase G_2, 182, 190
fase M, 182
fase S, 182, 186, 190
inhibidores del, 186
catrina, 190, 191
colchicina, 190
sincronización del, 186, 188

Clon, 97
efecto clonal, 363
historia, 96, 98
homogeneidad genotípica, 98
limpieza de, 6
origen de población, 98

CMV, 500 (ver Apéndice C)
detección por serología, 503
albúmina en, 503
extracción del virus, 503
patógeno del género *Musa*, 500
plantas indicadoras de, 501, 503

Coco (*Cocos nucifera*), 49

Coeficiente de regresión b, 399

Coeficiente de variación (CV), 366
fenotípico, 370
para estimar GDG, 366

Coffea spp. (ver Café)

Colchicina, 548
en duplicación de cromosomas, 540
en haploides duplicados, 282

Colocasia esculenta, 470, 477

Comparación múltiple, 393
con testigo, 395
diferencia de Tukey (HSD), 394
para intervalos de confianza, 394
DMS de Fisher, 393
ventajas, 394
factores cualitativos y, 396
método de Scheffé, 394
precisión de, 396
rango de Newman-Keuls, 394
rango múltiple de Duncan, 395

Conservación de germoplasma, 716
bancos de semillas, 716
colección activa, 407
colección de base, 407
colecciones vivas, 716
in vitro, 698, 699
base de datos, 703, 710
crecimiento mínimo, 704, 711
concentración de nutrimentos, 704
concentración osmótica, 705
reguladores del crecimiento, 705
temperatura, 704
estabilidad genética, 699, 701, 703, 705
electroforesis, 708
en cultivos de meristemas, 703
en micropropagación nodal, 703
en protoplastos, 703
evaluación de, 708
supresión del crecimiento, 705

Contaminación, 9, 11
antibióticos contra, 9
con hongos, 11, 13, 15
en área de trabajo, 11
en instrumentos, 11
en tejidos, 9
temperatura contra, 9

Cormos, 470, 472, 478
cormelos, 475, 476

Crioconservación, 407, 717
almacenaje, 723
congelamiento en, 721
escalonado, 723
glicerol en, 721
lento, 722
rápido, 722
crioprotectantes, 709
DMSO, 709
sorbitol, 709
de *Fragaria* x *ananassa*, 725
de papa, 453
de suspensiones celulares, 184
de yuca, 708, 710
descongelamiento, 723
pretratamiento para, 717
pruebas de viabilidad, 723

Criogenia, 326

Cruzamientos, 296
interespecíficos, 297
intergenéricos, 297

Digitized by Google

Cultivo aséptico, 128
de células y órganos, 128
de tejidos, 128, 138

Cultivo áxeno, 12

Cultivo de anteras, 80, 280, 534
con agente gelatinizador, 80
choque osmótico en, 277
de arroz, 535
de camote, 432
en fitomejoramiento, 272, 281, 282, 285
gametocidas en pretratamiento, 277
genotipo, 289, 539
de polen donado, 274
recalcitrante, 277
ósmosis en medio para, 279
rendimiento de arroz y, 289
resistencia a piricularia en, 286
sacarosa en, 279

Cultivo de embriones, 111, 112, 272, 296, 297 (ver Embrión)
androgénesis en, 112
de papaya, 299
división clonal en, 111
en *Musa* sp., 508
fuentes de nutrimentos para, 111
ginogénesis en, 112
medio de cultivo para, 298
por desarrollo in vitro de semillas, 112

Cultivo de esporas, 111, 272
en helechos, 112

Cultivo de meristemas, 80, 628 (ver Meristemas)
con agente gelatinizador, 80
de ápices (directo), 523
de puntas de brotes, 99, 102
en camote, 423, 438, 439
usos de, 99, 102

Cultivo de óvulos, 296, 300
de papaya, 302
en ginogénesis, 272
de yuca, 287
ovarios cultivados, 272
fertilización in vitro, 272, 296, 304
placenta en, 301

Cultivo de protoplastos (ver Protoplastos)

Cultivo de tejidos, 20, 212
a gran escala, 223
con células inmovilizadas, 224
aplicaciones en otras ciencias, 20, 939
comercial, 939, 940
crecimiento y acumulación de, 220
de musáceas, 499
polifenoles en, 500
de secciones nodales, 630
contaminación, 630, 631
frecuencia de desarrollo, 632
DHA en, 436 (ver Apendice A)
DKG en, 436
diferenciación celular en, 2, 128
en agitación, 5
en líneas de alto rendimiento, 227
en producción de químicos in vitro, 228
establecimiento de, 20
factores, 20
técnicas, 20
factores físicos en, 221, 222
factores nutricionales, 220, 221
inoculación de, 5
líneas trasformadas en, 219
población fenotípica múltiple en, 635
primario, 623
producción de metabolitos secundarios, 218, 219
de furanoterpenos, 435
reguladores en, 222, 223
respuestas morfogenéticas en, 21
callos, 22
vástagos múltiples, 22
secundario, 623, 626
diferenciación morfogenética, 627
trasferencias, 631
usos del, 128

Cultivo in vitro (ver Cultivo de tejidos)

Cymbidium spp., 99

Datura sanguinea, 659
alcaloides en, 659
cultivo in vitro, 660, 661
para propagación masiva, 660, 662
escopolamina en, 659
propagación convencional, 660

Deplasmólisis celular, 723

Digitized by Google

Determinación genética, 362
grado de (GDG), 364, 365, 366, 367, 369

Diacetato de fluoresceína, 724

Digitalis purpurea, 213
digitoxina en, 213

Dioscorea composita, 213
diosgenina en, 213

Diploide (ver Ploidía)

Diseño experimental, 377
aleatorización en, 380
control local (bloques) en, 380
de parcelas divididas, 397
experimentos en, 381
manejo, 381
objetivos, 381, 383, 384
sesgo, 381
validez, 382
variables, 384
factorial, 380, 386, 387
en tratamiento, 392
incompleta, 390
hipótesis en, 381
prueba por ANOVA, 382

Diversidad genética, 716

División celular, 62
BTOA, 65, 69 (ver Apéndice A)
citocininas en, 66
kinetina en, 66
pirimidinas en, 62, 63
purinas en, 62, 63
sustancias polifenólicas en, 68

DMSO (dimetil-sulfóxido), 709, 721, 725

Efecto C (ver Clon)

Efectos genéticos, 363
aditivos, 363
de dominancia, 280, 363
epistáticos, 363
estables, 363

ELISA, 674, 675, 688, 692 (ver Apéndice A)
anticuerpos (sandwich), 674
aplicaciones, 688, 692
en papa, 451
enzimas usadas, 675
metodología, 674

Emasculación (en cebada), 303

Embriogénesis in vitro, 633
ciclo celular en, 635
directa, 633
indirecta, 633
reguladores del crecimiento en, 635

Embriogénesis somática, 144, 152, 296, 317, 702, 703
a partir de nucelas, 305
adventicia, 145
agua de coco (AC) en, 145
anormalidades en, 145
aplicaciones, 105
auxina en, 146, 149
carbón activado en, 149
desarrollo, 104
directa, 105, 317
en camote, 426, 436, 441
en *Musa*, 509
estados de desarrollo, 318, 322
explante en, 147, 148
factores para,
carbón activado, 149
en *Daucus carota*, 149, 151
explante, 147, 148
medio de cultivo, 148
sacarosa, 149
indirecta, 104, 105, 317
inducción de, 145

Embrión, 135
actividad de peroxidasa en, 637
adventicio, 145
del esporofito, 135
del gametofito, 135
diferenciación de, 639
encapsulación de, 414
globular, 638
híbrido, 296
rescate de, 296-299
incubación de, 300
partenogénico, 272
rescate de, 623
somático aislado, 627

EMS, 328 (ver Apéndice A)

Digitized by Google

Endogamia, 272
depresión por (en yuca), 287
estabilidad genética de, 287

Endomitosis, 547

Endosperma, 296
extracto de, 298

Erosión genética, 716

Error experimental, 376, 380
de tipo I en Duncan, 395
efecto del gradiente en, 381, 382
estimador de, 377
sistemático, 381

Escopolamina (ver *Datura sanguinea*)

Espermidina y espermina (ver Camote)

Esterasa, 550

Esterilidad masculina (EMC), 290

Esterilización, 3, 4, 12
con bromuro de metilo, 476
con calor húmedo, 14
método de Koch, 15
con calor seco, 13
en autoclave, 4, 7, 13
equipo para, 7
factores de, 13
filtración en, 15, 478
intermitente, 14

Euploide (ver Ploidía)

Evaluación estadística, 376
de experimentos in vitro, 382
con polinomios ortogonales, 393
matemática, 393
por comparación múltiple, 393

Excisión, 5

Explante, 2, 80, 130, 132
de anteras, 25
de brotes adventicios, 137
de dicotiledóneas herbáceas, 23, 24
definición, 20
desinfección de, 129
elección, 22
criterios, 24, 25, 26
según edad, 25, 26
según genotipo, 25
según tamaño, 26
esterilización de, 12
estrés por separación, 130
para micropropagación, 132

Extracto de malta, 60, 61

Factor antiviral (AVF), 818
efecto en ATP, 819
en síntesis proteica, 819
similitud con interferón, 819

Fotoperíodo, 82
en cultivo de meristemas, 82
en plantas donantes de polen, 276

Gametogénesis, 272
en microsporas, 272, 277
endoreduplicación mitótica de, 284
gametos no reducidos en, 284, 288

Genética molecular, 939

Genotecas, 669

Giberelinas (ver Reguladores del crecimiento)

Guanto (ver *Datura sanguinea*)

Haploides, 272, 280 (ver Ploidía)
duplicados, 272, 287, 290
duplicación espontánea de cromosomas, 274, 284
en arroz, 284, 288
eliminación de cromosomas en, 272
en cebada, 304
esporofíticos, 272
dihaploides en yuca, 287
estériles, 274

Heredabilidad en sentido amplio (h^2), 364

Heterocigosis, 404
residual, 288

Heterosis, 290
de arroz, 282
en cruzamientos simples, 276
en cruzamientos triples, 276
en híbridos, 275, 276
de yuca, 280, 287

Digitized by Google

Hevea brasiliensis, 595
cultivo in vitro de, 597
carbón activado en, 598
embriogénesis somática en, 600
enraizamiento de tallos, 599
inducción de callos en, 601
medios de inducción para, 602
esqueje de, 597
injertos en, 596, 597
trasplante a tierra de, 599

Híbridos, 272, 764
de arroz (F_1 ó F_2), 284
en cultivo de anteras, 280, 288
interespecíficos, 272, 770
en yuca, 287
intergenéricos, 272, 770
en yuca, 287
información genética en, 781
marcadores selectivos de, 765
mutantes en selección de, 766
regeneración de, 770, 779
selección mecánica de, 764, 765
selección por complementación, 765, 766
somáticos, 781, 782

Hipoclorito de sodio (NaOCl), 12

Homocigosis, 287, 290
en anteras de arroz, 539

Hormonas (ver Reguladores del crecimiento)

Indice de heterogeneidad, 397

Indice mitótico, 177, 179, 190

Indización, 406, 664
virológica, 524

Ingeniería genética, 734, 735
aplicaciones agrícolas de, 778, 780, 783
captación de ADN por protoplastos, 775
enzimas de restricción en, 735, 736
manipulación genética en, 756, 757
pasos de, 756, 757
plásmidos en, 736
pBR322 (genealogía), 737
propiedades de, 736
Ti, 740
trasferencia de orgánulos en protoplastos, 774, 775
trasformación con esferoplastos, 776
trasformación con liposomas, 775, 776
trasformación con plásmidos Ti de *Agrobacterium* sp., 777, 778
trasformación genética en protoplastos, 774
vectores moleculares en, 777, 778

Inositol, 46, 413

Intercambio de germoplasma, 410 (ver *Manihot*)
fuente del material, 411
manejo del material, 411

Invernaderos, 6 (ver Casa de malla)

Ipomoea sp., 422, 699 (ver Camote)
conservación in vitro, 699, 701

Isoenzimas, 550, 827
alfa-beta-esterasa de yuca, 841-843
aloenzima, 859
aplicaciones, 841, 873
en identificación de haploides, 873
en identificación de poliploides, 873
en ligamiento agronómico, 873
en polinización cruzada, 874
bandas de, 860
alelos múltiples, 860
alelos nulos, 863, 864
híbridas, 863
rápidas y lentas, 860
base genética de, 832, 833
alelos múltiples, 836
alelos nulos, 833
como marcadores, 831, 858, 859, 860
de variabilidad genética, 831, 832
caracterización de materiales, 838
correlación con patógenos, 832
diversidad genética de, 827
interpretación genética, 839, 840
para identificar híbridos, 869
intergenéricos o somáticos, 870, 873
intraespecíficos e interespecíficos, 869
en alfalfa y papa, 870
en apio, 869
en coles, 869
en tomate, 869

Digitized by Google

limitaciones, 840, 841
metodología, 859, 860
colocación de la muestra, 868
electroforesis, 865-868
geles de almidón, 866, 868
tinción, 831

KIN (ver Reguladores del crecimiento)

Laboratorio de tejidos, 7
costo de equipos, 914, 920
costo de instalaciones, 912, 914
en América Latina, 943
equipo opcional, 9
infraestructura, 7
material de vidrio en, 15
limpieza de, 16
microscopios, 5, 9

Latencia de semillas, 296, 298

Látex sensibilizado (ver Virus, detección)

Leucoantocianinas, 68, 69

Levadura, 60, 61
extracto de, 547

Linamarina, 287

Líneas,
celulares, 326
homocigotas, 272, 280, 290
de yuca, 287
poliploides, 315

Lupinus sp., 217

Macerozimas, 183
en protoplastos de camote, 428

Maíz (*Zea mays*), 50

Malta (extracto de), 60, 61

Manihot spp., 698 (ver Yuca)
conservación convencional, 706
conservación in vitro de germoplasma, 698, 699, 701, 706, 711
crioconservación de, 708
cultivo in vitro, 698
intercambio internacional de, 711
medios de cultivo para, 707

Manitol, 569

Marcadores genéticos (en yuca), 287

Marcadores moleculares, 831

Media poblacional, 363
desvío de, 363, 367
esperada, 371

Medios de cultivo, 30, 42, 43, 44, 47, 80, 83
Abo El-Nil y Zettler, 474
basal, 45
Braun, 47, 48
componentes de, 30-32, 474, 476, 477
condiciones ambientales para, 35
de acondicionamiento, 623, 626
reguladores en, 636
de establecimiento, 631
de inducción, 623, 624, 626
de brotes múltiples, 628
de brotes ortótropos, 630
en micropropagación, 134
para diferenciación de brotes, 137
fórmulas, 921, 924
fuente de carbono, 45, 50, 63
in vitro, 220
inositol en, 45, 46
Knop, 47, 298
m-inositol en, 82
macroelementos en, 44
microelementos en, 44, 48, 49
de Heller, 49
Murashige y Skoog, 46, 48, 81-83, 405, 473, 476-479
en papa, 456-457, 459
para anteras de arroz, 284, 583
para enraizamiento, 130
para meristemas de *Ipomoea*, 423
quelato de hierro en, 45
nitrógeno y carbohidratos en, 42
N reducido, 45, 46, 58, 60
Nitsch, 47
para aráceas, 473
para papa, 456, 457
Knop, 458, 459, 461
Murashige y Skoog, 456
para producción de metabolitos, 220-223
pH de, 70
polaridad en, 430
preparación de, 33, 34
sacarosa en, 82, 83, 405, 413

Digitized by Google

sales minerales en, 45, 63
fórmulas, 44, 45, 48
sulfato de adenina en, 430, 431
tiamina en, 82
vitaminas B5, 81
vitaminas en, 45, 46, 51, 60, 61, 63
ácido nicotínico, 46, 60, 62
piridoxina, 46, 60
tiamina HCl, 46, 60
White, 46, 48, 56
en camote, 429
en cultivo de embriones, 300

Menta (*Mentha piperita*), 48

Meristemas, 5, 716
apicales, 628 (ver Apice meristemático)
del género *Musa*, 499, 500
adaptación, 507
brotes múltiples, 506, 509
colección del material, 505
cultivo de, 505
dominancia apical en, 414
en micropropagación, 508

Meristemoides, 154
en organogénesis, 160
periféricos, 155

Metabolitos secundarios, 215, 231
cultivo in vitro para, 228-230
manipulación genética para, 217, 218
obtención de precursores, 230
producción, 216
shikonina in vitro, 229
síntesis de, 215

Método científico, 381

Microinjerto, 108
en organización de proembriones, 108
in vitro, 514
protocolo clásico, 515, 519
protocolo modificado, 519, 521
in vivo, 521
metodología, 521, 523

Microprecipitación, 673

Micropropagación, 80, 115, 116, 128, 130, 138, 406, 412
brote múltiple, 414
clonal, 115
con agente gelatinizador, 80
de especies herbáceas, 133, 135
brotes adventicios, 133
estructuras unipolares en, 133
por embriogénesis somática, 135
por yemas axilares, 133
de especies leñosas, 135, 136
brotes adventicios, 136, 137
variación genética, 137
de un solo nudo, 413
de varias especies, 129, 130
embriogénesis somática y, 414
factores de, 131
cultivo aséptico, 129
enraizamiento de brotes, 130, 137
explante, 132
luz y temperatura, 132, 137
medio de cultivo, 133
multiplicación del inóculo, 129
origen de explante, 131, 137
pasos en, 129
trasplante, 130, 137
sin cultivo aséptico, 116

Microscopía electrónica, 675, 680
cortes ultrafinos para, 680
en detección viral, 677
inmuno-electromicroscopía, 679, 680
método de inmersión (dips), 677, 678

Mixoploides, 323, 548

Modelo biométrico, 362, 363
confiabilidad en, 373
de tipo II, 363
efectos aleatorios en, 363

Mosaico caribeño (virus), 415

Mosaicos cromosómicos, 362

Musáceas, 496
Bunchy Top (patógeno) en, 499, 500
conservación in vitro, 701
cultivo de tejidos, 499, 502
evaluación agronómica, 504
evaluación fitosanitaria, 500
Fusarium oxysporum L. en, 497, 508
mejoramiento, 497
método Barker, 498
Musa sp., 699
polifenoles en cultivo, 500

Digitized by Google

Pseudomonas solanacearum en, 497
partenocarpia en, 498
propagación vegetativa, 498
sigatoka negra en, 496, 498

Mutaciones, 314, 340, 341, 546
causas de, 316
en homocigotos, 342
inducidas, 340
en *Musa*, 508
por deleciones, 546
puntuales, 547, 550
simples, 342

Mutagénesis, 290
en arroz, 288
en yuca, 287

Mutagénicos, 548
físicos, 548, 549, 569
químicos, 550

Mycosphaerella sp. (ver Musáceas, sigatoka)

Nicotiana plumbaginifolia, 757
aislamiento de mutantes, 759
auxótrofos, 758
aislamiento de protoplastos haploides, 757
inducción de mutagénesis en, 758
irradiación de protoplastos de, 758, 759

Nucelas, 296, 297

Nucleasas, 808
inhibición de, 809

Nutrición de tejidos vegetales, 42
autótrofa, 42
heterótrofa, 42
mineral, 44
en polen, 276, 277
orgánica, 42

Ñame (*Dioscorea* sp.), 482, 494
condiciones ambientales en, 486, 487
cultivo de tejidos de, 485, 488
establecimiento de plántulas, 487, 489
medios en, 486
micropropagación, 485, 486
enfermedades en almacenamiento del, 484
nematodos en, 483, 489
propagación de, 484, 490
rendimiento, 493
virus en, 483, 489, 492
eliminación, 491
tipos, 483

Opio, 212
opiáceos sintéticos, 212

Opuntia amyclaea T., 644
enraizamiento de, 649
establecimiento en suelo, 649
micropropagación por cladodio, 646
desinfección, 645
multiplicación, 645
rizogénesis, 645
yemas laterales, 645
propagación de, 644

Organogénesis, 152, 316
adventicia, 322
caseína hidrolizada en, 153
de novo, 154
directa, 102
en cultivo de camote, 429, 440
en *Nicotiana tabacum*, 160
explante en, 155
tamaño del, 156
fenilalanina en, 157
fotoperíodo, 159
indirecta, 316
aplicaciones de, 103, 104
citocininas en, 103
método, 102
sistema abierto en, 104
meristemoides en, 160
mitosis en, 154
sacarosa en, 157
tirosina en, 157

Organos de perennidad, 107, 108

Osmolaridad, 299, 301

Oxido de cromo, 177

Papa (*Solanum tuberosum*), 83, 272
en cultivo de anteras, 274
en cultivo de meristemas, 456
en cultivo de tejidos, 452, 453, 464
en medios de cultivo, 279, 284

Digitized by Google

esquejes de, 449, 450
micropropagación de, 458, 460
multiplicación rápida de, 450
nivel de ploidía en, 288
polen de, 272
quimioterapia en, 450
semillas de, 448
básica, 448-452
tasa de multiplicación, 449
tubérculos de, 456, 458

Papaver somniferum, 214

Patógenos vasculares, 682
detección en *Dieffenbachia picta*, 683
medios de cultivo para, 683

Pectinasas, 175, 177, 183

PEG, 721 (ver Apéndice A)

Penicilina, 9

Permeabilización celular, 223
en cultivos in vitro, 225

Peroxidasa, 550, 552

Piretro (*Chrysanthemum cinerariaefolium*), 652
cultivo in vitro, 654, 658, 661
producción masiva, 654, 655, 659, 662
fuente de insecticida, 652
piretrinas en, 652, 659
piretroides sintéticos, 653

Plagiotropismo, 327

Plaqueo, 80
con agente gelatinizador, 80, 81
eficiencia de, 92, 183, 184

Plictran (cihexatin), 508

PLO, 804 (ver Apéndice A)

Ploidía, 182
aneuploidía, 182, 315, 323, 342
determinación en arroz, 539
diploide, 323, 548
en camote, 422
en *Citrus* spp., 296
cigoto, 296
diploides y tetraploides, 296
en el género *Musa*, 496
endopoliploidización, 323
euploides, 323
halopoliploides en yuca, 287
nivel de, 284
poliploidía, 182, 342, 404, 544, 546, 548
variabilidad, 288

Polen, 272, 274
dimorfismo en, 276, 277
efecto de temperatura, 276
microesporogénesis, 277, 278
androgénesis en, 277
desarrollo embriogénico, 277
formación de proembriones, 277

Poliembrionía, 301, 305

Polinización cruzada, 280

Polisomas, 182, 315, 323

Principios activos de plantas, 213
extracción de, 214
síntesis orgánica de, 213

Procesos morfogenéticos, 133

Prolina, 721

Propagación clonal, 2, 98, 117
estrategias adicionales, 116
etapas in vitro, 113
método general para, 99

Propagación vegetativa, 113, 116
en reproducción clonal, 114
micropropagación y, 114, 115

Proteínas, 827
análisis electroforético de, 827, 829, 830
arcelina, 830
faseolina, 830

Protoplastos, 80, 240, 314, 329, 756, 757, 802
agente gelatinizador y, 80
aislamiento de, 240, 242-244, 246, 249, 251, 257, 260
aplicaciones de, 240, 250
captación de ADN por, 775
características de, 240, 247
citoplastos y, 773
colonias de, 240, 253, 257
concentración de, 808

Digitized by Google

cultivo de, 250, 252, 256
en virología, 802
luz en, 810
medio para, 810
de mesófilo foliar, 803
enzimas proteolíticas, 803
enzimas para aislamiento de, 244, 245
fusión de, 759, 760
calcio en, 760
ciclo celular en, 763
citoplastos, 773
dielectroforesis y electro fusión, 762
en monocapa, 760
esferoplasto-protoplasto, 764
frecuencia de, 762
genética citoplásmica en, 770, 773
heterocarionte planta-animal, 763, 764
híbridos somáticos en, 766, 769
pasos de, 760, 761, 762
polietilenglicol en, 760
protocolo experimental, 784, 785
temperatura en, 763
variabilidad genética en, 769
haploides de *Nicotiana*, 757
inducción de mutaciones en, 757, 758
infección con virus, 804
con policationes, 804, 808
con PEG, 805, 806
eficiencia con TMV, 804, 805
osmolaridad en, 807
tampón de inoculación, 805
medios para, 253, 254, 255
métodos alternos, 254, 258
métodos citológicos, 785, 786
mutantes auxótrofos y, 758, 765
mutantes bioquímicos y, 757
PEG y PVP en trasferencia de, 774, 775
reduplicación viral de, 810
con anticuerpos fluorescentes, 811
con sondas moleculares, 811
del CMV, 813
del CPMV, 812
en gradiente de sacarosa, 812
en microscopio electrónico, 811
método ELISA en, 811
resistencia a antibióticos en, 759
soluciones para aislamiento de, 244
trasferencia de orgánulos de, 774, 775
trasformación genética, 774
liposomas para, 775, 776, 809
vectores moleculares para, 777, 778

Prueba y error (método), 376

Punta meristemática (ver Apice meristemático)

PVP (ver Apéndice A)
en cultivo de protoplastos, 429
en detección de CMV, 503

Quimeras, 97, 323

Quina (*Cinchona ledgeriana*), 212, 214
quinina, 214

Radiación ultravioleta, 550

Recultivo, 725

Regeneración de plantas, 240, 259
de embriogénesis somática, 702, 703
de híbridos somáticos, 769, 770

Reguladores del crecimiento, 45, 63, 83
ácido giberélico (AG), 67, 405, 414
AG_3, 82
en entrenudos del brote, 631
giberelinas, 67
auxinas, 45, 47, 64
AIA, 47, 64, 66, 68, 69
exógenas, 130
para diferenciar embriones, 135
intracelulares, 192
sintéticas, 64
AIB, 64
ANA, 47, 50, 64, 65, 69, 81-83, 405, 413
2,4-D, 47, 50, 64, 65, 69, 82, 89, 414, 546, 547
BAP, 66, 67, 81, 82
cinetina, KIN, 66, 67, 83
citocininas, 45, 65, 130, 192
en ciclo celular, 636, 637
en diferenciación de raíces, 130
en inducción del embrión, 150
en yemas de café, 631
en cultivo de anteras, 279
en cultivo de óvulos, 302
en embriogénesis somática, 638
en regulación de células mixtas, 636
inhibidores, 298

Digitized by Google

relación auxina/citocinina, 623
zeatina, 66, 67

Repetición (estadística), 377
costo, 380
distribución, 382
en biotecnología, 378
cálculo de, 379, 380
en experimento agrícola, 378
número de, 379

Reproducción agámica, 362

RFLP's, 846 (ver Apéndice A)
aplicaciones, 848
como marcadores, 874
metodología, 847, 848
ventajas, 848, 850

Saintpaulia sp., 102

Segregación, 280, 314

Selección, 314
de recombinantes, 280
diferencial de (S), 367, 369, 370
in vitro, 566
intensidad de (i), 370, 371
presión de, 314, 370, 371, 372
progreso esperado en, 371, 372
respecto al testigo, 372
respuesta esperada a, 368, 369, 370, 371
visual, 665, 669
en el diagnóstico viral, 665, 669

Semilla artificial, 414

Solanum spp. in vitro, 698, 699, 701

Stylosanthes guianensis, 80-83, 90, 343, 347, 352
antracnosis de, 343, 344
cultivo de callos, 83
cultivo de protoplastos, 81
plaqueo, 85, 87
cultivo de tejidos de, 345
subcultivo y ploidía, 346
cultivo en suspensiones celulares, 81
plaqueo, 85, 86
mejoramiento de, 344
evaluación de progenies, 346, 349, 351
regeneración de, 81
inducción de callo, 83
plantas regeneradas, 85

Suspensiones celulares, 80, 81, 174, 242, 243, 248, 250
anomalías cromosómicas en, 182
biosíntesis en, 195
ciclos de crecimiento en, 175
composición de, 175
con agente gelatinizador, 80
continuas abiertas, 176
continuas cerradas, 175, 176
crecimiento de, 176, 177, 180, 182
desaceleración progresiva, 178
estacionario, 175, 178, 181, 182
exponencial logarítmico, 178, 179, 180
lineal, 179
métodos de medición, 176, 177
retraso en, 178, 179
tasa específica de, 178, 179
criopreservación de, 184
en apio, 182
en camote, 434, 437
en *Nicotiana*, 182
en remolacha azucarera, 180
iniciación de, 174, 175, 179
mantenimiento de, 175
medios de cultivo para, 174
sincronización de, 186, 188
con FUdR, 194
sistemas de, 175
viabilidad de, 184

Suspensor embrionario, 296

Tabaco (*Nicotiana tabacum*), 48

Tejido embriogénico (TE), 623, 633
células periféricas, 633
desarrollo de, 636
diferenciado del callo, 638
en ESAF, 627
en mutantes de café, 628
organogénesis en, 639

Termoterapia, 484
en aráceas, 472
en camote, 424
en micropropagación de *Musa*, 500
en papa, 450

Theobroma sp., 604, 699 (ver Cacao)

Tiamina, 405, 413

Digitized by Google

Totipotencialidad, 144
  celular, 128
  en *Daucus carota*, 145

Toxinas, 566

Transposones, 315

Trasferencia, 5
  de genes, 290
    cocultivo, 290
    electroporación, 290
    introgresión, 290
    microinyección, 290
  de plántulas al suelo, 925
  equipos para, 7

Trasformación genética, 738
  aminoácidos esenciales y, 748
  calidad nutricional de cultivos y, 747
  con *Bacillus thuringiensis*, 745
  directa, 739, 740
  infecciones virales y, 742
    ARN de antisentido, 744
    protección cruzada, 742, 743
  inhibidores de proteasas y, 745
  mediada por *Agrobacterium*, 740
    T-DNA, 741
    con vector binario, 741
    con vectores cointegrantes, 741
  resistencia a herbicidas y, 747
  tolerancia a insectos y, 745

Trasformación 'Z', 372

Traslocación, 315, 546

Tratamientos, 377
  Al^{+++} en callos de alfalfa, 383, 385
  dosis óptima, 383
    relación dosis-respuesta, 384, 390, 391, 392
  efecto de, 384, 386, 390
    estimador del, 384, 392
    valor F de, 390
  factores en, 381, 383
    cualitativos y cuantitativos, 392, 396
  grados de libertad en, 392
  niveles de, 389, 393
  suma de cuadrados de, 392, 396

TTC, 724 (ver Apéndice A)

Unidad experimental (en biología), 378
  número de, 376, 379
  sensibilidad de, 378
  tamaño de, 379

Variabilidad, 547
  del material biológico, 376, 380
    coeficientes de, 380
  distribución de, 384, 392
    cuadrática, 384, 385
    lineal, 384, 385, 388, 390, 398
  en biotecnología, 378, 379, 382
    en cuarto de cultivo, 397
    por ambiente, 396, 399
  en invernadero, 379
  factores de, 548
  fenotípica, 376
  genética
    ambiental no seleccionable, 364
    en caña de azúcar, 365
    en híbridos somáticos, 768
    fenotípica seleccionable, 362, 371
    in vitro, 362
    por agentes mutagénicos, 769
    por eliminación cromosómica, 768, 769
    por recombinación cromosómica, 769
  medida de, 376, 377, 388
    por ANOVA, 397
    por regresión lineal, 398

Variación, 314 (ver Varianza)
  espontánea, 328, 364
  fenotípica, 340
  gametoclonal, 288, 290
  genética, 340, 341, 343
  protoclonal, 780
    importancia agronómica, 780, 781
  residual, 367, 371
  selección de, 342
  somaclonal, 315, 328, 340, 546
    causas epigenéticas, 340
    causas genéticas, 340
    en arroz, 353-355
    en camote, 437
    en *Stylosanthes guianensis*, 344
    genes somáticos, 315
    mecanismos de, 341
    origen de, 341

Digitized by Google

Varianza, 367, 398
ambiental, 364, 366
fenotípica, 363, 366
genética, 365
total, 366

Vermiculita, 300

Vigor híbrido (en yuca), 287

Vinca rosea L. (ver *Catharanthus roseus*)

Virus, 404, 802
AMV en *Musa* sp., 499, 500
detección de, 406, 665
aplicaciones, 683, 692
de la papa
con anticuerpos monoclonales, 451
ELISA, 451, 452
microscopía electrónica, 452
de PSTV, 878
construcción de sondas, 879
diagnóstico viral, 879, 882
hibridación, 881, 882
materiales necesarios, 879
resultados, 881, 882
sonda PSTVcADN para, 878
dsRNA y, 406
electroforesis y, 681, 682
ELISA y, 406
injertos en, 407
inoculación en, 407
métodos serológicos, 670, 675
de doble difusión, 503
difusión en agar, 671, 673
ELISA, 674, 675, 688, 692
floculación de látex, 673, 674, 685, 688
microprecipitación, 673
serodiagnóstico, 670
microscopía de luz, 680, 681
microscopía electrónica, 675, 679
plantas indicadoras en, 669, 670
pruebas electroforéticas, 681, 682
pruebas inmunológicas, 670, 674
selección visual en, 665, 669
eliminación, 404
por termoterapia, 405
HBV en arroz, 286
hipersensibilidad a, 813, 816
con proteínas foliares, 816
inclusiones virales, 680
infección viral, 404
por multiplicación vegetativa, 404
multiparticulados, 804
pinocitosis de, 805
reduplicación de, 810
resistencia a, 802, 813
ausencia de síntomas, 813
con nucleasas de célula, 817
con oligosacarina de pared celular, 815
en receptores de membrana, 817
por bloqueo de traducción de ARN, 818
por factor antiviral (AVF), 818
por menor movilidad de virus, 816
trasmisión por vector, 814

Xanthosoma sagittifolium, 470, 476

Yemas axilares, 413, 629

Yuca (*Manihot esculenta*), 80, 404
cianogénesis en, 287
cultivo de meristemas, 82, 87, 88
embriogénesis somática, 82, 89
medio de inducción para, 82
micropropagación de, 82, 88
medio para, 82
rendimiento de, 404

Zanahoria (*Daucus carota*), 47, 48, 49, 53

Digitized by Google