

# Manual de Técnicas de Propagación *in vitro* en la Escuela



Roosevelt Escobar, Liliana Muñoz, Auradela Ríos, Adriana Núñez,  
Carlos Dorado, José Restrepo y Joe Tohme

ISBN 978-958-694-132-7 (formato impreso)  
ISBN 978-958-694-131-0 (formato digital)



## CIAT

El Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) —miembro del Consorcio CGIAR— desarrolla tecnologías, métodos innovadores y nuevos conocimientos que contribuyen a que los agricultores, en especial los de escasos recursos, logren una agricultura eco-eficiente —es decir, competitiva y rentable así como sostenible y resiliente. La agricultura eco-eficiente reduce el hambre y la pobreza, mejora la nutrición humana y brinda soluciones ante la degradación ambiental y el cambio climático en los trópicos. Con su sede principal cerca de Cali, Colombia, el CIAT realiza investigación orientada al desarrollo en las regiones tropicales de América Latina, África y Asia.

[www.ciat.cgiar.org](http://www.ciat.cgiar.org)

CGIAR es una alianza mundial de investigación agrícola para un futuro sin hambre. Su labor científica la llevan a cabo los 15 centros de investigación que conforman el Consorcio CGIAR, en colaboración con cientos de organizaciones socias.

[www.cgiar.org](http://www.cgiar.org)

## FIDAR

La Fundación para la Investigación y Desarrollo Agrícola (FIDAR) es una organización no gubernamental, orientada a la búsqueda de alternativas para el desarrollo de comunidades urbanas y rurales en el suroccidente de la región andina de Colombia. Busca contribuir al fortalecimiento de modelos productivos en comunidades de escasos recursos económicos mediante procesos que generen un desarrollo integral del ser humano, en armonía con el ambiente, ejecutando sus actividades con criterios de equidad social, sustentabilidad ambiental y respeto por la biodiversidad biológica, étnica y cultural.

### Publicación CIAT No. 392

Área de Investigación en Agrobiodiversidad  
Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT)

y  
Fundación para la Investigación y Desarrollo Agrícola (FIDAR)

---

Edición de producción:	Victoria Rengifo y Claudia Calderón (CIAT)
Fotografía:	Camilo Oliveros, Roosevelt Escobar y Julio C. Martínez
Diseño de portada:	Julio C. Martínez
Diseño e impresión:	Grafitextos

---

Notas

ISBN 978-958-694-132-7 (formato impreso)

ISBN 978-958-694-131-0 (formato digital)

# Manual de Técnicas de Propagación *in vitro* en la Escuela

Roosevelt Escobar, Liliana Muñoz, Auradela Ríos, Adriana Núñez,  
Carlos Dorado, José Restrepo y Joe Tohme





# Referencias

- Anderson, WC. 1978. Tissue culture propagation of Rhododendrons. *In Vitro* 14: 334.
- Escobar Pérez RH; Escobar F; Gallego GJ; Cortés DF; Chávez AL.; Bohórquez A; Caicedo AL; Soto M; Narváez AS; Lozano E; Lugo J; Tohme J. 2004. La biotecnología en el salón de clases: Documento de trabajo para docentes de secundaria, versión 1 [CD-ROM]. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. Disponible también en: [http://ciat-library.ciat.cgiar.org/Articulos\\_ciat/cdbiotecnologia/cover.swf](http://ciat-library.ciat.cgiar.org/Articulos_ciat/cdbiotecnologia/cover.swf)
- Escobar RH; Muñoz L; Ríos A; Núñez A; Azcárate A; Dorado C; Tohme J. 2012. El cultivo *in vitro*: otra manera de propagar la yuca. Disponible en: [http://ciat-library.ciat.cgiar.org:8080/jspui/bitstream/123456789/6636/1/el\\_cultivo\\_in\\_vitro\\_otra\\_manera\\_propagar\\_yuca.pdf](http://ciat-library.ciat.cgiar.org:8080/jspui/bitstream/123456789/6636/1/el_cultivo_in_vitro_otra_manera_propagar_yuca.pdf)
- Gamborg, OL, RA Miller, K Ojima. 1968. Nutrient Requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Research* 50: 151-158.
- Knudson, L. 1946. A new nutrient solution for germination of orchid seed. *Amer. Orchid Soc. Bull.* 15:214-217.
- Lloyd, G and BH McCown. 1981. Commercially-feasible micropropagation of Mountain Laurel, *Kalmia latifolia*, by shoot tip culture. *Proc. Int. Plant Prop. Soc.* 30:421-427.
- Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) 2009 Manual del Protocolo de Montreal relativo a las sustancias que agotan la Capa de Ozono. Octava edición. Disponible en: [http://ozone.unep.org/Publications/MP\\_Handbook/MP-Handbook-2009-sp.pdf](http://ozone.unep.org/Publications/MP_Handbook/MP-Handbook-2009-sp.pdf).
- Ramírez H; Guevara ME; Escobar-Pérez RH. 2012. Cultivo de tejidos vegetales: Conceptos y prácticas. Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira. Colombia. 227 p.
- Roca WM. 1984. Cassava. En: Sharp WR; Evans DA; Ammirato P; Yamada Y, eds. *Handbook of plant cell culture, Crop species*. New York: MacMillan Publishing Co. 2:269-301.



# Contenido

	Pág.
<b>Introducción</b>	1
<b>Objetivos</b>	2
<b>La Célula</b>	3
Los sistemas de reproducción celular	3
La propagación de plantas	4
El cultivo de tejidos: Principios básicos	5
Normas generales de seguridad y convivencia	7
Reglas NO negociables	8
<b>El laboratorio para el cultivo <i>in vitro</i></b>	9
Área de preparación	10
Área de esterilización y lavado	10
Manejo de la autoclave	11
Manejo del material contaminado	13
Área de transferencia o subcultivo	13
Área de incubación o crecimiento controlado	15
Área de bodega y almacenamiento	16
Área de invernadero y crecimiento <i>ex vitro</i>	16
<b>La micropropagación</b>	17
El explante	19
El medio de cultivo	20
Tasa de propagación	24
Pérdidas en el proceso: Tasa de contaminación y no conformes	24
<b>Los sustratos</b>	25
El enraizamiento y la transferencia al suelo	26
El riego	27
Transferencia al suelo	28
<b>Glosario</b>	29
<b>Referencias</b>	30

# Glosario

**Asepsia:** Proceso, material, sitio o superficie libre de agentes contaminantes.

**Biotecnología:** Serie de técnicas en las cuales se usa un organismo vivo, o parte de él, para la producción y modificación de productos o procesos con la finalidad de obtener productos de uso específico, útiles para el hombre, el ambiente y los animales.

**Clonar:** Proceso de multiplicación celular donde se obtienen organismos genéticamente idénticos.

**Dormancia:** Fase del ciclo biológico en el que un organismo suspende temporalmente sus funciones y desarrollo.

**Explante:** Porción de tejido vivo aislado de la planta donante que se transfiere a un medio artificial para lograr su crecimiento y desarrollo.

**Flamear:** Técnica que consiste en pasar varias veces por la llama de un mechero un implemento para su esterilización.

**In vitro:** Se refiere al desarrollo de actividades biológicas que tienen lugar fuera de los organismos vivos, generalmente en recipientes de vidrio utilizados para lograr su desarrollo a través de medios artificiales de cultivo y condiciones ambientales controladas.

**Medio de cultivo:** Formulación líquida o sólida que suministra al explante los nutrientes necesarios para su desarrollo bajo condiciones de cultivo *in vitro*.

**Meristemo:** Estructura compuesta por células no diferenciadas totipotentes que se encuentran en constante y rápida división celular.

**Micra o micrómetro:** Unidad de longitud equivalente a la millonésima parte de un metro ( $1 \mu\text{m} = 10^{-6} \text{m}$ ).

**Micropropagación:** Conjunto de técnicas y métodos de cultivo *in vitro* utilizados para multiplicar plantas en forma asexual, rápida y eficiente.

**Surfactante:** Sustancia que afecta la tensión superficial en el área de contacto entre dos fases.

## Nota

La mención de productos comerciales en este manual no constituye una garantía del producto ni un intento para promocionarlo por parte del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) o de otra de las agencias colaboradoras.



## Transferencia al suelo

A los 2 meses de transferidas las plántulas al invernadero y una vez se observe en la planta buen aspecto, vigor y buena coloración, se puede iniciar la fase de traslado a condiciones de suelo abierto.

Para esto, se debe preparar con tiempo el lote, hacer camellones a 1 m de distancia y con un ahoyado entre plantas a 1x1 m (Figura 12A). Se realiza un riego al lote hasta lograr capacidad de campo y, al día siguiente, se procede a trasladar una planta por hueco en cada posición. Se rompe cada bolsa y con cuidado, se coloca la planta en el hueco y se rellena con suelo hasta completarlo. Se afirma un poco el suelo alrededor de la planta y se riega inmediatamente.

El traslado debe hacerse en horas de la mañana o en la tarde, siempre asegurando el riego en el primer mes, con espacio de cada día de por medio. Si se programa el traslado con la época de lluvias, se reducen los costos y se asegura el prendimiento de las plantas trasladadas (Figura 12B).

Al igual que en las anteriores fases, se deben cuantificar las pérdidas al momento del trasplante para poder monitorear el total y determinar la eficiencia en el proceso desde la fase *in vitro* hasta el desarrollo en campo.



**Figura 12.** (A) Detalle de una planta recién trasplantada al lote. (B) Vista panorámica de un lote de material *in vitro* bajo condiciones de campo, próximo a ser usado en programas de incremento de material de siembra.

## Introducción

La agricultura es la principal forma de producir alimentos y la biotecnología puede ser una herramienta útil para mejorar y fortalecer la producción de estos. Algunas técnicas de la biotecnología vegetal permiten la propagación (a diferentes niveles de escala) de materiales seleccionados por una característica de interés. Ello puede contribuir en forma rápida y uniforme al proceso de propagación, garantizando la calidad genética y sanitaria, con miras al desarrollo agrícola de una región y la consolidación del sistema productivo de un país.

Hacia este fin, ¿qué debe conocer alguien que desee realizar un trabajo experimental en cultivo de tejidos en la escuela? Debe tener claros los principios biológicos que son el fundamento de la técnica de propagación clonal, las normas de seguridad para trabajar en el laboratorio y sobre todo, los requerimientos técnicos y físicos para el desarrollo de dicha actividad. Esto unido al deseo constante de aprender y hacer parte de un mundo mágico que le permita investigar, direccionar y seguir el crecimiento y la respuesta de un explante, según sean los objetivos de cada actividad de investigación.

Con el fin de contribuir a estos propósitos, en línea con los objetivos de investigación y desarrollo de la agricultura de sus respectivas organizaciones, los autores han diseñado este manual como un complemento a la formación en Ciencias Naturales a nivel de secundaria, el cual se espera genere inquietudes en los estudiantes para que, en conjunto con sus profesores, apliquen la metodología descrita y contribuya a la formación de futuros biotecnólogos.

Ericson Aranzales R.  
Coordinador del Laboratorio de Conservación *in vitro*  
Programa de Recursos Genéticos  
Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT)



## Objetivos

El presente manual fue diseñado como material de apoyo complementario a un curso básico en Ciencias Naturales a nivel de secundaria. Ofrece información general acerca de las técnicas del cultivo de tejidos y su uso para generar material de siembra. Además, busca abrir un espacio de discusión y práctica al interior del salón de clase con dicha técnica.

Se usa la yuca (*Manihot esculenta* Crantz) como un cultivo modelo que permite desarrollar e implementar la técnica básica de propagación *in vitro* en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos, construido con el apoyo de la Embajada del Japón en la Institución Educativa Técnico Agropecuaria Carlos Arturo Verbel Vergara de Caracol-Tolúviejo (IETACAR), departamento de Sucre, y en la Institución Educativa Técnico de Tunía (IETT), departamento del Cauca.

Con algunos ajustes o modificaciones en la composición del medio de cultivo, del tipo de explante y las condiciones de siembra, dicha técnica puede ser aplicada a otros cultivos de interés en las zonas de influencia del proyecto propuesto.



**Figura 11.** (A) Práctica de transferencia de material *in vitro* a condiciones de invernadero con docentes y alumnos de la IETACAR (Tolúviejo, departamento de Sucre) y (B) en la IETT (Tunía, departamento de Cauca). El uso de sustrato esterilizado, el correcto lavado de las raíces y el manejo de la plántula con las manos húmedas minimizan pérdidas durante esta fase. Observe que cada plántula transferida se cubre con un vaso de icopor a manera de cámara para controlar la humedad en la primera etapa del trasplante (3 a 5 días) y evitar la pérdida por deshidratación.

## El riego

Algunos factores claves para asegurar el éxito del proceso de recuperación de las plántulas en la fase externa al proceso de propagación involucran el manejo del riego y las condiciones de manejo en vivero posteriores a la fase *in vitro*.

En la primera parte, se debe prestar atención a la calidad del agua, frecuencia del riego y manejo de las condiciones sanitarias para evitar pérdidas asociadas a la alta humedad. Otros puntos a tener en cuenta son:

1. Regar en las primeras horas de la mañana o al atardecer.
2. Controlar el riego, evitando excesos y encharcamientos del sustrato.
3. Aplicar el riego en la base de la planta, evitando el riego sobre el follaje.

El follaje húmedo favorece la aparición de hongos (mohos).

4. Aplicar riego solo de ser necesario. Para esto, palpe y observe la condición del sustrato. En las épocas de alta humedad o bajo períodos lluviosos, se debe regar con menos frecuencia, permitiendo que se seque el sustrato.
5. Aplicar el riego en forma uniforme en el sustrato, asegurando que el sistema radical quede cubierto.
6. Retirar las hojas caídas para evitar focos de contaminación.



bromuro de metilo como agentes desinfectantes, la aplicación del último compuesto está prohibida según los acuerdos del Protocolo de Montreal de 1987.

## El enraizamiento y la transferencia al suelo

Para el manejo de la yuca posterior a la fase *in vitro*, el CIAT usa frecuentemente un sustrato compuesto por una parte de suelo esterilizado por vapor, y dos a tres partes de arena gruesa lavada. En las instalaciones financiadas por la Embajada del Japón, se ha optado por un sustrato compuesto por suelo, arena gruesa lavada y lombriabono en proporciones (1:1:1). Una vez homogenizado el sustrato, se dispensa en bolsas negras perforadas, con fuelle para ayudar a mantenerlas en pie. Cada bolsa se riega con suficiente agua desde el día anterior al trasplante. Se hace un hueco al centro con un palo ahusado.

El recipiente que contiene las plantas a ser trasplantadas se golpea suavemente en el borde para romper el medio. Posteriormente se deslizan por el borde o con la ayuda de una pinza larga se toman las plantas y se remueven por completo del frasco. Las plantas se colocan sobre una de

las palmas de la mano bien humedecida y, con la otra mano se hace presión sobre la llave del grifo para aumentar la presión de salida del agua y lavar por completo cualquier resto de medio o gelificante en las raíces.

Posteriormente, se colocan en una bandeja con agua. Con las manos humedecidas, se toma una planta y se lleva a un hueco de una bolsa. Con la ayuda de un palo se acomoda la raíz y con cuidado se remueve el suelo alrededor y se riega de nuevo para lograr el contacto entre las partes. Se debe asegurar que no queden espacios o bolsas de aire entre la raíz de la planta y el sustrato en el hueco en la bolsa para evitar pérdidas por desecación de la raíz (Figura 11A).

Cada planta se cubre con un vaso de icopor invertido, el cual actúa como una cámara húmeda y evita la desecación de la planta. Los vasos han sido perforados previamente 3–4 veces con la punta de un lápiz en la base (Figura 11B).

Las plantas deben continuar con un manejo de la humedad y con controles sanitarios para evitar pérdidas. A los 20–30 días posteriores al trasplante, se realiza la primera fertilización con 2 g/L de una fuente rica en fósforo, como Plantex® (10:52:10) o Cosmocel® (20:30:10).

## La célula

La célula es la unidad morfológica, estructural y funcional de todo ser vivo. En ella se dan todas las funciones y procesos metabólicos que dan sustento a la vida. Las células pueden diferir en tamaño, forma y función y, de acuerdo al número de células que se agrupan en un organismo, se les puede considerar unicelulares o pluricelulares.

En organismos pluricelulares, las células que se unen con una función específica conforman un tejido, los tejidos conforman órganos, posteriormente a nivel superior, sistemas y estos al individuo.

### Trabajo de consulta

1. Realice un diagrama de una célula vegetal y una animal.
2. Establezca semejanzas y diferencias en su estructura.
3. Identifique los componentes celulares en cada caso.



## Los sistemas de reproducción celular

Se considera a la reproducción celular como aquel mecanismo mediante el cual una célula se perpetúa a sí misma a través de la generación de células hijas. En los organismos pluricelulares, este mecanismo resulta fundamental, ya que le permite al organismo crecer y desarrollarse, recuperar células muertas y asegurar el mantenimiento de las funciones celulares. Las células pueden ser somáticas o sexuales y

según su clasificación pueden ocurrir dos tipos de división celular: la mitosis o la meiosis.

**Mitosis:** proceso que ocurre en las células somáticas, mediante el cual una célula madre (diploide 2n) genera dos células hijas con la misma carga genética de la madre (diploide 2n). Mediante este sistema de división celular se aseguran copias idénticas del material inicial (propagación clonal o asexual).

**Meiosis:** ocurre en órganos específicos que cumplen una función en la reproducción sexual (glándulas sexuales). En este tipo de división celular, una célula diploide (2n) sufre una serie de divisiones sucesivas, las cuales generan como producto final cuatro células haploides (n) (sistema reduccional). En organismos con reproducción sexual, mediante este mecanismo se asegura la producción de gametos (espermatozoides y óvulos) de carga haploide que posteriormente madurarán y participarán en la reproducción sexual para recomponer la ploidia propia de la especie.

Durante el proceso de meiosis, entre los cromosomas homólogos ocurre un proceso de entrecruzamiento (recombinación), con lo cual cada célula hija (gameto) representa una combinación diferente y, por ende, favorece la diversidad de los productos de la reproducción sexual (los hijos). Así pues, la meiosis resulta ser un proceso clave para lograr mantener la ploidia propia de una especie y generar diversidad como producto de la recombinación ocurrida en las fases donde ocurre el entrecruzamiento entre los cromosomas homólogos.

## La propagación de plantas

De acuerdo a su sistema de reproducción, las plantas se pueden dividir en plantas de reproducción sexual y de reproducción asexual.

### Trabajo de consulta

1. Realice un diagrama general donde se represente: la mitosis y la meiosis.
2. Establezca diferencias y semejanzas.



En forma general, cuando se usa como medio de propagación una semilla botánica producto de la fusión (fecundación) de dos gametos de diferente sexo —uno masculino o polen y otro femenino u óvulo— se habla de reproducción sexual. Dicha semilla puede ser producto de una autofecundación o de una polinización cruzada. Ejemplos de cultivos que usan la reproducción sexual como mecanismo de propagación son entre otros, el frijón, la arveja, el maíz, los pastos, etc. Sin embargo, algunos cultivos no producen semilla botánica o, si la producen, presentan variaciones en la identidad y calidad (no se mantiene fija la característica de interés comercial) entre padres e hijos, lo cual afecta su valor y desarrollo potencial en cultivo intensivo.

En algunos cultivos de interés comercial, tales como la caña de azúcar, banano/plátano, yuca, papa, ajo, uva, entre otros, se usa la propagación asexual o vegetativa para lograr mantener las características de la planta original. Para ello, se recurre al uso de partes o porciones (diferentes a

la semilla) de la planta “madre”, como una estaca, un bulbo, bulbillos, hojas o colinos que, además de ser su medio de reproducción, permiten asegurar que se mantenga o se perpetúe (técnicamente clonar) la característica original del material de interés.

Según su sistema de polinización, las plantas se pueden agrupar en autógamas o en alógamas. En las primeras, ocurre un proceso en el cual la misma planta se fecunda, es decir, que el ovario (parte del pistilo u órgano femenino de la flor) recibe el polen (gameto producido en la antera —órgano masculino en la flor) de la misma planta. Contrario a ello, en una planta alógama ocurre una polinización cruzada, es decir, que el polen que se recibe proviene de otra planta diferente (se puede reconocer cuál planta en el cruce funcionó como madre, pero no cuál planta operó como padre).

### Trabajo de consulta

1. Realice un diagrama y compare ventajas y desventajas de:
  - a. La reproducción sexual y asexual.
  - b. La autogamia y la alogamia.



En aquellas plantas en las cuales la forma natural de mayor ocurrencia de la polinización es la autogamia, se favorece el desarrollo y uso de variedades, lo cual le facilita al agricultor usar y mantener semillas de generaciones previas sin que ocurran variaciones (desviaciones). Caso contrario ocurre en aquellos cultivos donde prevalece la polinización cruzada (plantas

Al igual que se debe calcular una tasa de propagación, también se debe cuantificar el porcentaje de pérdida, identificar la causa principal y tomar los correctivos necesarios para llevar al mínimo dicha pérdida. La falta de determinación de las causas de pérdida en el proceso de propagación se puede hacer inviable un laboratorio.

## Los sustratos

Un buen sustrato para usar en fase de vivero debe incluir entre otras las siguientes características:

1. Calidad nutricional. Para determinar la calidad, es necesario conocer su origen. Idealmente efectuar un análisis microbiológico y nutricional.
2. Tener una baja densidad (liviano).
3. Buena capacidad de intercambio iónico.
4. Facilidad de conseguir en el entorno. Su uso no debe afectar el medio ambiente (no se puede basar en una práctica extractiva). Ser económico y amigable con el ambiente.
5. Tener una buena capacidad de aireación y baja compactación.
6. Tener una buena capacidad de retención de humedad, pero no de encharcamiento.

Algunos sustratos son de origen natural y otros sintéticos. Algunas opciones son la cascarilla de arroz, el capacho de coco, productos compostados (viruta de madera, pasto picado, restos de cosecha), arena de río, suelo, humus de lombriz, turba, vermiculita, perlita, arena volcánica, fibra de vidrio, etc. Comercialmente se prefiere el uso de vermiculita, perlita o turba, pues

no requieren esterilización y se pueden usar en forma directa.

Una vez definido qué sustrato es la mejor opción en la zona del laboratorio, se debe proceder a la desinfección (eliminación de agentes contaminantes y semillas de arvenses) para evitar pérdidas y competencia por nutrientes y espacio en la planta de interés.

Diversas opciones para desinfectar el sustrato pueden ser consideradas siempre y cuando no afecten la salud de las personas y el medio ambiente. Asimismo, considerar aspectos económicos de la práctica y el tiempo usado en este proceso para incluirlos entre los factores de decisión.

La desinfección se lleva a cabo en el área de invernaderos. Allí se debe contar con un área de almacenamiento, desinfección y manejo de sustratos para garantizar un control adecuado de la presencia de arvenses, insectos plaga y microorganismos que causen contaminación y pérdidas durante el proceso de la transferencia.

Para la desinfección de sustratos, se puede recurrir al (1) uso de agentes químicos de amplio espectro (fungicidas), (2) el manejo de vapor de agua, ya sea mediante el uso de una caldera o de tanques de calentamiento, (3) a la solarización (tratar sustrato preparado, humedecido y embolsado en plástico en bloques no mayores a 10 cm, y exponer a los rayos del sol en un área despejada o plancha durante al menos 4–6 semanas).

Vale la pena mencionar que aunque alguna literatura hace referencia al uso de formol y

### Trabajo de consulta

1. Investigue acerca de otros grupos de reguladores de crecimiento.
2. Defina sus funciones y uso potenciales en las técnicas *in vitro*.



**Cuadro 4.** Composición de los medios de cultivo para la propagación (4E) y el enraizamiento (17N) de la yuca implementados en el CIAT.

Código del medio	Formulación	Explante
4E	MS completo, 2% sacarosa, 1mg/L Tiamina-HCl, 100mg/L m-Inositol, 0,04 mg/L BAP, 0,05 mg/L GA <sub>3</sub> , 0,02 mg/L ANA, pH 5,7-5,8.  Gelificante: 0,45% Duchefa®, 0,8% Agar Difco o 0,2 mg/L Gelrite/Phytigel®	Ápice y nudos
17N	1/3 MS, 2% sacarosa, 1mg/L Tiamina-HCl, 100 mg/L m-Inositol, 0,01 mg/L GA <sub>3</sub> , 0,01 mg/L ANA, *Plantex® 25 mg/L, pH 5,7-5,8.  Gelificante: 0,2 mg/L Gelrite® o Phytigel®	Ápice

\*Plantex® Fertilizante comercial de formulación 10:52:10.

## Tasa de propagación

La eficiencia de los procesos de propagación se mide por el número de nuevos explantes (propágulos) generados durante cada ciclo de cultivo. Para ello se debe calcular el número de explantes (puntas apicales y yemas laterales o nudos) obtenidos de una planta *in vitro* en un período de tiempo estandarizado como ciclo de propagación.

El valor promedio en varias evaluaciones se considera entonces la tasa de propagación. En el caso de la yuca, en la Figura 8 se puede observar que la planta madre fue propagada y generó cuatro explantes (un ápice y tres nudos). Cada uno de estos a su vez se cultivó y desarrolló de nuevo una planta. Al repetir el ciclo y contabilizar el número de nuevos explantes/planta propagada, se puede obtener la tasa de propagación.

## Pérdidas en el proceso: Tasa de contaminación y no conformes

Tal y como se había expresado en los apartes anteriores, la falta de control en las condiciones de cultivo puede acarrear pérdidas durante el proceso. Algunos de los eventos que ocasionan pérdidas son:

- Contaminaciones por hongos o bacterias
- Explantes que no inician desarrollo
- Muerte del tejido por quemazón en la manipulación
- Daño mecánico durante el corte, etc.

alógamas), pues se presentan variaciones entre los individuos producto de la polinización, es decir, cada semilla es diferente y, por ende, los individuos que se generan también lo son. Este mecanismo a nivel comercial favorece el manejo de poblaciones, el desarrollo y la generación de materiales híbridos.

Diversos mecanismos naturales en las plantas pueden favorecer la polinización cruzada, tales como dioecia, monoecia, protandria, protoginia, heterostilia, androesterilidad y auto-incompatibilidad.

### Trabajo de consulta

1. Realice un dibujo de una flor completa e identifique sus partes.
2. Consulte las definiciones de los mecanismos que favorecen la polinización cruzada.



## El cultivo de tejidos: Principios básicos

Bajo el término de cultivo de tejidos o cultivo *in vitro*, se incluye una serie diversa de técnicas celulares, en las cuales un explante (parte aislada de un individuo) se cultiva y crece bajo condiciones controladas (ambientales y nutricionales), de tal forma que las células que conforman el explante continúan con su desarrollo y logran producir ya sea un principio activo de interés (por ejemplo, un metabolito secundario) o reconstituir de nuevo al individuo usado como fuente (es decir, que se obtiene una copia o clon del organismo del cual fue aislado).

Diversas opciones de fuentes de explantes se pueden usar al inicio del proceso, entre ellas se pueden mencionar los meristemos, puntas apicales, yemas laterales, embriones, porciones de hojas, puntas de raíces, microsporas, óvulos, etc.

Algunas de las aplicaciones del cultivo de tejidos incluyen entre otras:

1. La propagación clonal del material de interés comercial (técnica de mayor aplicación a nivel industrial) o ecológico (aplicado a esquemas de reposición o repoblación).
2. La conservación de germoplasma (usado en el establecimiento de bancos genéticos).
3. Proceso de limpieza de germoplasma (producción de material libre de enfermedades y agentes de interés cuarentenario).
4. El uso para la producción de metabolitos secundarios.
5. El uso en transformación genética (transgénesis).

Para lograr el éxito en el cultivo de tejidos, como regla básica, se deben asegurar y mantener las condiciones de asepsia, es decir, asegurar la no presencia de agentes contaminantes que alteren o desvíen las condiciones de esterilidad en el cultivo.

Los principios que fundamentan las técnicas del cultivo de tejidos son:

1. La teoría celular.
2. La totipotencia celular.

La primera teoría, base estructural de la biología, fue establecida por Teodoro Schwann y Jacobo Schleiden entre los años 1938–1939, la cual expresa básicamente que:

1. Todo ser vivo está conformado por células.
2. La célula es la unidad básica de organización de la vida.

Actualmente existen algunas consideraciones modernas que complementan la definición y alcance de dicha teoría.

#### Trabajo de consulta

1. Investigue acerca de los conceptos modernos de la teoría celular.
2. Establezca un cuadro de resumen.



En 1902, Gottlieb Haberlandt realizó los primeros intentos de cultivar células vegetales aisladas, usando un medio artificial. Aunque en su momento no tuvo éxito, sentó las bases del cultivo *in vitro* y por sus aportes se le considera el padre del cultivo de tejidos.

Haberlandt propuso el concepto de la totipotencia celular, la cual se relaciona con la capacidad que tiene una célula somática vegetal de regenerar una planta completa donde se pueden observar las mismas características genéticas de la planta usada como fuente.

Para implementar las técnicas del cultivo de tejidos, es necesario definir los siguientes parámetros y condiciones:

1. Espacio de trabajo o laboratorio acondicionado para el proceso.
2. Limpieza (asepsia) apropiada.
3. Ajustar una metodología de acuerdo al objetivo del trabajo y a la especie.
4. Definir un explante de acuerdo al objetivo del trabajo o tipo de estudio.
5. Definir un medio de cultivo apropiado para el desarrollo del explante.
6. Instrumentos y equipos para desarrollar el proceso.
7. Previa capacitación en el tema a ejecutar.

Un medio de cultivo se diferencia de otro, además de en su formulación básica (solución basal), en la composición (suplementación) de los reguladores de crecimiento. La respuesta de un explante bajo condiciones de cultivo *in vitro* es influenciada por el tipo de regulador de crecimiento adicionado al medio de cultivo, la dosis usada y los efectos sinérgicos de las combinaciones entre grupos de reguladores.

Algunos de los grupos funcionales de mayor uso en la micropropagación de plantas son:

1. El grupo de las auxinas [por ejemplo, Ácido Índole Acético (AIA), Ácido Índole Butírico (IBA), Ácido Naftaleno Acético (ANA), 2,4-D, etc.] básicamente ejerce su función sobre la división celular y en la inducción de las raíces, proceso conocido como rizogénesis.
2. Las citoquininas [por ejemplo, 6-bencil amino purina (BAP), Kinetina (Kin), Zeatina (Zea), Tiazurón (TDZ), etc.] activan la división celular y favorecen la inducción de yemas o brotes adventicios, proceso conocido como caulogénesis.

3. Las giberelinas (por ejemplo, el Ácido Giberélico 3 o GA<sub>3</sub>) ejercen su función sobre la elongación celular, inducción floral y en la ruptura de la dormancia.

Para facilitar el trabajo en el laboratorio, mantener un control sobre los procesos y la calidad en las mediciones, normalmente se recurre al uso de soluciones de trabajo concentradas.

En el Cuadro 3, se detalla la manera de preparar las soluciones de trabajo de los reguladores de crecimiento para usar en la preparación del medio de cultivo. Para ello se determina una solución estándar X (relación dada entre peso/volumen) y se concentra tantas veces como se desee, modificando la relación peso-volumen.

Roca (1984) definió los medios de cultivo específicos para yuca; 4E para la fase de propagación y 17N para la fase de enraizamiento (Cuadro 4). Del mismo modo, definió las condiciones de cultivo *in vitro*: 28 °C ± 2 °C, fotoperíodo 12/12, 1000 lux de intensidad lumínica.

**Cuadro 3.** Preparación de los reguladores de crecimiento y cantidades (mg) necesarias para la preparación de la solución de trabajo y volumen respectivo de esta para preparar medio de propagación 4E en yuca (Roca 1984).

Regulador de crecimiento	Volumen a preparar (mL)	Cantidad (mg)	Concentración Stock (X)	Volumen (mL) a usar por litro de medio
6-BAP	200	20	100	0,4
GA <sub>3</sub>	200	22	100	0,5
ANA	200	20	100	0,2



**Cuadro 2.** Composición de medio basal de cultivo Murashigue y Skoog (1962) y ajuste para la preparación de soluciones madre de trabajo.

	Volumen a preparar (mL)	Cantidad (mg)	Concentración del stock (X)	Volumen (mL) a usar por litro de medio
<b>Stock No. 1</b> NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> KNO <sub>3</sub> MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	200	16500 19000 3700 1700	50	20
<b>Stock No. 2</b> H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O NaMoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	100	620 1690 860 25 2,5 2,5	1000	1
<b>Stock No. 3</b> KI	100	83	1000	1
<b>Stock No. 4</b> CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	100	14667	333,3	3
<b>Stock No. 5 *</b> Na <sub>2</sub> EDTA FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	200	1492 1114	200	5
<b>Stock No. 6</b> Tiamina-HCl	200	20	100	10
<b>Stock No.7</b> m-Inositol	200	1600	8000	12,5

\* Esta solución de trabajo debe mantenerse en un recipiente oscuro o ámbar. Para su preparación, deben diluirse por separado cada uno de los componentes, calentarlos un poco y luego mezclarlos.

## Normas generales de seguridad y convivencia

Antes de entrar a realizar cualquier procedimiento en un laboratorio, se deben conocer las normas de seguridad y convivencia. Solo cuando se tenga plena conciencia y manejo adecuado de estas normas, se puede ingresar al laboratorio, reconocer las áreas y realizar cualquier medición o experimentación en él.

Aun con previo conocimiento de las normas básicas para trabajar en un laboratorio, es importante al ingresar a una nueva instalación, consultar la reglamentación con la persona a cargo. Siempre se debe tener en cuenta el plan de manejo de riesgos, ruta de evacuación y puntos de encuentro para casos de emergencia.

A continuación algunas normas básicas de seguridad y convivencia para tener en cuenta en un laboratorio:

1. Las personas que ingresen a desarrollar actividades deben usar una bata de laboratorio mientras estén en él. Los botones de la bata deben mantenerse abrochados para evitar cualquier accidente.
2. Se prohíbe salir con la bata del laboratorio a las zonas comunes (cafetería, biblioteca, salón de clase, etc).
3. Se deben usar zapatos cerrados, con suela antideslizante y sin tacones para evitar accidentes.
4. Las personas con cabello largo deben mantenerlo recogido.
5. El mesón de trabajo debe permanecer limpio y organizado.



6. Las neveras y horno microondas del laboratorio no deben usarse para conservar o calentar alimentos.
7. Todo material contaminado debe ser removido inmediatamente y llevado a la autoclave.
8. Antes de terminar la práctica de laboratorio, se debe limpiar y asear el mesón de trabajo.
9. Todo desecho y material sucio producto de la práctica de laboratorio se debe lavar y entregar a la persona de la bodega el mismo día. No se permite acumular material para el otro día.
10. Ubique los desechos de acuerdo al tipo de residuo generado.
11. Una vez finalizada la práctica, las personas deben lavar sus manos con agua y jabón antes de salir del laboratorio.



## Reglas NO negociables

1. No se permite el acceso al laboratorio sin contar con la guía supervisada del docente o monitor durante la práctica.
2. Antes de iniciar cualquier actividad, se debe realizar una inducción de manejo de riesgos y procedimientos seguros en el laboratorio.
3. Ninguna reacción química o solución debe prepararse sin contar con la supervisión del docente o monitor encargado.
4. No se permite el consumo de ningún alimento o bebida dentro del laboratorio.
5. Antes de iniciar la práctica, cada alumno debe haber leído la guía de laboratorio para saber qué actividad (procedimiento) experimental va a llevar a cabo y qué materiales y equipos va a requerir.
6. Nunca se debe pipetear con la boca. Para ello se debe usar ya sea una bomba de succión o un pipeteador automático.
7. No se debe ingresar al laboratorio ni al cuarto de cultivo o crecimiento cuando se haya visitado el campo.
8. No se deben usar los equipos y reactivos sin haber tenido una capacitación previa y sin conocer su ficha técnica.
9. No se debe jugar en el laboratorio. Correr, empujarse o hacer bromas pone en peligro su integridad y la de sus compañeros.

**Cuadro 1.** Composición básica (mg/L) y relación molar (M) de medios basales de cultivo de amplio uso en las técnicas *in vitro*.

Macros	MS		B5		WPM		Knudson C		Anderson	
	mg/L	M	mg/L	M	mg/L	M	mg/L	M	mg/L	M
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	20,61 mM	-	-	400	5 mM	-	-	400	5 mM
KNO <sub>3</sub>	1900	18,79 mM	2500	24,73 mM	-	-	-	-	480	4,75 mM
CaCl <sub>2</sub>	332,02	2,99 mM	113,23	1,02 mM	72,5	0,65 mM	-	-	332,02	2,99 mM
MgSO <sub>4</sub>	180,54	1,5 mM	121,56	1,01 mM	180,54	1,5 mM	122,15	1,02 mM	180,54	1,50 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	1,25 mM	-	-	170	1,25 mM	250	1,84 mM	-	-
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	-	130,44	1,09 mM	-	-	-	-	330,60	2,75 mM
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	134	1,01 mM	-	-	500	3,78 mM	-	-
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	-	-	-	-	471,26	2,35 mM	596,4	1,43 mM	-	-
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	990	5,68 mM	-	-	-	-	-	-

Micros	MS		B5		WPM		Knudson C		Anderson	
	mg/L	M	mg/L	M	mg/L	M	mg/L	M	mg/L	M
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	0,10 mM	3	48,52 μM	6,2	0,10 mM	-	-	6,2	0,10 mM
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,25	1,03 mM	0,25	1,03 μM	0,25	1,03 μM	-	-	0,25	1,03 μM
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	16,9	0,10 mM	10	59,16 μM	22,30	0,13 mM	5,68	33,61 μM	16,90	0,10 mM
FeNaEDTA	36,70	0,10 mM	36,70	0,10 mM	36,70	0,1 mM	-	-	73,40	0,20 mM
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	-	-	-	-	-	-	25	0,09 mM	-	-
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	8,60	29,91 μM	2	6,96 μM	8,6	29,91 μM	-	-	8,6	29,91 μM
KI	0,83	5,00 μM	0,75	4,52 μM	-	-	-	-	0,30	1,81 μM
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,025	0,11 μM	0,025	0,11 μM	-	-	-	-	0,025	0,11 μM
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,025	0,10 μM	0,025	0,10 μM	0,25	1 μM	-	-	0,025	0,10 μM

**Nota:** La concentración y tiempo de acción del blanqueador sobre el tejido no debe causar daño excesivo al tejido. Si se nota decoloración y flacidez, esto significa que se llegó al máximo soportado por el tejido en el paso 4 y 5, y debe reconsiderarse una concentración o tiempo menor al usado.

## El medio de cultivo

Un medio de cultivo es una solución que provee los nutrientes esenciales para el correcto desarrollo de las plantas en cultivo.

Está conformado básicamente por una solución basal, una fuente energética, un juego de vitaminas (especialmente del grupo B) y un juego de reguladores de crecimiento. El efecto aditivo de cada uno de estos componentes y la relación entre los reguladores de crecimiento (tipo, dosis y efectos conjuntos) propician la respuesta del explante a través de la organogénesis o por la embriogénesis (Figura 9).

Dentro de las soluciones de medio basal, la de mayor uso es la MS (Cuadro 1) desarrollada por Murashigue y Skoog en 1962. Este medio provee un balance de macroelementos (N, P, K, S, Ca) y microelementos (B, Mn, Zn, Cu, Fe, Co, etc.) a la planta necesarios para su correcto crecimiento.

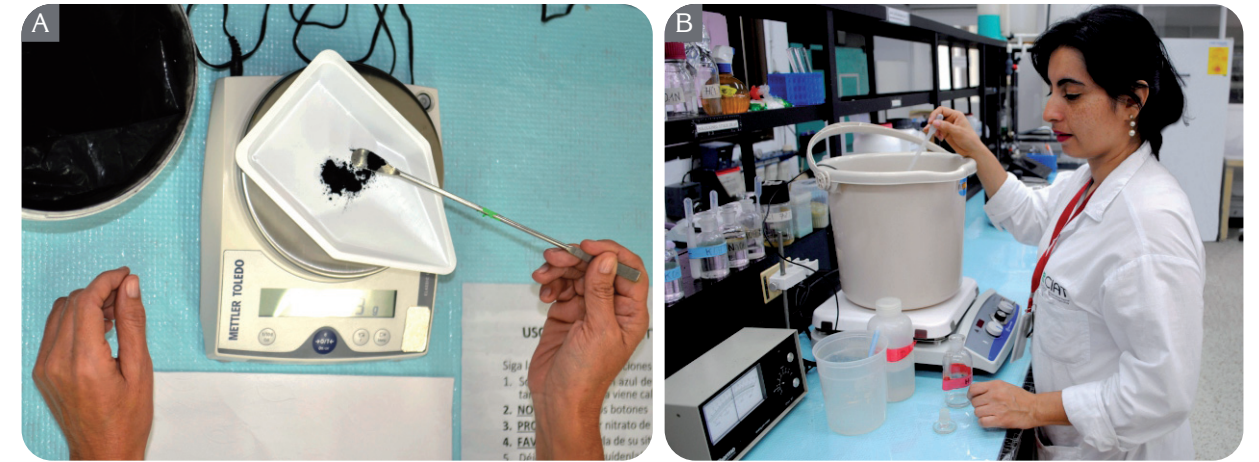
En el Cuadro 1, se detalla la composición de otros medios basales de uso general en el cultivo de tejidos, tales como el medio B5, desarrollado por Gamborg et al. (1968); el medio WPM (Woody Plant Medium), desarrollado en 1981 por Lloyd y McCown para

el cultivo de especies forestales; el medio Knudson C, desarrollado en 1946 por Knudson para el cultivo de orquídeas; y el medio Anderson, desarrollado en 1978 para el cultivo de azaleas y bifloras.

En el comercio, se pueden conseguir medios basales prefabricados que solo necesitan resuspenderse y tomar un peso o volumen de acuerdo a la cantidad a preparar. Sin embargo, en algunas ocasiones se recurre a la preparación de soluciones de trabajo (también conocidas como soluciones madre o stock), que permiten hacer modificaciones en algún elemento y ajustar las condiciones de investigación. En el Cuadro 2, se detallan las soluciones de trabajo para preparar el medio basal MS (1962).

Para la preparación de una solución de trabajo, se toma como base la formulación original reportada por los autores y se concentra ya sea modificando el volumen, el peso o ambos factores.

## El laboratorio para el cultivo *in vitro*



**Figura 1.** (A) Procedimientos de pesaje y (B) toma del pH. Observar algunos equipos en esta área: (1) balanza, (2) plancha agitadora-calentadora y (3) potenciómetro.

El laboratorio es un espacio definido que cuenta con unas condiciones, equipos y diseño específicos que facilitan el llevar a cabo el proceso de producción o investigación en cultivo de tejidos. Aquí los procesos deben estar normalizados, es decir, deben seguir un debido procedimiento que permita hacer seguimiento y mantener la confiabilidad en el resultado de la investigación.

En el laboratorio, se deben respetar unas normas básicas de seguridad y convivencia (ver pag. 7)

Entre las normas básicas de los procesos de laboratorio, se deben tener en cuenta el control del acceso a personal no autorizado y asegurar la inducción previa acerca de las actividades que allí se llevan a cabo.

La inducción debe incluir las normas de seguridad, la recomendación de contar con la guía de un supervisor y mantener el control de los ensayos y sus resultados, entre otras. Por otro lado, en el componente técnico se debe contar con protocolos (procedimientos) probados y ajustados (validados) a los procesos que permitan lograr el resultado esperado.

En un laboratorio, se distinguen las siguientes áreas de trabajo:

1. Área de preparación.
2. Área de lavado y esterilización.
3. Área de transferencia o subcultivo.
4. Área de incubación o crecimiento controlado.
5. Área de bodega y almacenamiento.
6. Área de invernadero y crecimiento *ex vitro*.

Cada una de estas áreas cumple una función específica, y para ello se debe contar con una serie de equipos, distribución y diseño de espacios que ayuden a cumplir dicha función.

Bajo ciertas condiciones de trabajo, en algunas ocasiones se pueden fusionar las áreas de preparación con la de lavado y esterilización, pero se requiere un manejo de tal forma que se controlen los flujos y cruces entre los procesos llevados a cabo para evitar pérdidas en la práctica (limpio/estéril-no limpio/contaminado).

## Área de preparación

En esta área, se realizan los pesajes y mediciones volumétricas claves para la preparación de soluciones de trabajo y medios de cultivo. Ahí se ubican balanzas, potenciómetro, nevera para el almacenamiento de soluciones de trabajo, gabinetes/estantes para almacenar los reactivos, equipo de deionización, agitadores/calentadores, horno microondas, pipeteador o servidor automático, etc. (Figura 1A y 1B).

Debe haber un mesón de trabajo con espacio suficiente que permita manipular cristalería en forma segura durante la preparación de las soluciones o los medios de cultivo.

Cuando se requiera calentar o agitar medios de cultivo o soluciones de trabajo, se puede recurrir al uso de una plancha calentadora o estufa.

Como regla de prevención de accidentes, se debe colocar una nota de aviso con la palabra “Caliente” y resaltarla, que indique la presencia en el área de un equipo bajo estas condiciones y minimizar el riesgo de quemaduras al operario.

Asimismo, se debe prestar atención a cualquier solución o líquido que se caliente, para evitar derrames sobre la superficie de la plancha. De ocurrir cualquier derrame o salpicadura, se debe seguir el protocolo de limpieza y seguridad establecido para este tipo de eventualidades en el laboratorio.

## Área de esterilización y lavado

En el área de esterilización o autoclavado, como su nombre lo indica, se ubica un equipo clave en el proceso de propagación *in vitro*, pues asegura la asepsia durante el proceso. Este equipo se conoce como esterilizador o autoclave.

En el mercado, se pueden encontrar opciones de autoclaves operadas por electricidad o por gas (equipo tipo olla). Estos equipos, diseñados de tal forma que permiten la presurización del vapor, logran las condiciones óptimas de trabajo a través de la generación de vapor de agua, bajo condiciones de alta temperatura y presión, evitando con las condiciones de alta presión que el agua llegue a punto de ebullición a pesar de la alta temperatura. Bajo estas condiciones, se eliminan los microorganismos contaminantes (bacterias y esporas de hongos).

La persona encargada del manejo de este equipo debe ser entrenada en cómo operarlo antes de realizar el procedimiento en forma rutinaria, ya que durante su manipulación siempre hay un riesgo de sufrir quemaduras, por contacto o por efecto del vapor de agua, o por manipulación a alta presión (riesgo de explosión).

## El explante

Un explante hace referencia a una porción o parte del tejido separado de un organismo, que es usado para dar inicio a un proceso de cultivo *in vitro*. Cuando se quiere clonar un material, se puede recurrir a cualquier parte de una planta; sin embargo, se prefiere el uso de meristemos o puntas apicales para procurar mantener la estabilidad genética y evitar posibles cambios (variación somaclonal) con respecto al patrón original a ser clonado. Algunas especies pueden usar otro tipo de explantes, tal es el caso de las violetas o los anturios, que usan porciones de hojas para clonar al individuo de interés. Esto demuestra el potencial de las técnicas *in vitro* y la capacidad (totipotencia) que tiene una célula/tejido para regenerar a un individuo.

Para procesos de limpieza de germoplasma, se prefiere aislar meristemos apicales obtenidos a partir de plantas pretratadas bajo condiciones extremas, por ejemplo, con la adición de antivirales (quimioterapia), uso de altas temperaturas (termoterapia) o el uso de temperaturas ultrabajas (crioterapia).

Un procedimiento general que puede ser usado para la desinfección previa al corte y aislamiento del explante incluye (Figura 10):

1. Colectar el explante, remover el tejido sobrante (en el caso de los ápices, remover las hojas). Colocar un poco de agua para mantener la humedad.
2. Llevar al laboratorio y, en la cámara de flujo, cambiar a un recipiente limpio.
3. Adicionar alcohol al 70% hasta cubrir el explante. Dejar actuar por unos pocos segundos.
4. Remover el alcohol y adicionar hipoclorito de sodio al 0,5–1%. La adición de un agente surfactante (que rompe la tensión superficial), como el Tween 20 o un jabón líquido de manos, mejora el contacto de la solución con el tejido.
5. Dejar actuar la solución entre 5–10 min. Agitar periódicamente.
6. Remover el blanqueador y realizar 3–4 enjuagues con agua estéril.
7. Reducir el tamaño y aislar el explante definitivo. Para esto se identifica la estructura del meristemo apical bajo un estereomicroscopio para su correcto aislamiento.
8. Sembrar el explante final en el medio de cultivo y llevarlo al cuarto de crecimiento.

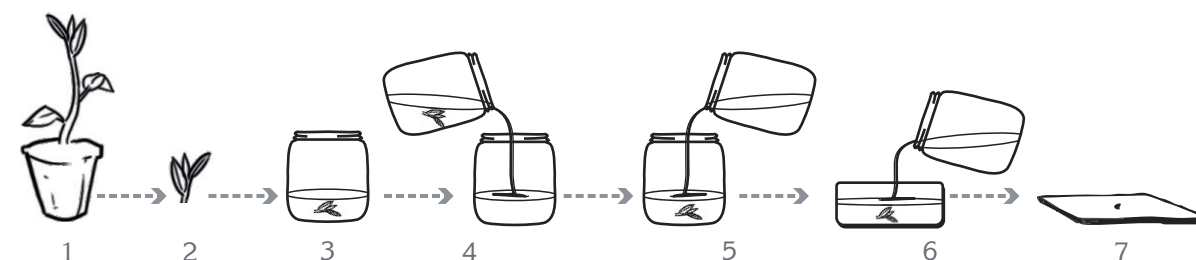
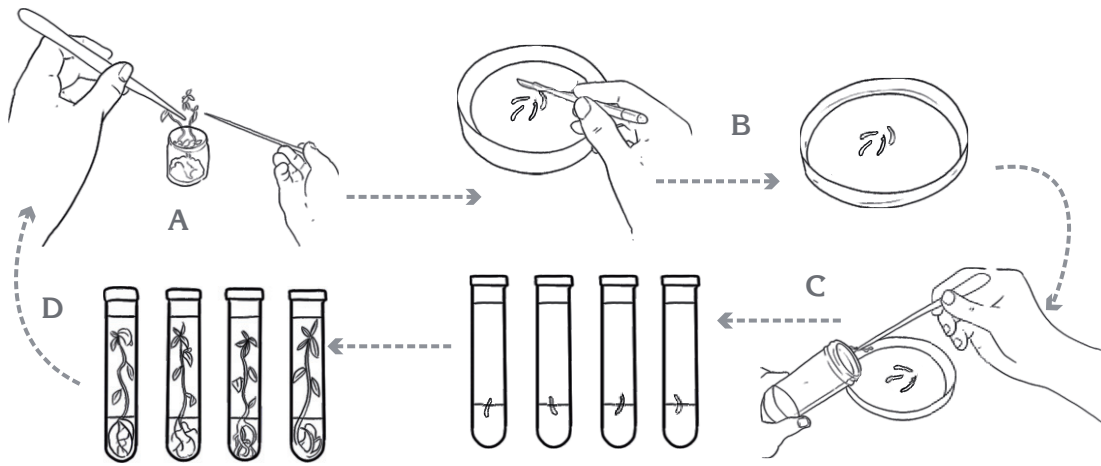
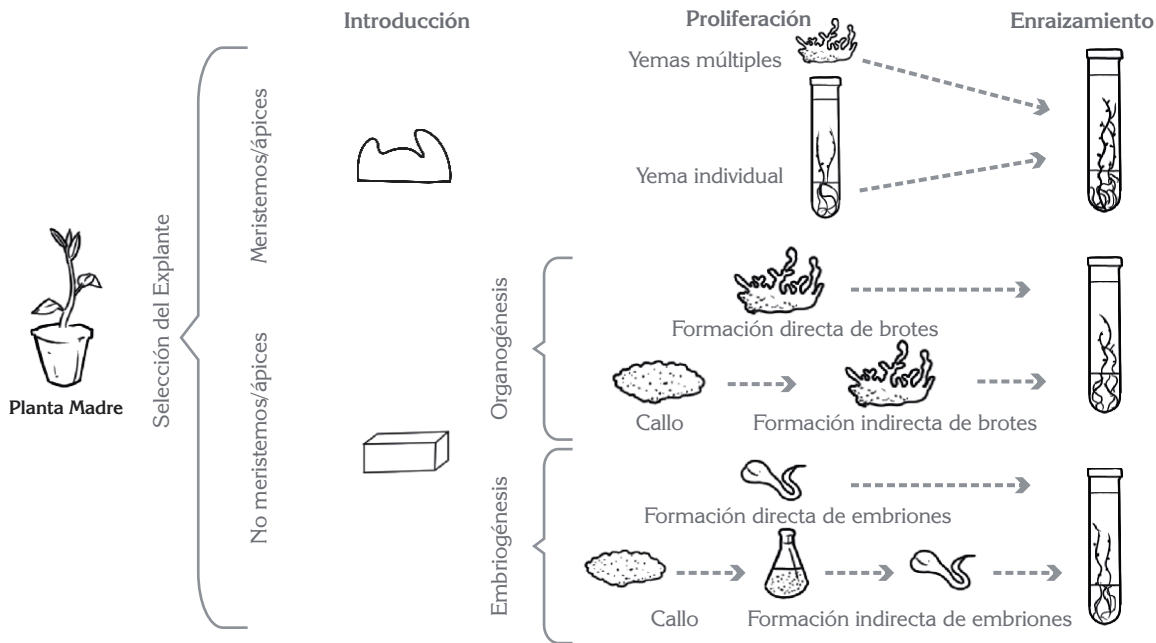


Figura 10. Procedimiento general para la desinfección de un explante previo a su introducción a condiciones *in vitro*.





**Figura 8.** Diagrama de la propagación *in vitro* de yuca. A partir de una planta *in vitro* (A) se pueden recuperar por cada ciclo 3–4 nuevos explantes (B). Esto representa la tasa de propagación 1:3 o 1:4. Cada explante bajo condiciones de cultivo (C) recupera una planta (D) al final de cada ciclo, que puede ser objeto de una nueva propagación (retorno a A). El incremento se da en forma exponencial.



**Figura 9.** Rutas de propagación en plantas a través de puntas meristemáticas o de una vía adventicia.

Esta área debe estar acondicionada con un mesón que tenga un sistema para lavar, de manera que permita el lavado y la preparación de la cristalería. Como mecanismo de control para minimizar pérdidas por contaminación inicial en medios de cultivo y soluciones de trabajo, se sugiere lavar la cristalería nueva antes de usarla por primera vez, previamente al llenado con medio de cultivo. Para ello se lava la cristalería y se esterilizan los recipientes abiertos para asegurar la entrada del vapor durante el proceso. El tiempo de esterilización depende del tipo de material preparado. De esta manera se mantienen los medios de cultivo una vez se alcanzan las condiciones de trabajo (121 °C y 15 psi dentro de la cámara de la autoclave) durante 15–20 min; material seco y cristalería, durante 45–60 min; y material contaminado, al menos por 60 min.

Para la correcta manipulación al momento de cargar y descargar el equipo, se debe contar con los implementos de seguridad, guantes y delantal para el manejo de los elementos calientes.

**Nota:** Este equipo nunca debe abrirse o forzarse si la aguja del manómetro de presión aún indica presión en la cámara interna.

### Manejo de la autoclave

La autoclave es un instrumento indispensable para lograr las condiciones de asepsia en los procesos de laboratorio. Este equipo funciona a alta presión y temperatura, lo cual favorece la producción y el manejo de vapor de agua contenido en su interior, para eliminar los agentes contaminantes presentes en las muestras, medios o insumos (cristalería, herramientas, papelería) en fase de esterilización.

Algunos de estos equipos son de carga frontal (Figura 2A) o vertical. Los esterilizadores usados en la implementación de los complejos rurales con énfasis en desarrollo biotecnológico, apoyados por la Embajada del Japón en los departamentos de Sucre y Cauca, son de tipo olla (Figura 2B).

Estas autoclaves de tipo olla son fáciles de manejar y se operan en estufas de gas. Antes de poner en funcionamiento una autoclave, hay que reconocer sus partes, tales como: manómetro de presión, válvula de escape, válvula de seguridad, tapón de sobrepresión, manija, mariposas para el cierre y accesorios (rejillas y canastilla de aluminio). Una vez identificadas y reconocidas sus partes, se puede iniciar el aprendizaje para operarla. Para ello se destapa el recipiente, se agrega agua hasta el límite marcado en el interior del mismo y se coloca la rejilla. Sobre esta se coloca la canastilla y enseguida se empieza a cargar la olla. Una vez se carga, se procede a cerrar la tapa, prestando atención a que la válvula de seguridad coincida con la ranura guía en uno de los bordes de la canastilla interior. Esta válvula no se puede torcer ni golpear.

En la tapa y el cuerpo de la autoclave, hay una flecha que indica el sitio de cierre de las partes. Haga coincidir y gire suavemente hasta asegurar las uñas de la tapa al cuerpo. Comience a asegurar suavemente las mariposas siempre en sentido cruzado (es decir en forma de cruz), al inicio suavemente y, cada vez que reinicie un nuevo ciclo, vaya aumentando la fuerza para cerrarla (Figura 2B).



Encienda la estufa y coloque la autoclave. Observe que la válvula de escape esté abierta. Una vez comience a salir vapor y gotas de agua, cierre la válvula y preste atención al aumento en la presión al interior de la olla. Se debe regular la llama en la estufa para evitar sobrecargar el sistema (esto se da cuando se llega al punto marcado en rojo en el manómetro).

Cuando el manómetro muestra 15 psi, se inicia el conteo del tiempo de la esterilización. Se debe ajustar la llama para que no descienda del punto de 15 psi ni sobrepase al punto de riesgo por sobrepresión.

Al concluir el tiempo de esterilización, se procede a apagar la llama y dejar en reposo hasta que se enfríe y baje completamente la presión en el interior de la autoclave (**debe marcar cero**). Como regla de seguridad en la operación de este equipo, no se debe aplicar agua o paños húmedos para forzar el descenso de la presión ni tratar de abrir la válvula de escape. Una vez descargada la autoclave y retirado el material estéril, este debe ir a un carro de laboratorio o mesón limpio sobre el cual termina de enfriarse.

Se deben tener presentes las normas de seguridad al operar este equipo, pues en el ciclo de esterilización el interior se encuentra a alta presión y los cambios bruscos en el manejo de un gas en estas condiciones puede ocasionar una explosión con consecuencias graves para las personas en el área y para la infraestructura.

En caso de una sobrepresión, el tapón de sobrepresión se dispara y desahoga el sistema, evitando cualquier riesgo para las personas y la infraestructura.



**Figura 2.** (A) Esterilizador eléctrico de carga frontal. Notar el uso obligatorio de implementos de seguridad al momento de manipular elementos calientes durante el cargue y descargue del equipo. (B) Detalle de un esterilizador tipo olla.

## Reconocimiento de las áreas

### Trabajo de observación

1. Visite el laboratorio y realice un diagrama a mano alzada de su diseño.
2. Reconozca todas las áreas y los equipos respectivos.
3. Establezca el flujo entre las áreas de trabajo.
4. Defina las áreas limpias y las que no lo están.

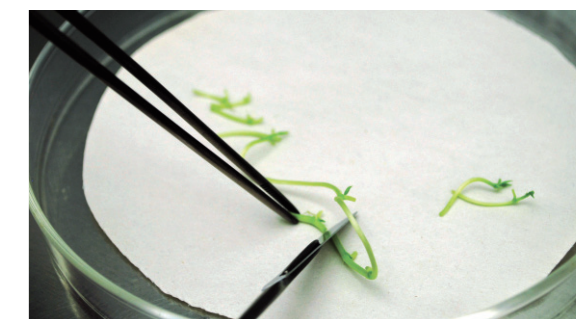


## La micropropagación

El proceso de micropropagación consiste en cortar o subdividir una planta en porciones que contengan una yema y ponerla de nuevo a crecer en un medio de cultivo bajo condiciones controladas (Figura 7). Para asegurar este proceso, se debe realizar bajo ambientes limpios en una cámara de flujo laminar. Los cortes deben hacerse de una manera limpia, evitando aplastar o machacar los bordes del tejido y manipular los explantes con instrumentos calientes para evitar perderlos.

En una plántula *in vitro*, se puede reconocer la zona terminal (yema apical con meristemos activos) y yemas laterales (con meristemos dormidos) (Figura 8). Algunas especies con capacidad de regeneración vía organogénica o embriogénica pueden usar explantes donde no se identifica la presencia de puntos meristemáticos, tales como porciones de hojas, raíces, tallos, etc. (Figura 9). Estos explantes bajo el efecto de altas dosis de reguladores de crecimiento, principalmente del tipo de las auxinas, pueden

generar las yemas o los embriones somáticos respectivos de acuerdo a la ruta de desarrollo inducida.



**Figura 7.** Diagrama de micropropagación y su efecto sobre la tasa de propagación. Una planta al inicio está en la capacidad de generar 3–4 explantes al momento del subcultivo, los cuales se desarrollarán y generarán 3–4 plantas con capacidad de ser propagadas de nuevo.





**Figura 6.** Cuarto de crecimiento *in vitro*. Ahí, el proceso de revisión periódica y monitoreo del estado del material para iniciar o programar subcultivo son operaciones de rutina.

El correcto funcionamiento en el manejo de las condiciones ambientales, sumado a un medio de cultivo bien definido, permite un buen crecimiento y desarrollo de los explantes/plántulas, lo cual se reflejará posteriormente en la tasa de propagación y en la reducción de tiempo entre los ciclos de propagación o subcultivo.

Esta área debe permanecer limpia y libre de polvo, se debe evitar cualquier condición que permita la acumulación de material contaminado o que favorezca la acumulación de polvo y controlar el acceso de personal ajeno al laboratorio.

Las condiciones que favorecen la acumulación de polvo pueden propiciar la aparición de ácaros, lo cual puede llevar a pérdidas masivas y la cancelación de los procesos en el laboratorio. Un control permanente de la presencia de hormigas e insectos debe considerarse dentro de las actividades rutinarias en esta área. Los implementos de limpieza (escoba y

trapeador) de esta área no deben ser usados en áreas comunes. Periódicamente se debe limpiar el piso con una solución de hipoclorito de sodio (0,5–1%) o amonio cuaternario, así como alternar la aplicación de esencia de menta, pino o eucalipto para repeler insectos, hormigas y ácaros. El uso de productos a base de benzoato de bencilo contribuyen a prevenir y controlar la aparición de ácaros.

## Área de bodega y almacenamiento

Área destinada al manejo del inventario de insumos y cristalería requeridos en los procesos de laboratorio. Debe contar con un sistema de estanterías donde se maneje y mantenga actualizado el flujo de entrada y salida del inventario hacia el laboratorio. No se puede convertir en una bodega donde se acumulen equipos sin uso, desechos u objetos inservibles.

## Área de invernadero y crecimiento *ex vitro*

En esta área, se continúa el desarrollo de material bajo condiciones externas al contenedor. Se debe acondicionar el área con un sistema de mesas de trabajo donde se pueda manejar y controlar el riego de las plantas. El acceso a esta instalación debe estar controlado y al ingreso del sitio debe haber una bandeja o alfombras/espumas impregnadas con una solución desinfectante (cal viva o amonio cuaternario) para la limpieza de las suelas de los zapatos o botas de trabajo. Esto ayuda a controlar la entrada de agentes extraños y contaminantes en el proceso.

Solo el personal capacitado para operar la autoclave en un laboratorio está autorizado para hacerlo.

## Manejo del material contaminado

El manejo del material contaminado tiene su propio protocolo diario. Este material se debe llevar a la autoclave antes de iniciar el proceso de lavado, con esto se evita aumentar el inóculo en el ambiente y se minimiza la posibilidad de contaminación cruzada al operario. Una vez el equipo de esterilización haya finalizado el ciclo y el manómetro indique presión cero, se puede proceder a abrir la compuerta, retirar los frascos (siguiendo las medidas de seguridad para la manipulación de equipos y elementos calientes), retirar los residuos del medio de cultivo de los frascos con la ayuda de una cuchara en una bolsa y, finalmente, colocarlos en remojo para evitar que se peguen los residuos al recipiente. Posteriormente, se procede a realizar el lavado respectivo.

## Área de transferencia o subcultivo

En esta área, se lleva a cabo el proceso de micropropagación, el cual consiste en cortar las plántulas generadas en pequeñas porciones que aseguren su desarrollo posterior en cultivo.

En el caso de la propagación de plántulas vía presencia de meristemo/yemas, debe asegurarse que las porciones generadas contengan estos puntos de crecimiento, los cuales son retornados a condiciones de cultivo *in vitro* para que continúen su desarrollo y posterior formación de nuevo de una plántula. Siempre donde hay una

yema, hay un meristemo, y un patrón indicativo a seguir en plantas dicotiledóneas es que donde se inserta una hoja se puede ubicar una yema.

Un equipo fundamental para la propagación *in vitro* es la cámara de flujo laminar. Este equipo asegura la calidad microbiológica del aire del entorno donde se manipulan los explantes y donde se lleva a cabo el proceso de la propagación (Figura 3). Para ello, el equipo toma el aire del cuarto de transferencia y lo obliga a pasar a través de un filtro HEPA (sigla en inglés que significa unidad de filtración de alta eficiencia de partículas).



**Figura 3.** Detalle de un área de transferencia o subcultivo.

Esta unidad de filtración está fabricada con un papel de filtro plegado lo cual permite aumentar el área de filtración a través de poros de 0,2 micrómetro ( $\mu\text{m}$ ). Por la acción ejercida por un motor, que toma el aire del exterior y lo fuerza a pasar a través de los poros del filtro, se obtiene un aire de altísima calidad (99,97% sin presencia de partículas o agentes contaminantes, esporas, virus o bacterias suspendidas) en la zona interior de trabajo de la cámara de flujo (Figura 4).



**Figura 4.** Detalle de cómo opera una cámara de flujo laminar. Un motor/ventilador (A) succiona aire del exterior (B) y lo fuerza a pasar a través de una unidad de filtración HEPA © para entregar aire de calidad microbiológica (esterilizado) al punto de manipulación del explante (D).

Para procurar mantener las condiciones de asepsia, el operario debe conocer las siguientes técnicas de manipulación y procedimientos de laboratorio:

- Limpiar y lavarse frecuentemente las manos, retirarse los accesorios personales (reloj, anillo o pulsera) al momento de trabajar en la cámara.
- Evitar hablar sobre la muestra.

- Evitar tocar directamente con las manos el tejido.
- No dejar caer o tocar el tejido sobre una superficie no asegurada.
- Limpiar las superficies de trabajo con alcohol al 70%.
- Flamear las herramientas con las cuales se van a manipular los tejidos antes, durante y al final del proceso.

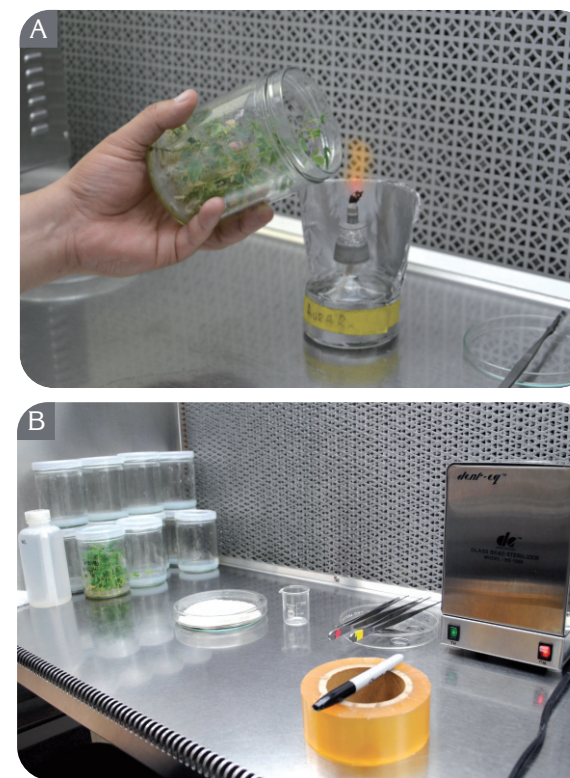
La técnica de flameo consiste en pasar varias veces por la llama de un mechero las herramientas de trabajo y las bocas de los recipientes usados en el proceso (Figura 5A).

La persona que realiza el procedimiento de flameo debe conocer la técnica, practicarla con calma, confianza, seguridad y atención para evitar accidentes. En caso de que sienta la llama cerca de la mano, debe guardar calma y no reaccionar en forma descontrolada, ya que puede ocasionar un accidente (conato de incendio) y colocar en riesgo su integridad ya que puede ocasionar quemaduras en el cuerpo o dañar el equipo en uso.

Para prevenir llamas, evitar el contacto con alcohol durante el proceso y garantizar que este se lleve a cabo de manera segura, se puede recurrir al uso de esterilizadores.

Estos equipos, propios del trabajo en laboratorios odontológicos, se operan calentando perlas de cristal, de tal forma que mantienen constante la temperatura en un rango que oscila entre 230–250 °C (Figura 5B). Cualquiera que sea el proceso usado para la esterilización de las herramientas, estas se deben dejar enfriar antes de manipular el tejido para evitar quemar y ocasionar daño mecánico al mismo.

Una vez se inicia la operación en la cámara de flujo de modo seguro y limpio, se realizan los procesos y controles para mantener las condiciones de asepsia y se flamean las herramientas. Para la micropropagación, solo se debe manipular el tejido con las herramientas sobre una superficie estéril (caja de Petri, azulejo o vidrio con papel).



**Figura 5.** (A) Técnica de flameo, por contacto directo de las herramientas con la llama del mechero. (B) Vista panorámica del sitio de trabajo, previo al inicio de la actividad de micropropagación o subcultivo. Observar en la cámara de flujo el esterilizador operado con perlas de cristal, la disposición de las herramientas esterilizadas y la caja de Petri con papel filtro donde se realizarán los respectivos cortes para el subcultivo.

## Área de incubación o crecimiento controlado

Esta área debe estar aislada del paso de las personas porque, al igual que en el área de subcultivo, este es un espacio donde se manejan flujos y procesos limpios. Cuando se está en la fase de diseño de un laboratorio, se debe considerar que el espacio de un proceso no se cruce con otro ni se mezcle con materias primas limpias (esterilización, subcultivo y crecimiento) o con procesos no limpios (lavado, preparación, manejo de contaminación).

En esta área, se ubican las estanterías donde reposan los recipientes con tejidos y plántulas en ciclo de multiplicación e incremento (Figura 6). Ahí, se debe ubicar un sistema de control ambiental que ajuste automáticamente las condiciones del cuarto, como temperatura, iluminación y fotoperíodo.

En países tropicales, donde el valor de la energía eléctrica es alto, se está recurriendo cada vez más al uso de sistemas mixtos, apoyados en el uso de luz natural. Para esto se recurre a la implementación de claraboyas o tragaluces para favorecer la entrada de luz, aprovechar el reflejo de estas, así como los sistemas de dobles paredes en el techo para filtrar la luz y atenuar el calor.

Periódicamente se debe revisar y monitorear el estado de los materiales en fase de propagación para retirar a la mayor brevedad posible cualquier material contaminado.