

LA BIOTECNOLOGÍA VEGETAL, APLICADA AL CULTIVO *IN VITRO* DE ESPECIES FORESTALES

Jenny Elizabeth Núñez Ramos

Elisa Quiala Mendoza

Jorge Marcelo Caranqui Aldaz

Edmundo Danilo Guilcapi Pacheco



© Autores

Jenny Elizabeth Núñez-Ramos

Técnica - Docente de la Escuela Superior Politécnica de
Chimborazo, Riobamba, Ecuador

Elisa Quiala-Mendoza

Investigadora - Instituto Nacional de Investigaciones
Agropecuarias, Quito, Ecuador

Jorge Marcelo Caranqui-Aldaz

Técnico - Docente de la Escuela Superior Politécnica de
Chimborazo, Riobamba, Ecuador

Edmundo Danilo Guilcapi-Pacheco

Docente de la Escuela Superior Politécnica de
Chimborazo, Riobamba, Ecuador



Casa Editora del Polo – CASEDELPO CIA. LTDA.

Departamento de Edición

Editado y distribuido por:

Editorial: Casa Editora del Polo
Sello Editorial: 978-9942-816
Manta, Manabí, Ecuador. 2019
Teléfono: (05) 6051775 / 0991871420
Web: www.casedelpo.com
ISBN: 978-9942-621-20-7

© Primera edición

© Abril – 2023

Impreso en Ecuador

Revisión, Ortografía y Redacción:

Lic. Jessica Mero Vélez

Diseño de Portada:

Michael Josué Suárez-Espinar

Diagramación:

Ing. Edwin Alejandro Delgado-Veliz

Director Editorial:

Dra. Tibusay Milene Lamus-García

Todos los libros publicados por la Casa Editora del Polo, son sometidos previamente a un proceso de evaluación realizado por árbitros calificados. Este es un libro digital y físico, destinado únicamente al uso personal y colectivo en trabajos académicos de investigación, docencia y difusión del Conocimiento, donde se debe brindar crédito de manera adecuada a los autores.

© **Reservados todos los derechos.** Queda estrictamente prohibida, sin la autorización expresa de los autores, bajo las sanciones establecidas en las leyes, la reproducción parcial o total de este contenido, por cualquier medio o procedimiento, parcial o total de este contenido, por cualquier medio o procedimiento.

Comité Científico Académico

Dr. Lucio Noriero-Escalante
Universidad Autónoma de Chapingo, México

Dra. Yorkanda Masó-Dominico
Instituto Tecnológico de la Construcción, México

Dr. Juan Pedro Machado-Castillo
Universidad de Granma, Bayamo. M.N. Cuba

Dra. Fanny Miriam Sanabria-Boudri
Universidad Nacional Enrique Guzmán y Valle, Perú

Dra. Jennifer Quintero-Medina
Universidad Privada Dr. Rafael Bellosó Chacín, Venezuela

Dr. Félix Colina-Ysea
Universidad SISE. Lima, Perú

Dr. Reinaldo Velasco
Universidad Bolivariana de Venezuela, Venezuela

Dra. Lenys Piña-Ferrer
Universidad Rafael Bellosó Chacín, Maracaibo, Venezuela

Dr. José Javier Nuvaéz-Castillo
Universidad Cooperativa de Colombia, Santa Marta,
Colombia

Constancia de Arbitraje

La Casa Editora del Polo, hace constar que este libro proviene de una investigación realizada por los autores, siendo sometido a un arbitraje bajo el sistema de doble ciego (peer review), de contenido y forma por jurados especialistas. Además, se realizó una revisión del enfoque, paradigma y método investigativo; desde la matriz epistémica asumida por los autores, aplicándose las normas APA, Sexta Edición, proceso de anti plagio en línea Plagiarisma, garantizándose así la científicidad de la obra.

Comité Editorial

Abg. Néstor D. Suárez-Montes
Casa Editora del Polo (CASEDELPO)

Dra. Juana Cecilia-Ojeda
Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela

Dra. Maritza Berenguer-Gouarnaluses
Universidad Santiago de Cuba, Santiago de Cuba, Cuba

Dr. Víctor Reinaldo Jama-Zambrano
Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí, Ext. Chone

Contenido

PROLOGO.....	15
PREFACIO.....	17
INTRODUCCIÓN.....	19

CAPÍTULO I

1 Organización, Equipamiento Y Funcionalidad Del Laboratorio De Cultivo De Tejidos Vegetales	23
1.1 Generalidades.....	23
1.2 Distribución de las diferentes áreas de Laboratorio.....	23
1.3 Descripción de los principales equipos e insumos utilizados en el laboratorio.....	27
1.4 Manejo de sustancias peligrosas.....	33
1.5 El uso del hipoclorito de sodio.....	34
1.6 Medidas de seguridad.....	35

CAPÍTULO II

2 Morfogénesis <i>In Vitro</i>	39
2.1 Generalidades.....	39
2.2 Control y expresión de la Morfogénesis.....	39

CAPÍTULO III

3 Conceptos, Definiciones Del Cultivo De Tejidos Vegetales.....	45
3.1 Generalidades.....	45
3.2 Conceptos y definiciones.....	45
3.3 Métodos de propagación <i>in vitro</i>	46

CAPÍTULO IV

4 Elaboración de medios de cultivo y soluciones concentradas.....	51
4.1 Medios de Cultivo.....	51
4.2 Componentes del medio de cultivo.....	51
4.3 Formulación y preparación de medios de cultivo.....	60
4.4 Preparación de soluciones madres o stock.....	62
4.5 Cálculo de cantidades.....	63

CAPÍTULO V

5 Preparación Del Material De Siembra, Desinfección Y Establecimiento <i>In Vitro</i> , Vía Organogénesis.....	71
5.1 Generalidades.....	71
5.2 Fases de propagación vía organogénesis.....	72
5.3 Fase preparativa o Fase 0.....	73
5.4 Fase de establecimiento o Fase 1.....	74
5.5 Fase de Multiplicación o Fase II.....	78
5.6 Fase de Enraizamiento o Fase III.....	80
5.7 Fase de Aclimatización.....	82

CAPÍTULO VI

6 Uso De Los Reguladores De Crecimiento.....	87
6.1 Generalidades.....	87
6.2 Proliferación de brotes en el Cultivo in vitro	87
6.3 Efecto de niveles de auxinas en el enraizamiento <i>in vitro</i>	90

CAPÍTULO VII

7 Desórdenes Morfo-Anatómicos Y Fisiológicos Asociados Al Cultivo <i>In Vitro</i>	95
---	----

7.1 Generalidades.....	95
7.2 Características del microambiente que generan los desórdenes estructurales y fisiológicos.....	96
7.3 Funcionamiento del complejo estomático.....	98
7.4 Hiperhidricidad.....	102
7.5 Factores que generan la hiperhidricidad.....	110
7.6 Estrategias para controlar o reducir la hiperhidricidad.....	117

CAPÍTULO VIII

8 Cultivos Fotoautotróficos y Aclimatización In Vitro.....	125
8.1 Generalidades.....	125
8.2 Influencia de la sacarosa y soportes porosos	128
8.3 Efecto de la ventilación.....	131
8.4 Actividad práctica.....	135
8.5 Respuesta morfológica y fisiológica en el cultivo <i>in vitro</i> de <i>Caesalpinia spinosa</i> (Mol.) O. Kuntz, en condiciones foto mixotróficas y foto autotróficas	137
8.6 Determinación de la masa fresca, seca y el contenido de agua.....	150
8.7 Caracterización de la anatomía foliar mediante microscopía electrónica de barrido (MEB).....	152
8.8 Determinación del contenido de pigmentos clorofílicos.....	157
8.9 Determinación del contenido de compuestos fenólicos totales en las plantas y detección de ligninas en secciones del tallo de los brotes.....	162
8.10 Evaluación de la supervivencia de las plantas in vitro en la fase de aclimatización <i>ex vitro</i>	169

CAPÍTULO IX

9 Elaboración De Soluciones Concentradas Y

Medios De Cultivo Para El Establecimiento *In Vitro*

Vía Embriogénesis Somática (Es).....177

9.1 Formación de embriones somáticos.....179

9.2 Multiplicación secundaria de los embriones somáticos.....180

9.3 Maduración.....181

9.4 Germinación de los embriones somáticos.....182

9.5 Conversión.....183

9.6 Enraizamiento *in vitro*.....184

9.7 Variación somaclonal en poblaciones de plantas obtenidas por embriogénesis somática...186

9.8 Consideraciones sobre las aplicaciones de la embriogénesis somática a la rama forestal.....188

Bibliografía.....195

PROLOGO

Entre las muchas definiciones de Biotecnología Vegetal, considero como la más ajustada a los objetivos de este texto la siguiente: «Aplicación de los fundamentos y técnicas del cultivo *in vitro* de material vegetal, de la Biología Molecular y de la Ingeniería Genética al conocimiento, mejora y productividad de las plantas». Esta definición no sólo tiene en cuenta el empleo de la Biotecnología Vegetal a la mejora de las plantas, sino que también resalta su utilidad al progreso del conocimiento de procesos fisiológicos de los vegetales tan complicados como la floración, el crecimiento y desarrollo de los tejidos y órganos, la respuesta a las fitohormonas, la fructificación o la senescencia y la apoptosis celular, por citar sólo algunos.

De esta manera, el objetivo de la Biotecnología Vegetal y que será descubierto en las líneas de este material lo constituye la «modificación de las plantas con propósitos de investigación o de obtención de individuos mejorados». En efecto, gracias al desarrollo de las técnicas de cultivo *in vitro* y de transformación genética y el conocimiento de los procesos fisiológicos de los vegetales ha experimentado un avance espectacular.

Dos grandes grupos de técnicas acompañan a la Biotecnología Vegetal, las basadas en la Biología Celular, la Fisiología Vegetal y la Bioquímica, que han posibilitado el cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales, permitiendo el control y la modificación del desarrollo y proliferación celular para conseguir la

regeneración de plantas completas a partir de trozos de tejido o, incluso, desde células individuales.

Esto será lo que se desarrollará en este material el cual busca dar a conocer algunos ejemplos particulares de la Biotecnología Vegetal, comprendiendo que sus aportes puedan variar desde las investigaciones en el campo de la genética, fisiología, botánica, agronomía y mejora vegetal; las aplicaciones a los aspectos agrícolas, por ejemplo plantas transgénicas resistentes a plagas, enfermedades y estreses abióticos; mejora de la productividad y calidad nutritiva de los cultivos; micropropagación y clonación de especies vegetales; obtención de individuos haploides; rescate de embriones; conservación de germoplasma vegetal y de la biodiversidad agrícola; obtención de plantas libres de enfermedades y selección asistida por marcadores moleculares. Así como también, aplicaciones industriales y farmacológicas. Colorantes; metabolitos secundarios de uso en la industria química y farmacéutica; fragancias y perfumes; aditivos agroalimentarios; insecticidas biológicos; aceites más cardiosaludables; bioplásticos biodegradables; enzimas de uso industrial; planticuerpos y vacunas de uso animal y humano.

Les invito a leer con detenimiento estos apuntes que lejos de pretender ser un manual, es solo una obra para la aplicación del conocimiento.

PREFACIO

Este texto está dirigido a los interesados en la Biotecnología Vegetal. El término Biotecnología comenzó a utilizarse en los años 70 para referirse a una serie de aplicaciones derivadas especialmente de la Genética, Fisiología, Bioquímica, Microbiología, Biología Molecular y Tecnología del ADN recombinante, técnica comúnmente conocida como Ingeniería Genética.

En un contexto amplio, por Biotecnología se entiende «la aplicación de sistemas biológicos y organismos a los procesos técnicos e industriales» y como Biotecnología Vegetal «la aplicación de los fundamentos y técnicas del cultivo *in vitro* de material vegetal, de la Biología Molecular y de la Ingeniería Genética al conocimiento, mejora y productividad de las plantas con fines agrícolas e industriales». En este libro, se tratarán las materias fundamentales de la Biotecnología Vegetal, incluyendo el cultivo *in vitro* de células y tejidos, la transformación de plantas mediante ingeniería genética y sus principales aplicaciones, su repercusión sobre la sociedad y sus perspectivas de futuro.

Finalmente, queremos dejar constancia de nuestro agradecimiento a todos los lectores y aquellos que contribuyeron que esta obra se hiciese realidad.

La Biotecnología vegetal, a través de técnicas específicas tales como el cultivo de tejidos, células y órganos, la fusión de protoplastos, la transformación genética, la edición génica, entre otras, representan una herramienta valiosa para el desarrollo sostenido de recursos renovables tanto del sector agrícola como el forestal.

La propagación vegetativa mediante el cultivo *in vitro*, tiene la propiedad de producir plantas genéticamente idénticas a la planta progenitora, perpetuándose así las características específicas deseables de la planta madre.

La inclusión de estas técnicas de cultivo *in vitro* en los programas de mejoramiento genético y el establecimiento de plantaciones comerciales, permite la clonación masiva de especies vegetales en espacios reducidos, conservando las características valiosas de los materiales, así como la obtención de material de propagación libre de enfermedades. Además, facilita la comercialización y transporte de las plantas así propagadas a lugares y países lejanos con menores restricciones aduaneras y menores posibilidades de pérdida de materiales (Nehra, y otros, 2005).

El contenido de este texto tiene como objetivo mostrar la información relativa a los conocimientos de la infraestructura básica para el cultivo de tejidos y órganos, así como la descripción de las metodologías para promover la regeneración de plantas.

La vinculación entre los profesionales de la agronomía y la silvicultura en las aplicaciones biotecnológicas en lo relacionado al cultivo de tejidos vegetales, es un paso importante, debido a que en algunas otras instituciones sólo se imparte a nivel de posgrado.

Se han desarrollado protocolos para la propagación clonal y a partir de semillas de especies forestales nativas de la región. Una de las limitantes para el desarrollo de la mayoría de las respuestas *in vitro* es la contaminación provocada por hongos y bacterias, así como la aclimatación *in vitro*, para que la planta salga con características adaptativas a las condiciones *ex vitro*. Otro factor, clave es contar con un adecuado funcionamiento de los equipos que son importantes en las actividades del laboratorio (autoclaves, destiladores, potenciómetro etc.) que garanticen tanto la calidad del agua, la conservación y almacenamiento de los reactivos y productos que de ellos se obtienen. Además, la preservación de las condiciones ambientales adecuadas; para llevar a cabo las técnicas del cultivo *in vitro*, tanto en los laboratorios de enseñanza, como en los comerciales y los de investigación. Es imprescindible tener en cuenta diferentes aspectos y seguir una serie de procedimientos a fin de hacer uso eficiente del equipamiento, el instrumental y reactivos, en particular en este último caso, con los reguladores de crecimiento vegetal.



CAPÍTULO I

ORGANIZACIÓN, EQUIPAMIENTO Y FUNCIONALIDAD DEL LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

1 Organización, Equipamiento Y Funcionalidad Del Laboratorio De Cultivo De Tejidos Vegetales

1.1 Generalidades

En la planeación y organización de un laboratorio de cultivo de tejidos vegetales, se debe considerar, principalmente, las condiciones de asepsia en las que se debe trabajar, así como su funcionalidad.

En general, un laboratorio de cultivo de tejidos no es muy distinto de cualquier otro laboratorio, quizá la diferencia principal es lo relativo a la cuestión de la asepsia y a la secuencia que deben tener las áreas, para lograr protocolos de cultivo *in vitro* eficientes y con escasas pérdidas.

1.2 Distribución de las diferentes áreas de Laboratorio

Área de dirección

En esta área se lleva a cabo las actividades administrativas y académicas, donde se encuentran ubicados generalmente el personal que dirige el laboratorio, docentes, investigadores.

Área de lavado y limpieza

Todo laboratorio debe contar con un área definida para realizar la limpieza de los utensilios y herramientas y contar con un sistema eficaz para la disposición final de los materiales que puedan generar contaminación. El

suministro permanente de agua de calidad y contar con sitios que permitan el secado de la cristalería y demás materiales lavados. Esta agua también se puede emplear para el lavado del material vegetativo (explantes).

Área de preparación de medios de cultivo y del material vegetativo.

En esta zona se elaboran los medios de cultivo que serán utilizados en las diferentes fases de desarrollo de los cultivos *in vitro*, en ella se encuentra lo siguiente: mesas de trabajo, gabinetes para guardar reactivos, cristalería, charolas de plástico para transportar soluciones concentradas, tubos de ensayo, frascos de vidrio, generalmente tipo gerber con tapas transparentes para dejar pasar la luz, gradillas, tapones, agitadores magnéticos con control de temperatura, balanza granataria, balanza analítica, potenciómetro, dosificadores automático de medio (Jeringa de flujo continuo o pipeteo automático), autoclave, destilador de agua, equipo para la cocción (cocina, horno microondas), estereoscopio, etc. Es necesario llevar un registro de inventario que indique no solamente las cantidades existentes de cada uno de los productos, también sus características físico-químicas y el sitio de almacenamiento.

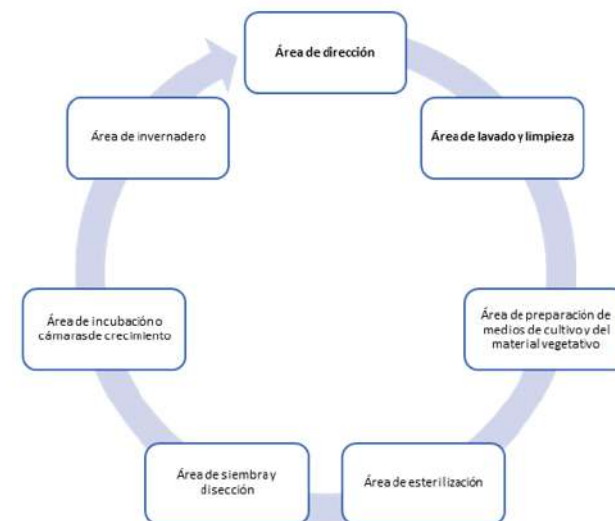


Figura 1 Distribución de las diferentes áreas de Laboratorio

Área de esterilización

La esterilización del medio de cultivo y utensilios se lleva a cabo en autoclaves, debe tener una buena ventilación.

Área de siembra y disección

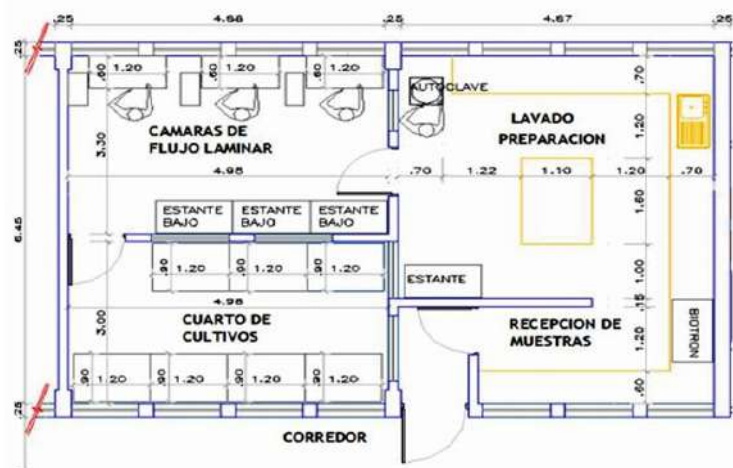
En esta zona se deben tener los máximos cuidados de asepsia, para lo cual se emplea una campana de aire de flujo horizontal a filtración, instrumental (bisturíes, pinzas y navajas), cristalería y agua en condiciones estériles. Además de microscopios, estereoscópicos, film o cinta de tamaño apropiado para el sellado de los tubos y frascos.

Área de incubación o cámaras de crecimiento

Es conocida también cuarto de cultivo, en el cual existe un control de luminosidad, temperatura y humedad. Deben tomarse en cuenta principalmente las conexiones eléctricas, existen anaqueles para incubación con iluminación individual para cada uno de ellos, se facilita su manejo con controles automáticos (Timers) para luz, pudiendo establecer fotoperiodos específicos, de preferencia el tipo de luz blanca, suministradas por lámparas LED.

Figura 2 Distribución de las diferentes áreas de trabajo, de un Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales

Área de invernadero



(Fotos: Núñez et al., 2017)

Es muy importante contar con un área donde se pueda transferir las plantas provenientes del laboratorio buscando un buen control de temperatura y humedad, elementos críticos durante la fase de aclimatación del material generado. Es recomendable contar con nebulización.

1.3 Descripción de los principales equipos e insumos utilizados en el laboratorio

Autoclave



Figura 3 Autoclave

Se caracteriza por ser un equipo que trabaja a una alta presión y en cada esterilización hay que cuidar el nivel de agua. El tiempo de esterilización se cuenta cuando la presión está entre 18 a 22 lb/in² (1.2 – 1.3 kg/cm²) y 121°C, una vez transcurrido el tiempo de esterilización (15 – 20 min). Se debe observar que la aguja del manómetro indique 0 kg/cm², hay que considerar que al abrir la tapa saldrá vapor muy caliente por lo que hay que tener mucho cuidado.

Cámara de Flujo Laminar



Figura 4 Cámara de flujo laminar

Cuando se trabaje en una cámara de flujo laminar, es necesario considerar que existe un mechero con flama constante y un recipiente con alcohol que se usa para flamear continuamente el instrumental (pinzas, bisturí, etc), hay que tener mucho cuidado para no encender el recipiente con alcohol, además el uso de la luz ultravioleta no debe activarse mientras se trabaja en este equipo.

Parrilla de agitación con calentamiento



Figura 5 Parrilla de agitación con calentamiento

Este equipo está destinado para la homogenización de los compuestos de un medio de cultivo, cuando se requiera temperatura mayor a la del ambiente, se debe utilizar recipientes de cristal, para utilizar la barra magnética en recipientes de vidrio, hágalo deslizándolo por las paredes, la agitación no hay que hacerlo a velocidades muy altas.

Potenciómetro de Ph



Figura 6 Potenciómetro de pH

Este equipo permite medir el pH de diferentes soluciones en escala de 0 a 14 (ácido o alcalino), después de agregar todas las sustancias que requiere el medio de cultivo, excepto el gelificante, se mide el pH, para ello es necesario iniciar calibrando el potenciómetro con una solución de pH referencial (4, 7, o 10) antes de tomar las lecturas para que sean más exactas. El nivel adecuado para un medio de cultivo es generalmente de 5.8 para lo cual se utilizan soluciones ácidas (HCl 0.1 y 1.0N) o

alcalinas (NaOH 0.1 y 1.0N) para llevar el pH hasta el nivel deseado. Después de usar el potenciómetro hay que lavar y secar el electrodo y colocar nuevamente su cubierta que siempre debe contener buffer. Las soluciones para ajustar el pH pueden ser irritantes al contacto con la piel, los ojos o la boca, hay que manejarlas con precaución.

Agitador orbital



Figura 7 Agitador orbital

Se requiere para agitar los cultivos de células en suspensión, para mantener oxigenado el cultivo, antes de colocar o retirar cultivos del agitador debe estar apagado. No se debe utilizar velocidades de agitación muy altas, la mayoría de las células vegetales en cultivo requieren entre 90 y 120 rpm.

Balanza Analítica



Figura 8 Balanza Analítica

Se requiere del uso de balanzas electrónicas con sensibilidad al menos de cuatro decimales de gramo (0.0000g), hay que utilizar espátula para el manejo del reactivo, es importante depositarlo gradualmente para no rebasar el peso buscado y así evitar tener que regresar reactivo manipulado a su depósito. Al terminar de usar la balanza, hay que limpiar cualquier residuo derramado, asegurándose de desconectarla de la corriente eléctrica.

Micropipetas



Figura 9 Micropipeta

Permiten el manejo de pequeños volúmenes de forma muy precisa, dependiendo de la capacidad: de 1 a 10 μL , de 10 a 100 μL y de 100 a 1000 μL (recuerde que 1 ml equivale a 1000 μL).

Refrigerador



Figura 10 Refrigerador

Una vez rotulado con el nombre, concentración, fecha de elaboración, se debe conservar en refrigeración los reactivos, sustancias y medios de cultivo, todo material dentro del refrigerador debe estar colocado en recipientes libres de suciedad, y cualquier medio contaminado es conveniente desalojarlo y llevarlo al autoclave para esterilizarlo.

Microscopios



Figura 11 Microscopios

El más utilizado es de bajos aumentos con enfoque amplio (estereoscopio), el microscopio de bajos aumentos es muy útil para observar estructuras morfogénicas como brotes, raíces, estomas, inflorescencias inmaduras, embriones somáticos, etc.

1.4 Manejo de sustancias peligrosas

Son pocas las sustancias peligrosas que se manejan en las prácticas de Cultivo de Tejidos Vegetales, pero no por eso se debe descuidar su manejo y es importante señalar que ninguna sustancia se debe pipetear con la boca.

Los reguladores de crecimiento sintético como el 2-4 D (ácido 2,4 – diclorofenoxiacético) y el TDZ (tidiazurón) se consideran sustancias peligrosas y nunca deben manejarse sin equipo de protección como mascarillas o cubrebocas en el momento de pesarlos y guantes para manejarlos. Nunca se debe permitir el contacto con la

piel u otras partes del cuerpo, tampoco los medios de cultivo que los contengan deben tocarse, a pesar de que se utilizan en concentraciones muy bajas es conveniente tener en cuenta el riesgo que representan, ya que pueden ser mutagénicos y potencialmente cancerígenos. En el caso del 2,4-D, lo recomendable es añadirlo al medio de cultivo después de la cocción o después del autoclavado, mediante filtración con filtros de 0,22 μ M en condiciones de cabina de flujo laminar.

1.5 El uso del hipoclorito de sodio

El hipoclorito de sodio puede encontrarse en productos con diferentes concentraciones de ingrediente activo, suministrados por proveedores de reactivos para laboratorios, pero lo más común es el uso de blanqueador comercial, que puede adquirirse en tiendas y centros comerciales. Este debe manipularse con cuidado, ya que es una sustancia corrosiva e irritante al contacto con partes sensibles del cuerpo, es recomendable usar guantes y cubrir boca para su manejo.,

Las sustancias que se utilizan para ajustar el pH del medio de cultivo como el ácido clorhídrico (HCl) y el hidróxido de sodio (NaOH), se preparan en concentraciones de 0.1 o 1.0N) pueden ser irritantes al contacto con la piel o mucosas, de llegar a ocurrir se debe lavar con agua abundante.

Algunas sales minerales también pueden ser irritantes al contacto e inhalación, es conveniente leer las etiquetas

para tener información sobre su manejo.

1.6 Medidas de seguridad

En el laboratorio debe contar con salidas de emergencia y estar señalizadas, todo el laboratorio debe contar con kits de primeros auxilios y extintores de incendios. Para cada equipo se debe colocar en forma escrita, y claramente visible, el protocolo de manejo, disponer de canecas de deposición de residuos en sitios estratégicos, almacenar los vidrios rotos y materiales cortantes en recipientes separados y debidamente rotulados, y realizar mantenimientos preventivos periódicos de los equipos.



CAPÍTULO II

MORFOGÉNESIS IN VITRO

2 Morfogénesis *In Vitro*

2.1 Generalidades

La morfogénesis engloba el desarrollo de las formas y estructuras de un organismo, sin embargo, el término forma no debe entenderse sólo como morfología externa, sino como su organización completa, que comprende distintos niveles, tales como son: nivel celular, nivel de tejido, nivel de órgano, etc.

Es necesario conectar estos niveles de complejidad estructural para entender la morfogénesis. Se conoce muy poco sobre las bases moleculares de la morfogénesis tiene como objetivo fundamental identificar los procesos moleculares, bioquímicos y fisiológicos que conducen a la aparición de nuevas estructuras organizadas en el cuerpo de las plantas.

2.2 Control y expresión de la Morfogénesis

La organogénesis y la embriogénesis somática son dos procesos morfogenéticos muy frecuentes en el cultivo *in vitro* de especies vegetales. La organogénesis es el proceso por el cual se puede obtener plantas a partir de yemas, tallos, raíces, flores; mientras que la embriogénesis somática es el proceso por el cual se obtiene una estructura similar al embrión zigótico sin que medie la fertilización de gametos.

Esto ocurre por la totipotencialidad celular que había sido anunciada por Haberlandt en 1902, quien propuso

la teoría de que todas las células vegetales tienen la capacidad de regenerar plantas completas. Trabajos posteriores en callos de tabaco y con el adición de cinetina, la primera citocinina o citoquinina descubierta, fue posible demostrar que la diferenciación de brotes, raíces o de ambos, era regulada por el balance de auxinas/citocininas. La diferenciación comprende los cambios morfológicos y fisiológicos que conllevan a la especialización de las células y a la formación de los diferentes tejidos y órganos de la planta.

En todas las plantas se presentan las células embrionarias indiferenciadas y es a partir de ellas que sucede la diferenciación de los tejidos permanentes primarios de la planta. Esto ocurre de forma normal durante la formación de los órganos de las plantas.

En condiciones de laboratorio *in vitro*, mediante esos mecanismos se puede obtener el cultivo de tejido, de cualquier planta y de cualquiera de sus órganos, la única condición es que el pedazo de la planta (explante) este compuesto por células vivas. Este es el fundamento fisiológico de la obtención de los cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. Esto se logró por primera vez a partir de la década de los años 30 del siglo pasado y es una metodología básica imprescindible que se aplica en la Biotecnología Vegetal actual para regenerar las plantas:

1. Totipotencialidad
2. Desdiferenciación y Rediferenciación

3. Balance Auxinas/Citocininas

La totipotencialidad es la habilidad de una célula a desarrollarse y producir células diferenciadas, hasta la producción de un organismo, permitiéndole expresar sus genes, incluso las células más maduras y diferenciadas retienen la capacidad de retroceder a un estado más primitivo, es decir desdiferenciarse para poder producir de nuevo muchas células nuevas y finalmente organismos completos.

Las células vegetales crecidas en condiciones asépticas sobre medios de cultivo adicionados con hormonas vegetales, pueden dividirse dando dos tipos de respuesta:

- Una desdiferenciación celular acompañada de crecimiento tumoral, que da lugar a una masa de células indiferenciadas denominada callo, la cual bajo las condiciones adecuadas es capaz de generar órganos o embriones somáticos, llamados así porque son estructuras similares a un embrión, pero no se originan por unión de gametas.
- Una respuesta morfogenética por la cual se forman directamente órganos organogénesis o embriones, embriones somáticos.

La formulación del medio cambia según se quiera obtener un tejido desdiferenciado (callo), crecer yemas y raíces, u obtener embriones somáticos.

El éxito en la propagación de una planta dependerá de la posibilidad de expresión de la potencialidad celular total, es decir que algunas células recuperen su condición meristemática. A tal fin, debe inducirse primero la dediferenciación y luego rediferenciación celular, uno de los factores más importantes a tener en cuenta para lograr la respuesta morfogenética deseada es la composición del medio de cultivo (Agrawal & Sardar, 2003).

El carácter del proceso de diferenciación depende del genoma de la especie, y que está regulado por el balance hormonal propio y por el estado fisiológico del órgano, tejido o célula puesta en cultivo. Sin embargo, este balance puede ser modificado por el agregado de compuestos que imiten la acción de las hormonas vegetales. Estos compuestos son los reguladores de crecimiento y se emplean en los medios de cultivo para conseguir la micropropagación de una planta.

La totipotencialidad celular es fundamental en el desarrollo de plantas genéticamente modificadas o transgénicas. Una vez realizada la transformación, ya sea por *Agrobacterium* o por el método biobalística, el paso siguiente es el cultivo *in vitro* con el fin de obtener a partir del explanto inicial transformado, plántulas que lleven el transgén en todas sus células.



CAPÍTULO III

CONCEPTOS, DEFINICIONES DEL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

3 Conceptos, Definiciones Del Cultivo De Tejidos Vegetales

3.1 Generalidades

Cultivo de Tejidos Vegetales involucra diferentes técnicas de cultivo de material vegetal diverso, incluyendo a los protoplastos (células desprovistas de su pared celular), células, tejidos, órganos y plantas completas. También se lo conoce como cultivo *in vitro* de plantas, por realizarse en recipientes de vidrio.

El Cultivo de Tejidos Vegetales es una técnica biotecnológica que comprende el mantenimiento de plantas o componentes de estas en condiciones ambientales controladas, ausencia de microorganismos asociados con nutrición heterotrófica y en recipientes de plástico o vidrio.

Permite la propagación clonal masiva de plantas en espacios reducidos y obteniendo tasas de multiplicación inimaginables bajo condiciones normales de multiplicación de propágulos asexuales.

3.2 Conceptos y definiciones

La Propagación vegetativa tiene la propiedad de producir plantas genéticamente iguales a la planta progenitora, perpetuándose así las características específicas deseables de la planta madre.

La propagación *in vitro* se puede realizar vía embriogénesis somática u organogénesis (Nehra, y otros,

2005). La regeneración de plantas vía embriogénesis somática ha sido más promisorio para las gimnospermas, mientras que para las angiospermas, la organogénesis ha permitido obtener los mejores resultados (Xavier, Wendling, & Silva, 2013).

3.3 Métodos de propagación *in vitro*

Los métodos de propagación *in vitro* vía organogénesis, están basados fundamentalmente en la multiplicación de brotes axilares a partir de una plántula, mediante el cultivo aséptico de un ápice o meristemo (Vasil, 1994). Esta técnica (Xavier, Wendling, & Silva, 2013) constituye una de las aplicaciones más generalizadas del cultivo *in vitro*, la composición del medio de cultivo depende de la especie vegetal y de la fase del proceso de propagación *in vitro* (Castillo, 2005).

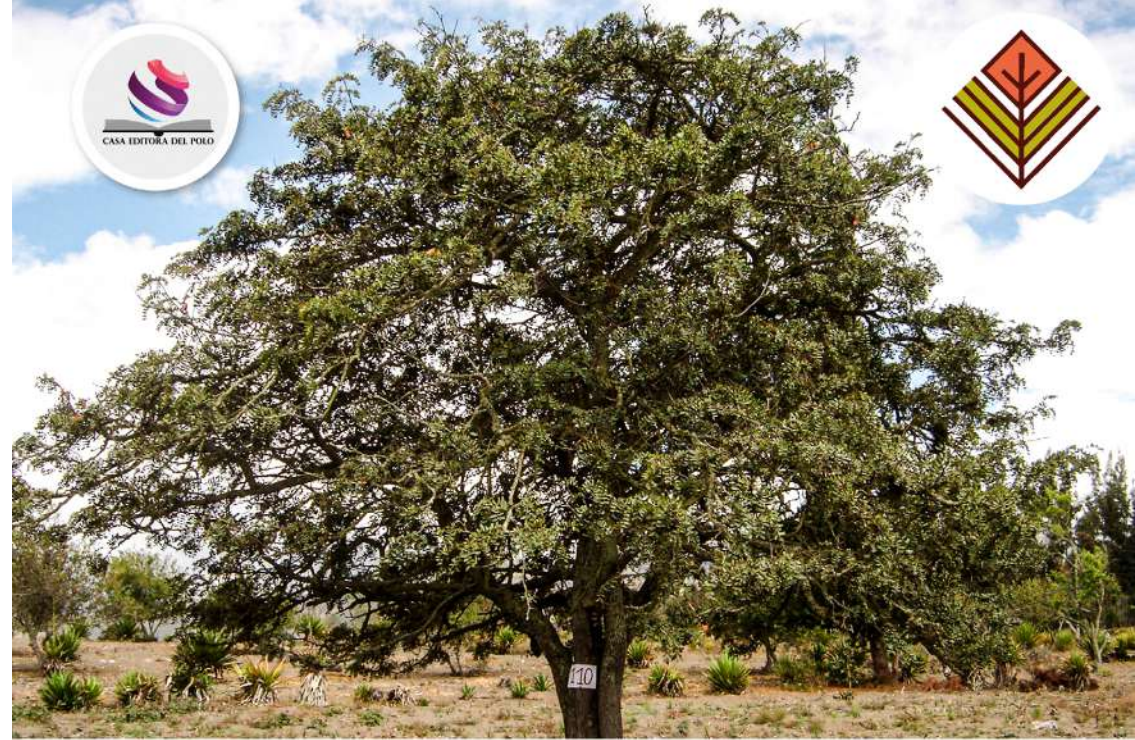
Aplicada a la rama forestal, la organogénesis ha permitido la propagación de plantas de diversos géneros como: *Acacia*, *Bombax*, *Casuarina*, *Dalbergia*, *Eucalyptus*, *Ficus*, *Pinus*, *Gmelina*, *Populus*, *Platanus*, *Salix*, *Shorea*, *Tectona*, *Terminalia*, *Quercus*, *Swietenia*, *Cedrella*, *Hibiscus*, *Tabebuia*, *Castanea*, entre otros (Castillo, 2005) (Xavier, Wendling, & Silva, 2013).

La inclusión de técnicas de cultivo *in vitro* en los programas de mejoramiento genético y el establecimiento de plantaciones comerciales, permite la clonación masiva de diversas especies vegetales en tiempos y espacios reducidos, conservando las características

valiosas de los materiales, así como la obtención de material de propagación libre de enfermedades. Además, facilita la comercialización y transporte de las plantas así propagadas a lugares y países lejanos con menos restricciones aduaneras y menores posibilidades de pérdida de materiales (Nehra, y otros, 2005).

Sin embargo a pesar del gran número de especies forestales propagadas por cultivo *in vitro*, se presentan problemas derivados de varios factores como: la oxidación fenólica, la contaminación endógena de los explantes, la hiperhidricidad, necrosis apical. Además de la disponibilidad y respuesta estacional de los explantes, el enraizamiento y la supervivencia *ex vitro* (Merkle & Nairn, 2005).

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 la técnica del cultivo *in vitro*: a) Propagación masiva de plantas, b) Clonación de individuos de características agronómicas muy deseables, c) Obtención de plantas libres de virus, d) Producción de semillas sintéticas, e) Conservación de germoplasma, f) Obtención de metabolitos secundarios, g) Producción de nuevos híbridos, h) Mejora genética de plantas, i) Germinación de semillas, j) Producción de haploides, k) Estudios fisiológicos diversos (George, 2008).



CAPÍTULO IV

ELABORACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES CONCENTRADAS

4 Elaboración de medios de cultivo y soluciones concentradas

4.1 Medios de Cultivo

De acuerdo con (Gamborg, Murashige, Thorpe, & Vasil, 1976), el éxito en el cultivo de tejidos depende de la selección del medio de cultivo, incluyendo su composición química y su fórmula física. La formulación descrita por (Murashige & Skoog, 1962), conocida como medio de cultivo basal (MS) es la más empleada en la fase I. Existen además diversos componentes que enriquecen los medios de cultivo, entre ellos: vitaminas, aminoácidos, azúcares y reguladores de crecimiento: auxinas y citoquininas (Gonzáles, 2002).

La sacarosa constituye la principal fuente de carbono de los medios de cultivo (Rao KS, 1996), su concentración óptima en los medios de cultivo varía entre 20 – 80 g L⁻¹, en dependencia del tipo de cultivo y material vegetal. Al medio de cultivo se le añade generalmente reguladores de crecimiento durante la iniciación del cultivo y uno de los reguladores más utilizados es el 6-BAP (6-bencilaminopurina), en concentraciones que varían entre 0,88 y 22,0 µM (Gonzáles, 2002).

4.2 Componentes del medio de cultivo

Sales inorgánicas

Los compuestos minerales presentes en el medio de cultivo constituyen todos aquellos elementos inorgánicos

que son necesarios para el desarrollo de la planta: macroelementos y microelementos como: Nitrógeno (N) es un componente de los ácidos nucleicos y aminoácidos y es un regulador del pH en el medio. Su deficiencia produce cultivos cloróticos y de tamaño reducido; se suministra al medio en forma de amonio (NH_4^+) y nitrato (NO_3^-). Fósforo (P) Es abundante en zonas meristemáticas y es componente de las moléculas de ADN y ATP. Los tejidos deficientes en fósforo tienen tamaño reducido y coloración rojiza. Este elemento se adiciona al medio en forma de fosfato de potasio (KH_2PO_4) o fosfato de sodio (NaH_2PO_4). Potasio (K) promueve el crecimiento de tejidos meristemático, actúa como osmoregulador y regula el pH. Se agrega al medio de cultivo en forma de fosfato de potasio (KH_2PO_4) o cloruro de potasio (KCl). Magnesio (Mg) Es un componente de la molécula de clorofila y actúa como activador enzimático, su deficiencia se observa en la clorosis de hojas maduras. Se agrega al medio en forma de sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (Agrawal & Sardar, 2007).

Azufre (S) Es componente de algunas proteínas y enzimas; su deficiencia se observa en forma de hojas cloróticas. El azufre es suministrado al medio en forma de compuestos a base de sulfatos (SO_4). Calcio (Ca) Es un componente de la pared celular y promotor de la formación de raíces; en cultivo de tejidos su deficiencia puede causar muerte de meristemas. El Ca se agrega al medio de cultivo en forma de cloruro de calcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) o como nitrato de calcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$). Cloro (Cl) Este

elemento actúa como un osmoregulador y componente del fotosistema II del proceso de la fotosíntesis. Es adicionado al medio en forma de compuestos a base de cloruros (Cl_2) (Agrawal, 2007).

Sodio (Na) Es un elemento que actúa como osmoregulador y confiere tolerancia a la salinidad en algunos tipos de plantas; se adiciona al medio de cultivo en forma de compuestos a base de sodio (Na^+). Manganeso (Mn) Este elemento es un componente de la membrana de los cloroplastos y su deficiencia se observa en plantas adultas en forma de moteados foliares. Es suministrado al medio en forma de sulfato de manganeso ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$).

Zinc (Zn) Tiene diversas funciones, entre ellas la de actuar como activador enzimático de la clorofila. Se suministra al medio en forma de sulfato de zinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Boro (B) Es un elemento que al parecer funciona en el transporte de azúcares, en la estructura de la membrana celular y en el metabolismo del ácido fenólico, es suministrado al medio en forma de ácido bórico (H_3BO_3). Cobre (Cu) Este microelemento interviene en la síntesis de la clorofila y en la transferencia electrónica. Se adiciona al medio en forma de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Molibdeno (Mo) Se cree que interviene en la conversión del N en amonio y en la fijación del mismo. Es agregado al medio como molibdato de sodio ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). (Al Malki & Elmeer, 2010) Cobalto (Co) Es un elemento componente

de la vitamina B12 y de la síntesis de ácidos nucleicos. Es agregado al medio de cultivo en forma de cloruro de cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Hierro (Fe) Está involucrado entre otros procesos en la síntesis de clorofila y en las reacciones de óxido/reducción que suceden en los cloroplastos y mitocondrias. Su deficiencia se expresa en hojas con apariencia clorótica. El hierro es adicionado al medio mezclando sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) con la sal disódica del ácido etilendiamina tetraacético (EDTA) formando el quelato de hierro.

Vitaminas

Los tejidos y células vegetales cultivado *in vitro* requieren de suplementos externos de estos compuestos para llevar a cabo sus procesos de crecimiento y desarrollo. Siendo las más comunes: Tiamina (Vitamina B₁) Es un cofactor que actúa en el ciclo de los ácidos orgánicos de la respiración (Ciclo de Krebs) y es un componente regular de la mayoría de los medios de cultivo. Ácido nicotínico (Niacina o Vitamina B₃) Es un componente de las enzimas que actúan en las reacciones activadas por la luz. Su uso es menos común que la tiamina. Mio-inositol Es un constituyente del complejo B de vitaminas y componente regular de todos los medios de cultivo. Aunque no es estrictamente necesario para los procesos de crecimiento y desarrollo, los cultivos tienen un mejor comportamiento en presencia de éste. Ácido ascórbico (Vitamina C) Es usado más frecuentemente como un antioxidante en cultivo de tejidos de especies

que producen grandes cantidades de fenoles *in vitro*.

Reguladores del crecimiento vegetal

Son compuestos, algunos naturales (fitohormonas) y otros sintéticos que, a muy bajas concentraciones, afectan los procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas (Aragón, Escalona, Rodríguez, Capote, & González, 2010) Los tejidos *in vitro* generalmente no producen cantidades necesarias de reguladores para suplir las necesidades de sus procesos, por lo que se hace necesario suplementar con fuentes exógenas. Las hormonas o reguladores de crecimiento clásicos son las auxinas, citocininas, giberelinas, el ácido abscísico y el etileno (Apóstolo, 2000)

Auxinas: son reguladores de crecimiento que estimulan la dominancia apical, el crecimiento y la división celular, el desarrollo meristemático, la inducción de raíces adventicias y la formación de embriones somáticos. En su estado natural la planta produce el ácido indolacético (AIA) y el ácido indolbutírico (AIB), los cuales son sintetizados en los ápices foliares desde donde se desplazan en forma basipétala a la parte radical. Entre los compuestos análogos a las auxinas, sintetizados en el laboratorio, el ácido naftalenacético (ANA), el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y el picloram. En el cultivo de tejidos *in vitro*, los más usados son el AIB y ANA en la micropropagación de meristemos y organogénesis. El 2,4-D y el picloram tienen efectos

más fuertes, por lo que son utilizados en la inducción de tejidos embriogénicos. El AIA por su facilidad para ser degradado enzimáticamente es menos utilizado (Berthouly, 2005).

Citocininas: Estos reguladores de crecimiento actúan en la interrupción de la dominancia apical, división celular, desarrollo de yemas axilares y retardo de la senescencia de hojas. Son sintetizados en los ápices radicales desde donde son transportadas a las yemas apicales y axilares. Naturalmente la zeatina y el 2-isopentenil adenina (2iP) son sintetizados por la planta, pero en el comercio se pueden encontrar sustitutos como la benzilaminopurina (BAP o BA), la kinetina y el tidiazuron (TDZ). De todos estos compuestos, BAP es más utilizada en cultivo *in vitro*, especialmente en la multiplicación de meristemas pre-existentes y organogénesis (Gaspar, Kevers, & Bisbis, 2000)

Giberelinas Son compuestos que promueven el alargamiento de los entrenudos de la planta mediante la inducción de la división y elongación celular. La síntesis en plantas completas ocurre principalmente en las hojas jóvenes. Aunque existen más de 90 compuestos similares, la giberelina más comúnmente utilizada en cultivo *in vitro* es el ácido giberélico (GA_3), el cual es adicionado al medio de cultivo para promover la elongación de tallos micropropagados y conversión de embriones somáticos en plantas (Valledor, Hasbún, Cañal, & Rodríguez, 2010). Se ha observado cierto efecto inhibitorio en formación

de nuevos tallos y raíces y la inducción de tejidos embriogénicos, por lo que es inconveniente su uso en los eventos de multiplicación de brotes y emisión de raíces. El GA_3 es alterado en su estructura por el calor, por lo que es mejor esterilizar a través de filtración.

Acido abscísico: Este regulador de crecimiento es el encargado de controlar la apertura y cierre de estomas, inhibir la elongación y división celular, promover cierto grado de abscisión foliar e inducir la dormancia de las semillas. Su sitio de origen son las raíces y las hojas adultas desde donde se desplaza a sus sitios de acción.

En condiciones *in vitro* inhibe la formación de callo y es utilizado para inducir la maduración de embriones somáticos y la formación de órganos de almacenamiento y dormancia como cormos y microtubérculos. No es soluble en agua por lo que debe ser diluido en etanol (De Feria, Jiménez, Barbón, Capote, & Chávez, 2003)

Etileno Es un gas que es sintetizado a partir del aminoácido metionina y se produce en la mayoría de los tejidos vegetales. En plantas induce la senescencia y abscisión de hojas y flores, la formación de raíces adventicias y elimina la dormancia de semillas y yemas. Su presencia se torna inconveniente en condiciones *in vitro*, por lo que algunas veces la ventilación de los tejidos es necesario para evitar su acumulación.

Carbohidratos

Las plantas en su estado natural producen sus propias fuentes de energía (autótrofos); sin embargo, en condiciones *in vitro*, por la ausencia de fotosíntesis los organismos vegetales necesitan de una fuente externa de carbohidratos para poder crecer y desarrollarse (heterótrofos), por lo que la mayoría de los medios deben ser suplementados con compuestos que actúen como fuente de energía como la Sacarosa

Es un disacárido compuesto por fructosa y glucosa ($C_{12}H_{22}O_{12}$). Se adiciona al medio en forma de azúcar común y casi siempre es una concentración del 2 al 4%.

Agua

El agua constituye más del 95% de cualquier medio de cultivo y es el solvente de todos los solutos que componen en el medio. Es necesario aplicar mecanismos que permitan alcanzar un alto grado de pureza del agua corriente antes de ser utilizada para las preparaciones de medios como es la destilación, desionización y la osmosis reversa.

La destilación, es el más común y utilizado de los métodos de purificación de agua, se requiere de un equipo relativamente económico (destilador) y fácil de manejar.

Desionización, consiste en la remoción o captura de contaminantes presentes en el agua con base a su

carga eléctrica, el proceso funciona forzando el paso del agua a través de unas columnas que contienen resinas con diminutas esferas plásticas cargadas con iones de hidrógeno (H^+) e hidróxido (OH^-), los cuales son intercambiados por contaminantes catiónicos o aniónicos presentes en el agua.

Osmosis reversa, este sistema consiste en utilizar presión para hacer pasar el agua a través de membranas semipermeables que permiten la retención de partículas y contaminantes.

Agentes gelificantes y solidificantes

Existen dos estados para la consistencia del medio de cultivo, y éstos dependen de la presencia o ausencia de un medio de soporte. Los medios líquidos generalmente están conformados únicamente por la formulación del medio disuelta en agua sin ningún tipo de medio de soporte; de forma inversa, los medios en estado semi-sólido adquieren cierta dureza proporcionada por agentes gelatinizantes. Agar Es el elemento gelatinizante más usado debido a su grado de dureza que permite sostener los cultivos en su sitio y su inactividad iónica que permite el flujo de nutrientes del medio hacia los tejidos. Estructuralmente, el agar es una mezcla compleja de polisacáridos extraídos de algas rojas que se disuelven a $100^{\circ}C$ y solidifican a $45^{\circ}C$, no es digerido por las enzimas vegetales y no reacciona con los componentes del medio. En el comercio existen diferentes tipos de agar, por lo

que es conveniente usar uno con alto grado de pureza y que esté manufacturado para cultivo de tejidos (TC-Agar); igualmente, se debe tener en cuenta que los pH bajos (<4.0) afectan la dureza del mismo. Generalmente una concentración de 0,6 a 0,8 % (6 a 8 gL⁻¹) es suficiente para lograr una dureza adecuada del medio de cultivo (Afreen, Zobayed, Kubota, Kozai, & Hasegawa, 1999)

Phytigel: Es un polímero derivado de la fermentación de la bacteria “Pseudomonas elodea”. De forma natural contiene cantidades significativas de potasio, sodio, calcio y magnesio, aunque no perjudiciales y generalmente es más duro que el agar. Se utilizan proporciones de 0,2% a 0,4% (2 a 4 gL⁻¹). Una tercera alternativa a la formulación del medio de cultivo es el de doble fase. En este medio, se coloca una fase sólida y sobre esta una fase líquida; la sólida brinda la estabilidad para mantener en su sitio a los explantes, y la líquida le permite renovar el suministro de nutrientes sin realizar subcultivos del material vegetal permitiendo el crecimiento de los tejidos en el mismo recipiente; adicionalmente, la adición de nutrientes disueltos en una fase líquida permite una asimilación más rápida de los nutrientes (Cabrera, y otros, 2011)

4.3 Formulación y preparación de medios de cultivo

La mayoría de las formulaciones de medios de cultivo que se conocen en la actualidad fueron desarrollados en la década de los 60’s y 70’s del siglo XX, y difieren básicamente en la concentración de las sales que utilizan.

La formulación del medio de Murashige y Skoog (1962) es la más utilizada a nivel mundial en el cultivo de plantas o tejidos vegetales *in vitro* y se caracteriza por tener un contenido alto de sales. Otras formulaciones ampliamente utilizadas son la B5 (Gamborg, Murashige, Thorpe, & Vasil, 1976), utilizada preferiblemente en el cultivo de callos y células, Nitsch para el cultivo de anteras

Tabla 1 Formulación de macro y micro nutrientes de cuatro medios de cultivo

Medios de cultivo	1 MS	2 SH	3 B5	4 White
	CONCENTRATION			
Macronutrientes	mM	mM	mM	mM
NH ₄ NO ₃	20.6	25.0	---	---
KNO ₃	18.8	1.4	25.0	0.8
CaCl ₂	3.0	1.6	1.0	---
Ca(NO ₃) ₂	---	---	---	1.3
MgSO ₄	1.5	---	1.0	3.0
Na ₂ SO ₄	---	---	---	1.4
(NH ₄) ₂ SO ₄	---	---	1.0	---
KH ₂ PO ₄	1.25	1.25	---	---
NaH ₂ PO ₄	---	---	1.1	0.1
NH ₄ H ₂ PO ₄	---	2.6	---	---
Micronutrientes	μM	μM	μM	μM
KI	5.0	6.0	4.5	4.5
KCl	---	---	---	871.9
H ₃ BO ₃	100.0	80.0	48.5	24.3
MnSO ₄	100.0	60	59.2	22.4
ZnSO ₄	30.0	3.5	7.0	10.4
NaMoO ₄	1.0	0.4	1.0	---
CuSO ₄	0.1	0.8	0.1	0.0
CoCl ₂	0.1	---	0.1	---
Na ₂ EDTA	100.0	55.0	---	---
FeSO ₄	*	100.0	55.0	---
Fe ₂ (SO ₄) ₃	---	---	---	6.3
Comp orgánicos	μM	μM	μM	μM
Myo-Inositol	550.0	5500.0	555.1	---
Acido Nicotínico	4.6	40.6	8.1	0.4
Prídoxina HCl	2.4	2.4	4.9	0.0
Tiamina HCl	0.3	14.8	29.6	0.0
Glicina	26.6	---	---	40.0

Fuente: (Di Pinto, Terio, Novello, & T., 2020)

Existen tres formas diferentes de realizar la preparación de los medios de cultivo: la primera es pesando todos los componentes en forma individual, al momento de preparar la formulación. Un segundo método consiste en la preparación de soluciones madres o stock, y el tercero es la dilución de formulaciones premezcladas comercialmente y que vienen en cantidades específicas para determinar cantidad de agua. Estas últimas son bastante convenientes por la facilidad de preparación pero por el alto costo no son utilizadas regularmente.

4.4 Preparación de soluciones madres o stock

Las soluciones madres consisten en medios de cultivos preparados a concentraciones muy altas lo cual permite tomar una determinada cantidad de éstas y diluirlas en agua para completar el volumen total de medio a la concentración requerida. Generalmente las soluciones stock se preparan a una concentración 10 a 100 veces (10x a 100X) mayor a la concentración final del medio, de tal forma que la dilución de 10 ml o 100 ml de ésta, respectivamente, en un litro de agua terminará en la concentración adecuada del medio.

La preparación de soluciones stock es relativamente fácil, disminuye costos, facilita el pesaje de componentes que se agregan en pequeñas cantidades y permite modificar las concentraciones de los ingredientes. Para mayor facilidad de manejo, normalmente las sales con los elementos que se agregan en cantidades milimolares (mM), tales como N, P, K, Na, S, Cl, Ca, se preparan en

un stock separado a una concentración de 10X; mientras que los elementos que se agregan en cantidades trazas o micromolares (μM), Mn, B, Cu, Mo, Co y Fe, se preparan a una concentración de 100X.

4.5 Cálculo de cantidades

La mayoría de los medios de cultivo expresan las cantidades de sus componentes en unidades de masa. Estos en muchos casos no refleja la diferencia que puede existir entre compuestos análogos que difieren en sus estructuras moleculares. Puesto que el efecto de una sustancia es el resultado de la acción del número de moléculas presentes en el medio y no de su peso, las cantidades adicionales se convierten en factores críticos, especialmente cuando se comparan los efectos de reguladores de crecimiento (Gamborg et al., 1976).

Las cantidades de los componentes del medio deben calcularse preferiblemente en unidades molares; por ejemplo, al agregar 1 mg L^{-1} de ANA (peso molecular = 186,2) y calcular en número de micromoles que se adiciona ($1000/186,2$) es de $5,37 \mu\text{M}$. Si agregamos el mismo peso de AIB, otra auxina, (peso molecular = 203,2) tenemos que el número de micromoles que se adiciona ($1000/203,2$) es de $4,92 \mu\text{M}$, es decir se estaría agregando una mayor cantidad real de ANA que de IBA. Si esto no se tiene en cuenta, es posible que las evaluaciones de un experimento puedan conducir a expresar conclusiones erróneas.

Las fórmulas necesarias para realizar la conversión de unidades de masa a unidades molares y viceversa son:

Molar (M) = g L⁻¹ / Peso Molecular

Minimolar (mM) = mg L⁻¹ / Peso Molecular

Micromolar (μM) = μg L⁻¹ / Peso Molecular

Preparación del medio de cultivo

El proceso de preparación de un medio de cultivo se efectúa en una serie de pasos, que deben terminar en la obtención de una formulación con los componentes en la proporción adecuada, el pH óptimo, la consistencia deseada, estéril y distribuido en las cantidades requeridas. Los pasos a seguir para la preparación de un litro de medio de cultivo son los siguientes:

Adición de los componentes

Diluir en una cantidad de agua pura (500 ml para 1 L de medio) las soluciones stock, el azúcar, el mio-inositol, la tiamina, los reguladores de crecimiento, etc., de acuerdo con lo requerido para el medio de cultivo específico y luego adicionar agua pura hasta completar 1000 ml. Esto debe realizarse con la ayuda de una barra magnética en un plato giratorio, con el fin de lograr la completa dilución de todos los componentes.

Medición y ajuste de pH

El pH del medio es determinante para la solubilidad de las sales, asimilación de los reguladores de crecimiento y la dureza del medio. La medición y ajuste de pH debe realizarse antes de la esterilización del medio de cultivo y se efectúa adicionando HCl o NaOH para disminuir o aumentar su valor, respectivamente. Aunque el pH del medio puede tener un rango de 4,5 a 6,0; este se ajusta a un valor entre 5,6 o 5,8, lo cual dependerá del cultivo, con el fin de que al ser esterilizado disminuya a su valor óptimo para la toma de nutrientes por los tejidos vegetales (entre 5.4 y 5.5).

Adición de agar

Al preparar medios de consistencia semisólida, el agar debe ser agregado y mezclado después de la medición del pH, ya que su adición previa puede dañar el potenciómetro.

Esterilización

Generalmente, el medio con todos sus componentes es esterilizado en un autoclave a una temperatura de 121 °C y una presión de 1,05 kg cm⁻², mientras que el tiempo de esterilización, depende de la cantidad de medio que se tenga en el recipiente. (Tabla 2)

Tabla 2 Tiempos de esterilización en autoclave

Volumen de medio (ml)	Tiempo mínimo de esterilización (min)
20-50	15
75	20
250-500	25
1000	30
1500	35
2000	40

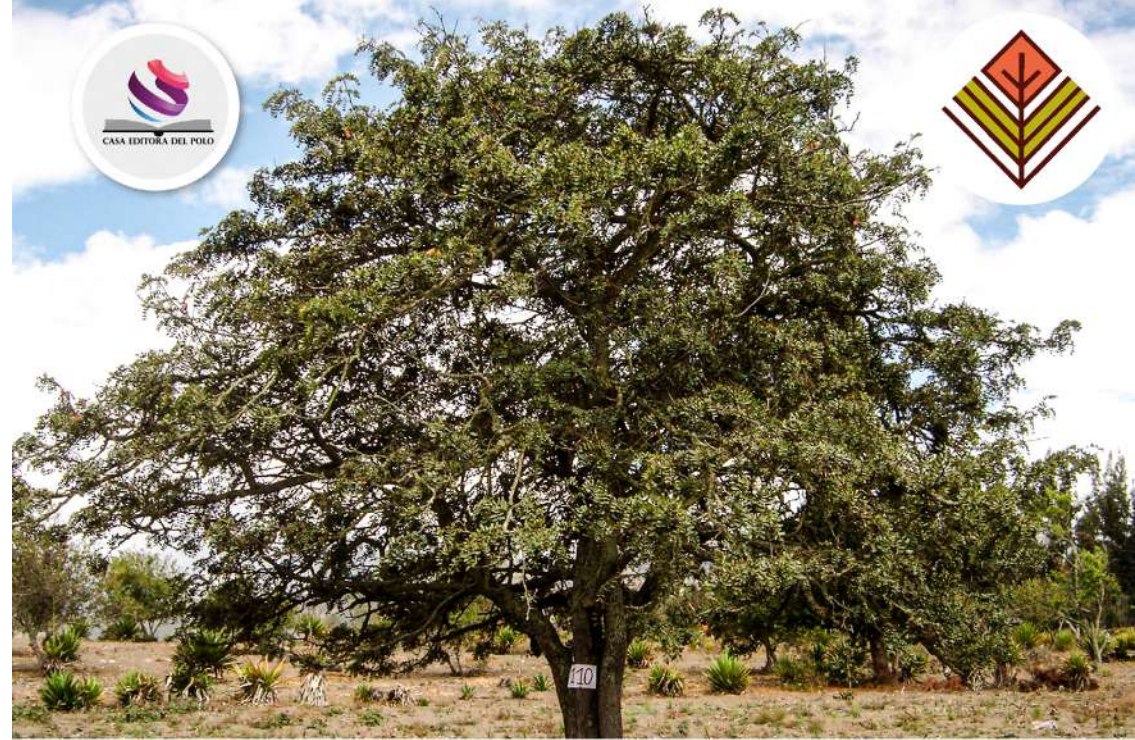
Fuente: (Colectivo de Autores., 2008.)

Un método alternativo de esterilización de medios líquidos es por filtración, utilizando membranas con poros diminutos (0,22µm) que evitan el paso de bacterias, hongos y la mayoría de virus; sin embargo, debido a sus costos y funcionalidad, éste método se utiliza sólo para esterilizar aquellos compuestos que cambian su naturaleza con el calor (ácido abscísico, ácido giberélico, etc).

Distribución

De acuerdo con las características de los recipientes o contenedores a utilizar, el medio es distribuido antes y después de la esterilización. Generalmente cuando el medio es líquido y se utilizan erlenmeyers de vidrio, las cantidades de medio son distribuidas previo a la esterilización en cada uno de los recipientes; de forma inversa cuando el medio es semi sólido, la distribución puede hacerse antes de la esterilización cuando se

utilizan recipientes de vidrio (tubos de ensayo y frascos), aunque en este caso el agar debe ser disuelto calentando el medio antes de la distribución. Al utilizar recipientes plásticos (cajas de Petri desechables, etc.) que no resisten la temperatura de esterilización, la distribución de las cantidades del medio debe hacerse posterior a su esterilización.



CAPÍTULO V

PREPARACIÓN DEL MATERIAL
DE SIEMBRA, DESINFECCIÓN Y
ESTABLECIMIENTO IN VITRO,
VÍA ORGANOGENESIS.

5 Preparación Del Material De Siembra, Desinfección Y Establecimiento *In Vitro*, Vía Organogénesis

5.1 Generalidades

La propagación *in vitro* constituye una de las aplicaciones más generalizadas del cultivo *in vitro*, donde a partir de un fragmento (explante) de una planta madre, se obtiene una descendencia uniforme, con plantas genéticamente idénticas, denominadas clones. El explante más usado para los procesos de propagación *in vitro* vía organogénesis son las yemas vegetativas de las plantas. Los frascos de cultivo que contienen las plantas se ubican en cámaras de crecimiento con luz artificial o solar, donde se fija la temperatura en valores que oscilan entre los 21 y 28°C, además de controlar la cantidad de horas luz. Por su parte, el medio de cultivo se compone de una mezcla de sales minerales, vitaminas, reguladores de crecimiento, azúcar, agua y gelificante.

La composición del medio de cultivo depende de la especie vegetal y de la fase del proceso de propagación *in vitro* (Castillo, 2005). El éxito con este método ha sido relativamente rápido con especies herbáceas, pero el progreso con plantas perennes ha sido más lento debido al mayor desconocimiento de la información genética en estas especies y a su forma “recalcitrante” para la regeneración y multiplicación de algunas de ellas, típico de las plantas leñosas (Nehra, y otros, 2005). No obstante, aplicada a la propagación de especies arbóreas,

la organogénesis ha permitido la propagación de varias especies leguminosas.

La propagación *in vitro*, es una técnica de propagación de plantas, que proporciona ciertas ventajas comparativas sobre las técnicas tradicionales de propagación a nivel macro, tales como mayores tasas de multiplicación en períodos de tiempo y espacios más eficientes. Obtención de plantas con altos grados de uniformidad genética y fenotípica, regeneración de plantas completas a partir de células, tejidos u órganos, rápido desarrollo y liberación de cultivares mejorados o genéticamente modificados, posibilidad de obtener plantas sanas a partir de material contaminado con patógenos de tipo sistémico, reducción de costos y riesgos de pérdidas en el almacenamiento de germoplasma, y adicionar un valor agregado a las plantas producidas. También tiene ciertas limitantes que impiden su uso generalizado en todas las especies vegetales. Algunas de estas limitantes son la deficiente disponibilidad, o ausencia total, de protocolos para ciertas especies, denominadas recalcitrantes por su dificultad de manejo en condiciones *in vitro*, la ocurrencia de altos niveles de variación somaclonal en ciertos tipos de plantas y los altos costos de producción que implica la producción *in vitro*.

5.2 Fases de propagación vía organogénesis

Se reconoce cinco fases en el proceso de propagación *in vitro* vía organogénesis, las mismas son: Fase 0 o fase preparativa; fase I o fase de establecimiento; fase II o

fase de multiplicación; fase III o fase de enraizamiento y fase IV o fase de aclimatación, algunos autores plantean un número mayor de fases, pero estas se encuentran implícitas dentro de las antes mencionadas (Jimenez, 1998).

5.3 Fase preparativa o Fase 0

Esta fase persigue garantizar material de partida de alta calidad genética y fitosanitaria, disminuyendo los problemas de contaminación para lograr un esquema de propagación *in vitro* real y repetible (George, 2008). Aunque algunos trabajos de investigación señalan el empleo de tejidos adultos de plantas provenientes de campo, el porcentaje de contaminación en este tipo de material es alto (Sánchez, 2001). Para poder establecer el cultivo en condiciones de asepsia, se debe obtener explantes con un nivel nutricional y un grado de desarrollo adecuado, para esto es recomendable mantener a la planta madre durante un período de tiempo que puede oscilar entre unas semanas o varios meses bajo condiciones sanitarias controladas y con un control de la nutrición y riego adecuados para permitir un crecimiento vigoroso y libre de enfermedades (Castillo, 2005). La importancia del establecimiento de un banco de plantas donantes bajo condiciones semicontroladas (invernadero o casa de cultivo) y la aplicación sistemática de fungicidas comerciales, con el fin de disminuir los porcentajes de contaminación microbiana en la fase de establecimiento. Una vez seleccionado el mejor explante

se requiere desinfectarlo superficialmente, ya que en el medio de cultivo pueden crecer microorganismos, principalmente bacterias y hongos, que competirán ventajosamente con el explante (Villalobos & Thorpe, 1991).

5.4 Fase de establecimiento o Fase 1

El objetivo de esta fase es lograr el establecimiento *in vitro* del explante de forma vigorosa y libre de contaminación para iniciar la multiplicación en gran escala. En el cultivo de tejidos *in vitro* de especies leñosas generalmente se presentan limitaciones que dificultan el desarrollo de las fases de la propagación *in vitro*, sobre todo durante el establecimiento. Los mayores problemas durante el establecimiento *in vitro* son la contaminación bacteriana y fúngica, presente en la superficie de las hojas y segmentos nodales, así como la oxidación fenólica (Teixeira, 2001) (Azofeifa, 2009). La selección del tejido vegetal, el estado fisiológico del mismo, la metodología de desinfección, así como el medio de cultivo, tiene gran influencia en la efectividad del establecimiento *in vitro*. (Andrade, Wong, Waddell, & Liu, 2007).

Selección del explante

Las características del explante son determinantes en esta fase y según señalan (Olmos, Luciani, & Galdeano, 2004). Los factores que influyen sobre la calidad del explante son: la edad ontogénica y fisiológica del mismo, el tipo de órgano que sirve como explante inicial, el

tamaño y estado fitosanitario de la planta donante y la estación en la cual se colecta el material vegetal. Por lo tanto, diversos autores plantean la necesidad de realizar tratamientos de revigorización o plantas donadoras de explantes, sobre todo en especies leñosas. Por otra parte (Mroginski, Sansberro, & Faschland, 2004), señalan que la edad del explante es un factor crítico, siendo la propagación *in vitro* a partir de tejidos jóvenes la de mayor éxito, los órganos jóvenes tienen mejor respuesta en el establecimiento *in vitro* que los obtenidos a partir de materiales adultos.

Desinfección de los ápices

Para la desinfección se han empleado diferentes compuestos. 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 (Villalobos & Thorpe, 1991). Los más comunes son la solución de hipoclorito de sodio y de calcio, el peróxido de hidrógeno, el nitrato de plata, el cloro comercial, el etanol a diferentes porcentajes y otros (Orellana, García, Bermúdez, Veitía, & Romero, 2002). Otro desinfectante comúnmente utilizado para la desinfección de las especies forestales es el bicloruro de mercurio ($HgCl_2$) que es el de mayor toxicidad y se emplea en concentraciones bajas durante cortos períodos de tiempo (Abdelnour & Muñoz, 2005).

Además, para el control de patógenos que permanecen latentes durante el cultivo *in vitro* se emplean antibióticos en el medio de cultivo (Olmos, Luciani, & Galdeano, 2004). La desinfección superficial incluye varios pasos: el lavado de los explantes con agua corriente, el empleo de etanol al 70% por un minuto, seguido de concentraciones variables de hipoclorito de sodio (0,5 a 1,5% de cloro activo) con unas gotas de tensoactivos para favorecer su penetración y actividad. Posteriormente los explantes deben ser enjuagados al menos tres veces con agua destilada estéril (Levitus, Echenique, Rubinstein, Hopp, & Mroginski, 2010).

Algunos microorganismos permanecen latentes y se expresan cuando son transferidos a un medio de cultivo nuevo. En general, estos incluyen los microorganismos superficiales del material vegetal, los microorganismos endógenos y los microorganismos propios del manejo en laboratorio. En la fase I también puede observarse infecciones por bacterias y hongos asociados a trips (Thripidae) que sobreviven a los tratamientos de esterilización y por microorganismos endógenos latentes dentro del sistema vascular, resultado de una esterilización inefectiva de los explantes. Estos microorganismos latentes podrían manejarse mediante el empleo de antibióticos en el medio de cultivo (Levitus, Echenique, Rubinstein, Hopp, & Mroginski, 2010).

Medios de cultivo

De acuerdo con (Gamborg, Murashige, Thorpe, & Vasil, 1976) el éxito en el cultivo de tejidos depende de la selección del medio de cultivo, incluyendo su composición química y su fórmula física. La formulación descrita por (Murashige & Skoog, 1962), conocida como medio de cultivo basal (MS) es la más empleada en la fase I. Existen además diversos componentes que enriquecen los medios de cultivo, entre ellos: vitaminas, aminoácidos, azúcares y reguladores de crecimiento: auxinas y citoquininas (González, 2002). La sacarosa constituye la principal fuente de carbono de los medios de cultivo (Rao KS, 1996), su concentración óptima en los medios de cultivo varía entre 20–80 g L⁻¹, en dependencia del tipo de cultivo y material vegetal. Al medio de cultivo se le añade generalmente reguladores del crecimiento durante la iniciación del cultivo y uno de los reguladores más utilizados es el 6 – BAP (6 – bencilaminopurina), en concentraciones que varían entre 0,88 y 22,0 µM (González, 2002).

En especies forestales como la teca (*Tectona grandis* L.), (Abdelnour & Muñoz, 2005), señalan el empleo del medio de cultivo MS con 30 g L⁻¹ de sacarosa y 2,3 gL⁻¹ de Phytigel®. Durante esta fase los ápices fueron cultivados en el medio de cultivo básico enriquecido con thidiazuron (TDZ) o benciladenina (BA), en la oscuridad durante una semana y luego transferidos a condiciones de luminosidad (36,0 µm m⁻² s⁻¹). En este mismo cultivo

(Quiala, Barbón, Jiménez, de Feria, Capote, & Pérez, 2006) recomendó el uso del medio de cultivo MS con 20 gL^{-1} de sacarosa, $4,4 \text{ }\mu\text{M}$ de 6-BAP y $2,5 \text{ g L}^{-1}$ de Phytigel®.

Una problemática que se presenta en la propagación *in vitro* lo constituye la oxidación fenólica, para contrarrestar este efecto se añaden a los medios de cultivo de establecimiento compuestos antioxidantes como el ácido cítrico, la cisteína, el ácido ascórbico y adsorbentes como la polivinilpirrolidona (PVP) y el carbón activado, las concentraciones más frecuentes de carbón activado fluctúan de $2,0$ a $3,0 \text{ g L}^{-1}$ (Azofeifa, 2009). (Teixeira, 2001), destacó que en condiciones *in vitro* la oxidación fenólica constituye un inconveniente en el establecimiento de especies leñosas, la misma que en gran medida está relacionada con el genotipo, tipo de explante y época del año, ya que en períodos de crecimiento activo de la planta la concentración de polifenoles es menor.

5.5 Fase de Multiplicación o Fase II

Esta fase tiene como objetivo principal la producción del mayor número posible de propágulos a partir de los explantes introducidos *in vitro*, sin comprometer la calidad genética de las plantas generadas. Esta fase es la que determina la eficiencia del proceso (Pérez, Ramírez, Núñez, & Ochoa, 1998). Durante la multiplicación *in vitro* se espera que los explantes que sobrevivieron las fases 0 y I originen brotes con varias hojas, en la base de cada hoja hay una yema que se desarrollará luego

de ser puesta en contacto con el medio de cultivo. Periódicamente estos nuevos brotes se deben subcultivar en un medio de cultivo mediante divisiones y resiembras en recipientes adecuados. Estas operaciones se realizan en la cabina de flujo laminar lo que permite mantener las condiciones de asepsia.

De esta forma aumenta el número de plantas en cada subcultivo. El número de plantas a obtener dependerá de la especie vegetal y de las condiciones de cultivo y el medio de cultivo, lo que permitirá alcanzar incrementos exponenciales, considerando que todos los factores que afectan el crecimiento hayan sido optimizados (Castillo, 2005). Durante la multiplicación del material vegetal, en dependencia de la especie, se utilizan diferentes manejos para subcultivar los brotes a medio de cultivo fresco, la separación de los nuevos brotes y la disección del explante inicial separando los ápices de los segmentos nodales (Abdelnour & Muñoz, 2005) (Mendoza, Royani, & Rugini, 2007).

Medios de cultivo

El estado físico de los medios de cultivo y la formulación de las sales inorgánicas constituye un aspecto importante para el cultivo *in vitro*. Desde que se inició el cultivo de tejidos, los medios de cultivo han sido empleados en estado semisólido y líquido (Novak, 1988), con las sales inorgánicas completas o reducidas en un 50%. Esta última estrategia es muy común en las especies

forestales para controlar desórdenes fisiológicos como la hiperhidricidad (Azofeifa, 2009) (Chaturvedi & Razdan, 2004) (Souza, Dantas, Cavalcante, Tenorio, & Houllou, 2017), estudiaron el efecto de las sales completas y reducidas al 50% durante el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *Azadirachta indica* A. Juss, los autores observaron diferencias significativas entre ambos tratamientos.

La totalidad de los explantes en el medio de cultivo con las sales completas se tornaron de color marrón después de dos semanas de cultivo, mientras que en el medio de cultivo con el 50% de las sales MS el 50%, el 50% de los explantes brotaron en un medio de cultivo suplementado con 1,0 µM de 6 – BAP. En otras especies leguminosas arbóreas la gran mayoría de la literatura científica existente coincide en el empleo de medios de cultivo semisólidos para esta fase del proceso de propagación *in vitro*. Siendo estos utilizados en investigaciones descritas para *Caesalpinia echinata* Lam. (Werner, Milanez, & Mengarda, 2010), *Caesalpinia bonduc* (L.) Roxb (Cheruvathur, Britto, & Thoma, 2010) y *Caesalpinia pyramidalis* Tul. (Silva TS, 2012).

5.6 Fase de Enraizamiento o Fase III

El objetivo de esta fase es preparar las plantas para su restablecimiento en condiciones naturales, es la fase más voluminosa de todo el proceso, ya que cada brote debe manejarse de forma individual en condiciones *in vitro* para que además de crecer y formar

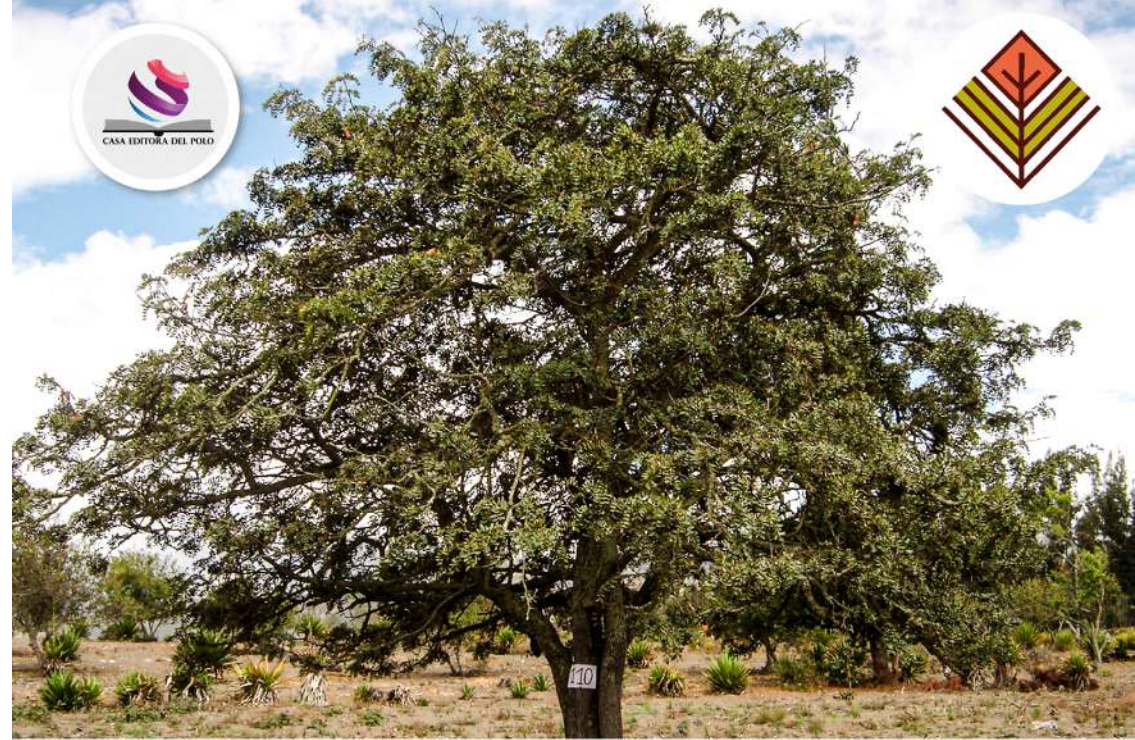
un pseudotallo o tallo, forme y desarrolle raíces que le permitan absorber los nutrientes al trasplantarlo sobre un sustrato enriquecido y convertirse en una planta aclimatizada lista para llevarse al campo (Orellana., 1998). Con bajas concentraciones de auxinas predomina la formación de raíces adventicias, mientras que con altas concentraciones de auxinas no se producen raíces y tiene lugar en cambio la formación de callo (De Souza & Grasso, 2012). En muchos de los casos las raíces que se han originado *in vitro* son vulnerables y no funcionan de forma adecuada en vivo (no tienen o tienen poco pelos radicales) por lo que mueren rápidamente debiendo ser sustituidas por nuevas raíces subterráneas. Un desarrollo pobre del sistema radical hace que el crecimiento en vivo sea lento, especialmente cuando hay una elevada transpiración. Es de vital importancia que las plantas *in vitro* pierdan la menor cantidad de agua posible cuando pasa a condiciones *ex vitro* (De Souza & Grasso, 2012). La formación de órganos, especialmente la formación de raíces adventicias y funcionales, es facilitada por un mejor suministro de oxígeno. Es un hecho comprobado que, especialmente los brotes *in vitro* de especies leñosas encuentran grandes dificultades en regenerar sus raíces, cuando estas se encuentran en agar. Por esta razón desde hace algunos años se informan trabajos donde se sustituye el agar por minerales como la vermiculita, la perlita, entre otras buscando una mayor oxigenación en la zona de formación de las raíces (Abdelnour & Muñoz, 2005) .

El efecto estimulador de las auxinas en el enraizamiento de plantas procedentes del cultivo *in vitro* de diversas especies leñosas ha sido descrito por varios autores como (Copes & Mandel, 2000) (Husen & Pal, 2003) (Lara, Wolodarsky, Aravena, Cortes, Fraver, & Silla, 2003); Blanco et al., 2004; Tacoronte et al., 2004; Billard y Lallana, 2005) recomendándose su empleo en la mayor parte de los medios de cultivo para el enraizamiento. Por su parte Azcón – Bieto y Talón (2008) señalaron que cada órgano presenta una sensibilidad diferente a la auxina, las raíces son más sensibles que las yemas, y estas más sensibles que los tallos. Así el tratamiento con una disolución $10^{-8}\mu\text{M}$ de auxina producirá un crecimiento máximo en las yemas y una ligera estimulación en los tallos, mientras que el crecimiento de las raíces estaría fuertemente inhibido. El desarrollo de una metodología de propagación *in vitro* eficiente y con bajos costos que permita obtener plantas con un sistema de raíces de alta calidad es esencial para el escalado de la propagación *in vitro* en cualquier cultivo.

5.7 Fase de Aclimatización

Esta es la fase más difícil del cultivo, cuando las plantas *in vitro* son transferidas del ambiente aséptico y rico en nutrientes del frasco de cultivo para iniciar su desarrollo en condiciones *ex vitro*. Se requiere de condiciones adecuadas y grandes cuidados para que estas no mueran por pérdida excesiva de agua o por ataque de patógenos (Martínez et al., 2005). Según Rodríguez et al. (2009) al

ser sacadas las plantas *in vitro* del frasco de cultivo o tubo de ensayo, deben ser limpiadas de todos restos del medio de cultivo con agua corriente y ser sumergidas en una solución de fungicida sistémico. Se colocarán en vasos o macetas, en una mezcla balanceada de suelo, arena y material inerte estéril, almacenadas en un invernadero bajo condiciones de humedad constante y baja radiación solar. Se requiere durante los tres primeros días, de un ambiente cercano al 95% de humedad relativa y 30% e exposición a la luz. Al cabo de unos días una vez endurecidas deben ser aclimatizadas, por lo que se trasplantan a un nuevo sustrato con suelo, arena y materia orgánica en condiciones de vivero (Posada, 2016). Durante un proceso de aclimatización, las plantas propagadas *in vitro* logran sobrevivir a condiciones *ex vitro* después del trasplante. Es importante que tengan las mismas un sistema radical funcional para garantizar no sólo su supervivencia, sino su crecimiento durante y después de la fase de aclimatización en invernadero, en vivero y posterior en el campo (Rodríguez et al., 2009).



CAPÍTULO VI

USO DE LOS REGULADORES DE CRECIMIENTO

6 Uso De Los Reguladores De Crecimiento

6.1 Generalidades

Los reguladores de crecimiento, son compuestos algunos naturales (hormonas) y otros sintéticos, que a muy bajas concentraciones, afectan los procesos de crecimiento y desarrollo en las plantas. Los tejidos *in vitro* generalmente no producen las cantidades necesarias de reguladores para suplir las necesidades de sus procesos, por lo que se hace necesario suplementar con fuentes exógenas. Las hormonas o reguladores de crecimiento clásicos son las auxinas, citocininas, giberelinas, el ácido abscísico y el etileno (Suárez, 2011).

En general, la respuesta de un tejido al cultivo *in vitro* depende en mayor medida de la interacción entre el nivel fitohormonal endógeno y el tipo y concentración de los reguladores de crecimiento en el medio de cultivo. De acuerdo con esto, cada explante o un mismo explante pero de diferentes especies, puede responder de manera distinta a una misma concentración de reguladores de crecimiento, a causa de diferencias en el contenido hormonal endógeno (Molphe-Balch et al., 1999).

6.2 Proliferación de brotes en el Cultivo *in vitro*

Las citoquininas han sido esenciales para el desarrollo de brotes ya que la elongación y el incremento en su proliferación depende de la presencia de una fuente externa de estos reguladores del crecimiento (Kim y Kim, 2002).

Autores como Cruz y Ramos (2003), Billard y Lallana (2005), Ríos et al. (2005), Quintanilla (2007) señalaron que en especies leñosas, durante la fase de multiplicación de los brotes es casi indispensable la adición de citoquininas y es el 6-BAP la más utilizada. Sin embargo, en la mayoría de las especies forestales la adición de una auxina en combinación con citoquinina mejora la proliferación y la calidad de los brotes (Nayak et al., 2007). En este sentido, Abdelnour y Muñoz (2005) indicaron que para el caso de la teca, durante la fase de multiplicación, los brotes obtenidos en la fase de establecimiento fueron cultivados en un medio de cultivo al que se le adicionó 8,8 μM de 6-BAP, sólo o en combinación con 0,098 y 0,98 μM de ácido indolbutírico (AIB), lo que indujo la mayor proliferación de brotes (4,6).

Por su parte Soni et al. (2011) señalaron después de evaluar el efecto de varias concentraciones de 6-BAP (2,22 - 4,44 μM) combinadas con 0,49 μM de AIB en un medio de cultivo MS para la inducción de brotes axilares en 'Merton I-793', un cultivar patrón para injertos en manzano (*Malus domestica* Borkh); que la mayor proliferación de brotes (85%) ocurrió en el medio de cultivo MS con 6-BAP (4,44 μM) y AIB (0,49 μM). Diferentes autores destacaron que la combinación de 6-BAP y ANA fue más efectiva para inducción de brotes en especies arbóreas como *Ficus benghalensis* L. (Munshi et al., 2004), *Acacia mangium* Willd. y *A. mangium* Willd. $\times$ *A. auriculiformis* A. Cunn. Ex Benth (Monteuuis et al., 2013).

Autores indicaron que después de evaluar el efecto de la combinación de 4,44 μM de 6-BAP y 0,54 μM de ANA; alcanzaron 2,68 número de brotes por explante con una longitud de 1,81 cm en el primer subcultivo, mientras que en el segundo subcultivo 3,26 cm brotes por explante con una longitud de 1,64 cm de longitud del brote de *Caesalpinia spinosa*. Esto permitió la producción de brotes con calidad para pasar a la fase de enraizamiento. Lo que demuestra la importancia de la combinación de ambos reguladores de crecimiento para la multiplicación *in vitro* de una especie leñosa como *C. spinosa* (figura 12).

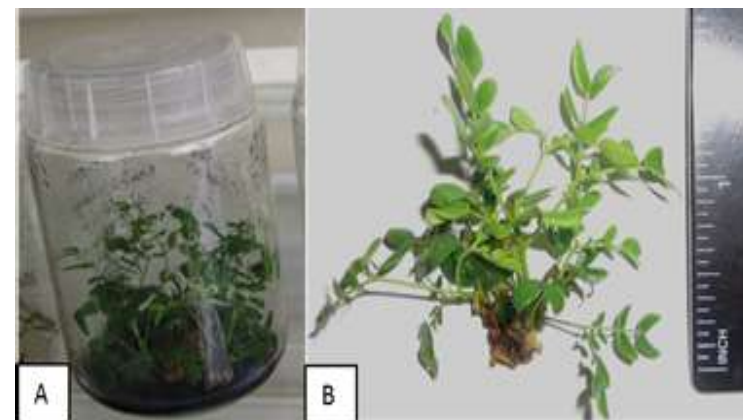


Figura 12. Brotes in vitro de *C. spinosa* en fase de multiplicación obtenidos en medio de cultivo basal MS 50% con 4,44 μM de 6-BAP + 0,54 μM de ANA a los 60 días de cultivo, subcultivo tres (A) frascos de cultivo con los brotes in vitro, (B) Brotes Axilares (Fotos: Núñez et al., 2017).

6.3 Efecto de niveles de auxinas en el enraizamiento in vitro

La formación de raíces en un brote *in vitro* es un proceso complejo que consta de al menos dos fases: la formación de los primordios de raíz a partir de ciertas células susceptibles y el crecimiento de las raíces. Ambas fases requieren de auxinas, aunque las necesidades de cada una son diferentes y depende de la especie (Acosta et al., 2008).

Los mejores resultados en el enraizamiento de las plantas *in vitro* de *C. spinosa* fue de AIB 2,45 µM, con diferencias significativas. También la altura de los explantes en relación con los demás tratamientos fue superior. Las plantas desarrollaron como media tres pares de hojas en todos los tratamientos.

De forma integral la mejor concentración de AIB para el enraizamiento de los brotes *in vitro* de *C. spinosa* fue 2,45 µM de AIB. Con valores siempre superiores o iguales con relación a los otros tratamientos. El 72% de los brotes desarrollaron raíces *in vitro* en el medio de cultivo compuesto por el 50% de las sales MS + 2,45 µM de AIB.

Al incrementar la concentración de AIB, en el medio de cultivo tuvo un efecto negativo en el número de raíces por explante. Al respecto Taíz y Zeiger (2002) refieren que altas concentraciones de auxinas no solo retarda el alargamiento celular sino que inhibe la formación de

raíces, los resultados coinciden con lo señalado por estos autores (Tabla 3, Figura 13).

Tabla 3 Efecto del AIB en el enraizamiento de brotes de *C. spinosa*, a los 60 días de cultivo (Fotos: Núñez et al., 2017).

AIB (µM)	Altura (cm)	Número de hojas	Plantas enraizadas (%)	Número de Raíces	Longitud de la raíz (cm)
0	2,32 c	3,0 a	51,5 c	1,90 c	4,10 b
1,22	2,85 b	3,0 a	60,5 b	2,25 b	5,20 a
2,45	3,58 a	3,0 a	72,0 a	3,35 a	4,40 ab
4,90	2,21 c	2,0 b	69,5 a	1,10 d	2,10 c

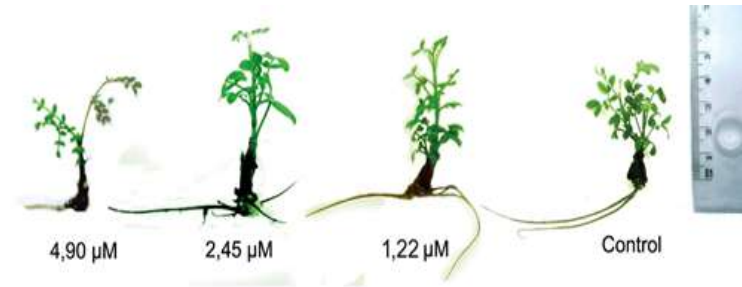


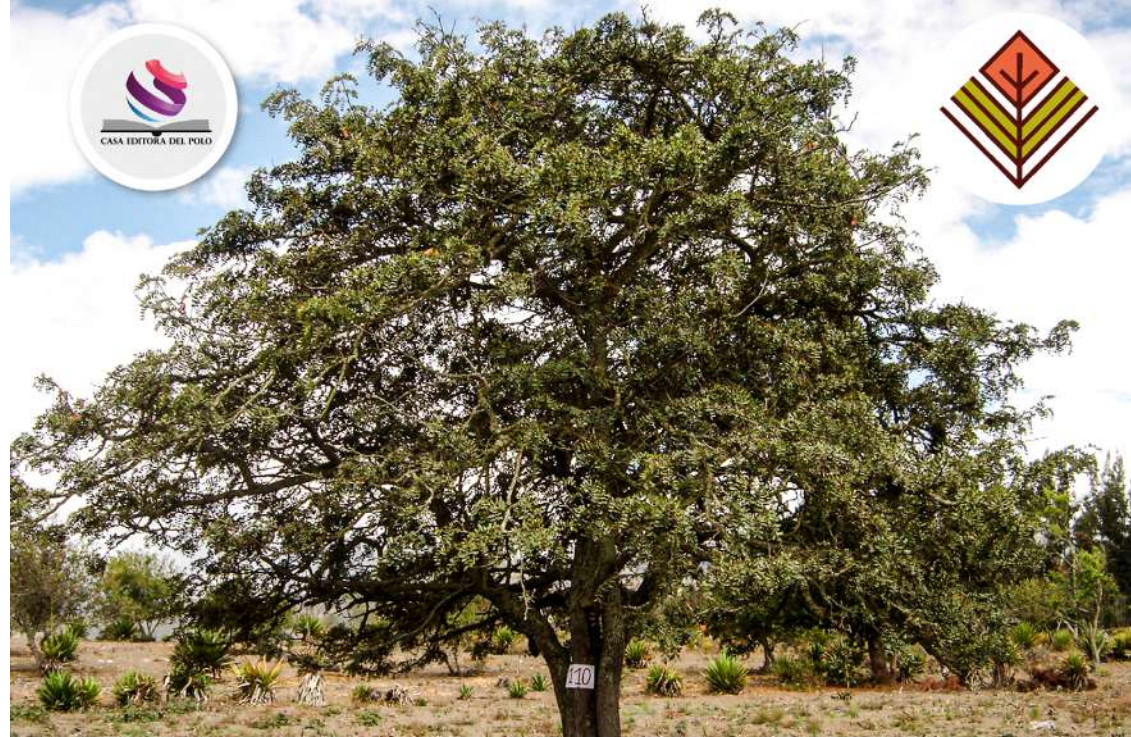
Figura 13 Explantes de *C. spinosa*

En la ilustración se presenta Explantes de *C. spinosa* en fase de enraizamiento en medio de cultivo con diferentes concentraciones de AIB a los 60 días de cultivo (Fotos: Núñez et al., 2017).

En la concentración más alta de AIB (4,90 μ M) se observó que las hojas de los brotes *in vitro*, se mostraban con folíolos pequeños y senescencia de los mismos. La abscisión de los órganos de las plantas es un fenómeno relacionado con el efecto auxínico (Taiz y Zeiger, 2002). De las auxinas, el AIB es el regulador del crecimiento en los medios de cultivo más empleado para el enraizamiento de otras especies leguminosas arbóreas.

El enraizamiento es una fase difícil durante la propagación *in vitro* de muchas especies leñosas (Custódio et al., 2004). No obstante, Ahmad et al., (2003) y Custódio et al., (2004) señalaron que tener la mayor cantidad de plantas *in vitro* con raíces es un aspecto importante para aumentar la supervivencia y el crecimiento durante la aclimatización *ex vitro* y que las pérdidas en esta fase tienen desde el punto de vista práctico un valor económico. Otros autores recomiendan usar para el enraizamiento de diversos genotipos de nogal microbrotes de 3 a 5 cm de longitud, provenientes directamente de la multiplicación y subcultivados cada tres semanas.

Se ha señalado que la perdurabilidad de las *in vitro* raíces en el tiempo, la existencia de conexión vascular de éstas con el tallo y la presencia de elementos vasculares bien estructurales son un indicador de que las condiciones bajo las que se conduce las fases de pre-inducción y de expresión radical son, como mínimo favorables.



CAPÍTULO VII

DESÓRDENES MORFO-ANATÓMICOS Y FISIOLÓGICOS ASOCIADOS AL CULTIVO *IN VITRO*.

7 Desórdenes Morfo-Anatómicos Y Fisiológicos Asociados Al Cultivo *In Vitro*.

7.1 Generalidades

El cultivo de tejidos ha sido extensamente utilizado para la rápida multiplicación de gran cantidad de especies vegetales, sin embargo el éxito comercial del mismo depende de la habilidad de transferir a condiciones *ex vitro* las plantas a gran escala, con bajos costos de producción y un alto porcentaje de supervivencia.

Las plantas durante el cultivo *in vitro* sufren cambios o anomalías que las hacen generalmente muy susceptibles al trasplante. En algunas especies forestales las pérdidas pueden ascender hasta más del 30% de las plantas producidas *in vitro*. De modo que, entender y conocer estas anomalías es prerequisite indispensable para desarrollar un protocolo de aclimatización y trasplante eficiente.

7.2 Características del microambiente que generan los desórdenes estructurales y fisiológicos.

Las plantas o brotes que se desarrollan *in vitro* están expuestas continuamente a un microambiente, creado para provocar el mínimo de estrés y estimular el crecimiento del cultivo.

Estas condiciones se caracterizan por:

Frascos de cultivos semi-herméticos

- alta humedad relativa
- limitado intercambio de gases
- escaso CO₂
- acumulación de etileno
- baja luminosidad

Medios de cultivos artificiales sobredimensionados en nutrientes

- sales minerales
- sacarosa
- reguladores del crecimiento y suplementos

Aunque, estas condiciones bajo las cuales la gran mayoría de los laboratorios realizan el cultivo de tejidos promueven el rápido crecimiento, con frecuencia también conducen a la formación de plantas con anomalías estructurales y fisiológicas. Las cuales desarrollan un genotipo incapaz de sobrevivir en condiciones ambientales cuando son directamente transferidas a condiciones de invernadero o campo.

El estudio y conocimiento de la morfo-fisiología de las plantas *in vitro*, entender mejor las señales de respuestas de estas a los cambios del microambiente. Este conocimiento permite optimizar las condiciones de cultivo *in vitro*, controlar mejor la morfogénesis y reducir los desórdenes fisiológicos, lo que incrementa la

eficiencia en la aclimatización de plantas.

Los cambios más frecuentes que se observan en las plantas propagadas *in vitro* generalmente afectan la capacidad fotosintética, la funcionalidad de los estomas, la características de la cutícula, la anatomía y la sobre-acumulación de agua en los tejidos (hiperhidricidad).

Capacidad fotosintética

La presencia de sacarosa y sales minerales que se utilizan en los medios de cultivo, sumado a los bajos niveles luminosidad y el escaso CO₂ en los frascos de cultivo, provocan una disminución de la capacidad fotosintética de las plantas cultivadas *in vitro*. Aunque en ocasiones estas plantas pueden parecer normales, en realidad tienen una actividad fotosintética baja.

En los frascos de cultivos casi herméticos el poco intercambio gaseoso genera un microambiente semi-enrarecido con una reducida disponibilidad de CO₂ atmosférico, por tanto la sacarosa suministrada de manera exógena en el MS, se convierte en la fuente primaria de suministro de carbono, lo que provoca que estas plantas no necesiten el desarrollo de un aparato fotosintético normal. Es por ello que en comparación con plántulas de semilla cultivadas en invernadero, las plantas cultivadas *in vitro* generalmente tienen menor contenido de clorofilas y carotenoides, o de enzimas responsables de la fotosíntesis, como por ejemplo la ribulosa bifosfato carboxilasa (RuBisCo), que es una

enzima clave en la fijación del CO₂ atmosférico.

En 1978 Grout y Donkin durante el estudio de plantas *in vitro* de coliflor, midieron la toma de CO₂ de estas plantas y el intercambio de gases utilizando carbono marcado con isótopos radioactivos y un analizador de gas infrarrojo. Como resultado encontraron que la toma de CO₂ era despreciable en la luz mientras las plantas estuvieron *in vitro*. Una vez transferidas a invernaderos el balance negativo de CO₂ persistió durante 2 semanas más y solo a partir de la tercera semana se registró un balance positivo de CO₂, lo cual coincidió con el desarrollo de nuevas hojas.

7.3 Funcionamiento del complejo estomático

La estructura del estoma y su mal funcionamiento se han considerado como factores que contribuyen a la excesiva pérdida de agua en las plantas cultivadas en condiciones controladas. Los estudios de microscopía electrónica indican que la estructura en las plantas cultivadas *in vitro* difiere marcadamente con las plantas cultivadas en invernadero o campo. Mientras que en las plantas *in vitro* los estomas tienen células oclusivas más redondeadas y elevadas sobre el parénquima de la hoja, las plantas de campo presentan estomas con células oclusivas elípticas y hundidas en el parénquima de la hoja.

Apertura y cierre estomático: Muchos autores describen que los estomas de las plantas *in vitro*

muestran incapacidad para cerrar adecuadamente cuando son separadas del medio de cultivo. Por ejemplo, los estomas en hojas escindidas de plantas *in vitro* de teca cultivadas en medio de cultivo semisólido con 4,44 µM de 6-BAP se observaron completamente abiertas al microscopio electrónico de barrido (MEB), estos no cerraron inmediatamente después que fueron extraídas de los frascos y expuestas al ambiente *ex vitro*. Sin embargo, las plantas procedentes de los biorreactores de inmersión temporal se observaron cerradas (Fig. 14).

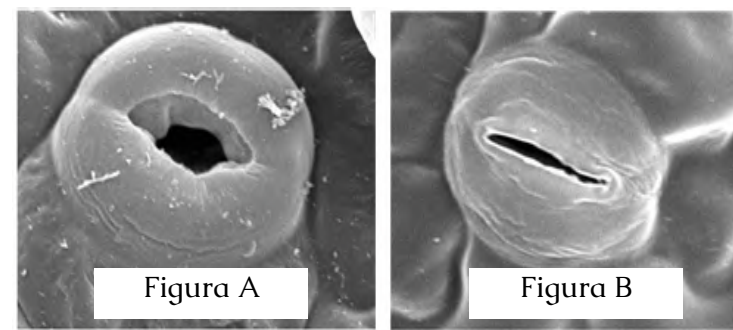


Figura 14 A) Estomas de Plantas cultivadas *in vitro* de teca (*Tectona grandis* L)

Figura A) Medio de cultivo semisólido. Figura B) Biorreactores de inmersión temporal. (Fotos: Quiala et al., 2012).

Densidad estomática: Se ha descrito que la densidad estomática en plantas *in vitro* del género *Prunus* y *Rhododendrum* aumentó después de la transferencia *ex vitro*, mientras que el tamaño del poro estomático disminuyó. **Tamaño del poro:** La dimensión del poro

estomático es controlada por el volumen relativo de las células oclusivas, correspondiente al grado de turgencia. La turgencia de las células oclusivas depende del potencial osmótico e hídrico. Por lo que el fallo de los estomas para cerrarse adecuadamente puede ser el resultado de propiedades anormales de la pared celular o de la inapropiada función del protoplasto.

Por ejemplo estudios en Crisantemo revelan que los estomas de plantas *in vitro* no se cerraron cuando fueron incubados en la oscuridad, tratados con ABA o colocados en una solución hipertónica, lo cual fue correlacionado con defectos en la estructura de la pared celular, caracterizados por una orientación anormal de las microfibrillas de celulosa. Cutícula de la hoja: La cutícula es una capa no celular superficial secretada por la epidermis y compuesta por una matriz de cutina y cera que cubre la superficie de los tejidos de la planta, su función primaria es limitar la pérdida de agua por transpiración.

La permeabilidad del agua a través de la cutícula está influenciada primeramente por la estructura y la cantidad de cera cuticular y epicuticular. De hecho, la escasa deposición de cera EPI cuticular en la superficie de las hojas de las plantas *in vitro* es considerado como uno de los factores más importantes, responsables de la excesiva pérdida de agua, que conducen a un trasplante deficiente. Por otro lado, estudios comparativos realizados en Berza, indicaron que la composición

química de la cera EPI cuticular de hojas desarrolladas *in vitro* fue diferente de aquellas en invernadero.

Se detectó en la cera de las plantas *in vitro*, una mayor proporción de esteres y compuestos polares, así como significativamente menos hidrocarburos de cadena larga que las plantas de invernadero. Los compuestos polares son menos hidrofóbicos que los hidrocarburos de cadena larga por lo que permiten una mayor permeabilidad al agua, de modo que es muy probable que esta composición química anormal contribuyera a la pérdida de agua de las plantas *in vitro*.

Anatomía: La pobre diferenciación del mesófilo y la débil vasculatura de las hojas desarrolladas *in vitro* tornan a las plantas altamente susceptibles al stress durante el trasplante. Las hojas *in vitro* son más delgadas y tienen poco desarrollo del parénquima de empalizada con significativa cantidad de espacios de aire en el mesófilo en comparación con las plantas de invernadero. Estudios comparativos realizados en hojas de plantas de ciruela propagadas *in vitro* revelaron que el parénquima tenía una sola capa de células de empalizada con grandes espacios de aire en comparación con las usuales dos o tres capas observadas en las plantas de invernadero o campo.

Los tallos de las plantas *in vitro* suelen ser más delgados y tienen considerablemente menos tejido de sostén colénquima y esclerénquima que aquellas de

invernadero o campo.

Por otro lado, las raíces *in vitro* suelen ser delgadas, cubiertas por pelos radiculares y con menos peridermo. Generalmente la conexión entre la raíz y el tallo es incompleta, lo que resulta en una ineficiente transportación de agua desde la raíz a los brotes.

Se ha descrito además que por ejemplo los hidátodos de hojas propagadas *in vitro* de fresa están abiertos, mientras que los de las plantas de invernaderos se observaban poco abiertos o cerrados. Teniendo en cuenta que los hidátodos se encontraban abiertos y exhibían síntomas de gutación, los autores sugieren que estos podrían contribuir a la pérdida de agua por la región adaxial de la hoja.

7.4 Hiperhidricidad

El cambio hiperhídrico es la culminación de varias fases en las que en distinto grado se manifiestan malformaciones y alteraciones en el normal funcionamiento de las plantas afectadas. Es reconocido como un problema serio que limita el éxito de muchos sistemas de micropropagación y aunque ocurre en muchos géneros, es más frecuente en las especies leñosas.

Las plantas cultivadas *in vitro* son sometidas a condiciones medioambientales específicas, creadas para estimular el rápido crecimiento. Sin embargo, en ocasiones estas condiciones pueden ser perjudiciales y provocar estrés: el corte de los explantes y su transferencia

a medio de cultivo fresco, el bajo potencial osmótico del medio de cultivo, que favorece el movimiento rápido del agua al interior de los tejidos, el alto contenido de compuestos nitrogenados, la alta humedad relativa y la acumulación de gases tóxicos en la atmósfera interna de los frascos de cultivo, la baja intensidad luminosa, las altas concentraciones de reguladores del crecimiento, principalmente citoquininas, las cuales pueden reprimir o modificar la respuesta morfogénica de los explantes (Franck et al., 2004).

Aunque muchas de las plantas pueden adaptarse a estas condiciones medioambientales, algunas de ellas se desarrollan anormales, con un aspecto traslúcido, debido a deficiencias de las clorofilas y al alto contenido de agua (Gaspar et al., 2002; Ziv, 1991). Este fenómeno, fue previamente conocido como vitrificación (Debergh et al., 1981) y años más tarde redefinido como hiperhidricidad (Debergh et al., 1992). Es descrito como un desorden fisiológico causado por la presencia de grandes cantidades de agua residual en los espacios apoplásticos de los tejidos. Las hojas y los tallos de las plantas hiperhídricas muestran una apariencia turgente y acuosa, sus órganos se muestran translúcidos, menos verdes y se quiebran con facilidad (Ziv, 1991).

La hiperhidricidad, bajo condiciones específicas puede evolucionar hacia la pérdida de la capacidad regenerativa, está asociado a un proceso de juvenilidad (Gaspar et al., 2002) e implica problemas

de diferenciación de los tejidos (Kevers et al., 2004). Los brotes hiperhídricos (BH) enraízan en un porcentaje bajo, generalmente no sobreviven durante la aclimatización y cuando lo hacen con frecuencia dan lugar a plantas malformadas (Hazarika, 2003).

En general, estudios morfo-anatómicos realizados en BH de *Prunus avium* L., revelan que los tallos se observan engrosados y con los entrenudos más cortos que las plantas con apariencia normal, con hojas más finas, con frecuencia muy elongadas, arrugadas, risadas y quebradizas (Gaspar, 1991). En *Simmondsia chinensis* (Link) Schn., los BH anatómicamente se caracterizan por una hipertofia en el parénquima cortical y la médula del tallo, con grandes espacios intercelulares, así como un incremento del espacio extracelular y volumen de aire. Los vasos y traqueidas en las plantas hiperhídricas no están lignificadas apropiadamente y se ha determinado un menor contenido de ligninas en comparación con los brotes normales (Apostolo y Llorente, 2000).

En hojas hiperhídricas de *Prunus avium* L., se detectó la no existencia del tejido de empalizada o este se encontraba prácticamente reducido y el mesófilo esponjoso poseía grandes espacios intercelulares (Kevers et al., 2004). En BH de *Vanilla planifolia* L., se detectaron severos daños estructurales en el domo apical y la ausencia de bandas procambiales que descendieran basipetalmente a partir del primordio de la hoja (Sreedhar et al., 2009).

Los tejidos hiperhídricos en comparación con los tejidos normales, presentan diferentes características bioquímicas, algunas de ellas relacionadas con las anomalías morfológicas descritas para este tipo de brotes (Gaspar, 1991), como son:

- Menor contenido de masa seca y mayor contenido de agua, esencialmente localizada en los espacios apoplásticos.

- Menor contenido de ligninas, asociado con una baja actividad de enzimas involucradas en la polimerización de las ligninas o en la síntesis de sus precursores.

- Menos celulosa, lo cual está asociado con una baja relación C/N favorable a la síntesis de aminoácidos que de unidades de azúcar para formar celulosa.

- Elevada actividad glutamato deshidrogenasa, lo que sugiere cambios en la composición de carbohidratos para la síntesis de aminoácidos.

- Menos clorofila, lo cual pudiera ser la causa de la apariencia traslúcida y probablemente una baja capacidad fotosintética.

- Menor contenido de fenoles.

- Elevada actividad Peroxidasa, lo cual pudiera estar asociado a un incremento del catabolismo de las auxinas. El transporte polar de la auxina es aparentemente reducido.

- Menor contenido de Ca^{2+} , Mn^{2+} y Na^{+} y más K^{+} , al

menos en clavel (*Dyanthus caryophyllus* L.)

–Reducida producción de etileno, seguido del daño oxidativo a medida que permanecen las condiciones que favorecen la hiperhidricidad.

La hiperhidricidad es un desorden multicausal y los factores que la generan están relacionados con las condiciones de cultivo *in vitro* (Debergh et al., 1992, Kevers et al., 2004). Por ejemplo, en *Prunus avium* L., la hiperhidricidad de los brotes puede ser inducida en cuatro semanas mediante el reemplazo del agar por el gelrite en el medio de cultivo (Franck et al., 1998), de forma similar ocurre con los brotes de *Alloe pollyphyla* L. (Ivanova y Van Staden, 2011). La alta humedad relativa en los frascos de cultivo de los tratamientos con menor frecuencia de ventilación forzada, favoreció la hiperhidricidad de los brotes de clavel (*Dyanthus caryophyllus* L.) (Majada et al. 1997), mientras que una ventilación óptima permitió controlar este desorden en *Scrophularia yoshimurae* L. (Tsay et al., 2006). En *Solanum tuberosum* L., el mayor número de BH observados en los sistemas de cultivo completamente hermético, estuvo asociado con una elevada concentración de etileno y CO₂ en los frascos de cultivo (Park et al., 2004). Los reguladores del crecimiento aplicados de manera exógena al medio de cultivo, principalmente las citoquininas, constituyen uno de los principales factores que generan la hiperhidricidad (Debergh, 1983).

Las citoquininas son esenciales para la morfogénesis vía organogénesis, a partir de que están asociadas con el desarrollo del aparato fotosintético de las plantas (Argita et al., 2005), estas pueden afectar de forma directa la diferenciación de los cloroplastos (Kulaeva et al., 2002; Oliveira et al., 2008), incrementar la actividad fotoquímica del fotosistema II (PSII) (Goltsev et al., 2001) y reducir la degradación de las clorofilas (Downs et al., 1997). También se ha descrito, que las citoquininas estimulan el desarrollo del sistema vascular y promueven el transporte de nutrientes (Aloni, 2001). Sin embargo, existen diferencias en la capacidad de cada tipo de citoquinina y su concentración para afectar la estabilidad de las membranas fotosintéticas (Genkov et al., 1997), la eficiencia fotosintética (Goltsev et al., 2001), la diferenciación de los cloroplastos y el contenido de clorofilas (Oliveira et al., 2008), así como la morfogénesis de los brotes (Nagori y Purohit 2004) y la aparición de desórdenes morfo-fisiológicos como la hiperhidricidad (Ivanova, 2009; Moncaleán et al., 2009; Ivanova y Van Staden, 2011).

Castro et al. (2002) describen que la hiperhidricidad en la teca se manifiesta por succulencia de los tejidos de las hojas y los tallos y apariencia vidriosa de los mismos, que disminuyen la calidad de los brotes y la eficiencia del proceso de propagación *in vitro*. Así mismo refieren durante la propagación *in vitro* de este cultivo, el estudio de diferentes concentraciones de 6-BAP para la multiplicación de los brotes y destacan que el porcentaje

de BH aumentó proporcionalmente con la concentración de esta citoquinina en el medio de cultivo y que el menor porcentaje de BH (5,0%) se obtuvo con 2,22 μM de 6-BAP.

Otros autores destacan el control efectivo de la hiperhidricidad en brotes de teca, mediante la reducción de los compuestos nitrogenados del medio de cultivo, la sustitución del agar por el gelrite, la adición de pectina y el empleo de una mezcla de auxina, citoquinina y giberelina durante la multiplicación de los brotes, así como la adición de putrescina al medio de cultivo de enraizamiento, no obstante estas estrategias si bien fueron efectivas, probablemente encarecen el proceso de propagación a escala comercial. En otros cultivos como *Actinidia deliciosa* L., la exposición de los brotes a una elevada concentración de 6-BAP (44,4 μM) indujo la hiperhidricidad de los brotes (Moncaleán et al., 2009), mientras que en *Alloe pollyphyla* L., concentraciones de 6-BAP superiores a 4,44 μM incrementaron significativamente el número de BH (Ivanova y Van Staden, 2011).

De acuerdo a Debergh et al. (1992) pueden existir varios niveles de hiperhidricidad, de manera que estos desórdenes pueden estar presente en el material vegetal, sin que exista manifestación visual en la morfología de los brotes, por lo que la apariencia vítrea sería el indicador más distintivo de la etapa final de la hiperhidricidad, el cual generalmente coincide con un grado severo de desórdenes anatómicos y fisiológicos e incluso la

pérdida de la capacidad morfogénica o la activación de la muerte celular programada (Ziv, 1991).

La hiperhidricidad, al igual que la habituación, se ha considerado como parte de una progresión neoplástica, que conduce en un corto tiempo a una pérdida de la capacidad de diferenciación celular o de regeneración de plantas y a largo plazo a un cáncer o la muerte celular (Gaspar et al., 2000). Se ha podido detectar una distribución anormal de ADN (aneuploidía y poliploidía), en células con una pérdida de la totipotencia organogénica, como por ejemplo en callos habituados e hiperhídricos de *Beta vulgaris* L. (Kever et al., 1999). También en regenerantes hiperhídricos de guisantes (*Lathyrus sativus* L.) obtenidos a partir de callos, la hiperhidricidad observada fue asociada con un contenido anormal de ADN (Ochatt et al., 2002). Sin embargo, estudios comparativos realizados mediante citometría de flujo en BH y brotes normales de *Prunus avium* L., no revelaron diferencias en el cariotipo (Franck et al., 2004). Por lo que concluyen que la hiperhidricidad no fue consecuencia de una modificación genética, sino de una respuesta fisiológica a una condición medioambiental específica.

La teoría más aceptada acerca de la causa de la hiperhidricidad sugiere que la hipolignificación de las células hiperhídricas, debido a la alteración de la actividad de enzimas peroxidasas ácidas y de la fenilamonio liasa (PAL) pudiera disminuir la presión

parietal y facilitar el contacto entre las células y el medio de cultivo, alterando el balance osmótico de la célula (Gaspar, 1991; Olmos et al., 1997). El agua retenida en los espacios intercelulares (Gribble et al., 1998) pudiera alcanzar niveles de saturación provocando hipoxia celular y bajo esta condición de estrés se ha demostrado existe daño oxidativo por peroxidación lipídica en los tejidos (Monk et al., 1989), además algunas actividades metabólicas que pueden generar H_2O_2 en las plantas (Asada y Takahashi 1987) podrían alterarse, conduciendo a la producción de niveles tóxicos de H_2O_2 y de estrés oxidativo (Olmos et al. 1997). Sin embargo, resulta difícil determinar si los BH se encuentran estresados o no y cuáles de estos cambios bioquímicos son los que causan el estado hiperhídrico y cuales son consecuencia (Franck et al., 2004).

7.5 Factores que generan la hiperhidricidad

Las causas de estas malformaciones, están todas ligadas a las características especiales del cultivo *in vitro*:

- Medios de cultivos sobredimensionados en elementos minerales, carbohidratos y elevadas dosis de reguladores de crecimiento, que producen un efecto subtóxico global;

- Condiciones de cultivo caracterizadas por una baja intensidad luminosa, una alta humedad relativa y un escaso intercambio gaseoso.

- Por otro lado tenemos factores relacionados con el material vegetal, su manejo y las características propias

de cada especie.

Material vegetal: especie, cultivar, tiempo del subcultivo, número de subcultivos.

Especie, cultivar: Se ha descrito que las especies leñosas son más susceptibles a la hiperhidricidad que las especies herbáceas. Incluso dentro de una misma especie existen cultivares más susceptibles que otros. Tiempo de subcultivo: es otro de los factores a tener cuenta, se ha descrito por diversos autores que la presencia de brotes hiperhídricos se incrementa cuando los explantes son repicados de manera muy frecuente en un tiempo relativamente muy corto en medios de cultivos que contienen fundamentalmente citoquininas. Se ha observado que en dependencia de la especie, el número de brotes hiperhídricos ha disminuido con el incremento del tiempo de subcultivo. En nuestra opinión, podríamos especular que esto se debe al agotamiento durante el tiempo de cultivo de componentes del medio de cultivo que inicialmente al estar en altas concentraciones favorecen la hiperhidricidad como es el caso de las sales nitrogenadas, los reguladores del crecimiento, etc.

Sin embargo, al disminuir la concentración de estos componentes, el explante que inicialmente emerge con síntomas de hiperhidricidad se recupera gradualmente, siendo capaz de emitir nuevos órganos con una morfofisiología normal. Número de subcultivos: El subcultivo muy frecuente del material vegetal durante largos períodos de tiempos puede provocar en algunas especies,

lo que se conoce como habituación. Principalmente ocurre en aquellas especies para las cuales se utilizan elevadas concentraciones de citoquininas. El subcultivo continuado provoca que el explante sea capaz de producir de forma endógena niveles sostenidos de citoquinina, los cuales pueden conllevar a la aparición de posteriores desórdenes estructurales y fisiológicos.

Medio de cultivo: estado físico, concentración y tipo de gelificante, el tipo y concentración de reguladores del crecimiento, concentración de sales.

Estado físico: En cuanto al estado físico del MS se ha demostrado que el medio de cultivo líquido en condiciones estáticas favorece la formación de brotes hiperhídricos en algunas especies de plantas, en comparación con los medios semisólidos. Tipo de gelificante y concentración: se ha descrito por diferentes autores que por ejemplo, el Phytigel y el Gelrite (que son productos sintéticos) inducen con más frecuencia la formación de brotes con desórdenes morfo-fisiológicos que el Agar-Agar. Por otro lado la concentración del gelificante es también importante, ya que cambia el potencial hídrico del medio, el incremento del gelificante aumenta la dureza del medio de cultivo y forma una matriz más fina que ofrece mayor resistencia al agua, lo cual hace más lento el movimiento de los componentes del MS al interior del explante, permitiendo que estos sean asimilados por el explante de forma gradual. Tipo de regulador del crecimiento y concentración: De todos los reguladores

del crecimiento las citoquininas como el BA y la Kinetina son las mayores inductoras de la hiperhidricidad en las plantas *in vitro* y dentro de las auxinas el 2,4-D. Sobre todo, cuando se utilizan en concentraciones elevadas.

Estudios realizados para determinar la influencia de diferentes factores en la proliferación de brotes y la aparición de hiperhidricidad en teca (*Tectona grandis* L.) (Quiala et al., 2014), demuestran que con el incremento de la concentración de 6-BAP se logra una alta tasa de proliferación de brotes cuando los explantes se cultivan en un medio con 6,66 y 8,88 μM de 6-BAP (5.22 y 5.56 brotes/explante, respectivamente). Sin embargo, la hiperhidricidad se incrementó proporcionalmente alcanzando valores del 25 y 35%, respectivamente en estos dos tratamientos (Tabla 4). El Gelrite favoreció la hiperhidricidad en comparación con el agar (Tabla 5) y los subcultivos sucesivos en medios de proliferación con 4,44 μM 6-BAP dieron como resultado una alta proliferación de brotes y una baja frecuencia de hiperhidricidad, pero solo hasta el 11º subcultivo. A partir de este subcultivo el número de brotes hiperhídricos se incrementa de un subcultivo a otro provocando una baja frecuencia de formación de brotes normales (Ilustración 15).

Tabla 4 Efecto de la concentración de BA sobre la aparición (número de brotes por explante) e hiperhidricidad (%) de brotes de *T. grandis*

[BA] (μM)	Proliferación (brotes/ explante)	Hiperhidricidad (%)
0.00	1.05 d	---
2.22	2.84c	10 d
4.44	4.88b	15 c
6.66	5.22ab	25 b
8.88	5.56a	35 a
± EE	± 0.62	±4.21

Los explantes de brotes se cultivaron en medio a base de MS gelificado con agar (6,6 g l⁻¹). Los datos se recogieron después de 4 semanas de cultivo. Los valores representan las medias (40 brotes por tratamiento, repetido tres veces, n=120) y EE= Error Estándar. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas determinadas por Tukey en P < 0,05

Tabla 5 Efecto del tipo de agente gelificante sobre la proliferación (número de brotes por explante) e hiperhidricidad (%) de brotes de *T. grandis*

Agente gelificante	Proliferación (brotes/ explante)	Hiperhidricidad (%)
Agar	3.70b	16 b
Gelrite	4.84a	34 a
± EE	± 1.01	±8.18

Los explantes de brotes se cultivaron en un suplemento basado en MS con 4,44 μM de BA. Los datos se recogieron después de 4 semanas de cultivo. Los valores representan las medias (40 brotes por tratamiento, repetido tres veces, n=120) y EE= Error Estándar. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas determinadas por Tukey en P < 0,05

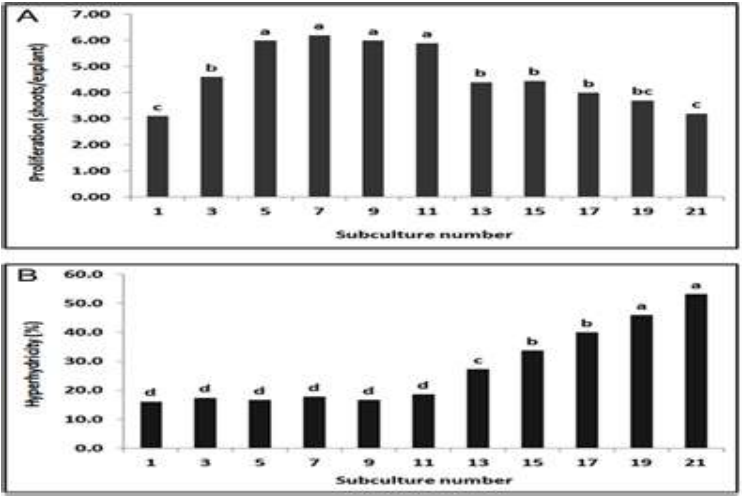


Figura 15 . A Proliferación (vástago/explante). B Hiperhidricidad (%) de brotes de *T. grandis* formados desde el subcultivo 1 al 21. Los datos se recogieron después de 4 semanas de cultivo. Los valores representan las medias (40 brotes por cada subcultivo). Letras diferentes en las barras indican diferencias significativas determinadas por Tukey en P < 0,05. (Quiala et al., 2014)

Concentración de sales: Las altas concentraciones de sales nitrogenadas inducen hiperhidricidad en las plantas *in vitro*. Según se conoce, existen diferentes

formulaciones de medios basales y en dependencia de la especie es recomendable utilizar uno u otra formulación, para evitar estas anomalías. El medio de cultivo MS por ejemplo es muy rico en sales nitrogenadas y se recomienda para casi todas las especies pero no es el ideal para la propagación de las especies leñosas; en su lugar se recomienda la formulación del medio DKW, que contiene menor concentración de compuestos nitrogenados.

Frasco de cultivo: Intercambio gaseoso, composición y concentración de gases

Composición y concentración de gases: La condición semi-hermética de los frascos de cultivos impide el intercambio gaseoso y conduce a la acumulación a niveles tóxicos de gases como el etileno, que puede inhibir el crecimiento de las plantas, provocando el descenso de los niveles de clorofila, lo cual conduce a la senescencia y la abscisión de las hojas, al tiempo que reduce la disponibilidad de O₂ para la respiración.

Ambiente: temperatura, humedad relativa, intensidad y calidad de luz.

Temperatura y humedad relativa: Una temperatura elevada provoca la formación de vapor de agua, generando una elevada humedad relativa dentro de los frascos, lo cual favorece el desarrollo de una estructura anormal, que afecta fundamentalmente el aparato fotosintético.

Intensidad y calidad de luz: la baja luminosidad durante el cultivo *in vitro* hace que las plantas desarrollen un sistema fotosintético ineficiente, incapaz de funcionar adecuadamente cuando estas son transferidas a condiciones de luz natural, cuya intensidad es 10 veces más intensa.

7.6 Estrategias para controlar o reducir la hiperhidricidad.

Composición del medio de cultivo

Reguladores del crecimiento: Se recomienda preferentemente emplear reguladores del crecimiento en concentraciones óptimas, evitando los excesos. En el caso que se utilice citoquininas emplearlas en bajas concentraciones y/o combinadas con una auxina que favorezca la diferenciación, tal es el caso del AIA, AIB o el ANA.

Fuentes de nitrógeno: La reducción al 75 o al 50% de las nitrogenadas como el NH₄NO₃ y el KNO₃ contenidas en el medio de cultivo MS ha permitido reducir hiperhidricidad.

Agentes anti vitrificantes: El empleo de agentes anti vitrificantes como el floroglucinol o agentes osmóticos como el PEG han permitido reducir la presencia de brotes hiperhídricos. Además, la adición de carbón activado también previene la hiperhidricidad en algunas especies, a partir de que contrarresta la formación de etileno.

Reducción de fuentes exógenas de Carbono: La reducción del contenido de fuentes de carbono como la sacarosa o su sustitución o combinación con otros polisacáridos como el manitol o el sorbitol han permitido controlar la hiperhidricidad en algunas especies.

Estado físico, soportes y agentes gelificantes: Se recomienda emplear el medio de cultivo líquido solo en aquellas especies capaces de adaptarse bien al mismo, usando siempre soportes como papel, algodón, etc., que impiden la completa inmersión del explante en el medio líquido evitando condiciones que provocan hipoxia e hiperhidricidad. En el caso de los agentes gelificantes se debe realizar un estudio empleando varios tipos y concentraciones para cada especie en cuestión y evitar el empleo de medios de cultivos muy blandos.

Algunos autores señalan que el cultivo de los explantes en un medio líquido estacionario por algunos días, seguido de un subcultivo sobre un medio en agar sólido, así como el uso de un medio de agar inclinado ha sido efectivo para reducir la hiperhidricidad.

Volumen de medio de cultivo: Grandes volúmenes de medio de cultivo, principalmente si este es líquido, generan la inmersión permanente del explante provocando hipoxia e hiperhidricidad, por lo que se recomienda emplear bajos volúmenes, lo suficiente para que el explante quede parcialmente inmerso en él.

Condiciones de cultivo

Incremento de la intensidad luminosa: Se recomienda incrementar la intensidad luminosa, para lo cual el empleo de lámparas tipo LED ha sido señalado recientemente como una vía muy efectiva. Tengamos en cuenta que las plantas *ex vitro* se cultivan en intensidades de luz de 50000-150000 lux ($700 - 2100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), mientras que las plantas *in vitro* se cultivan en un rango de 10 -15 veces menor.

Sistemas ventilados, enriquecimiento de la atmósfera con CO₂: El empleo de sistemas ventilados ha permitido mejorar la composición de la atmósfera interna de los frascos a partir de la renovación de la mezcla gaseosa, evitando la acumulación de gases tóxicos como el etileno. El enriquecimiento en CO₂ bajo condiciones de alta intensidad lumínica permite estimular la fotoautotrofía de las plántulas, quizá al contrarrestar la dependencia que crea la planta del carbono procedente de la sacarosa del medio de cultivo o al actuar el CO₂ como antagonista del etileno, estabilizándose por ello la actividad metabólica implicada en los procesos de lignificación.

Enfriamiento del medio de cultivo: el enfriamiento del medio de cultivo permite reducir la HR en el interior de los frascos, para lo cual los frascos se colocan en una plataforma que refresca la parte inferior del frasco para lograr que el medio este más fresco que el aire sobre él evitando la formación de vapor de agua.

Material vegetal

Manejo del explante: Para el manejo del explante es de vital importancia tener en cuenta la especie, fundamentalmente en las especies leñosas que son más susceptibles a la hiperhidricidad que las herbáceas. Incluso dentro de las propias leñosas también existen peculiaridades, por ejemplo mientras que en el eucalipto se puede repicar o separar los nuevos brotes en explantes pequeños, en la teca se debe cortar los segmentos dejando una porción de tallo mayor de 1 cm y en aquellos casos que los entrenudos estén muy unidos, separar los segmentos dejando que contenga 2 o 3 entrenudos, de esta forma los nuevos brotes que emergerán de las yemas basales del explante serán hiperhídricas, pero los que emergen de las yemas superiores serán normales. Un manejo inadecuado durante el subcultivo de los brotes de teca, tal como se aprecia en la figura de la izquierda conlleva a la formación de brotes pequeños y con una morfología anormal, mientras que un material manejado según se observa en la figura de la derecha permite obtener brotes normales.

En cuanto a la colocación de los explantes, estos deben ser introducidos a poca profundidad, evitando, siempre que sea posible, que las yemas basales entren en contacto directo con el medio de cultivo.

Número de subcultivos: Se debe evaluar el crecimiento del material vegetal durante varios subcultivos para

determinar su número óptimo. Un número excesivo de subcultivos en medios enriquecidos fundamentalmente con citoquininas, puede conllevar a la habituación del material vegetal, los cuales acumulan niveles de citoquininas endógenas que conllevan a un estado hiperhídrico. Una buena práctica suele ser disminuir los niveles de citoquinina en subcultivos alternos para desintoxicar el material vegetal y evitar la habituación.

Densidad de explantes por frasco: La elevada densidad de explantes en los frascos puede provocar menor luminosidad dentro de los frascos, hacinamiento de los explantes y el aumento de la humedad relativa dentro de los frascos favoreciendo la hiperhidricidad.

Tiempo de subcultivo: En dependencia de la especie el incremento del tiempo de subcultivo ha permitido reducir el número de brotes hiperhídricos. Por ejemplo, en el caso de la teca el incremento del tiempo de subcultivo de 28 a 35 días permitió disminuir en casi un 10% la presencia de brotes con hiperhidrosis.



CAPÍTULO VIII

CULTIVOS
FOTOAUTOTRÓFICOS
Y ACLIMATIZACIÓN
IN VITRO

8 Cultivos Fotoautotróficos y Aclimatización *In Vitro*

8.1 Generalidades

Las características anatómicas y fisiológicas de las plantas cultivadas *in vitro* obedecen en gran medida al microambiente de los frascos de cultivo. Este resulta de la interacción de diferentes factores tales como la intensidad de la luz, la concentración de dióxido de carbono (CO_2) y la composición del medio de cultivo (Kozai et al., 2005). La presencia de sacarosa y sales minerales en los medios de cultivo, sumados a los bajos niveles de luminosidad y CO_2 en los frascos de cultivo, provocan una disminución de la capacidad fotosintética de las plantas cultivadas *in vitro*. Aunque en ocasiones estas plantas pueden parecer normales, en realidad tienen una actividad fotosintética baja (Aragón et al., 2010).

En los frascos de cultivos casi herméticos el poco intercambio gaseoso genera un microambiente semi-enrarecido con una reducida disponibilidad de CO_2 atmosférico, por tanto la sacarosa suministrada de manera exógena en el medio de cultivo, se convierte en la fuente primaria de suministro de carbono, lo que provoca que estas plantas no necesiten el desarrollo de un aparato fotosintético normal (Nguyen y Kozai, 2001; Zobayed et al., 2001). Como resultado del ambiente *in vitro*, las plantas presentan una anatomía y fisiología diferente a las que son cultivadas en condiciones de campo o casas de cultivo (Pospíšilová et al., 1997; Majada

et al., 2001; Chakrabarty y Subodh, 2008). Los desórdenes afectan todos los órganos de la planta, aunque no todos tienen el mismo peso sobre el comportamiento *ex vitro*.

Según Hazarika (2003) dentro de estos desórdenes se encuentran el pobre desarrollo del aparato fotosintético, de las cutículas de las hojas y la emisión de raíces no funcionales sin conexión con los haces conductores. Kevers et al., (2004), informaron que en comparación con plántulas de semillas cultivadas en invernadero, las plantas cultivadas *in vitro* generalmente tienen menor contenido de clorofila y carotenoides, o de enzimas responsables de la fotosíntesis. Las plantas que crecen durante el cultivo *in vitro*, debido a la baja luminosidad, pueden tener afectadas la concentración de clorofilas y la eficiencia y calidad de los fotosistemas (Pospíšilova et al., 1997; Hazarika, 2003), además de irregularidades en la diferenciación y la distribución de las granas y los tilacoides en los cloroplastos. Por lo tanto las plantas cuando son transferidas a mayores intensidades luminosas tienden a tener mayores valores de fotosíntesis, la velocidad de la fotosíntesis alcanza un límite. (Miranda y Williams, 2007). Bajo condiciones *in vitro* no controladas ocurre el agotamiento del CO₂ por las plantas o la inhibición por retroalimentación negativa del Ciclo de Calvin debido a los azúcares, esto produce un excesivo flujo de electrones en las membranas de los tilacoides, lo cual causa fotoinhibición, fotooxidación y reduce la fotosíntesis neta (Fn) (Desjardins, 1995). Por sus características anatómicas y fisiológicas (estomas

poco funcionales, un pobre desarrollo del sistema radical y de la cutícula, etc.) las plantas propagadas *in vitro* necesitan ser gradualmente aclimatizadas al ambiente *ex vitro* (Hazarika, 2003; Huang et al., 2011).

Diversas son las estrategias utilizadas para mejorar la calidad de las plantas desde la etapa *in vitro*. Dentro de estas se destaca la adición a los medios de cultivos de sustancias que promueven el fortalecimiento de los tejidos, como es la adición de floriglucinol, de pectatos cálcicos, etc. (Teixeira da Silva et al., 2013; Posada, 2016). Otros investigadores cambian algunos factores del ambiente *in vitro* para favorecer que el metabolismo sea más cercano al autotrófico, como son la reducción o eliminación de la sacarosa del medio de cultivo, el incremento de la ventilación de los recipientes ya sea de forma natural o forzada, el incremento de la intensidad luminosa y el suministro de CO₂ (Kozai et al., 2005; Hazarika, 2006; Aragón et al., 2010; Posada et al., 2015). La aclimatización *in vitro* es una alternativa empleada para favorecer el desarrollo de las plantas y por ende incrementar su supervivencia. Sin embargo, la mayoría de los estudios se han centrado en las condiciones ambientales de crecimiento en la fase de aclimatización *ex vitro*. A pesar de que las condiciones de crecimiento ambientales de cultivo *in vitro* han tenido poca atención, algunos estudios indican que puede contribuir a reducir el estrés causado por las condiciones *ex vitro* y la disminución de las tasas de mortalidad observadas durante la transferencia al ambiente *ex vitro* (Huang et al., 2011).

al., 2011).

8.2 Influencia de la sacarosa y soportes porosos

La sacarosa es la molécula más transportada dentro de una planta que crece en condiciones en vivo. En estas condiciones, tanto las cantidades de nutrientes del medio de cultivo como de sacarosa disminuyen a medida que avanza el período de cultivo. De forma natural en las paredes celulares, vacuolas y citoplasma se localizan isoformas de la enzima invertasa. Como respuesta al corte realizado los explantes segregan invertasas a los medios de cultivo (Neguyen y Kozai, 2001). Esta enzima invertasa hidrolisa la sacarosa convirtiéndola en glucosa y fructosa, pero el grado de hidrólisis depende de la cantidad de invertasa secretada, la cual difiere de una planta a otra. Las plantas *in vitro* que crecen en los recipientes de cultivo convencionales se caracterizan por una tasa de fotosíntesis baja causada por las bajas concentraciones de CO₂ durante el fotoperíodo y la baja intensidad luminosa típica de las cámaras de crecimiento (Kozai y Zobayed, 2000).

Bajo estas condiciones la sacarosa debe ser incluida en los medios de cultivo para promover el crecimiento y desarrollo de los brotes. Sin embargo, su suministro en los medios de cultivos también es posiblemente el factor que más influye significativamente en la baja tasa de fotosíntesis neta de las plantas *in vitro* (Kozai et al., 2005). Las altas concentraciones de sacarosa que se utilizan en el medio de cultivo semisólido es

uno de los factores principales que provocan que las plantas *in vitro* realicen escasa fotosíntesis. Estudios realizados en plantas propagadas in vitro de rosas (*Rosa multiflora* L. 'Montse') mostraron que la fotosíntesis neta (Fn) de las plantas in vitro estuvo influenciada por las concentraciones de sacarosa en el medio de cultivo; los niveles más altos de Fn se producían en aquellas cultivadas con los niveles más bajos de sacarosa Capellades et al. (1991); Jo et al. (2009) evaluaron el efecto de diferentes concentraciones de sacarosa (0-90 gL⁻¹) en el crecimiento in vitro de *Alocasia amazónica* y su repercusión en la fase de aclimatización. El incremento de la sacarosa en concentraciones superiores a 30 g L⁻¹ durante la fase *in vitro*, afectó la fotosíntesis y la posterior supervivencia de las plantas. Autores como Kozai (2010) mostraron que la mayoría de plantas cultivadas *in vitro* pueden crecer foto autotróficamente en un medio de cultivo sin sacarosa, demostrando por primera vez que estas condiciones ambientales son favorables para la fotosíntesis.

En estudios realizados en plantas *in vitro* de uva (*Vitis vinífera* L.) otros autores encontraron que la alta intensidad luminosa incrementó la capacidad fotosintética y el subsiguiente mejoramiento de la supervivencia de las plántulas durante la aclimatización. Resultados similares se han observado con elevadas concentraciones de CO₂ (Seon et al., 2000). Adicionalmente varios autores informaron que la adición de sacarosa en el medio de cultivo inhibió la fotosíntesis

en las hojas desarrolladas *in vitro* (Seon et al., 2000; Van Huylenbroek et al., 2000). También se implementaron exitosos sistemas foto autotróficos para el incremento de la actividad fotosintética y el crecimiento de las plantas mediante el incremento de la concentración de CO₂ y de la intensidad luminosa en los recipientes de cultivo (Kozai et al., 2005). Además para incrementar la capacidad de supervivencia durante la aclimatización, autores como Nguyen et al. (1999) recomiendan el uso de soportes porosos con adición de medios de cultivos líquidos en lugar del medio de cultivo convencional gelificado con agar, para permitir la formación de raíces *in vitro* con el desarrollo de un sistema vascular eficiente.

Las plantas que crecen en estos sistemas han sido bien caracterizadas por varios parámetros de desarrollo y crecimiento incluido la masa fresca y seca de la biomasa acumulada (Cristea et al., 1999), la tasa de fotosíntesis neta (Heo y Kozai, 2001; Valero-Aracama et al., 2001), el desarrollo de la cutícula y el funcionamiento estomático (Zobayed et al., 2004) y el contenido de carbohidratos (Gallardo et al., 2004). El uso de soportes porosos ha permitido mejorar el enraizamiento *in vitro* y el desarrollo autotrófico en varias especies cultivadas *in vitro*. Zobayed et al., (2005) describen el uso de Florialita (vermiculita y fibra de celulosa) durante el cultivo foto autotrófico de *Ipomoea batatas* L. Couceiro et al.(2006) destacan el uso de este mismo sustrato para el cultivo foto autotrófico de plantas *in vitro* de *Hypericum perforatum* L. Otros autores como Posada et al. (2015) señalan el

uso de la zeolita como soporte para la aclimatización *in vitro* de plantas regeneradas de embriones somáticos de *Carica papaya* L. El PRO-MIX es un sustrato de cultivo a base de turba de Sphagnum mezclado con vermiculita.

La textura fibrosa de la turba utilizada favorece el crecimiento rápido de las raíces y permite mantener un óptimo equilibrio aire/agua. Además la adición de un agente humectante favorece la absorción y la difusión del agua. Sphagnum es el género más abundante dentro de las briófitas, teniendo una importancia considerable para la ecología y economía mundial. Un aspecto peculiar de los musgos de este género es la baja tasa de descomposición del material muerto; por lo anterior, las plantas muertas se acumulan como turba. Entre las varias razones del porqué ocurre esto se encuentra la baja concentración de nitrógeno en estas plantas, comúnmente menos del 1% de la materia seca (Tapia, 2008). El pH del PRO-MIX oscila entre 5,5 y 6,5, su valor de conductividad eléctrica se encuentra 1,3 y 2,0 dSm⁻¹. La porosidad de este sustrato se encuentra en un intervalo entre 15 y 20% (del volumen); con una capacidad de retención de agua entre 70 y 90% (del peso del sustrato seco). La densidad aparente del PRO-MIX es de 0,13 a 0,16 g cm³ (Premier PRO-MIX, 2008).

8.3 Efecto de la ventilación

La ventilación es un problema porque la tecnología de cultivo de tejidos está inexplicablemente ligada a la necesidad de la esterilidad y la prevención de la

deshidratación. La hermeticidad de los frascos de cultivo y el medio de cultivo rico en nutrientes que contienen, reducen drásticamente el intercambio de gases. A pesar de la importancia evidente del medio gaseoso para los cultivos *in vitro*, es un componente a menudo que no se tiene en cuenta en muchas de las metodologías de propagación. Esta deficiencia puede tener consecuencias no deseadas para el rendimiento del cultivo debido al fuerte impacto fisiológico de los gases involucrados, especialmente O_2 , CO_2 y C_2H_4 (Zobayed et al., 2004). El crecimiento de las plantas *in vitro* puede verse seriamente afectado por la composición gaseosa de la atmósfera *in vitro* (Kozai y Zobayed, 2000). Para las plantas cultivadas en frascos de cultivos cerrados la mayoría del período de luminosidad transcurre con una fotosíntesis neta relativamente baja, lo que retarda el crecimiento autotrófico e influye negativamente en la aclimatización de las plantas. El uso de los vasos herméticos puede prevenir la contaminación microbiana en cultivos *in vitro*. Sin embargo, el uso de tales recipientes de cultivo crea un ambiente enrarecido, una alta humedad relativa (HR) y la condensación de agua en la superficie interna del recipiente. La alta HR en los recipientes de cultivo es en parte responsable de trastornos fisiológicos y morfológicos, como la falta de formación de cera epicuticular o la hiperhidratación de las plantas cultivadas *in vitro* (Aitken-Christie et al., 1995). Por lo tanto, se conoce que la reducción de la HR en el recipiente de cultivo previene la hiperhidricidad,

las plantas bajo estas condiciones forman *in vitro* una cera normal y desarrollan estomas funcionales. Así, la aclimatización en la fase *ex vitro* puede reducirse o incluso eliminarse (Nguyen y Kozai et al., 2005).

El sistema de cierre de los recipientes generalmente utilizando en el cultivo de tejidos *in vitro* son de tapas de rosca, láminas de aluminio, membrana de plástico transparente, tapas de polipropileno o plásticas, etc., las cuales restringen el intercambio gaseoso entre el recipiente de cultivo y el ambiente exterior. En la actualidad, existe mayor interés en la aireación de los recipientes de cultivo, ya que se ha demostrado que los sistemas con mayor aireación ofrecen mayores ventajas para el desarrollo de los cultivos que el sistema convencional de tapas de rosca (Zobayed et al., 2001). Mediante el uso de recipientes de cultivos ventilados (ventilación natural o forzada), el agotamiento de CO_2 durante el fotoperíodo puede reducirse considerablemente, y dependiendo del tamaño de las plántulas, las concentraciones de CO_2 durante el fotoperíodo puede reducirse considerablemente, y dependiendo del tamaño de las plántulas, las concentraciones de CO_2 se pueden mantener cerca de la concentración atmosférica. Los sistemas ventilados de ventilación natural o forzada también reducen adecuadamente la acumulación de CO_2 en el período oscuro. La concentración de CO_2 puede incluso enriquecerse por encima de la atmósfera muy fácilmente mediante el aumento de las concentraciones fuera de los recipientes, lo que permite aumentar la

fotosíntesis dando incluso mayor rendimiento del cultivo (Kozai et al., 1999; Zobayed et al., 2000). Los recipientes pueden ser aireados mediante el uso de membranas de filtros microporosas, utilizando películas delgadas difusibles tales como películas de polipropileno o con aireación forzada utilizando bombas de aire (Zobayed et al., 2000). Autores como Nguyen y Kozai (2005) demostraron que el uso de sistemas ventilados permite la exitosa propagación *in vitro* de varias especies leñosas en condiciones fotoautotrófica, como es el caso de Acacia (*Acacia mangium* Willd.), bambú (*Thyrsostachys siamensis* Gamble), Eucalyptus (*Eucalyptus* sp.), Gmelina (*Gmelina arborea* Roxb.), mangostán (*Garcinia mangostana* L.), Nim (*Azadirachta indica* A. Juss), paulonia (*Paulownia fortunei* Siebold y Zucc.) y pino (*Pinus radiata* D. Don). Otros autores como Iarema et al. (2012) señalan el cultivo fotoautotrófico de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen mediante el incremento de la ventilación de los frascos con membranas microporosas. El estudio de estas condiciones en el cultivo basados en el uso de soporte poroso, el incremento de la ventilación con el uso de membranas microporosas combinado con la eliminación de la sacarosa del medio de cultivo pudiera permitir el desarrollo de un sistema de propagación *in vitro* fotoautotrófico en el guarango para lograr plantas que sobrevivan con un alto porcentaje en la transferencia de las condiciones *in vitro* – *ex vitro*.

8.4 Actividad práctica

Experimento para determinar el efecto de la sacarosa, tipos de soportes y la ventilación de los frascos de cultivo en el enraizamiento y la aclimatización *in vitro* de brotes de *Caesalpinia spinosa*.

Todos los brotes *in vitro* empleados en este experimento provenientes del tercer subcultivo de multiplicación tenían una altura entre 2,0–2,5 cm, a los cuales solamente se les habían dejado las tres últimas hojas apicales. Estos brotes fueron colocados en frascos de cultivo de vidrio de 250 mL de volumen total que contenía medio de cultivo preparado con las sales MS al 50% de su concentración, carbón activado 2,0 g L⁻¹, con dos concentraciones de sacarosa (0 y 30 g L⁻¹). Como soportes se emplearon agar 7,0 g L⁻¹ y el sustrato PRO-MIX (compuesto por la mezcla de turba negra Sphagnum, vermiculita, cal dolomítica, calcítica y agente humectante. A los frascos de cultivo de los tratamientos con PRO-MIX se les añadieron 30 g del mismo, esterilizado previamente en estufa a 180°C durante 20 min y 30 mL de agua desionizada estéril. Los frascos de cultivo fueron cubiertos con tapas de polipropileno transparente sin orificio, con uno y tres orificios de 8 mm de diámetro, para incrementar el intercambio gaseoso. En los orificios se colocaron filtros de ventilación, consistentes en discos adhesivos con microporos (TQPL, Reino Unido). Los mismos consistieron en una membrana permeable con porosidad de 0,45 µm (Figura 16). El diseño de los diferentes

tratamientos empleados se muestra en la Tabla 6.



Figura 16 Frascos de cultivo con brotes *in vitro* de guarango (*C.spinosa*) sin filtro, con uno y tres filtros de ventilación en la tapa (Fotos: Núñez et al., 2017).

Tabla 6 Tratamientos empleados para el estudio de las condiciones foto mixotróficas y foto autotróficas de los brotes in vitro de *C.spinosa* (Fotos: Núñez et al., 2017).

Tratamientos	Ventilación	Sacarosa (g L ⁻¹)	Agar (g L ⁻¹)	PRO-MIX® (g L ⁻¹)
1 (control)	sin filtro	30	7	0
2	1 filtro	30	7	0
3	3 filtros	30	7	0
4	sin filtro	0	7	0
5	1 filtro	0	7	0
6	3 filtros	0	7	0
7	sin filtro	0	0	30
8	1 filtro	0	0	30
9	3 filtros	0	0	30

La humedad relativa (HR) medida con el empleo de un termohigrómetro portátil con sonda externa (EM 886, PCE-Instruments, Alemania) dentro del frasco de cultivo con un filtro fue de 73 – 76%, mientras que en los frascos con tres filtros fue de 65 – 68%. En los frascos de cultivo cubiertos con igual tapa plástica transparente sin orificios la humedad relativa medida en el interior fue de 85 – 90%. Se utilizaron 15 frascos de cultivo con tres plantas in vitro cada uno por cada tratamiento. A los 60 días de cultivo se realizaron las evaluaciones de indicadores morfológicos y fisiológicos de las plantas in vitro.

8.5 Respuesta morfológica y fisiológica en el cultivo *in vitro* de *Caesalpinia spinosa* (Mol.) O. Kuntz, en condiciones foto mixotróficas y foto autotróficas

En los tratamientos sin sacarosa y sin ventilación utilizando como soporte agar, los brotes *in vitro* no sobrevivieron a estas condiciones de cultivo (Figura 17D). Esto pudo ser debido a la baja concentración de CO₂ dentro del frasco de cultivo, el cual no tenía orificio en su tapa, lo que impidió que los brotes realizaran fotosíntesis, a pesar de la ausencia de la sacarosa en el medio de cultivo. Lo mismo ocurrió en el tratamiento empleado el PRO-MIX como fuente de carbono (turba negra mineralizada) y soporte, sin ventilación (Figura 17G). Estos resultados demostraron la importancia de la ventilación de los frascos de cultivo en el crecimiento in vitro de los brotes de *C.spinosa* (Figura 17B,C,E,F,H,I). A

pesar de la presencia en el tratamiento con PRO-MIX de turba negra, no fue suficiente el aporte como fuente de carbono, al estar la misma más mineralizada que una turba rubia. Es necesario una fuente de carbohidratos en el medio de cultivo (Figura 17A) o una mayor concentración de carbono inorgánico (CO_2) para el crecimiento y enraizamiento de los brotes *in vitro* de esta especie. Al respecto Rodríguez et al. (2016) señalaron que los niveles de CO_2 en el interior de los frascos de cultivo fueron influenciados por la capacidad de intercambio gaseoso de los mismos. Por todo lo anterior, a partir de estos resultados se hace referencia en lo adelante a los tratamientos con PRO-MIX sin sacarosa y con incremento de la ventilación (uno y tres orificios con filtro) como condiciones de cultivo foto autotróficas.



Figura 17. Plantas in vitro de *C. spinosa* cultivadas en diferentes condiciones fotomixotróficas y fotoautotróficas a los 60 días de cultivo. (A) Agar con 30 g L⁻¹ de sacarosa y sin filtro de ventilación (control). (B) Agar con 30 g L⁻¹ de sacarosa y un filtro de ventilación. (C) Agar

con 30 g L⁻¹ de sacarosa y tres filtros de ventilación. (D) Agar sin sacarosa y sin filtro de ventilación. (E) Agar sin sacarosa y un filtro de ventilación. (F) Agar sin sacarosa y tres filtros de ventilación. (G) Sustrato PRO-MIX sin filtro de ventilación. (H) Sustrato PRO-MIX y un filtro de ventilación. (I) Sustrato PRO-MIX y tres de filtros ventilación (Fotos: Núñez et al., 2017).

El mejor tratamiento para el enraizamiento y la aclimatización *in vitro* se logró en condiciones foto autotróficas de cultivo (frasco de cultivo con tres filtros y PRO-MIX como soporte) previo pulso con AIB a los brotes *in vitro*. Este tratamiento presentó valores iguales y superiores con diferencias significativas con la mayoría de los tratamientos para todas las variables evaluadas, exceptuando el tratamiento con PRO-MIX con solo un filtro de ventilación, al cual superó en variables importantes como la altura y el número de raíces. En estos tratamientos se alcanzó un 100% de enraizamiento con 60 días de cultivo (Tabla 7 y Figura 17).

Tabla 7 Efecto de las condiciones foto autotróficas y foto mixotróficas

Sacarosa (g L ⁻¹)	Filtro	Soporte	Altura (cm)	No. de hojas	Área Foliar (cm ²)	Enraizamiento (%)	Longitud de la raíz (cm)	Número de raíces brote
30**	0	Agar	3,20 c	4,00 a	2,31 c	55,6 c	4,45 a	3,15 b
30	1	Agar	3,30 bc	4,00 a	2,37 c	64,4 c	4,50 a	3,20 b
30	3	Agar	3,55 b	4,00 a	3,16 b	85,6 b	4,60 a	3,45 b
0	1	Agar	2,45 d	3,00 b	1,18 d	26,7 d	1,30 c	1,20 c
0	3	Agar	2,60 d	3,00 b	2,06 c	31,1 d	2,60 b	1,60 c
0	1	P	3,60 b	4,00 a	4,63 a	100,0 a	4,70 a	3,50 b
0	3	P	3,95 a	4,00 a	4,37 a	100,0 a	4,92 a	4,25 a

Control*Medias con letras distintas en una misma columna difieren significativamente según prueba de H de Kruskal-Wallis/U de Mann-Whitney ($p \leq 0,05$; $n=45$), $P=PRO-MIX$. Tabla 7. Efecto de las condiciones foto autotróficas y fotomixotróficas sobre el enraizamiento y la aclimatización in vitro de plantas de Guarango (*C.spinosa*) en frascos de cultivo con diferentes niveles de ventilación a los 60 días de cultivo (Fotos: Núñez et al., 2017).

Los mejores resultados alcanzados en el tratamiento formado por frascos de cultivo con tres filtros de ventilación, PRO-MIX como soporte (condiciones fotoautotróficas) pueden tener una explicación en las condiciones de cultivo *in vitro* requerida por esta especie leñosa. Todo parece indicar que *C.spinosa* necesitó para su crecimiento y enraizamiento una fuente de carbono (CO₂ atmosférico), esto se logró con el incremento de la ventilación del frasco de cultivo, lo que probablemente permitió una adecuada concentración de CO₂ para que las plantas realizaran la fotosíntesis y por ende un mayor crecimiento y enraizamiento *in vitro*.

Estos resultados no han sido informados hasta el presente en la literatura científica nacional e internacional para esta especie.

De acuerdo con Kitaya et al. (2005), el uso de membranas permeables para la ventilación de los frascos en el cultivo *in vitro* permitió mejorar la ventilación

natural de los frascos de cultivo y provee una adecuada concentración de CO₂, lo cual incrementa la fotosíntesis y las tasas de crecimiento. Estos resultados concuerdan con los descritos por Iarema et al. (2012) durante el estudio del efecto de la sacarosa y el incremento de la ventilación de los frascos en el cultivo *in vitro* de la especie ginseng brasileño [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. Estos autores destacaron que en presencia o no de sacarosa el incremento de la ventilación de uno a dos orificios con membranas porosas mejoró el crecimiento de las plantas *in vitro* y el porcentaje de enraizamiento.

La importancia del desarrollo del sistema radical estriba en el éxito que posteriormente presentarán las plantas *in vitro* en la fase de aclimatización *ex vitro*. Según los bajos porcentajes de producción de raíces de las plantas y una baja fuente de humedad para las raíces son considerados como las principales causas de pérdidas de plantas durante la fase de aclimatización *ex vitro*.

Para los bajos porcentajes de enraizamiento y área foliar mostrados en los dos tratamientos con agar como soporte, sin sacarosa e incrementos de la ventilación (condiciones fotoautotróficas) una posible explicación a los resultados alcanzados pudo ser debido al empleo del agar como gelificante. Este no favoreció el desarrollo de las raíces. Por una parte la matriz que formó el agar es poco porosa, lo que pudo limitar el flujo de gases, aún cuando se utilizaran tres filtros de ventilación. Estas

condiciones la ventilación pudiera ser insuficiente para suministrar la fuente de energía inorgánica necesaria para el crecimiento y enraizamiento de los brotes *in vitro*. En el cultivo *in vitro* la sacarosa sigue siendo la fuente de energía principal, pero al estar ausente en el medio de cultivo fue limitante para que las plantas formaran raíces, por lo que evidencia la necesidad en el medio de cultivo de una fuente de energía para poder lograr la formación de estas. También esto pudo provocar que las plantas tuvieran un pobre crecimiento (2,45 a 2,60 cm de altura), lo cual debió dificultar el efecto fuente-demanda para que el fotoautotrofismo potenciara el estímulo enraizador con el pulso de auxina.

Contrario a lo que ocurrió en los tratamientos con el sustrato PRO-MIX® como soporte, condiciones de cultivo fotoautotróficas con incremento de la ventilación. En ambos tratamientos, incluso con un filtro de ventilación se logra estimular el desarrollo de la planta y la formación de raíces, lo cual podría estar dado porque el sustrato PRO-MIX® no es un material totalmente inerte, está compuesto por micro y macroelementos, así como por vermiculita, la cual es una arcilla muy rica en potasio; esto sumado a que el sustrato es poroso y que pudo haber permitido un mejor flujo de gases en la zona radical, son factores que probablemente facilitaron el efecto fuente-demanda para que el fotoautotrofismo potenciara el estímulo enraizador con el pulso de auxina, favoreciendo el crecimiento de las raíces y la absorción de nutrientes.

Al respecto Xiao et al. (2011) señalaron que las especies leñosas son generalmente difíciles de enraizar por lo tanto materiales de soporte tales como vermiculita y Florialita® podrían ser beneficiosos para estos cultivos. También Khan et al. (2002) informaron que lograron un mayor crecimiento de los brotes *in vitro* de *Eucalyptus tereticornis* Smith cultivados en condiciones fotoautotróficas con Florialita® (mezcla de vermiculita y fibra de celulosa) como soporte, que aquellos que fueron cultivados en iguales condiciones, pero con el empleo de agar. Los resultados de la presente investigación fueron similares a los señalados por estos autores.

De acuerdo a Afreen-Zobayed et al. (2000) la naturaleza del material de soporte para enraizar ejerce una considerable influencia sobre el crecimiento y calidad de las plantas *in vitro*. La sustitución del gel de agar convencional por materiales porosos mejoró significativamente al ambiente radical y por tanto a las características anatómicas de las raíces.

En el cultivo *in vitro* de la orquídea *Laelia anceps* Lindl, Sánchez (2009) informó que al evaluar el efecto en el crecimiento y enraizamiento de los brotes in vitro del sustrato PRO-MIX® y agua desionizada en comparación con la fibra de coco y las sales MS al 100% de su concentración, sin sacarosa y en estado líquido se obtuvieron resultados superiores con este sustrato en varias de las variables evaluadas. El PRO-MIX® por los nutrientes inorgánicos que aportó (macros y

micronutrientes) fue superior a las sales MS para las variables altura, longitud de raíz y masa seca de raíz sin embargo, las sales MS fueron superiores para la masa fresca de la parte aérea.

Según este autor el sustrato PRO-MIX® aportó altos niveles de fósforo, calcio, hierro, cobre, manganeso y boro, segundo en magnesio, zinc, sodio y poco potasio. La mezcla de la turba con la vermiculita permitió un buen desarrollo de las raíces de las plantas in vitro de la orquídea. En la presente investigación el PRO-MIX® fue capaz de contribuir con sales minerales, además de servir de soporte, lo cual unido a un incremento en la ventilación de los frascos de cultivo favoreció el crecimiento y mayor enraizamiento de los brotes *in vitro* de *C. spinosa* a partir de la mezcla de turba negra de musgo y vermiculita.

No obstante, la presencia de sacarosa en el medio de cultivo (30 g L⁻¹) combinado con tres filtros de ventilación de los frascos de cultivo favoreció el enraizamiento de las plantas, aunque con valores inferiores (85,6%) a los tratamientos con PRO-MIX® sin sacarosa y con uno y tres filtros (100%).

El uso del sustrato PRO-MIX® con uno y tres filtros de ventilación mostraron los mayores valores para la variable área foliar con diferencias significativas con respecto al resto de los tratamientos (Tabla 7).

En los dos tratamientos con PRO-MIX® (condiciones fotoautotróficas) las plantas in vitro desarrollaron hojas

compuestas, con dos pares de pinnas y cinco pares de foliolos (figura 18A), superiores a las plantas cultivadas en condiciones fotomixotróficas (con sacarosa y agar) y fotoautotróficas con agar, lo que indicó un mayor desarrollo y similitud con las plantas que crecen in vivo (Figura 18B).



Figura 18. Hojas de plantas de *C. spinosa*. (A) Cultivadas in vitro en diferentes condiciones de cultivo fotomixotróficas y fotoautotróficas, a los 60 días de cultivo. (B) Hoja de planta en vivero con 30 días de cultivo después de la germinación (Fotos: Núñez et al., 2017).

Los resultados observados son similares a los informados por otros autores en diferentes especies de plantas cultivadas en condiciones fotoautotróficas. Afreen-Zobayed et al. (2000) señalaron que en plantas de boniato [*Ipomoea batatas* L. (Lam)] empleando la vermiculita como soporte, se estimuló significativamente el crecimiento de las hojas (área foliar) respecto al control en agar. En la orquídea *Doritaenopsis Guillaumin*, Shin et al. (2013) refirieron que las condiciones fotoautotróficas

e incremento del CO₂ en el frasco de cultivo, también alcanzaron los mejores resultados respecto al cultivo en condiciones mixotróficas para las variables área foliar y largo de la hoja.

Iguals resultados fueron informados por Posada et al. (2015) para el cultivo in vitro de papaya (*Carica papaya* L. cv. *Maradol Roja*) en condiciones fotoautotróficas de cultivo. Estos resultados fueron también similares a los informados por Rodrigues et al. (2016) en la especie *Billbergia zebrina* L. estudiando condiciones de cultivo fotoautotróficas con agar como soporte y orificios con filtros de ventilación en los frascos de cultivo.

No obstante, según Fuentes et al. (2009) no siempre las condiciones de cultivo fotoautotróficas son adecuadas para el crecimiento de algunos cultivos como fue el caso del cocotero (*Cocos nucifera* L.) donde sin la presencia de sacarosa en el medio de cultivo las plantas in vitro tuvieron un área foliar pequeña con respecto a las cultivadas con sacarosa. Al respecto Jo et al. (2009) refirieron un mayor desarrollo foliar en plantas de malanga ornamental (*Alocasia amazónica* L.) creciendo en condiciones fotomixotróficas (con sacarosa y agar) que aquellas cultivadas en condiciones fotoautotróficas (sin sacarosa y agar).

Sin embargo, Iarema et al. (2012) señalaron que no encontraron diferencias significativas en el área foliar de plantas de ginseg brasileño entre tratamientos con

condiciones fotomixotróficas y fotoautotróficas de cultivo con incremento de la ventilación.

El sustrato PRO-MIX® el cual es una mezcla de turba negra y vermiculita jugó también un importante papel en los resultados obtenidos. Al respecto, Fujiwara y Kozai (1995) señalaron que el uso de material poroso de soporte como la vermiculita mejoró el ambiente en la zona de la raíz y por lo tanto incrementó el porcentaje de enraizamiento y el número de raíces por planta.

En relación con lo anterior Imbrogno (2007) informó que el número de raíces formadas *in vitro* es una variable relevante en el enraizamiento y el trasplante a las condiciones *ex vitro* donde tiene una enorme influencia en el mantenimiento del estatus hídrico de las plantas y por ende, su supervivencia sobre todo en casos de estrés hídrico. Esto tuvo una influencia clave en los resultados alcanzados en la supervivencia en condiciones *ex vitro* de cultivo del guarango.

Diferentes materiales porosos como soporte en el cultivo *in vitro* en sustitución del agar para mejorar las condiciones de cultivo *in vitro* se han utilizado como la vermiculita; Sorbarod® (tapón de celulosa); Florialita® (mezcla de vermiculita y fibra de celulosa); lana de roca, Xiao et al., (2011); zeolita, Posada et al., (2015).

Una alta porosidad del soporte empleado incrementó la concentración de oxígeno alrededor del sistema de raíces, lo cual mejoró el desarrollo de las raíces e

incrementó la absorción de agua y nutrientes por las plantas *in vitro*. Además, el extenso sistema de raíces que se produce *in vitro* bajo estas condiciones parece contribuir al mayor porcentaje de supervivencia de las plantas durante la aclimatización *ex vitro*. Los resultados de estos trabajos señalan la importancia del uso de la vermiculita como soporte para mejorar el enraizamiento de los brotes *in vitro* ya que protege a la auxina de la descarboxilación por la acción de la luz y además incrementó la concentración de oxígeno en la zona de formación de la raíz favoreciendo su crecimiento (Xiao et al., 2011).

La turba a partir del musgo Sphagnum aportó nutrientes minerales a los explantes por su composición y aportó oscuridad en la zona de las raíces, lo que evitó la degradación de la auxina por la luz. Según Aubé et al. (2015) la textura fibrosa de la turba utilizada favoreció el crecimiento rápido de las raíces y permitió mantener un óptimo equilibrio aire/agua. La presencia de un agente humectante favoreció la absorción y la difusión del agua, lo cual pudo haber influido en el 100% de enraizamiento obtenido en las plantas *in vitro* de guarango cultivadas en el sustrato PRO-MIX®.

Los resultados obtenidos demuestran la efectividad de las condiciones de cultivo fotoautotróficas empleando PRO-MIX® como sustrato y que la turba no fue utilizada por los brotes *in vitro* como fuente de carbono. Estas condiciones se favorecieron aún más con el incremento de

la ventilación de los frascos de cultivo, lo que de conjunto probablemente favoreció el efecto fuente-demanda para que se potenciara el estímulo de la auxina sobre el crecimiento y la rizogénesis.

8.6 Determinación de la masa fresca, seca y el contenido de agua

Los mejores resultados para las variables masa fresca y seca se obtuvieron en ambos tratamientos con PRO-MIX®, sin diferencias significativas entre estos, pero sí con el resto de los tratamientos evaluados. La ausencia de sacarosa en aquellos tratamientos donde se utilizó el medio de cultivo gelificado con agar (condiciones fotoautotróficas) afectó la masa fresca y seca de los brotes *in vitro*, lo cual ocurrió en menor medida en los brotes cultivados en presencia de sacarosa. No obstante, el incremento de la ventilación bajo estas condiciones solo provocó un aumento significativo en estas variables para las plantas *in vitro* cultivadas con sacarosa y tres filtros (Figura 7A y B).

El mayor incremento en cuanto a masa fresca y seca de las plantas *in vitro* se obtuvo en ambos tratamientos con PRO-MIX®, lo que pudo corresponder con un mayor crecimiento y acumulación de solutos. En cuanto al contenido de agua el mayor porcentaje se determinó en las plantas del control, cultivadas con 30 g L⁻¹ de sacarosa, con agar y sin ventilación con diferencias significativas con los demás tratamientos (Figura 7C). Sin embargo, el resto de los tratamientos fueron iguales estadísticamente

a pesar de estar creciendo en frascos de cultivo con diferentes números de filtros de ventilación (uno y tres). Esto puede sugerir que a pesar de las diferencias en la ventilación con diferentes números de orificios con filtro, no fueron capaces de aportar diferencias para esta variable. Al respecto Rodríguez y Leihner (2006) señalaron que la masa fresca constituye una medida del contenido de agua que puede tener una cantidad determinada de tejido vegetal, órgano o planta completa, mientras que la masa seca solamente constituye la biomasa producida por la planta, pues de ella se excluyen el agua y otros compuestos volátiles.

Ha sido informado por Kubota (2002) y Shin et al. (2013) que la sacarosa en el medio de cultivo aumentó tanto la masa fresca como seca de los brotes *in vitro*. Los resultados alcanzados en la presente investigación (tratamiento con sacarosa y tres filtros de ventilación) coinciden con lo señalado por estos autores. Lo anterior pudo ser debido a que al aumentar el contenido de sacarosa, el potencial osmótico del medio de cultivo disminuye (Cárdenas y Villegas, 2002) y se limita la absorción de agua, pero se favorece el ingreso de sacarosa y con ello el aumento de materia seca. De igual forma, Nguyen y Kozai (2001) señalaron que la masa seca y fresca se favoreció al utilizar frascos de cultivo con intercambio gaseoso, lo cual ocurrió en los tratamientos con PRO-MIX® e incrementos de la ventilación (condiciones fotoautotróficas de cultivo). Según Gaspar et al. (2002) el contenido de agua es un marcador fisiológico que define

la calidad de los brotes *in vitro*.

8.7 Caracterización de la anatomía foliar mediante microscopía electrónica de barrido (MEB)

La caracterización mediante MEB de la superficie abaxial de las hojas de las plantas *in vitro* de guarango, demostró que las condiciones de cultivo evaluadas tuvieron influencia en la anatomía foliar.

La mayor densidad estomática de la hoja (número total de estomas mm⁻²) se alcanzó en las plantas in vitro del tratamiento control (30 g L⁻¹ de sacarosa, con agar y sin ventilación), con diferencias significas con el resto de los tratamientos (Tabla 8).

El mayor número de estomas cerrados por mm² de la hoja se encontró en los tratamientos con y sin sacarosa, agar y PRO-MIX® como soporte, todos con tres filtros de ventilación. Esto sugiere que en el tratamiento con sacarosa, agar y tres filtros, la planta *in vitro*, al no depender solo de la sacarosa como fuente de carbono pudo desarrollar una nutrición fotomixotrófica pero más próxima a la fotoautotrófica, que condujo a la formación de estomas funcionales, al igual que los tratamientos fotoautróficos con agar y PRO-MIX®.

El menor número de estomas cerrados, se observó en el tratamiento control con 30 g L⁻¹ de sacarosa, con agar y sin ventilación (Tabla 8). Esto demostró que bajo estas condiciones de cultivo la planta al tener limitada la fuente de carbono proveniente del CO₂ atmosférico

condujeron a que la planta *in vitro* dependa solo de la sacarosa como única fuente de carbono; esto unido a una alta HR dentro del frasco de cultivo que no favorece la transpiración, probablemente condujo al desarrollo de estomas no funcionales y en su mayoría siempre abiertos.

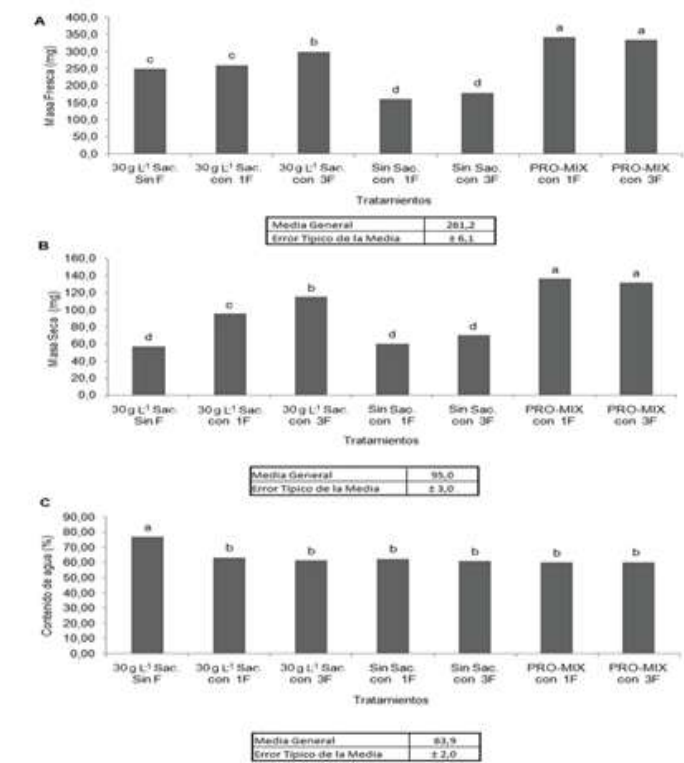


Figura 19. Efecto de diferentes condiciones de cultivo fotomixotróficas y fotoautotróficas en el crecimiento *in vitro* de brotes de *C. spinosa* a los 60 días de cultivo. (A)Masa fresca (mg MF). (B) Masa seca (mg MS). (C)

Contenido de agua (%). Barras con letras distintas indican diferencias significativas según prueba de Tukey; $p \leq 0,05$ (Fotos: Núñez et al., 2017). Para el tratamiento estadístico del contenido de agua, los datos fueron transformados de acuerdo con $x' = 2 \arccos(x/100)^{0,5}$. Los datos que se presentan en la figura son no transformados, ($n=30$)

El análisis morfométrico del complejo estomático demostró que las condiciones de cultivo en el tratamiento control (30 g L⁻¹ de sacarosa con agar y sin ventilación) favorecieron el aumento tanto del tamaño de los estomas, como de las dimensiones del poro estomático.

En este tratamiento, se determinaron los mayores valores en cuanto al largo, ancho y área tanto del estoma como del poro estomático, con diferencias significativas respecto a los demás tratamientos (Tabla 7).

Todo lo contrario ocurrió en los tratamientos con PRO-MIX® con uno y tres filtros de ventilación, los valores del largo, ancho y área tanto del estoma como del poro estomático fueron los más bajos. Esto pudiera sugerir la presencia de estomas funcionales, capaces de cerrar adecuadamente. Sin embargo, en cuanto al ancho y área del poro estomático, no se encontraron diferencias significativas entre los dos tratamientos con PRO-MIX® y el tratamiento con 30 g L⁻¹ de sacarosa con agar y tres filtros de ventilación, lo que podría ser un indicador de que en presencia de fuente de carbono, pero con incremento de la ventilación los brotes y plantas *in vitro*

de *C. spinosa* desarrollaron estomas funcionales.

La observación al microscopio electrónico de la superficie abaxial de las hojas mostraron que en todos los tratamientos los estomas se observaron en forma elíptica y al mismo nivel de la superficie de la hoja (Figura 20).

No obstante, las microfotografías revelaron que las condiciones de cultivo *in vitro* influyeron en la funcionalidad de los estomas. En el tratamiento control con 30 g L⁻¹ de sacarosa con agar y sin ventilación, los estomas se observaron en su mayoría abiertos (Figura 20A,B). De forma similar ocurrió en el tratamiento con un filtro de ventilación con 30 g L⁻¹ de sacarosa y agar (Figura 20C,D). Sin embargo, en el tratamiento con 30 g L⁻¹ de sacarosa, agar y tres filtros de ventilación los estomas se observaron con el poro de menor tamaño y casi cerrados (Figura 20E,F).

En los tratamientos sin sacarosa y con uno y tres filtros de ventilación (condiciones fotoautotróficas) los estomas se observaron con el poro de menor tamaño y ligeramente abiertos (Figura 20G,H,I,J). Los estomas se encontraban también de menor tamaño y en su mayoría cerrados en los tratamientos con PRO-MIX® con uno (Figura 20 K,L) y tres filtros de ventilación (Figura 20M,N). Estos fueron similares a los estomas de las plantas en vivo de guarango que crecieron en invernadero (Figura 20 Ñ,O).

La densidad estomática se incrementó en el tratamiento control con 30 g L⁻¹ de sacarosa, con agar y sin ventilación. Estos resultados sustentan los descritos en otras especies leñosas cultivadas *in vitro* como *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. (Zobayed et al., 2000), *Paulownia fortunei* (Khan et al., 2003), *Annona glabra* L. (Decchetti, 2008). Todos los autores señalaron un incremento en el número de estomas por mm² en las hojas de plantas cultivadas *in vitro* en condiciones convencionales de cultivo (sacarosa en el medio de cultivo, agar y sin filtros de ventilación) en comparación con las hojas de las plantas que crecieron en otros ambientes *in vitro*, lo cual es atribuido principalmente a la alta humedad relativa dentro del frasco de cultivo (Khan et al., 2003; Decchetti, 2008).

La forma elíptica es típica de las plantas que crecen en condiciones en vivo (Pospíšilová et al., 1999) y es característica de plantas cultivadas *in vitro* de *Nicotiana tabacum* L. (Tichá et al., 1999), *Simmondsia chinensis* (Link) Schn (Apóstolo y Llorente, 2000) y *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla* (Louro et al., 1999) que muestran un desarrollo normal durante la fase de multiplicación-crecimiento y enraizamiento *in vitro*.

Los estomas de las hojas *in vitro* en el tratamiento control (30 g L⁻¹ de sacarosa, con agar y sin ventilación) presentaron una mayor área del estoma que los presentes en las hojas cultivadas en condiciones de ventilación con uno y tres filtros, en presencia o ausencia de fuentes de

carbono, con el uso de agar o sustrato PRO-MIX® como soporte. Estos resultados concuerdan con los descritos por Decchetti (2008) durante el estudio del efecto de las condiciones de cultivo *in vitro* en la morfología de los estomas en *Annona glabra* L. En esta especie las hojas de los brotes en condiciones de cultivo convencional (sin ventilación) presentaron estomas con mayor área, con células oclusivas en forma de anillos; mientras que en las hojas cultivadas con incremento de la ventilación (dos filtros de 0,5 µm) los estomas fueron significativamente de menor tamaño y con forma elíptica.

La presencia de estomas funcionales en las hojas de las plantas *in vitro* de guarango cultivadas en condiciones de ventilación, principalmente cuando se utilizaron tres filtros y utilizando el PRO-MIX® como soporte, pudieran prevenir la excesiva desecación de las plantas durante la transferencia a las condiciones *ex vitro*.

8.8 Determinación del contenido de pigmentos clorofílicos

El mayor contenido de clorofila a, clorofila b y carotenoides totales se obtuvieron en los brotes *in vitro* de ambos tratamientos con PRO-MIX® (fotoautotrófismo) con valores similares a las plantas *in vitro* cultivadas sin sacarosa, con agar y tres filtros de ventilación (fotoautotrófismo) con diferencias significativas con los demás tratamientos. En relación con el control (30 g L⁻¹ de sacarosa, con agar sin ventilación), en todas las variables evaluadas presentó los valores más bajos. Solo

fue igualado para la variable contenido de clorofila a por el tratamiento sin sacarosa, con agar y un filtro de ventilación (condiciones fotoautotróficas) (Figura 21 A,B,C).

El menor contenido de clorofilas observados en la plantas *in vitro* cultivadas con sacarosa pueden ser debido a que estas plantas utilizaron la sacarosa como principal fuente de energía, por lo que probablemente no requieran tener un alto contenido de clorofilas, ya que no dependen de la energía luminosa para realizar su metabolismo. Esto ha sido señalado por algunos autores como Hazarika (2003) y Kozai (2005), los cuales señalan que la presencia de sacarosa en recipientes de cultivos con ventilación limitada inhibe el desarrollo del aparato fotosintético dentro de ellos el contenido de clorofilas, debido a que la planta no está obligada a realizar la fotosíntesis para obtener energía.

Otra posible explicación podría ser prevención en la acumulación de las clorofilas por la sacarosa, según informaron Grout y Donkin (1987) También señaló Tsay et al. (2006) que los altos niveles de CO₂ en los frascos de cultivo con mayor intercambio de gases favoreció el incremento del contenido clorofílico en la hoja. Estas observaciones fueron consistente con lo informado por otros autores (Nguyen y Kozai, 2001b; Shin et al., 2013; Martins et al., 2004). Los resultados obtenidos en la presente investigación respaldan lo referido por estos autores. El incremento de la ventilación causó un

incremento significativo del contenido clorofílico. Esta respuesta puede ser relacionada con una disminución en la concentración de etileno en el frasco de cultivo (Alvarez et al., 2012). Al respecto Hazarika (2006) informó que la acumulación de este gas causó degradación de los pigmentos fotosintéticos e incluso favoreció a la formación de brotes hiperhídricos.

Los incrementos observados en los contenidos de clorofila a y b en los tratamientos PRO-MIX, sin sacarosa con uno y tres filtros pueden ser una respuesta a las condiciones de cultivo fotoautotróficas. Estos resultados fueron similares a los informados por Osório et al. (2005); Faisal et al. (2007) y Días et al. (2013).

Según Seon et al. (2000) el contenido de las clorofilas no es un indicador directamente relacionado con la capacidad fotosintética, pero es un buen indicador del estado del aparato fotosintético. Como fue señalado por Faisal et al. (2007); Días et al. (2013) el incremento en el contenido de carotenoides totales observados en los brotes de las especies *Mucuna purence* L. y *Ulmus minor* pudo ser un reflejo de protección de la maquinaria fotosintética contra los daños causados por la fotooxidación.

Al respecto, Iarema et al. (2012) informaron un incremento de la actividad fotosintética al analizar el contenido de pigmentos clorofílicos y los carotenoides totales en plantas *in vitro* de ginseg brasileño (P.

glomerata) cultivadas en ausencia de sacarosa y frasco de cultivo con mayor nivel de ventilación.

También otros autores informaron el incremento de los pigmentos fotosintéticos y una mayor actividad fotosintética en el cultivo *in vitro* de brotes de estática *Limonium* spp (Lian et al., 2002) y en la orquídea *Dendrobium candidum* Wall ex Lind (Xiao et al., 2007) y *Billbergia zebrina* (Rodrigues et al., 2016) en condiciones de cultivo fotoautotróficas.

Tabla 8 Análisis morfométrico de la superficie de la hoja de brotes de *C. spinosa*

VARIABLES	30 g L ⁻¹ Sac.sin F	30 g L ⁻¹ Sac.con 1 F	30 g L ⁻¹ Sac.con 3 F	0 g L ⁻¹ Sac.con 1 F	0 g L ⁻¹ Sac.con 3 F	PROMIX ^a 1F	PROMIX ^a 3F	MG±EE
Densidad estomática (mm ²)	286a	262b	255b	249b	252b	256b	261b	260±6,0
Número de estomas cerrados (mm ²)	40c	186 b	247 ^a	204b	250 ^a	234b	261a	185±12,0
Largo del estoma (µm)	21,79a	19,16b	19,07b	19,43b	19,34b	19,66b	18,01c	19,5±0,68
Ancho del estoma (µm)	14,92a	13,07b	12,87b	12,30b	12,10b	12,01b	11,05c	12,6±0,60
Área del estoma (µm ²)	229,52a	219,05b	212,98b	21324b	212,09b	215,9b	203,19c	215,1±3,3
Largo del poro (µm)	10,91a	9,11b	7,94c	8,11bc	8,01bc	7,15d	6,91d	8,30±0,52
Ancho del poro (µm)	3,33a	1,71b	0,24c	2,09b	1,14b	0,37c	0,16c	1,29±0,70
Área del poro (µm ²)	22,66a	16,0b	3,10c	14,18b	7,38bc	2,12c	1,67c	9,70±1,95

Nota: diferentes condiciones de cultivo, fotoautotróficas y fotomixotróficas a las seis semanas de cultivo (Fotos: Núñez et al., 2017).

Medias con letras distintas en una misma columna difieren estadísticamente según prueba de Tukey; p≤0,05. Los valores representan la Media General±Error Estándar (n=25) 1 y 3F (uno y tres filtros de ventilación). Ilustración 20 Comparación de la superficie abaxial (Microscopía Electrónica de Barrido) de la hoja de brotes de *C. spinosa*

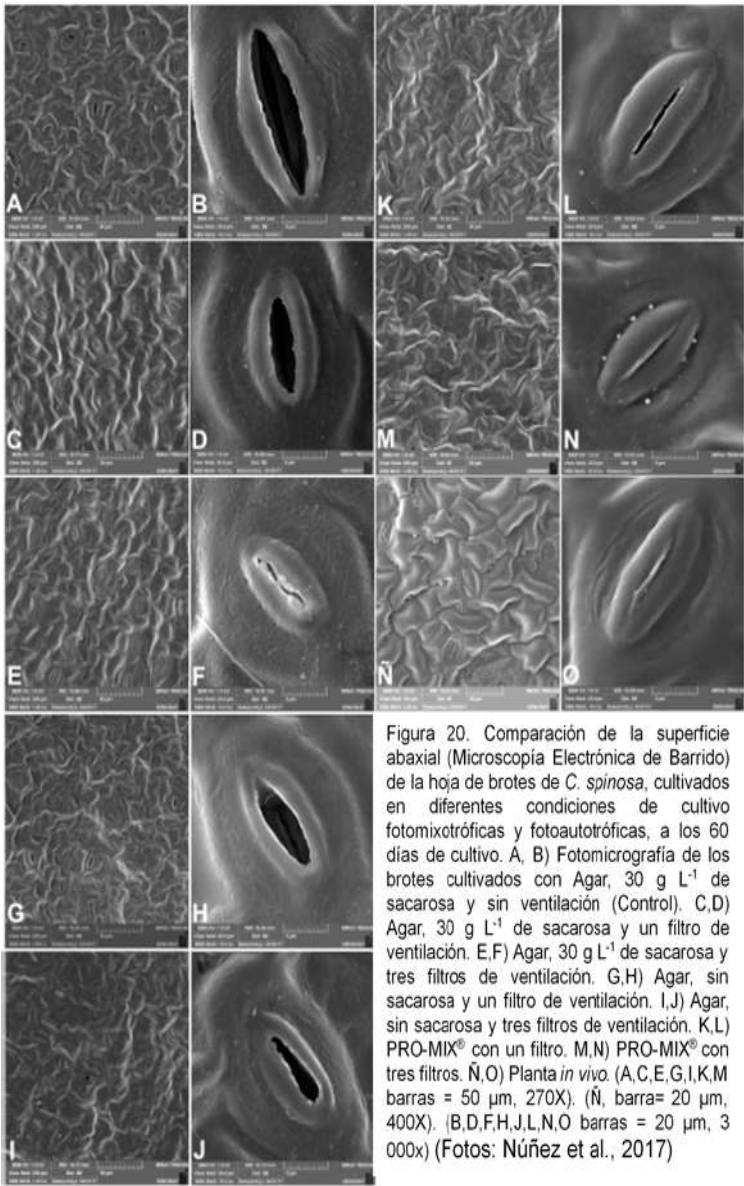


Figura 20. Comparación de la superficie abaxial (Microscopía Electrónica de Barrido) de la hoja de brotes de *C. spinosa*, cultivados en diferentes condiciones de cultivo fotomixotróficas y fotoautotróficas, a los 60 días de cultivo. A, B) Fotomicrografía de los brotes cultivados con Agar, 30 g L⁻¹ de sacarosa y sin ventilación (Control). C, D) Agar, 30 g L⁻¹ de sacarosa y un filtro de ventilación. E, F) Agar, 30 g L⁻¹ de sacarosa y tres filtros de ventilación. G, H) Agar, sin sacarosa y un filtro de ventilación. I, J) Agar, sin sacarosa y tres filtros de ventilación. K, L) PRO-MIX[®] con un filtro. M, N) PRO-MIX[®] con tres filtros. Ñ, O) Planta *in vivo*. (A, C, E, G, I, K, M barras = 50 µm, 270X). (Ñ, barra= 20 µm, 400X). (B, D, F, H, J, L, N, O barras = 20 µm, 3 000x) (Fotos: Núñez et al., 2017)

8.9 Determinación del contenido de compuestos fenólicos totales en las plantas y detección de ligninas en secciones del tallo de los brotes

El contenido de compuestos fenólicos varió significativamente entre las diferentes condiciones de cultivo in vitro. Los valores más altos se obtuvieron en los tratamientos con PRO-MIX® con ventilación (uno y tres filtros), fotoautotrofismo y tratamiento con sacarosa 30 g L⁻¹ y tres filtros (fotomixotrofismo) con 397,50, 396,29 y 368,46 µg EAG g⁻¹MS respectivamente, sin diferencias significativas entre ellos. Mientras que el valor más bajo fue en el tratamiento sin sacarosa y con un filtro (229,03 µg EAG g⁻¹MS) condiciones fotoautotróficas (Figura 10).

El mayor contenido de compuestos fenólicos en estos tratamientos pudo estar dado por la mayor área foliar que presentaron estas plantas in vitro y los mayores contenidos de pigmentos clorofílicos. Lo que pudo estar relacionado con una mayor presencia de cloroplastos, lugar donde se sintetizan y se acumulan los compuestos fenólicos. Según Cartaya y Reynaldo, (2001) los mismos se encuentran localizados en la membrana de los tilacoides de los cloroplastos.

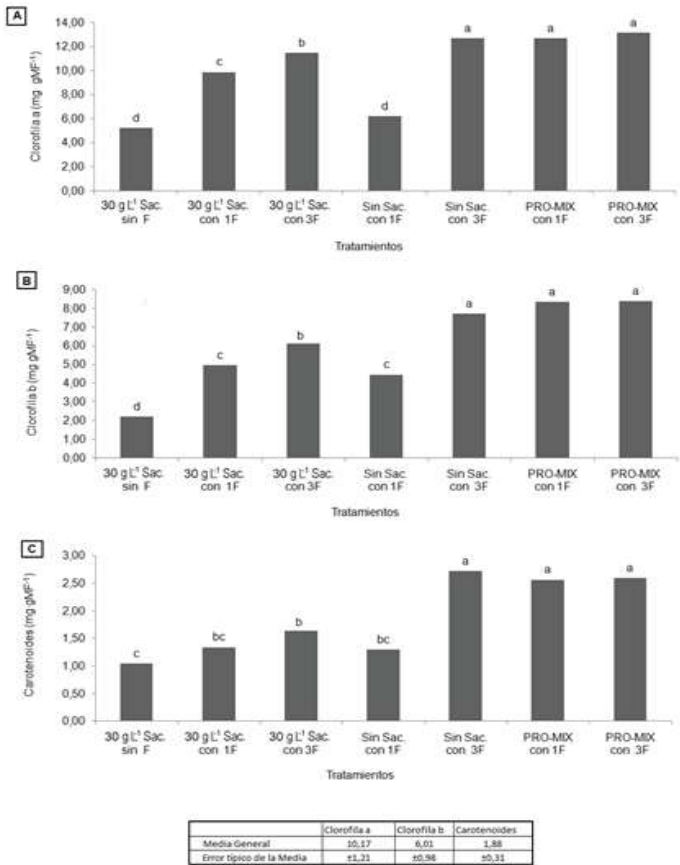


Figura 21. Efecto de las condiciones fotomixotróficas y fotoautotróficas de cultivo en el contenido de pigmentos clorofílicos en diferentes tipos de brotes de *C. spinosa*, a los 60 días de cultivo. (A) Clorofila a. (B) Clorofila b. (C) Carotenoides totales (Fotos: Núñez et al., 2017). Letras sobre barras con letras distintas indican diferencias estadísticas según prueba de Tukey para $p \leq 0,05$.

Los compuestos fenólicos son sintetizados en la parte foliar de las plantas y después en otros tejidos y órganos, por lo tanto la cantidad de estos en las hojas es mucho mayor que en el resto (Ozyigit, 2008). Este mismo autor informó en el cultivo *in vitro* del algodón (*Gossypium hisutum* L.) que después de la segunda semana de cultivo *in vitro* se incrementó el contenido de fenoles totales, hasta la tercera semana.

En referencia a lo anterior Zagoskina et al. (2000), encontraron una relación directa entre el grado de desarrollo del cloroplasto y la acumulación de compuestos fenólicos en diversas zonas de plantas de té (*Camellia sinensis* L.) bajo iluminación continua o fotoperíodo de 16 horas. Lo cual activó la formación de cloroplastos, promovió la síntesis de clorofila y de metabolitos secundarios. Cartaya y Reynaldo (2001) señalaron que los compuestos fenólicos participan en la fase luminosa de la fotosíntesis como catalizadores de electrones y como reguladores de canales de iones en la fosforilación.

En relación con este tema informaron que los compuestos fenólicos son esenciales para el control de varios procesos morfogénicos que ocurren *in vitro*, indicando que el rol está aún lejos de comprenderse. Un ejemplo es el efecto positivo de los compuestos fenólicos estimulando la formación de raíces, lo cual apoyan los resultados del presente trabajo, ya que fue posible alcanzar los mayores porcentajes de enraizamiento (85,6 -100%)

en los brotes *in vitro* de guarango en los tratamientos con condiciones fotoautotróficas de cultivo (con sustrato PRO-MIX® uno y tres filtros) y fotomixotróficas (sacarosa, agar y tres filtros de ventilación) que tenían un alto contenido de compuestos fenólicos y pudieron tener un efecto también en la morfogénesis, en este caso la formación de raíces.

De acuerdo con Grace (2005), los compuestos fenólicos forman parte de la compleja red de defensa antioxidante de las plantas. En situaciones de estrés se produce una acumulación de compuestos fenólicos, los cuales dado su carácter antioxidante desempeñan un papel protector de las células ante la peroxidación lipídica en estas circunstancias. Esto pudo ser el caso de los tratamientos con PRO-MIX® con uno y tres filtros de ventilación. Sin embargo, esto no ocurrió en los tratamientos sin sacarosa, agar e incremento de la ventilación (condiciones fotoautotróficas también) con igual estrés, ya que las plantas de guarango en estas condiciones tuvieron un desarrollo pobre del área foliar.

Respecto a la variable presencia de lignina en los tallos de las plantas *in vitro*, el estudio histoquímico permitió demostrar que las diferentes condiciones de cultivo con y sin sacarosa, el uso del PRO-MIX®, así como la ventilación con uno y tres filtros influyeron en la disposición de ligninas en las células vasculares. En las plantas cultivadas en los tratamientos con 30 g L⁻¹ de sacarosa y sin filtros de ventilación (control) la

organización del xilema fue pobre y el área de la sección transversal teñida positivamente con fluoroglucinol-HCl presentó patrón de disposición inconsistente, poco identificable y con escasa lignificación (Figura 23A).

Este patrón de lignificación fue similar en el tratamiento con 30 g L⁻¹ sacarosa y un filtro de ventilación (Figura 22 B). Sin embargo, en presencia de sacarosa el patrón fue más homogéneo con una incipiente formación de haces radiales cuando la ventilación del frasco de cultivo se incrementó con tres filtros, aunque no todas las células de los haces radiales se observaron teñidas (Figura 22 C). En los tratamientos sin sacarosa con uno y tres filtros se observó que los haces radiales no están bien estructurados, aunque con tres filtros los resultados fueron mejores (Figura 22 D,E).

En las secciones transversales de los brotes cultivados con los tratamientos con PRO-MIX® teñidos con fluoroglucinol-HCl, independientemente del nivel de ventilación, se observó una región bien definida de color magenta (código de color #FF00FF; CSS, 2017) y un sistema vascular bien organizado con un patrón de lignificación homogéneo (Figura 22 F,G). Se observó además, un incipiente crecimiento secundario con la formación de haces radiales, características similares a los brotes cultivados in vivo, donde la organización del xilema y floema también fueron normales con la formación de haces radiales (Figura 22 H).

Estos resultados ponen en evidencia que la mayor presencia de lignina se observó en las plantas cultivadas en condiciones de fotoautotrofismo durante el enraizamiento, empleando el PRO-MIX® como soporte. Esto pudo ser debido a que la lignina se forma en las plantas mediante la reacción de fotosíntesis (Chávez y Domine, 2013), siendo estas plantas las que mayor contenido de pigmentos clorofílicos presentaron.

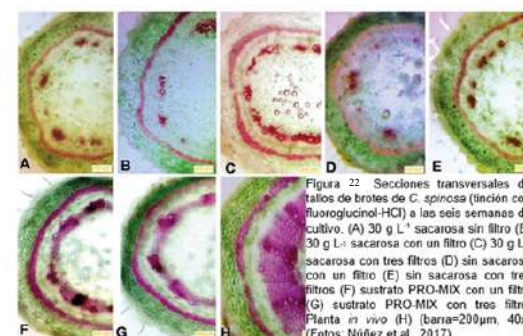


Figura 22 Secciones transversales

Por otro lado, los precursores de la lignina son compuestos fenólicos y es válido señalar que el mayor contenido de fenoles totales se determinó en estos tratamientos con PRO-MIX® y en el tratamiento con sacarosa, agar y tres filtros de ventilación, lo que podría justificar la mayor presencia de ligninas detectadas mediante la técnica histoquímica en estos brotes.

En plantas *in vitro* en condiciones fotomixotróficas y fotoautotróficas de cultivo en el ginseg brasileño (*P. glomerata*) durante la tinción con fluoroglucinol-HCl, Iarema et al. (2012) detectaron estructuras lignificadas

en secciones de tallos de los tratamientos con medio de cultivo con sacarosa. Sin embargo, las plantas cultivadas en el tratamiento sin filtro no mostraron engrosamiento de la pared celular ni lignificación incipiente del tejido vascular. Curiosamente, las secciones de tallos de plantas cultivadas en medio de cultivo sin sacarosa y filtro con membrana mostraron un mayor grado de lignificación. Una tinción intensa de haces vasculares en los tratamientos restantes indicó fuerte lignificación del xilema y engrosamiento de la pared celular en la región interfascicular, formando un anillo continuo. El mayor número de capas celulares con engrosamiento de la pared celular en la región interfascicular se encontró en tratamientos que usaban filtros de membrana y medios de cultivo sin sacarosa. Sin embargo, las plantas cultivadas con sacarosa y dos filtros probablemente tuvieron una mayor lignificación. Los resultados obtenidos en el presente trabajo para ambas condiciones de cultivo fueron muy similares a los informados por estos autores.

Estos resultados indicaron que en los tratamientos con PRO-MIX® y el uso de filtros de ventilación (condiciones fotoautotróficas) se crearon condiciones de cultivo que favorecieron el crecimiento normal de las plantas *in vitro*. Le indujeron a las mismas a desarrollar desde la etapa *in vitro* (aclimatización *in vitro*), el desarrollo de características adaptativas morfo-anatómicas y fisiológicas que podrían ser determinantes durante la transición *in vitro/ex vitro* como fue el desarrollo de hojas compuestas con dos pares de pinnas, una mayor

concentración de pigmentos fotosintéticos, una elevada acumulación de compuestos fenólicos, una mayor lignificación del tejido vascular, mayor masa fresca y seca, el desarrollo de estomas funcionales. De acuerdo a estos resultados, se podría predecir que estas plantas desarrollaron características morfológicas y fisiológicas necesarias para sobrevivir y adaptarse mejor durante para la fase de aclimatización *ex vitro*.

8.10 Evaluación de la supervivencia de las plantas *in vitro* en la fase de aclimatización *ex vitro*

La evaluación de la supervivencia de las plantas de guarango durante la aclimatización *ex vitro* mostró que el crecimiento de las plantas *in vitro* en las diferentes condiciones de cultivo fotoautotróficas y fotomixotróficas establecidas durante el cultivo *in vitro*, influyeron en el porcentaje de supervivencia *ex vitro*. La mayor supervivencia se obtuvo en las plantas procedentes de los dos tratamientos con PRO-MIX®. En ambos tratamientos el 100% de las plantas sobrevivieron durante la aclimatización *ex vitro*, con diferencias significativas con los demás tratamientos evaluados (Tabla 9).

Las plantas de guarango cultivadas *in vitro* en condiciones fotoautotróficas sin sacarosa, agar como soporte y con un filtro no sobrevivieron durante la aclimatización *ex vitro*, mientras que el tratamiento con tres filtros sobrevivieron en un porcentaje muy bajo (12,8%) (Tabla 9). Esto pudo ser debido principalmente al bajo porcentaje de enraizamiento alcanzado por las

plantas en ambos tratamientos.

Shim et al. (2003) señalaron que el intercambio gaseoso en los frascos de cultivo fue más importante que la concentración de sacarosa para el crecimiento del portainjerto de Vitis ‘5BB’ en condiciones *ex vitro*. Los resultados alcanzados con los tres tratamientos con condiciones de cultivo fotomixotróficas apoyan los resultados referidos por estos autores. En la medida que se incrementó el intercambio de gases (cero, uno y tres filtros) aumentó el nivel de supervivencia *ex vitro* de las plantas de *C. spinosa* en estas condiciones (Tabla 9).

Tabla 9. Efecto de las diferentes condiciones de cultivo fotomixotróficas y fotoautotróficas en la supervivencia de las plantas in vitro de *C.spinosa*, durante la aclimatización *ex vitro* a los 15 días después del trasplante (Fotos: Núñez et al., 2017).

Tabla 9. Efecto de las diferentes condiciones de cultivo fotomixotróficas y fotoautotróficas

Sacarosa (g L ⁻¹)	Agar (g L ⁻¹)	PRO-MIX* (g L ⁻¹)	Ventilación	Supervivencia (%)
30	7	0	sin filtro	54,5 c
30	7	0	1 filtro	62,0 c
30	7	0	3 filtros	78,6 b
0	7	0	1 filtro	0,0 e
0	7	0	3 filtros	12,8 d
0	0	30	1 filtro	100 a
0	0	30	3 filtros	100 a

Medias con letras distintas en una misma columna difieren significativamente según prueba de H de Kruskal-Wallis/ U de Mann-Whitney ($p \leq 0,05$; $n = 100$),

Las plantas *in vitro* de *C. spinosa* cultivadas en los tratamientos que tuvieron los mayores valores de área foliar, fueron las que alcanzaron el 100% de supervivencia en condiciones de aclimatización *ex vitro*. Al respecto Tadesse et al., (2000) informaron que el área foliar de las plantas *in vitro* al inicio del proceso de aclimatización *ex vitro* fue una característica importante para lograr una mayor área foliar al final de esta fase.

Se confirma así el problema de la muy baja supervivencia si no se realizan oportunos manejos que logren mejor calidad de plantas *in vitro*, con énfasis en su patrón de raíces. Autores como Afreen-Zobayed et al. (2000) en el boniato (*Ipomea batata* L.) alcanzaron 90% de supervivencia en las plantas *in vitro* cultivadas en condiciones fotoautotróficas respecto al 73% de aquellas cultivadas en agar y sacarosa. Kozai et al. (2005) informaron en la especie Lirio Cala (*Zantedeschina elliottian* L.), 95% de supervivencia (condiciones fotoautotróficas) a los 12 días del trasplante a fase de aclimatización en relación con el 60% de las plantas cultivadas en condiciones mixotróficas. También en la especie Abeto chino [*Cunninghamia lanceolata* (Lambert) Hooker] obtuvieron 16% de supervivencia en las plantas *in vitro* cultivadas en condiciones fotomixotróficas y 95% en las fotoautotróficas.

Sin embargo, Jo et al. (2009) informaron que los mejores resultados en la aclimatación *ex vitro* lo alcanzaron para la especie ornamental Oreja de Elefante (*Alocasia amazónica*) las plantas cultivadas con 30 g L⁻¹ de sacarosa y no aquellas que fueron cultivadas en condiciones fotoautotróficas.

Al respecto Kozai y Zobayed (2000) informaron que con la micropropagación fotoautotrófica la formación de las raíces, el desarrollo y crecimiento *in vitro* de las plantas son fisiológica y morfológicamente normales. Las plantas son capaces de controlar la transpiración y por lo tanto tener una menor pérdida de agua cuando son expuestas a condiciones ambientales *ex vitro*. Una de las razones puede ser una alta porosidad del material de soporte, lo cual permite una alta disolución de la concentración del oxígeno alrededor de la base del brote. Todo lo anterior parece haber ocurrido también en las plantas de guarango cultivadas en condiciones fotoautotróficas empleando el sustrato PRO-MIX® como soporte y con incrementos de la ventilación en los frascos de cultivo.

Como señalaron Sáez et al. (2012) en el cultivo *in vitro* de brotes de *Castanea sativa* L. con incremento de la ventilación en los frascos de cultivos mostraron diferencias morfológicas significativas con respecto a los brotes cultivados en condiciones convencional. Estos cambios permitieron que las plantas tuvieran calidad similar a plantas de semillas. Las condiciones de cultivo

con mayor ventilación en el frasco de cultivo aumentaron la capacidad de respuesta de los estomas e incrementaron la capacidad de las plantas para controlar la pérdida de agua. Esto pudo favorecer la aclimatación *ex vitro* al evitar una excesiva desecación de las plantas después del trasplante, sumado a una mayor concentración de pigmentos fotosintéticos, lo que hizo posible su adaptación a las condiciones *ex vitro*.

A los 90 días de cultivo en condiciones de aclimatación *ex vitro* las plantas de guarango de ambos tratamientos con PRO-MIX® alcanzaron valores superiores en todas las variables evaluadas, con diferencias significativas con el tratamiento con sacarosa, agar y tres filtros de ventilación (Tabla 10 y Figura 23). Una vez más, se confirmó que las condiciones de cultivo fotoautotróficas empleando PRO-MIX® como soporte, sin sacarosa e incrementos de la ventilación de los frascos de cultivos permitieron un alto enraizamiento y la aclimatación *in vitro* de los brotes de *C. spinosa* que garantizaron una alta supervivencia en condiciones *ex vitro* de cultivo.

Tabla 10 Efecto de las condiciones de cultivo fotomixotróficas y fotoautotróficas con sustrato PRO-MIX® sobre las variables morfológicas de plantas *in vitro* de *C. spinosa* en condiciones de aclimatación *ex vitro*, a los 90 días después del trasplante (Fotos: Núñez et al., 2017).

Tabla 10 Efecto de las condiciones de cultivo fotomixotróficas y fotoautotróficas

Sacarosa (g L ⁻¹)	Filtro	Soporte	Altura (cm)	No. de hojas	Área Foliar (cm ²)	Long. de la raíz más larga (cm)
30	3	Agar	6,55 b	4,34 b	5,20 b	6,30 b
0	1	PRO-MIX	9,90 a	5,12 a	9,32 a	9,70 a
0	3	PRO-MIX	10,15 a	5,28 a	9,45 a	10,42 a

Medias con letras distintas en una misma columna difiere significativamente según prueba de H de Kruskal-Wallis/U de Mann-Whitney ($p \leq 0,05$; $n=100$)

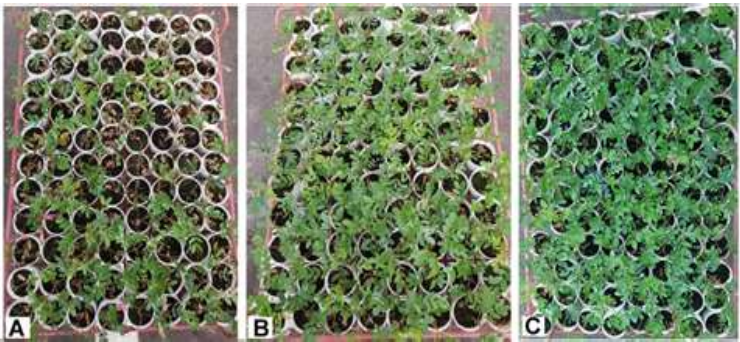


Figura 23. Plantas propagadas *in vitro* de *C. spinosa* después de 90 días en fase de aclimatización *ex vitro* procedente de tres condiciones de cultivo (A) fotomixotróficas (sacarosa 30 g L⁻¹, agar como soporte y tres filtros). (B) fotoautotróficas (sustrato PRO-MIX® y un filtro de ventilación). (C) fotoautotróficas (sustrato PRO-MIX® y tres filtros de ventilación) (Fotos: Núñez et al., 2017).

En plantas *in vitro* de *Eucaliptus camaldulensis*

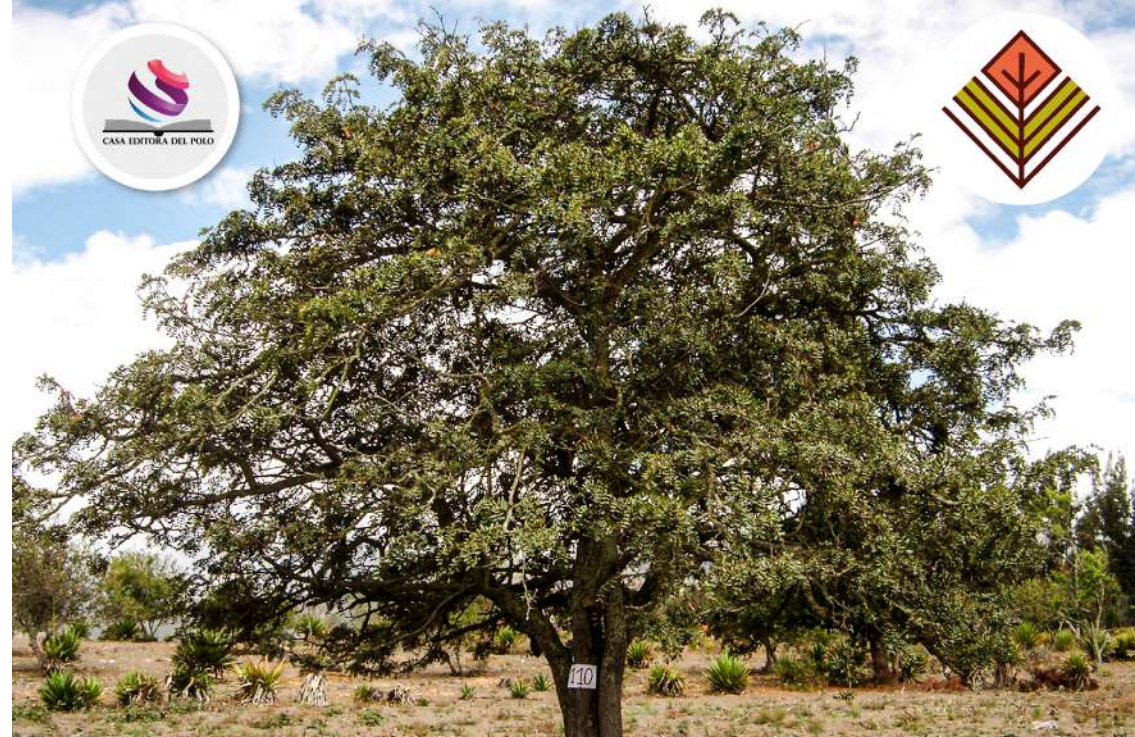
(Zobayed et al., 2000) informaron que las plantas que crecieron en materiales porosos pueden sobrevivir a las condiciones ambientales *ex vitro*. Además señalaron que obtuvieron una alta correlación entre los porcentajes de supervivencia con el desarrollo de las raíces, gracias a la mejora del ambiente en la zona radical.

También en papaya cultivar ‘*Maradol Roja*’, Posada et al. (2017) alcanzaron altos niveles de supervivencia en la aclimatización *ex vitro* al combinar condiciones de cultivo fotoautotróficas (sin sacarosa, como soporte la zeolita e incremento de la ventilación con orificios en los frascos de cultivo) y el AIB; lo que permitió alcanzar 100% de enraizamiento *in vitro*, la aclimatización *in vitro* y 96,5% de supervivencia a los 15 días en la fase de aclimatización *ex vitro*.

De acuerdo con Iarema et al. (2012) durante la propagación *in vitro* fotoautotrófica del ginseg brasileño en frascos de cultivo de vidrio con incremento de la ventilación (uno y dos filtros en la tapa) y sin sacarosa, pero con agar como soporte alcanzaron 100% de supervivencia en la fase de aclimatización *ex vitro*. Estos resultados en la presente investigación apoyan lo informado por estos autores.

En resumen, los resultados obtenidos hasta aquí demuestran la importancia de un pretratamiento *in vitro* donde las condiciones de cultivo que se crean, favorezcan el fotoautotrofismo de las plantas para que

estas desarrollen características morfo-anatómicas y fisiológicas más próximas a las de plantas que crecen *in vivo*. En este caso el uso del PRO-MIX® como soporte y el uso de filtros de ventilación en los frascos de cultivo favorecieron el desarrollo de plantas con la formación de un buen sistema radical, una mayor acumulación de materia fresca y seca, mayor concentración de pigmentos fotosintéticos y de compuestos fenólicos. Así como la formación de hojas compuestas con dos pares de pinnas y mayor número de folíolos, con la presencia de estomas funcionales y la formación de haces vasculares bien lignificados y con mejor organización del tejido vascular. Todas estas características garantizaron que estas plantas propagadas *in vitro* de *C. spinosa* sobrevivieran y se adaptaran mejor durante la fase de aclimatización *ex vitro*.



CAPÍTULO IX

ELABORACIÓN DE SOLUCIONES
CONCENTRADAS Y MEDIOS DE CULTIVO
PARA EL ESTABLECIMIENTO *IN VITRO*
VÍA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA (ES)

9 Elaboración De Soluciones Concentradas y Medios De Cultivo Para El Establecimiento *In Vitro* Vía Embriogénesis Somática (ES)

9.1 Formación de embriones somáticos

La Embriogénesis somática se define como la formación de un embrión a partir de células somáticas, sin la necesidad de la fusión de gametos Merkle et al., 1995. La formación de embriones somáticos puede ocurrir por vía directa o indirecta, la primera ofrece la posibilidad de obtener embriones somáticos directamente desde el explante utilizado sin la formación de callo; mientras que, la segunda incluye la dediferenciación de tejidos para inducir la formación de callos que luego producirán embriones somáticos Slater et al., 2003. Este desarrollo directo es el resultado de una fuerte correlación entre el tipo de explante y la concentración de la auxina. La ES directa se ha desarrollado con el empleo de diferentes reguladores del crecimiento utilizando embriones cigóticos Fernando et al., 2001; Del Sol et al., 2001. El regulador del crecimiento tipo auxina más utilizado en la formación de los embriones somáticos ha sido el 2,4 – diclorofenoxiacético (2,4-D) en concentraciones que han variado desde 9,0 – 112,5 μM en dependencia del cultivar, no obstante según el tipo de explante inicial utilizado se han empleado otras auxinas con el ácido indol– 3–acético (AIA) en combinación con la citoquinina 6-bencilaminopurina (6-BAP) Gallardo et al., 2004.

9.2 Multiplicación secundaria de los embriones somáticos

Los procesos de multiplicación han recibido varios términos como embriogénesis somática secundaria, recurrente o repetitiva, conocida como fase de Proliferación de los ES Merkle et al.,1995; Von Arnol, 2008. El grado de diferenciación de los embriones somáticos varía en las distintas especies de plantas. Sin embargo, en muchas especies a partir del embrión primario no se desarrolla una planta sino que da lugar a sucesivos ciclos de embriones secundarios, terciarios, etc, lo cual se reconoce como embriogénesis secundaria, continua o recurrente. En algunos casos la formación de embriones secundarios es de gran importancia para aumentar la cantidad de plantas regeneradas Merkle et al.,1995; Von Arnold, 2008. Usualmente, los ES tienen una mayor capacidad embriogénica que ningún otro explante y han demostrado que pueden incrementar las tasas de regeneración en varias especies Saiprasad, 2001. Según Parrott, 2002 cuando las concentraciones de auxina exógena se elevan a un determinado nivel, los embriones somáticos no pasan de la etapa globular, se detiene su desarrollo y forman embriones nuevos a partir de los existentes. La ES secundaria constituye uno de los aspectos más interesantes de la embriogénesis somática debido a las posibles aplicaciones de la misma para la propagación masiva como en el mejoramiento genético. En cultivos de ciclo de vida larga, como los frutales y forestales, es posible mantener líneas embriogénicas

preservadas *in vitro* mientras son probados bajo condiciones de campo, una vez seleccionadas las líneas pueden ser multiplicados en grandes cantidades por embriogénesis secundaria Wann, 1989.

9.3 Maduración

La fase de maduración es un complejo período de desarrollo del embrión somático en el cual ocurre la expansión de la célula, la acumulación de sustancias de reserva y adquieren tolerancia a la desecación Parrott, 1993. Los niveles de sacarosa favorecen la maduración de los embriones por dos razones, la primera de ellas es que bloquea la germinación precoz de los mismos y la segunda es que resulta ser un excelente proveedor de carbohidratos que son utilizados para su crecimiento, la respiración y la acumulación de carbohidratos de reserva. Merkle et al., 1995.

La correcta acumulación de reservas conlleva a un incremento en la masa seca de los embriones somáticos, lo que indica una alta calidad en el vigor e influye positivamente en su posterior germinación Fuji et al., 1990. Diferentes patrones en la acumulación de sustancias de reserva en el embrión somático pueden guiar los protocolos para elevar el desarrollo y posterior rendimiento de las plantas. Se han realizado varios estudios usando como marcadores de la calidad del desarrollo del embrión somático distintas sustancias de reserva tales como la acumulación de proteínas, lípidos y almidón, aunque este último ha sido menos estudiado

Parrott, 2002. La adición del ácido abscísico (ABA) durante la fase de maduración del embrión promueve también la acumulación de sustancias de reserva, esto seguido de un apropiado tiempo de secado puede lograr un mejor crecimiento y desarrollo del embrión somático y también previene la germinación precoz, Attree et al., 1992. En un estudio reciente de Malabadi et al., 2011 con doce cultivares de papaya emplearon exitosamente para la maduración de los embriones somáticos un medio de cultivo compuesto por las sales de Murashigue y Skoog (1962) (MS), 3% de sacarosa, 5 μ M de ABA y 8 gL⁻¹ de agar; se mantuvo en condiciones de oscuridad durante cuatro semanas. Al igual que los embriones cigóticos, la maduración del embrión somático termina en un cierto grado de secado, que se traduce en una reducción gradual del metabolismo por la pérdida de agua, pasando a un estado metabólicamente inactivo o de reposo, Jiménez y Thoma, 2006, Von Arnol, 2008.

9.4 Germinación de los embriones somáticos

En el proceso de embriogénesis somática los pasos finales lo constituyen las fases de germinación y la conversión en plantas. Sin embargo, en la mayoría de los trabajos realizados, los autores hacen poca distinción entre los procesos de germinación y conversión. Merkle et al., 1995. La germinación se refiere al desarrollo de la raíz y/o brote y las primeras señales en esta etapa en los embriones somáticos son la elongación del hipocotilo, el desarrollo de color verde de los cotiledones y la

elongación de la radícula. Alemanno et al., 1997; Salomao y Mundim, 2000. Las reservas de proteínas y lípidos en el embrión somático declinan sustancialmente a partir del primer día en condiciones de imbibición *in vitro* o bien antes de la elongación de la raíz. Cry et al., 1991. La degradación tan rápida de las sustancias de reserva en el embrión somático, la cual es diferente en un embrión cigótico es probablemente el resultado de la falta del tejido nutritivo que rodea a la semilla, lo cual explica el por qué a veces las plantas de embriones somáticos son más pequeñas y débiles que las procedentes de semillas. Merkle et al., 1995.

9.5 Conversión

La Conversión la definen algunos autores como la emisión de brotes con el primer par de hojas verdaderas en condiciones *ex vitro*. Alemanno et al., 1997. Mientras que otros la definen como la supervivencia y desarrollo en fase de propágulo en condiciones ambientales *ex vitro* o sea, en el suelo. Stuart y Strickland, 1984. La capacidad de obtener plantas *in vitro* con raíces no es necesariamente un indicador de continuo crecimiento y vigor en condiciones *ex vitro* ya que también la altura de las plantas, el número de hojas y el estado de funcionamiento de los estomas son fundamentales para su adaptación a las nuevas condiciones de cultivo. Fuji et al., 1990. El crecimiento *ex vitro* de las plantas procedentes de embriones somáticos es el resultado de los tratamientos previos realizados durante las fases

in vitro. Högberg et al., 2001; Von Arnold et al., 2002; Gaj, 2004. Sin embargo, la inducción, formación de los embriones somáticos y la germinación en plantas todavía presenta problemas en muchas especies cultivadas. La transferencia de las plantas *in vitro* a las condiciones *ex vitro* es una de las etapas críticas de cualquier protocolo de propagación. Lo fundamental es que las plantas desarrollen un buen sistema radical, debido a que su nutrición depende en gran parte de la efectividad de sus raíces, así como, de los nutrientes acumulados en las plántulas antes de llegar a las condiciones *ex vitro*. En el caso de los ES, su conversión a plantas en la última fase del proceso embriogénico garantiza la existencia de un sistema radical que determinará una mayor supervivencia en la fase de aclimatización. Malabadi et al., 2011.

9.6 Enraizamiento *in vitro*

Se conoce como la etapa de transferencia de las partes aéreas (brotes) producidas para medios de cultivo de enraizamiento con auxina para la formación de las raíces adventicias. Con bajas concentraciones de auxinas predomina la formación de raíces adventicias, mientras que con altas concentraciones de auxinas no se producen raíces y tiene lugar en cambio la formación de callo. De Souza y Grasso, 2012. La formación de raíces en un brote *in vitro* es un proceso complejo que consta de al menos dos etapas: la formación de los primordios de raíz a partir de ciertas células susceptibles y el crecimiento de las

raíces. Ambas etapas requieren de auxinas, aunque las necesidades de cada una son diferentes y dependen de la especie. Acosta et al., 2008. En muchos de los casos las raíces que se han originado *in vitro* son vulnerables y no funcionan de forma adecuada *in vivo* (no tienen o tienen pocos pelos radicales) por lo que mueren rápidamente debiendo ser sustituidas por nuevas raíces subterráneas. Un desarrollo pobre del sistema radical hace que el crecimiento *in vivo* se haga difícil, especialmente cuando hay una elevada transpiración.

Es de vital importancia que las plantas *in vitro* pierdan la menor cantidad de agua posible cuando pasan a condiciones *ex vitro* (De Souza y Grasso, 2012. La formación de órganos, especialmente la formación de raíces adventicias y funcionales, es facilitada por un mejor suministro de oxígeno. Es un hecho comprobado que, especialmente los brotes *in vitro* de especies leñosas encuentran grandes dificultades en regenerar sus raíces, cuando estas se encuentran en agar. Por esta razón desde hace algunos años se informan trabajos donde se sustituye el agar por minerales como la vermiculita, la perlita, florialita, la lana de roca, entre otros buscando una mayor oxigenación en la zona de formación de las raíces (Afreen-Zobayed et al., 2000; Yu et al., 2000; Kozai et al., 2005).

El genotipo también tiene una importancia clave en el proceso de enraizamiento. Según De Souza y Grasso (2012) existen varias evidencias de que la formación

de raíces en los segmentos de tallos o brotes *in vitro* es genéticamente controlada. La gran variación observada en especies, cultivares y clones en relación a la mayor o menor habilidad natural de formación de raíces ha demostrado la importancia de los factores genéticos en el enraizamiento.

9.7 Variación somaclonal en poblaciones de plantas obtenidas por embriogénesis somática

La propagación *in vitro* de plantas leñosas y cultivos frutales constituye éxito en la aplicación comercial del cultivo *in vitro*. Un aspecto importante a considerar cuando se propagan plantas es el mantenimiento de la integridad genética con respecto a la planta madre. Debido a esto, la variación somaclonal se ha informado en diferentes niveles (morfológica, citológicos, citotóxica, bioquímica y molecular) en plantas micropropagadas (Rani y Raina, 2000). Con el fin de evaluar su presencia varias estrategias se han utilizado para detectar variantes somaclonales, basado en uno o más determinantes de los rasgos morfológicos, análisis citogenético (variación numérica y estructural en los cromosomas) y los marcadores moleculares y bioquímicos (Rani, Parida y Raina, 1995). Además, los estudios sobre la variación somaclonal son importantes para su control y la posible supresión con el objetivo de producir plantas genéticamente idénticas y para su uso como una herramienta para producir la variabilidad genética, lo que es usado en la mejora genética. La

variación somaclonal se ha estudiado extensamente en plantas herbáceas, mientras que pocos estudios se han centrado en los cultivos frutales perennes.

En cuanto a la estabilidad genética de las plantas propagadas *in vitro*, se ha demostrado que son estables, a partir de la proliferación de brotes axilares y meristemas, por sus características morfológicas, agronómicas e industriales y por los análisis citológicos, isoenzimáticos y moleculares, y se considera el sistema más adecuado para la multiplicación clonal de papaya (Roque et al., 2006). Sin embargo, se han observado pequeñas diferencias entre plantas micropropagadas y las producidas por semilla, siendo las primeras ligeramente de menor porte y más precoces, lo cual es ventajoso para la cosecha (Fitch et al., 2005; Talavera et al., 2009). Por otro lado, cuando se ha utilizado la embriogénesis somática como proceso de propagación, se han conseguido variaciones morfológicas en la altura de la planta, número y longitud de flores, al igual que en el número de frutos, las dimensiones y su forma, sobre todo cuando se usan altas concentraciones de 2,4-D (45 μ M) y estas diferencias se pudieron asociar a patrones polimórficos obtenidos en el análisis molecular del ADN usando cebadores arbitrarios (RAPD) (Homhuan et al., 2008). En otro estudio y con concentraciones bajas de 2,4-D (9,0 μ M), hubo un porcentaje alto de variaciones de ploidía, del 14%, en las plantas *in vitro* regeneradas (Clarindo et al., 2008). Las tasas de multiplicación pudieran aumentarse significativamente en 20 veces o

más al utilizar la embriogénesis somática, pero existe el riesgo de aumentar la variabilidad de las plantas producidas (Clarindo et al., 2008; Homhuan et al., 2008).

Diferentes técnicas de análisis molecular se han utilizado para señalar la variación somaclonal en plantas obtenidas por cultivo de tejidos.

9.8 Consideraciones sobre las aplicaciones de la embriogénesis somática a la rama forestal.

El primer reporte exitoso de la aplicación de la embriogénesis somática (ES) fue descrito en el año 1985 para especies coníferas, desde entonces hasta la actualidad son impresionantes los resultados que se han logrado.

Esta poderosa herramienta ahora está disponible para muchas especies forestales de importancia económica y ecológica. Entre sus muchas aplicaciones, la actual y más importante es su implementación en la silvicultura multivarietal, con el desarrollo de plantaciones comerciales a partir de variedades de árboles con atributos superiores para la silvicultura, junto con la criopreservación. La ES ofrece una producción eficiente de los mismos genotipos probados de manera constante a lo largo del tiempo y, por lo tanto, permite el desarrollo de variedades de árboles de alto valor equivalentes a las variedades agronómicas. Esto ha llevado al desarrollo a escala comercial de variedades de piceas y pinos, ofreciendo un nuevo paradigma en la mejora de árboles.

Además, la ES la principal tecnología habilitadora para muchos procedimientos de biotecnología de árboles, incluida la transformación genética, la edición génica y la posterior propagación masiva. La aplicación de ES en la preservación de especies ecológicamente importantes y amenazadas abre una nueva dimensión para la conservación de recursos genéticos y la restauración de especies en ecosistemas degradados. Ya se están realizando esfuerzos para preservar las especies amenazadas y propensas a enfermedades, como los pinos de corteza blanca y los pinos ágiles en el oeste de Canadá por medio de ES. Además, existen muchas potencialidades de la ES aún sin explotar para la investigación de la biología de los árboles; esto incluye la genética, la fisiología, la resistencia a las enfermedades, la genómica, la metabolómica, la proteómica, el desarrollo, la epigenética, etc. Las propiedades de muestreos uniformes y precisos que ofrecen las réplicas clonales producidas por la ES constituye un beneficio importante para tales estudios.

De acuerdo a Bonga y Park (2010) en los últimos 40 años, los programas de mejoramiento de árboles en todo el mundo han contribuido en gran medida a los atributos de productividad y calidad de la madera de las plantaciones forestales. La entrega de dicha mejora ha sido a través de huertos semilleros y según estos autores, este seguirá siendo el principal medio de proporcionar mejora genética. Estos programas generalmente producen un aumento de altura del 3 al 5% cuando se

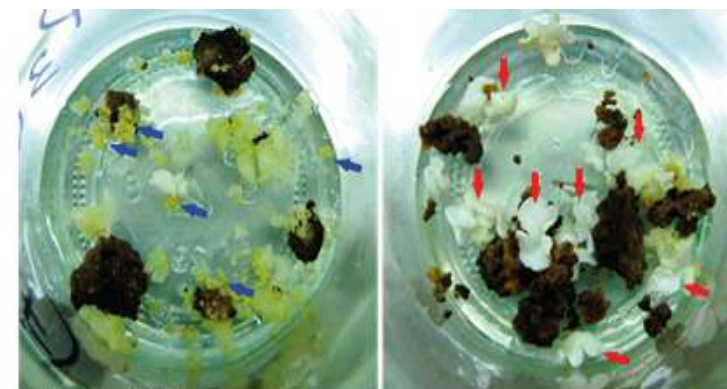
evalúan alrededor de los 10 años de edad. Sin embargo, los huertos de semillas a menudo se asocian con varias ineficiencias, como la contaminación por polen y las contribuciones desiguales de los padres. Además, los programas de mejoramiento convencionales suelen ser esfuerzos a largo plazo, que involucran selección y pruebas recurrentes de múltiples generaciones que generalmente son costosas y requieren mucho tiempo. Además, nos enfrentamos a nuevos desafíos: (1) la productividad de las plantaciones debe llevarse a un nivel superior, lo que genera un debate sobre la silvicultura intensiva en sitios privilegiados; (2) los objetivos de los productos están cambiando a medida que buscamos nuevos productos; (3) el cambio climático arroja incertidumbre sobre la adaptación de los árboles; (4) la resistencia a plagas seguirá siendo un problema y (5) se espera que contribuyamos a la conservación y restauración de especies de árboles amenazadas. Lo anterior conduce a que existe la necesidad de desarrollar un sistema de reproducción y despliegue “flexible”. Por lo tanto, es necesario modificar la estrategia de reproducción actual para enfrentar estos desafíos. La embriogénesis somática (ES), la criopreservación y el uso de marcadores genéticos moleculares son tecnologías que se pueden usar para impulsar la silvicultura intensiva pero sostenible, simplificar los esquemas de mejoramiento y selección, estudiar la dinámica del polen de los huertos de semillas, brindar una dimensión adicional para la conservación y restauración de especies,

y en la investigación que aporta al conocimiento de la respuesta genética a factores bióticos y abióticos.

Al comienzo del siglo XX Haberlandt predijo que si todas las células de un organismo tenían la misma información genética que la célula inicial, el cigoto, sería posible una “marcha atrás” en su expresión génica, de tal forma que volvieran a expresar el patrón de desarrollo embriogénico hasta formar auténticos embriones de origen somático. Esta posibilidad se verificó en células del parénquima de raíz de zanahoria a finales de los años 50, y desde entonces se ha ampliado a cientos de especies diferentes. Las primeras especies forestales en las que se logró esta expresión de la “totipotencia” de sus células fueron *Santalum álbum* en el caso de frondosas (Rao, 1965), y *Picea abies* (Chalupa, 1985; Hackman y Von Arnold, 2008) y *Larix decidua* (Nagmani y Bonga, 1985) en el caso de coníferas. Desde entonces se han publicado miles de artículos y se han regenerado cientos de especies forestales por embriogénesis somática. Esta vía de regeneración consiste en la obtención de semillas somáticas, que tienen su origen en células somáticas de la planta donante, las cuales se reprograman y siguen un patrón de desarrollo idéntico al embrión de origen cigótico. Al no ser la célula inicial producto de un proceso de recombinación y fusión de gametos, se conserva íntegramente el genotipo de la planta donante. Actualmente, la vía de regeneración que cumple con los requisitos que se mencionaron anteriormente para lograr una óptima propagación vegetativa, y

que por tanto se considera como la más adecuada para la micropropagación de especies forestales, es la embriogénesis somática. (Merkle y Deam, 2000).

La ES se está abriendo paso como la vía de regeneración más adecuada para complementar las técnicas de mejora clásica en diversas especies forestales. La genómica está tratando de determinar los procesos básicos que subyacen a esta vía de regeneración (Bis-hop-Hurley et al., 2003; Charbit et al., 2004). La posibilidad emergente de clonar mediante embriogénesis somática árboles adultos seleccionados con fiabilidad, podrá resolver el serio problema de las pérdidas de volumen de tronco constatadas en ramets procedentes del estaquillado de ortets de edades crecientes, como efecto de su envejecimiento fisiológico (Smith, 1999). Sin embargo el coste de producir árboles clónicos es más elevado que el de árboles propagados por semilla. Por tanto la Silvicultura clonal probablemente se practicará en los sitios comercialmente más productivos para aprovechar las características específicas de los clones evaluados. Así, los bosques clonales representarán solamente una porción de las plantaciones forestales. En la mayoría de los lugares a reforestar, la regeneración natural y otros métodos de gestión forestal que fomenten la silvicultura sostenible, cabe pensar que seguirán siendo la base principal de la reforestación.



Fotos: Elisa Quiala

Figura 24 Etapas de desarrollo del embrión somático de caoba *Swietenia* sp. A) Globular, B) Corazón, C) Torpedo, D) Cotiledonal.



Foto: Quiala et al. (2022)

Figura 25 Embriogénesis somática indirecta en *Swietenia* sp., a partir de segmentos nodales foliares

Bibliografía

Abdelnour A, Muñoz A (2005) Micropropagación de Teca (*Tectona grandis* L.) Revista Forestal Kurú 5:1-11

Abdelnour, A., & Muñoz, A. (2005). Micropropagación de Teca (*Tectona grandis* L.). Revista Forestal Kurú, 5:1-11.

Acosta M, Sánchez J, Bañón M (2008) Auxinas. En: Azcón-Bieto J, Talón M (Eds) Fundamentos de Fisiología vegetal. Mc Graw Hill Interamericana, Madrid, pp 377-397

Acosta M, Sánchez J, Bañón M (2008) Auxinas. En: Azcón-Bieto J, Talón M (Eds) Fundamentos de Fisiología vegetal. Mc Graw Hill Interamericana, Madrid, pp 377-397

Afreen, F., Zobayed, S., Kubota, C., Kozai, T., & Hasegawa, O. .. (1999). Supporting material affects the growth and development of in vitro *sweet potato* plantlets cultured photoautotrophically. 5:.. In vitro Cell Dev Biol-Plant 3, 470-474.

Afreen-Zobayed F, Zobayed SMA, Kubota C, Kozai T, Hasegawa O (2000) A combination of vermiculite and paper pulp supporting material for the photoautotrophic micropropagation of *sweet potato*. Plant Science 157:225-231

Afreen-Zobayed F, Zobayed SMA, Kubota C, Kozai

T, Hasegawa O (2000) A combination of vermiculite and paper pulp supporting material for the photoautotrophic micropropagation of *sweet potato*. Plant Science 157:225-231

Afreen-Zobayed F, Zobayed SMA, Kubota C, Kozai T, Hasegawa O (2000) A combination of vermiculite and paper pulp supporting material for the photoautotrophic micropropagation of *sweet potato*. Plant Science 157: 225-231

Agrawal T, Gupta AK, Kumar AP, Shekhawat NS (2014) Micropropagation and validation of genetic homogeneity of *Alhagi maurorum* using SCoT, ISSR and RAPD markers. Plant Cell Tissue and Organ Culture 120:313-323

Agrawal, N., & Sardar, P. (2007). In vitro regeneration through somatic embryogenesis and organogenesis using cotyledons of *Cassia angustifolia* Vahl.43:. In Vitro Cell Dev Biol Plant, 585-592.

Agrawal, V., & Sardar, P. (2003). In vitro organogenesis and histomorphological investigations in senna *Cassia angustifolia* a medicinally valuable shrub -9:. Physiol. Mol. Biol. Plants , 131-140.

Agrawal. (2007). In vitro regeneration through somatic embryogenesis and organogenesis using cotyledons of *Cassia angustifolia* Vahl.43. In Vitro Cell Dev Biol Plant, 585-592.

Ahmad T, Ur-Rahman H, Ahmed MCH, Laghari MH (2003) Effect of culture media and growth regulators on micropropagation of *peach rootstock* GF 677. Pak Journal Botany 35 (3):331-338

Aitken-Christie J, Kozai T, Takayama S (1995) Automation in plant tissue culture – general introduction and overview. In: Aitken.Christie J, Kozai T, Smith L (eds) Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 1-18.

Al Malki, H., & Elmeer, K. (2010). Influence of auxin and cytokinin on in vitro multiplication of *Ficus Anastasia* Afr in African 9(5) . Journal of Biotechnology , :635-639 .

Alemanno L, Berthouly M, Michaux-Ferriere NA (1997) Histology of somatic embryogenesis from floral tissues of cocoa. Plant Cell Tiss Organ Cult 46: 187-194

Aloni R. (2001) Foliar and axial aspects of vascular differentiation: Hypotheses and evidence. J. Plant Growth Regul. 201: 22 – 34.

Alvarez C, Sáez P, Sáez K (2012) Effects of light and ventilation on physiological parameters during in vitro acclimatization of *Gevuina avellana* mol. Plant Cell Tissue Organ Culture 110:93-101 doi: 10.1007/s11240-012-0133-x

Andrade CF, Wong AP, Waddell TK, Keshaujee S, Liu M (2007) Lung Cellular and Molecular Physiology 292

(2):510-518 doi 10.1152/ajplung.00175.2006

Andrade CF, Wong AP, Waddell TK, Keshaujee S, Liu M. (2007). Lung Cellular and Molecular Physiology. 292(2):510-518.

Apóstolo NM, Llorente B (2000) Anatomy of normal and hyperhydric leaves and shoots of in vitro grown *Simmondsia chinensis* (link) schn In Vitro Cell Dev Biol.- Plant 36:414 – 418

Apóstolo, N. „ (2000). Anatomy of the normal and hyperhydric leaves and shoots of in vitro grown *Simmondsia chinensis* (Link)36: . Schn. In Vitro Cell Dev Biol Plant , 243–249. .

Aragón CE, Carvalho L, González J, Escalona M, Amancio S (2010b) *Ex vitro* acclimatization of plantain plantlets micropropagated in temporary immersion bioreactor. Biol Plant 54:237–244.

Aragón CE, Escalona M, Rodríguez R, Cañal MJ, Capote I, Pina D, González-Olmedo J (2010a). Effect of sucrose, light, and carbon dioxide on plantain micropropagation in temporary immersion bioreactors. In Vitro Cell Dev Biol – Plant 46: 89–94.

Aragón, C., Escalona, M., Rodríguez, R. „, Capote, I. „, & González, J. (2010). Effect of sucrose, light, and carbon dioxide on plantain micropropagation in temporary immersion bioreactors- Plant 46:. . In Vitro Cell Dev Biol , 89–94.

Argita L, Fernández AG, González A, Tamés RS (2005) Effect of the application of benzyladenine pulse on organogenesis, acclimatization and endogenous phytohormone content in kiwi explants cultured under autotrophic conditions. Plant Physiol. Biochem. 432: 161 – 167.

Asada K (1992) Ascorbate peroxidase – a hydrogen peroxide –scavenging enzyme in plants. Physiol Plant. 85: 235–241.

Attree S, Fowke L (1992) Embryogeny of Gymnosperms: Advances in Synthetic Seed technology of conifers. Plant Cell Tiss Organ Cult 35: 1–35

Aubé M, Quenum M, Ranasinghe LL (2015) Characteristics of Eastern Canadian cultivated Sphagnum and potential use as a substitute for perlite and vermiculite in peat – based horticultural substrates. Mires and Peat. 15:154–161

Azcón-Bieto J, Talón M (2008) Fundamentos de Fisiología Vegetal. Segunda Edición. 638 pp

Azofeifa, A. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes in vitro. Agronomía Mesoamericana, 20(1):153–175.

Bairu MW, Aremu AO, Van Staden J (2011) Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. Plant Growth Regulation 63:147–173

Berthouly, M. ., (2005). Temporary immersion systems: a new concept for use liquid medium in mass propagation. (Springer Ed). Liquid Culture Systems or in vitro Plant Propagation, 165-195.

Billard C y Lallana V (2005) Multiplicación *in vitro* de *Eucalyptus dunnii*. Ciencia, Docencia y Tecnología 16 (30): 192-216. [Página web en línea] Disponible en: www.redalyc.uaemex.mx.

Billard C, Lallana V (2005) Multiplicación in vitro de *Eucalyptus dunnii*. Ciencia, Docencia y Tecnología 16 (30):192-216

Blanco HA, Vargas TE, de García E (2011) Micropropagación clonal de tres cultivares de piña nativas de la región amazónica mediante cultivo de yemas axilares y apicales. Interciencia 36(6): 437-443

Blanco M, Valverde R, Gómez L (2004) Micropropagación de *Dracaena deemensis*. Agronomía Costarricense, 28:7-15.

Brown J, Lauretin H, Dávila M (2003) Genetic relationship between *Annona muricata* L. accessions using RAPD markers. Fruits 58 (5):255-259

Cabrera, J., Gómez, R., Cabrera, R., De Fera, M., Basail, M., Medero, V., y otros. (2011). Performance of yam microtubers from temporary immersion system in field conditions. 10: . African Journal of Biotechnology , 9268-9271.

Capellades M, Lemeur L, Debergh P (1991) Effects of sucrose on starch accumulation and rate of photosynthesis in rosa culture in vitro. Plant Cell, Tissue Organ Culture 25:21-26

Carra A, Sajeva M, Abbate L, Siragusa M, Sottile F, Carimi F (2012) In vitro plant regeneration of Caper (*Capparis spinosa* L.) from floral explants and genetic stability of regenerants. Plant Cell Tissue Organ Cult 109:373-381

Cartaya O, Reynaldo I (2001) Flavonoides: Características química y aplicaciones, Cultivos Tropicales 22 (2):5-14

Castillo, A. (2005). Propagación de plantas por cultivo in vitro, una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Obtenido de www.agrotec.com.uy

Castro D y González-Olmedo J (2002) Micropropagación de eucalipto (*Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden) en el sistema de inmersión temporal. Agricultura Técnica 62:68-78.

Chakrabarty D, Subodh A (2008) Micropropagation of gerbera: lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities during acclimatization process. Acta Physiol. Plant 30: 325-331.

Chaturvedi, R., & Razdan, M. ., (2004). In vitro clonal propagation of an adult tree of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) by forced axillary branching. Plant Science,

166:501-506.

Chávez S, Domine M (2013) Lignina, estructura y aplicaciones: Métodos de depolimerización para la obtención de derivados aromáticos de interés industrial. Avances en Ciencias e Ingeniería 4(4):15-46

Cheruvathur MK, Britto J, Thoma TD . (2010). Callus induction and shoot regeneration from epicotyl explants of ethnomedicinally important *Caesalpinia bunduc* (L.) Roxb Iranian. Journal Biotechnology , 8(4):263-269.

Clarindo W, Carvahlo C, Santos F, Abreu I, Campos W (2008) Recovery polyploid papaya in vitro regenerants as screened by flow cytometry. Plant Cell Tiss Organ Cult 92: 207-214

Colectivo de Autores. (2008.). Manual de Bioseguridad Estomatológica. Editorial Ciencias Médicas. Ciudad de la Habana .

Couceiro MA, Afreen F, Zobayed SMA, Kozai T (2006) Enhanced growth and quality of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) under photoautotrophic in vitro conditions. In Vitro Cell Dev. Biol-Plant 42:278-282

Cristea VF, Dalla Vecchia, La Rocca N (1999) Development and photosynthetic characteristics of a photoautotrophic Chrysanthemum culture. Photosynthetica 37:53-59

Cruz N, Ramos L (2003) Micropropagación clonal

in vitro de árboles seleccionados de *Tectona grandis* L. (Teca). Agronomía Costarricense: (2):1-5

Custódio L, Martins – Loucao M, Romano A (2004) Influence of sugars on in vitro rooting and acclimatization of carob tree. Biol Plant 48 (3):469-472

De Fera, M., Jiménez, E., Barbón, R., Capote, A., & Chávez, M. . (2003). Diferenciación y germinación de embriones somáticos de *Coffea arabica* L. cv. Catimor 9722 obtenidos en agitador orbital.2. Revista de Biotecnología Vegetal, : 15-19.

De Souza R, Grasso R (2012) Evaluación de un sistema de enraizamiento in vitro fotoautotrófico para *Eucalyptus dunnii*. Tesis presentada para obtener el título de Ingeniero Agrónomo, Universidad de la República, Facultad de Agronomía, Montevideo, Uruguay, 75 pp

De Souza, R., & Grasso, R. (2012). Evaluación de un sistema de enraizamiento in vitro fotoautotrófico para *Eucalyptus dunnii*. Tesis, 75.

Debergh PC (1983) Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. Physiol Plant 59: 270-276

Debergh PC, Aitken-Christie J, Cohen D, Grout B, von Arnold S, Zimmerman R, Ziv M (1992) Reconsideration of the term vitrification as used in micropropagation. Plant Cell Tissue and Organ Culture 30: 140-165.

Deccetti SF (2008) Effect of the culture environment on stomatal features, epidermal cells and water loss of micropropagated *Annona glabra* L. plants. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam 117:341–344

Desjardins Y (1995) Photosynthesis *in vitro* on the factors regulating CO₂ assimilation in micropropagation systems. *Acta Hort.* 393:345–3

Di Pinto, A., Terio, V., Novello, L., & T., G. (2020). Comparación entre el agar tiosulfato-citrato-sal biliar sacarosa (TCBS) y CHRO-Magar Vibrio para aislar Vibrio parahaemolyticus. *Control de alimentos.* .

Días MC, Pinto G, Correia CM, Moutinho-Pereira J, Silva S, Santos C (2013) Photosynthetic parameters of *Ulmus minor* plantlets affected by irradiance during acclimatization. *Biologia Plantarum* 57(1): 33–40

Downs C.G, Somerfield SD, Davery MC (1997) Cytokinin treatment delays senescence but not sucrose loss in harvested broccoli. *Postharvest Biol. Technol.* 112: 93 – 100.

Faisal M, Siddique I, Anis M (2007) An efficient plant regeneration system for *Mucuna purence* L. (DC) using cotyledonary node explants. *In vitro Cell Dev Biol.-Plant* 42:59–64

Fitch MM, Leong T, Akashi L, Yeh A, White S, De la Cruz A, Santo L, Ferreira S, Moore PH (2005) Growth and yield of clonally propagated and seedling-derived

papayas. I. growth. II yield. *J Hort Sci Biotech* 40 (5):1283–1290

Franck T, Crèvecoeur M, Wuest J, Greppin H, Gaspar Th (1998) Cytological comparison of leaves and stems of *Prunus avium* L. shoots cultured on a solid medium with agar or gelrite. *Biotech. Histochem.* 73: 32–43

Franck T, Kevers C, Gaspar T, Dommes J, Deby C, Greimers S, Deby-Dupont G (2004) Hyperhydricity of *Prunus avium* shoots cultured on gelrite: a controlled stress response. *Plant Physiol and Bioch.* 42: 519–527

Fuentes G, Talavera C, Espadas F, Contreras F, Santamaría J (2009) Acclimatization, rooting and field establishment of micropropagated papaya plants. *Acta Hort.* 812:373–378

Fuji SD, Olsen R, Ruzin S, Redenbough K (1990) Alfalfa somatic embryo maturation and conversion to plants. *Plant Science* 72: 93–97

Fujiwara K, Kozai T (1995) Physical microenvironment and its effects En: Aitken-Christie J, Kozai T, Smith Mal (Eds) *Automation and environmental control in plant tissue culture*, Springer Publishers, Dordrecht, pp 319–369

Gallardo J, Posada L, Gómez R, Más L, Reyes M, Herrera I (2002) Micropropagación del híbrido cubano de papay IBP 42–99. *Biotecnología vegetal* 2(4): 211–215

Gallardo J, Gómez R, Herrera I, Tejeda M, Posada L, Chong B, Reyes M, Freire M (2004) Regeneración de plantas de un híbrido de papaya (IBP 42-99) a partir de callos obtenidos de ápices de plantas in vitro. *Biotechnología Vegetal* 4 (3):159-163

Gamborg OL, Murashige T, Thorpe TA, Vasil IK (1976) Plant Tissue Culture media. *In vitro*, 12:473-478

Gamborg, O., Murashige, T., Thorpe, T., & Vasil, i. (1976). *In vitro*. Plant Tissue Culture Media, 12:473-478.

Gaspar T (1991) Vitrification in micropropagation, in: Y.P.S. Bajaj (Ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 17, High-Tech and Micropropagation I, Springer-Verlag, Berlin, pp117-126.

Gaspar T, Franck T, Bisbis B, Kevers C, Jouve L, Hausman JF, Dommes J (2002) Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *Plant Growth Regulation* 37:263-285

Gaspar T, Franck T, Bisbis B, Kevers C, Jouve L, Hausman JF, Dommes J (2002) Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *Plant Growth Regulation* 37:263-285

Gaspar, T., Kevers, C., & Bisbis, B. . (2000). Loss of plant organogenic totipotency in the course of *in vitro* neoplastic progression, 36: In *Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.*, 171-181.

Genkov T, Tsoneva P, Ivanova I (1997) Effect of cytokinin on photosynthetic pigments and chlorophyllase activity in in vitro cultures of axillary buds of *Dianthus caryophyllus* L. J. *Plant Growth Regul.* 163: 169 – 172.

George, E. . (2008). *Micropropagation: Uses and Methods*. Box 17, 3300 AA Dordrecht, The Netherlands: 3rd Edition, Springer.

Goltsev V, Genkov T, Lexa M, Ivanova I (2001) Effect of benzyladenine, 4-PU-30 and thidiazuron on millisecond delayed and prompt chlorophyll fluorescence of *Dianthus caryophyllus* L. axillary buds cultured in vitro. *Sci. Hortic.* 891: 41 – 54.

González, S. (2002). *Medios de Cultivo*. Departamento de Biología Vegetal. Facultad de Biología. Universidad de la Habana, Cuba, 13 p.

Goyal P, Kachhwaha S, Kothari SL (2012) Micropropagation of *Pithecellobium dulce* (Roxb.) Benth—a multipurpose leguminous tree and assessment of genetic fidelity of micropropagated plants using molecular markers. *Physiol Mol Biol Plants* 18 (2):169-176; doi: 10.1007/s12298-012-0112-z

Grace SC (2005) Phenolics antioxidants. In: *Antioxidants and reactive oxygen species in plants*. (Ed. Nicholas Smirnoff) Blackwell Publishing LTD, UK

Gribble K, Tingle J, Sarafis V, Heaton, Holford P (1998) Position of water in vitrified plants visualised by NMR

imaging, Protoplasma 201: 110–114.

Grout BW, Donkin ME (1987) Photosynthetic activity of cauliflower meristem cultures in vitro and at transplanting into soil. Acta Hort. 34:323–328

Grout BW, Donkin ME (1987) Photosynthetic activity of cauliflower meristem cultures in vitro and at transplanting into soil. Acta Hort. 34:323–328

Grout BW, Donkin ME (1987) Photosynthetic activity of cauliflower meristem cultures in vitro and at transplanting into soil. Acta Hort. 34:323–328

Harish, Gupta AK, Phulwaria M, Rai MK, Shekhawat NS (2014) Conservation genetics of endangered medicinal plant Commiphora wightii in Indian Thar Desert. Gene 535:266–272

Hazarika B (2003) Acclimatization of tissue-cultured plants. Current Science. 85:1704–1712

Hazarika B (2003) Acclimatization of tissue-cultured plants. Current Science. 85: 1704–1712.

Hazarika B (2003) Acclimatization of tissue-cultured plants. Current Science 85: 1704–1712

Hazarika B (2006) Morpho-physiological disorders in in vitro culture of plant. Scientia Horticulturae 108(2): 105–120

Hazarika BN (2006) Morpho-physiological disorders

in in vitro culture of plants. Sci Hortic 108:105–120

Heo J, Kozai T (2001) Forced ventilation micropropagation system for enhancing photosynthesis, growth and development of plantlets and its application to sweet potato. Environ. Control Biol. 37:83–92

Homhuan S, Kijwijan B, Wangsomnuk P, Bodhipadma K, Leung DWM (2008) Variation of plants derived from indirect somatic embryogenesis in cotyledon explants of papaya. Science Asia 34: 347–352

Hrahse L, Basu A, Sahoo L, Thangjam R (2014) In vitro propagation and assessment of the genetic fidelity of Musa acuminata (AAA) cv. Vaibalhla derived from immature male flowers. Appl Biochem Biotechnol 172:1530–1539

Huang P, Liao L, Tsai C, Liu Z (2011) Micropropagation of bromeliad Aechmea fasciata via floral organ segments and effects of acclimatization on plantlet growth. Plant Cell Tissue Organ Cult 105:73–78

Huang P, Liao L, Tsai C, Liu Z (2011) Micropropagation of bromeliad Aechmea fasciata via floral organ segments and effects of acclimatization on plantlet growth. Plant Cell Tissue Organ Cult 105:73–78

Iarema L, Da Cruz ACF, Saldanha CW, Dias LLC, Vieira RF, De Oliveira EJ, Otoni WC (2012) Photoautotrophic propagation of Brazilian ginseng [Pfaffia glomerata (Spreng.) Pedersen]. Plant Cell Tissue Organ Cult 110

(3):227-238

Iarema L, da Cruz ACF, Saldanha CW, Dias LLC, Vieira RF, de Oliveira EJ, Otoni WC (2012) Photoautotrophic propagation of Brazilian ginseg [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 110(3): 227-238

Imbrogno LP (2007) Elongación in vitro y enraizamiento ex vitro de brotes de *Pinus taeda* L. Tesis de Maestría. UCLV-UNM. 77 p

Ivanova M (2009) Regulation of hyperhydricity in *Aloe polyphylla* L. propagated in vitro. Dissertation, University of KwaZulu-Natal. p 240.

Ivanova M y Van Staden J (2011) Influence of gelling agent and cytokinins on the control of hyperhydricity in *Aloe polyphylla*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 104:13-21.

Jimenez, E. (1998). Generalidades del Cultivo *In vitro*. Propagación y mejoramiento genético de plantas por Biotecnología, 13 - 55.

Jo EA, Tewari RK, Hahn EJ, Paek KY (2009) *In vitro* sucrose concentration affects growth and acclimatization of *Alocasia amazonica* plantlets. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 96:307-315. Doi 10.1007/s11240-008-9488-4

Jo EA, Tewari RK, Hahn EJ, Paek KY (2009) *In vitro* sucrose concentration affects growth and acclimatization

of *Alocasia amazonica* plantlets. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 96:307-315. Doi 10.1007/s11240-008-9488-4

Kevers C, Franck T, Strasser R, Dommes J, Gaspar T (2004) Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress-induced change of physiological state. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 77: 181-191

Kevers C, Franck T, Strasser R, Dommes J, Gaspar T (2004) Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress-induced change of physiological state. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 77:181-191

Kevers C, Franck T, Strasser R, Dommes J, Gaspar T (2004) Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stressinduced change of physiological state. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 77:181-191.

Khan PSV, Kosai T, Nguyen QT, Kubota C, Dhawan V (2003) Growth and Water Relations of *Paulownia fortunei* under photomixotrophic and photoautotrophic conditions. *Biología Plantarum* 46 (2):161-166

Khan PSV, Kozai T, Nguyen QT, Kubota C, Dhawan V (2002) Growth and net photosynthesis rates of *Eucalyptus tereticornis* Smith under photomixotrophic and various photoautotrophic micropropagation conditions. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 71:141-146

Kim SH, Kim SK (2002) Effect of cytokinins on in vitro growth of Grapes (*Vitis* spp.). *Korean Journal Plant Biotechnology* 29v(2):87-91

Kitaya Y, Ohmura Y, Kubota C, Kozai T (2005) Air movement and photosynthesis in micropropagation. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 83:251–257

Kozai T, Zobayed SMA (2000) Acclimatization. En: Spier R (Ed) *Encyclopedia of Cell Technology*, John Wiley & Sons, Inc. New York, pp 1–12

Kozai T, Zobayed SMA (2000) Acclimatization. En: Spier R (Ed) *Encyclopedia of Cell Technology*, John Wiley & Sons, Inc. New York, pp 1–12

Kozai T (2010) Photoautotrophic micropropagation–environmental control for promoting photosynthesis. *Propag. Ornamental Plants* 10:88–97

Kozai T y Smith MAL (1995) Environmental control in plant tissue culture. In: Aitken–Christie J, Kozai T, Smith MAL (eds) *Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture*. Dordrecht: Kluwer, p. 301–18.

Kozai T, Kubota C (2005) Concepts, definitions, ventilation methods, advantages and disadvantages. En: Kozai T, Afreen F, Zobayed SMA (Eds) *Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new propagation and transplant production system*. Springer, Dordrecht, pp 19–30

Kozai T, Kubota C (2005) Concepts, definitions, ventilation methods, advantages and disadvantages. En: Kozai T, Afreen F, Zobayed SMA (Eds) *Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new*

propagation and transplant production system. Springer, Dordrecht, pp 19–30

Kozai T, Kubota C (2005) Unit and terminology use for the studies of photoautotrophic micropropagation. En: *Photoautotrophic(sugar-free medium) micropropagation as a new propagation and transplant production system* (Eds.) by T. Kozai, F. Afreen, SMA. Zobayed. pp. 6–17.

Kozai T, Kubota C, Zobayed SMA, Nguyen QT, Afreen–Zobayed F, Heo J (1999) Developing a mass-propagation system of woody plants. In: Watanabe K, Komamine A, eds. *Proceedings of the 12th Toyota conference: Challenge of plant and agriculture sciences to the*

Kozai T, Xiao Y, Nguyen QT, Afreen F, Zobayed SMA (2005) Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation system for large-scale commercialization. *Propag. of Ornamental Plants* 5:23–34

Kozai T, Xiao Y, Nguyen QT, Afreen F, Zobayed SMA (2005) Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation system for large-scale commercialization. *Propag. of Ornamental Plants* 5:23–34

Kubota C, Khan PSV, Kozai T, Nguyen QT, Dhawan V (2002) Growth and net photosynthesis rates of *Eucalyptus tereticornis* Smith under photomixotrophic and various

photoautotrophic micropropagation conditions. Plant Cell Tissue and Organ Culture 71:141–146

Kulaeva O N, Burkhanova EA, Karavaiko NN, Selivankina SY, Porfirova SA, Maslova GG, Zemlyachenko YU, Borner T (2002) Chloroplasts affect the leaf response to cytokinin. J Plant Physiol 159:12: 1309 – 1316.

Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., & Mroginski, L. (20 de Octubre de 2010). Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Obtenido de <http://intainforma.inta.gov.ar/wpcontent/uploads/2010/09/bio-web.pdf>.

Lian M, Murthy H, Paek K (2002) Culture method and photosynthetic photon flux affect photosynthesis growth and survival of Limonium “Misty Blue” in vitro. Sci Hortic 95:239–249

Louro RP, Dos Santos AV, Machado RD (1999) Ultrastructure of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla*. I. Shoots cultivated in vitro in multiplication and elongation-rooting media. Int J Plant Sci 160: 217–227

Lowe AJ, Hanotte O, Guarino L (1996) Standardization of molecular genetic technique for the characterization of germplasm collections: the case of random amplified polymorphic DNA (RAPD). Plant Genet. Resour. Newsl 107:50–54

Majada J, Sierra I, Sanchez-Tames R (2001) Air exchange rate affects the in vitro developed leaf cuticle

of carnation. Hort. Sci. 87:121–130

Malabadi RB, SV Kumar, GS Mulgund, Nataraja K (2011) Induction of somatic embryogenesis in papaya (Carica papaya). Res Biotechnol 2(5): 40–55

Martínez R, Aspiroz HS, Rodríguez JL (2005) Aclimatización de plantas obtenidas in vitro de *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake y *Eucalyptus grandis* Hill Ex maiden Universidad Autonoma Indígena de México Mochicahui, El Fuerte, Sinaloa 1 (3):591–597

Mendoza, E., Royani, J., & Rugini, E. (2007). Efficient method of micropropagation and in vitro rooting of teak (*Tectona grandis* L.) focusing on large scale industrial plantations. Ann. For Sci, 64:73–78.

Merkle S y Nairn J (2005) Hardwood tree biotechnology. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 41:602–619.

Merkle S, Parrott W, Flinn B (1995) Morphogenetic aspects of somatic embryogenesis. En: Thorpe TA (Ed.) *In vitro* Embryogenesis in plants. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Holanda. pp 155–203 262–263

Merkle, S., & Nairn, J. (2005). Hardwood tree biotechnology. In Pitro Cell. Dev.Biol.- Plant, 41:602–619.

Miranda J, Williams R (2007) Developmental influence of *in vitro* light quality and carbon dioxide on photochemical efficiency of PS II of strawberry leaves (*Fragaria x ananassa*) Journal of Applied Horticulture

9:13-1

Molphe – Balch E, Ramírez M, Núñez R, Palenius HG, Ochoa NA (1999) Introducción al cultivo de tejidos vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes, pp 25-27

Moncaleán P, Fal MA, Castañón S, Fernández B, Rodríguez A (2009) Relative water content, in vitro proliferation, and growth of *Actidiana deliciosa* plantlets are affected by benzyladenine. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science 37:351–359.

Moncaleán P, Fernández B, Rodríguez A (2009) *Actinidia deliciosa* leaf stomatal characteristics in relation to benzyladenine incubation periods in micropropagated explants. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science 35: 159- 169.

Monk LS, Fagerstedt KV, Crawford RMM (1989) Oxygen toxicity and superoxide dismutase as an antioxidant in physiological stress. *Physiol Plant* 76: 438–745.

Monteuuis O, Galiana A, Goh D (2013) *In Vitro* Propagation of *Acacia mangium*, *A. mangium* × *A. auriculiformis*. Chapter 15 En: Protocols for Micropropagation of Selected Economically-Important Horticultural Plants, Methods in Molecular Biology, Vol. 11013, Maurizio Lambardi et al. (eds.), Springer Science Business Media New York, pp 199-211

Mroginski, L., Sansberro, P., & Faschland, E. (2004). Establecimiento de cultivo de tejidos vegetales. En C. L. V.Echenique (Ed.), *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal* (págs. 35-42). Argentina: INTA.

Munshi MK, Hakim L, Slam MRI, Ahmed G (2004) In Vitro Clonal Propagation of Banyan (*Ficus benghalensis* L.) through Axillary Bud Culture. *International Journal of Agriculture Biology* 6:321–323

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant*, 15:473–497.

Nagori R, Purohit SD (2004) In vitro planted regeneration in *Annona squamosa* L. through direct shoot bud differentiation on hypocotyls segments. *Sci. Hortic.* 991: 89–98.

Nayak R, Behera PR, Manikkannan T (2007) High frequency plantlet regeneration from cotyledonary node cultures of *Aegle marmelos* (L.) Corr. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 43:231–236

Nehra, N., Becwar, M., Rottmann, W., Pearson, L., Chowdhury, K., Chang, S., y otros. (2005). Forest Biotechnology Innovative methods, emerging opportunities. *In vitro Cell Dev Biol.- Plant*, 41: 701 - 717.

Nguyen Q y Kozai T (2001) Growth of in vitro banana (*Musa* spp.) shoots under photomixotrophic and photoautotrophic conditions. *In Vitro Cell. Dev. Biol*

Plant 37: 824-829.

Nguyen QT, Kozai T (2001) Growth of in vitro banana (*Musa* spp.) shoots under photomixotrophic and photoautotrophic conditions. In *Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*. 37:824-

Nguyen QT, Kozai T (2001b) Photoautotrophic micropropagation of tropical and subtropical woody plants. En: Morohoshi N. Komamine A. (eds) *Molecular Breeding of Woody Plants*. Elsevier Science B.V. Amsterdams. The Netherlands pp. 335-344

Nguyen QT, Kozai T (2005). Photoautotrophic micropropagation of woody species. In: Kozai, T., Afreen, F., Zobayed, S.M.A. (Eds.), *Photoautotrophic (Sugar-Free Medium) Micropropagation as a New Propagation and Transplant Production System*. Springer, Dordrecht, pp. 119-142

Novak, F. (1988). Embriogénesis somática y mutaciones inducidas mediante cultivos in vitro del banano y el plátano. *Musa* spp, 99-107.

Núñez J, Quiala E, Posada L (2017) Propagación in vitro de *Caesalpinia Espinosa* (Mol.) O. Kuntz, a partir de segmentos nodales de árboles plus. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas, Santa Clara, Cuba.

Oliveira LM, Renato P, Santana JRF, Alves E, Cravo NR, Pereira FD (2008) Effect of cytokinins on in vitro

development of autotrophism and acclimatization of *Annona glabra* L. In *Vitro Cell Dev Biol-Plant*. DOI 10.1007/s11627-008-9119-0.

Olmos, S., Luciani, G., & Galdeano, E. (2004). *Micropropagación en Biotecnología y Mejoramiento Vegetal*. Argentina: Ediciones Inta.

Orellana P. (1998). Introducción a la propagación masiva, en propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. *Biotecnología Vegetal*, 125-133.

Orellana, P., García, L., I., B., Veitía, N., & Romero, C. (2002). Manejo de hijos y ápices de cultivares de *Musa* spp para iniciar la micropropagación y comportamiento durante seis cultivos in vitro. *Biotecnología Vegetal*, Volumen 2: 77-81.

Osório ML, Goncalves S, Osório J, Romano A (2005) Effects of CO₂ concentration on acclimatization and physiological responses of two cultivars of carob tree. *Biol. Plant*. 54: 415-422

Ozyigit I (2008) Phenolic changes during in vitro organogenesis of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) shoot tips. *African Journal of Biotechnology* 7 (8):1145-1150

Park SW, Jeon JH, Kim HS, Park YM, Aswath C, Joung H (2004) Effect of sealed and vented gaseous microenvironments on hyperhydricity of potato shoots in vitro. *Sci. Hort*. 99:199-205.

Parrott W (1993) Biotechnology applications for banana and plantain improvement. Reunión INIBAP. San José, Costa Rica. Proceedings. INIBAP, 120 pp

Parrott W (2002) La embriogénesis somática en las angiospermas. En: Resúmenes del VI Simposio Internacional en Biotecnología Vegetal. Instituto de Biotecnología de las Plantas. junio 12-14, Santa Clara, Cuba. 95 p

Parrott W (2002) La embriogénesis somática en las angiospermas. En: Resúmenes del VI Simposio Internacional en Biotecnología Vegetal. Instituto de Biotecnología de las Plantas. junio 12-14, Santa Clara, Cuba. 95 pp

Pérez, M., Ramírez, M., Núñez, P., & Ochoa, A. (1998). Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales. Aguas Calientes: Universidad Autónoma de Aguas Calientes.

Phulwaria M, Patel AK, Rathore JS (2014) An improved micropropagation and assessment of genetic stability of micropropagated *Salvadora oleoides* using RAPD and ISSR markers *Acta Physiol Plant* 36:1115-1121

Posada L (2016) Embriogénesis somática y enraizamiento in vitro fotoautotrófico en papaya (*Carica papaya* L.) cultivar '*Maradol Roja*'. Tesis Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas, Santa Clara, Cuba 100 pp

Posada L, Padrón Y, Gonzáles J, Barbón R, Rodríguez

R, Norman O, Hurtado O, Daniels D, Gómez R (2015) Effect of different culture conditions (photoautotrophic, photomixotrophic) and the auxin índole-butyric acid on the in vitro acclimatization of papaya (*Carica papaya* L. var. Maradol Roja) plants using zeolite as support. *African Journal of Biotechnology* 14 (35):2622-2635

Posada L, Padrón Y, Gonzáles J, Barbón R, Rodríguez R, Norman O, Hurtado O, Daniels D, Gómez R (2015) Effect of different culture conditions (photoautotrophic, photomixotrophic) and the auxin índole-butyric acid on the in vitro acclimatization of papaya (*Carica papaya* L. var. Maradol Roja) plants using zeolite as support. *African Journal of Biotechnology* 14 (35):

Pospíšilová J, Synkova H, Haisel D, Semoradova S (2007) Acclimatization of plantlets to ex vitro conditions: effects of air, humidity, irradiance, CO₂ concentration and abscisic acid. *Acta Horticulturae* 748(3): 29-39

Pospíšilová J, Tichà I, Kadlec P, Haisel D, Plzaková S (1999) Acclimatization of micropropagated plants to ex vitro conditions. *Biol Plant* 42: 481-497.

Quiala E (2012) Efecto de la 6-Bencilaminopurina en la morfo- anatomía y la fisiología de brotes de *Tectona grandis* L. cultivados en sistemas de inmersión temporal. Tesis Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas, Santa Clara, Cuba 100 pp

Quiala EM., Kosky GR, De Fera M, Posada LP,

Gilliard T, Bernal FM, Reyes MV, Chávez MM, (2002) Somatic embryogenesis of the banana hybrid cultivar 'FHIA-18' (AAAB) in liquid medium and scale-up in a bioreactor. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 68: 21-26

Quiala, E., Barbón, E., Jiménez, R., de Feria, M. ,, Capote, A., & Pérez, N. (2006). Biomass production of *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf, a medicinal plant, in temporary immersion system. 42. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 298-300.

Quintanilla K (2007) Establecimiento in vitro de Loroco (*Fernaldia pandurata* W.). *Agronomía Mesoamericana* 18:75-84

Rani V, Parida A, Raina S (1995) Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in micropropagated plants of *Populus deltoides* Marsh. *Plant Cell Rep* 14: 459-462

Rani V, Raina S (2000) Genetic fidelity of organized meristem derived micropropagated plants: a critical reappraisal. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 36: 319-330

Rao KS . (1996). Embryogenesis in flowering plants. Recent approaches and prospects *J. Biosci*, 21 (6):827-841.

Rathore JS, Rai MK, Phulwaria M, Shekhawat NS (2014). A liquid culture system for improved micropropagation of mature *Acacia nilotica* (L.) del spp. *Indica* and *ex vitro* rooting. *Proc. Nat.Acad.Sci. India*

Seet. B:Biología. Sci. 84:193-200

Ríos D, Avilés F, Sánchez OM, Escobar R, Pereira G (2005) Variación de la tasa de enraizamiento asociada al número de subcultivo y diámetro de micro tallos de Castaño (*Castanea sativa* Mill.). *Agricultura Técnica* 65(3):258-264

Rodrigues J, Verdoodt V, Pasqual M, De Proft M (2016) Physiological responses by *Billbergia zebrina* (Bromeliaceae) when grown under controlled microenvironmental conditions. *African Journal of Biotechnology* 15(36):1952-1961 doi 10.5897/AJB2016.15584

Rodríguez S, Ortiz RS, Hernández RP, Armas PM, Guillen DS (2009) Propagación in vitro *Heliconia macbride* en Cuba. *Revista Chapingo. Serie Horticultura* 15: 15-21

Roque AY, Ardisana E, Cornide M, Coto O, Vargas D, Arencibia A (2006) Estabilidad genética de plantas de papaya (*Carica papaya* L., cv *Maradol Roja*) propagadas in vitro. *Revista Innovación tecnológica* 12 (3): 24-27

Sáez P, Bravo L, Sáez K, Sánchez-Olate M, Latsegue M, Ríos D (2012) Photosynthetic and leaf anatomical characteristics of *Castanea sativa*: a comparison between *in vitro* and nursery plants. *Biologia Plantarum*. 36(1): 15-2

Saher S, Piqueras A, Hellin E, Olmos E (2004) Hyperhydricity in micropropagated carnation shoots: the role of oxidative stress. *Physiologia Plantarum* 20: 152–161.

Saiprasad, G. V. S (2001) Artificial seeds and their applications. *Resonance* 6: 39–47

Salomao AN, Mundim RC (2000) Germination of papaya seed in response to desiccation, exposure to subzero temperatures, and gibberellic acid. *HortScience, Alexandria*, 35(5): 904–906

Sánchez J , Acosta M, , Bañón M (2009) Auxinas. En: Azcón-Bieto J, Talón M (Eds) *Fundamentos de Fisiología vegetal*. Mc Graw Hill Interamericana,

Sánchez, C. (2001). Estudio preliminar para la propagación *in vitro* de Tara. La Molina - Perú: Tesis de Grado.

Santana O. (04, 2016 de diciembre de 2005). Obtenido de www.jardinactual.com

Seon J, Cui Y, Kozai T, Paek K (2000) Influence of in vitro growth conditions on photosynthetic competence and survival ration of *Rehmannia glutinosa* plantlets during acclimatization period. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 64:135–142

Seon J, Cui Y, Kozait T, Paek K (2000) Influence of in vitro growth conditions on photosynthetic competence

and survival ration of *Rehmannia glutinosa* plantlets during acclimatization period. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 64: 135–142

Shim SW, Hahn EJ, Paek KY (2003) In vitro and ex vitro growth of grapevine rootstock ‘5BB’ as influenced by number of air exchanges and the presence or absence of sucrose in culture media. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 75:57–62

Shin KS, Park SY, Paek KY (2013) Sugar metabolism, photosynthesis, and growth of in vitro plantlets of *Doritaenopsis* under controlled microenvironmental conditions. *In vitro Cell Dev. Biology–Plant* 49:445–454 doi:10.1007/s11627-013-9524-x

Silva TS. (2012). Morfogenese e conservacao in vitro de *Caesalpinia pyramidalis* Tul. Feira de Santana: Dissertacao (Mestrado em Biotecnologia).

Slater, A., Scott, NW y Fowler, M.R. (2003) *Plant Biotechnology: The Genetic Manipulation of Plants* Oxford University Press. New York 346 pp

Soni M, Thakur M, Modgil M (2011) In vitro multiplication of Merton I. 793–An apple rootstock suitable for replantation. *Indian Journal of Biotechnology* 10

Souza RA, Dantas PVP, Cavalcante P de F, Tenorio RR, Houllou LM. (2017). Basic procedure for the in vitro propagation of Brazilian trees for reforestation purposes.

Journal of Environmental Analysis and Progress, 2(2):107-114.

Sreedhar RV, Venkatachalam, Neelwarne B (2009) Hyperhydricity-Related Morphologic and Biochemical Changes in Vanilla (*Vanilla planifolia* L.). J Plant Growth Regul 28:46-57

Suárez LS, Ferrari D, Savatin M, Cervone F, Hernández M (2012) Aportes al estudio de los mecanismos de acción del Pectimorf®. En: Resúmenes X Simposio Internacional de Biotecnología Vegetal, 17-19 de abril de 2012. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas, Santa Clara (Cuba), 102 pp

Tacoronte M, Vielma M, Mora A, Valecillos C (2004) Propagación in vitro de caoba (*Swietenia macrophylla*) a partir de yemas axilares. ACV, (Caracas). 55 (1):52-74. [En línea]. Disponible en: www2.bvs.org.ve/cielo.php?lng=es [consultado: 4 de diciembre del 2015]

Tadesse M, Lommen WJM, Struik PC (2000) Effects of in vitro treatments on leaf area growth of potato transplants during acclimatization, Plant Cell Tissue Organ Culture 61:59-67

Taiz L, Zeiger E (2002) Auxin: The growth hormone, Chapter 19. En: Plant Physiology. Third Edition. Sinauer Associates, Sunderland, MA. 690 pp

Talavera C, Espadas F, Contreras F, Fuentes G, Santamaría J (2009) Acclimatization, rooting and field

establishment of micropropagated papaya plants. Acta Hort. 812: 373-378

Tapia MC (2008) Crecimiento y productividad del musgo *Sphagnum magellanicum* Brid. En turberas secundarias de la provincia de Llanquihue, Chile. Universidad Austral de Chile. Tesis de Licenciatura. Chile pp 3-7

Teixeira da Silva JA, J Dobránszki J, Ross S (2013) Phloroglucinol in plant tissue culture. In Vitro Cell.Dev. Biol.-Plant 49:1-16

Teixeira, J. (2001). Limitacoes ao processo de cultivo in vitro de especies lenhosas. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnología. Ciencia Forestal, Santa María, 16 (4)381-390.

Tsay HS, Lee CY, Agrawal DC, Basker (2006) Influence of ventilation closure, gelling agent and explant type on shoot bud proliferation and hyperhydricity in *Scrophularia yoshimurae* – a medicinal plant. In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant 42:445-449.

Valero-Aracama C, Zobayed SMA, Roy SK, Kubota C, y Kozai T (2001) Photoautotrophic micropropagation of *Rhododendron*. Progress in Biotechnology, 18:385-390 Doi:10.1016/S0921-0423(01)80095-2

Valledor, L. ., Hasbún, R., Cañal, M., & Rodríguez, R. (2010). Variations in DNA methylation, acetylated histone H4, and methylated histone H3 during *Pinus*

radiata needle maturation in relation to the loss of in vitro organogenic capability. J. Plant Phy.

Van Huylenbroeck J, Piqueras A, Debergh P (2000) The evolution of photosynthesis capacity and the antioxidant enzymatic system during acclimatization of micropropagated Calathea plants. Plant Sci. 155:59-66

Vasil, I. (1994). Automation in plant propagation. Plant Cell Tissue and Organ Cult.

Villalobos, V., & Thorpe, T. (1991). Micropropagación: Conceptos, metodología y resultados. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Turrialba, Costa Rica.

von Arnold S (2008) Somatic embryogenesis. En: Plant Propagation by Tissue Culture (eds.) George EF, Hall MA y De Klerkl GJ, 3rd Edition, Volume 1. Holanda. pp 335-354.

Wann SR (1989) Somatic embryogenesis in woody species. In J Janick, ed, Horticultural Reviews, vol 10. Timber Press, Portland, OR, pp 153-181

Werner ET, Milanez CRD, Mengarda LHG, Vendrame WA, Cuzzuol GRF. (2010). Meios de cultura, reguladores de crescimento e fontes de nitrogenio a regulacao da calogenese do pau-brasil (Caesalpinia echinata Lam). Acta Bot.Bras., 24(4):1046-1051.

Xavier, A., Wendling, L., & Silva, R. (2013). Silvicultura Clonal: Principios e técnicas. Vicososa: Da UFV.

Xiao Y, Niu G, Kozai T (2011) Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. Plant Cell Tissue Organ Cult.105:149-158

Xiao Y, Zhang Y, Dang K, Wang D (2007) Growth and photosynthesis of Dendrobium candidum plantlets cultured photoautotrophically. Propagat. Ornamental Plants 7:86-96

Yadav R, Yadav N, Kumar S (2015) An improved micropropagation and assessment of genetic fidelity in multipurpose medicinal tree Acacia auriculiformis. Proc. Natl. Acad.of Sci.,India Sect B: Biol.Sci.,(3):1-9 doi 10.1007/s40011-015-0550-9

Yadav R, Yadav N, Pal M, Goutam U (2013) Multiple shoot proliferation, bulblet induction and evaluation of genetic stability in Asiatic hybrid lily (Lilium sp.). Indian J Plant Physiol 18:354-359

Yu TA, Yeh SD, Cheng YH, Yang JS (2000) Efficient rooting for establishment of papaya plantlets by micropropagation. Plant Cell Tissue Organ Culture 61:29-35

Zagoskina NV, Alyavina AK, Gladysenko TO, Lapshin PV, Egorova EA, Bukhov NG (2005) Ultraviolet Rays Promote Development of Photosystem II Photochemical Activity and Accumulation of Phenolic Compounds in the Tea callus culture Camellia sinensis Russian Journal of Plant Physiology, 52:731-738

Ziv M (1991) Vitrification: morphological and physiological disorders of in vitro plants. In: Debergh PC, Zimmerman RH (eds) Micropropagation: technology and application. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 45–69.

Zobayed SMA (2005) Ventilation in micropropagation. In: Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new propagation and transplant production system (Springer Eds.) by T. Kozai, F. Afreen, SMA. Zobayed: 143–182

Zobayed SMA, Kozai T, Xiao Y, Nguyen QT, Afreen F, (2005) Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation system for large-scale commercialization. Propag. of Ornamental Plants 5: 23–34

Zobayed SMA, Afreen F, Kubota C, Kozai T (2000) Mass propagation of *Eucalyptus camaldulensis* in a scaled-up vessel under in vitro photoautotrophic condition. Ann. Bot. 85: 587–592

Zobayed SMA, Afreen F, Kubota C, Kozai T (2000) Mass propagation of *Eucalyptus camaldulensis* in a scaled-up vessel under in vitro photoautotrophic condition. Ann. Bot. 85: 587–592

Zobayed SMA, Afreen F, Xiao Y, Kozai T (2004) Recent advancement in research on photoautotrophic micropropagation using large culture vessels with forced

ventilation. In Vitro Cell Dev. Biol. Plant 40:450–458

Zobayed SMA, Armstrong J, Armstrong W (2001) Micropropagation of potato: evaluation of closed, diffusive and forced ventilation on growth and tuberization. Annals of Botany 87:53–59