



**✓ CONCEPTOS BASICOS DEL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES**

**Ana <sup>✓</sup>Ábdelnour-Esquivel**  
**Jean Vincent Escalant**

## CONTENIDO

Prefacio	i
Agradecimiento	
Introducción	ii
Tipos de crecimiento <i>in vitro</i>	1
Crecimiento organizado	
Crecimiento desorganizado	
Términos para identificar los principales tipos de propagación <i>in vitro</i>	
Organos	
Callos	
Suspensión de células	2
Protoplastos	
Anteras	
Principales aplicaciones del cultivo de tejidos	
Micropropagación	
Obtención plantas libres de virus	4
Mejoramiento genético	
Conservación de germoplasma	6
Factores que intervienen en el cultivo de tejidos	
El inóculo o explante	
Factores físicos	
Factores químicos	8
El medio de cultivo	
Sales orgánicas	9
Compuestos orgánicos	
Preparaciones naturales complejas	10
Materiales inertes	

Formulación de sales de Murashige y Skoog	11
La preparación del medio de cultivo	12
Ejemplos de medios de cultivo	15
Micropropagación de ápices de <i>Musa</i>	
Micropropagación de estacas de café	
Micropropagación de vainilla	
Micropropagación de <i>Dioscorea</i>	
Micropropagación de <i>Xanthosoma</i>	
Micropropagación de <i>Ipomoea batata</i>	
Micropropagación de orquídeas	
Métodos de desinfección	18
El material vegetal	
El medio de cultivo	
La cristalería	
La cámara de transferencia	
Los instrumentos de trabajo	
El cuarto de transferencia	
Embriogénesis somática y suspensiones celulares	21
Embriogénesis somática	
Suspensiones celulares	26
Métodos de conservación de los recursos fitogenéticos	30
Conservación <i>in situ</i>	
Conservación <i>ex situ</i>	
Los bancos de semillas	
Las colecciones de campo	
Conservación <i>in vitro</i>	

## **PREFACIO**

**El presente documento se preparó como ayuda didáctica para aquellos estudiantes que se inician en el cultivo de tejidos a través de los cursos de capacitación y entrenamientos en servicio del Centro. En éste encontrarán conceptos y términos rutinarios explicados de una manera sencilla, así como los principales campos de aplicación de éstas técnicas. También podrá ser utilizado como una guía práctica para la preparación de soluciones madre, medios de cultivo y métodos de desinfección.**

## **AGRADECIMIENTO**

**Los autores desean hacer un reconocimiento:**

**A Kenneth G. Royo O. por su gran ayuda en la edición de este documento.**

**A Domingo Loaiza por la diagramación y diseño de portada.**

**Al personal del Laboratorio de Cultivo de Tejidos de C.A.T.I.E. por su valiosa colaboración.**

---

## INTRODUCCION

---

El concepto de cultivo de tejidos o propagación *in vitro* (del latín en vidrio) abarca tanto el cultivo aséptico de tejidos como de células y órganos. Se le llama *in vitro* debido a que se cultiva en recipientes de vidrio o plástico transparente. Esta técnica consiste en cultivar un inóculo con potencialidad de diferenciación bajo condiciones asépticas en presencia de una dieta balanceada de nutrientes y hormonas. Esta capacidad de regenerar no solamente tejidos y órganos, sino también una planta entera es única en plantas, no puede encontrarse un fenómeno similar en animales superiores. Podemos definir el cultivo de tejidos como un conjunto de técnicas con las cuales podemos ejercer un control relativo sobre los procesos morfogénéticos, fisiológicos y bioquímicos que se llevan a cabo en los tejidos bajo estudio.

Al igual que en otros métodos de multiplicación vegetativa o asexual, los individuos descendientes de una planta madre propagada *in vitro* son clones, es decir, son copias genéticamente idénticas entre ellas e idénticas a la planta madre. En plantas propagadas por semilla (propagación sexual), la descendencia no es clónica ya que cada semilla tiene su propia base genética que resulta de la mezcla de ambos progenitores, por lo tanto, cada individuo es único.

Cuando el explante (material inicial en cultivo *in vitro*, que puede ser un pedacito de tallo, hoja, yema o raíz) se coloca en un tubo de ensayo bajo las condiciones antes descritas, producirá pequeñas plantitas, réplicas del progenitor. Producirá un número tan alto de plántulas que se necesitará separarlas frecuentemente para que puedan sobrevivir. El nuevo crecimiento es generalmente iniciado en tejido meristemático (conjunto de células no diferenciadas para su última función). Las células meristemáticas se encuentran localizadas en los ápices de los tallos y raíces, en las axilas de las hojas, en el cambium de tallos, en los márgenes de las hojas y en callos, así, estas células dependiendo de su base genética y localización e influenciadas por la luz, temperatura, hormonas y probablemente otros factores se diferencian en hojas, tallos, raíces y otros órganos y tejidos de una manera organizada.

---

---

## **TIPOS DE CRECIMIENTO *IN VITRO***

---

---

### **I. CRECIMIENTO ORGANIZADO**

Se refiere al tipo de cultivo que se inicia con una parte organizada de la planta (ápices, hojas, brotes, semillas, etc.) y esa parte u órgano sigue creciendo *in vitro* manteniendo sus características estructurales. Se aplica también cuando se desarrolla una estructura a partir de un tejido desorganizado (organogénesis).

### **II. CRECIMIENTO DESORGANIZADO**

Este tipo de crecimiento se caracteriza porque a partir de fragmentos de tejidos u órganos se produce un tejido sin estructura específica que contiene un número limitado de algunos tipos de células especializadas encontradas en una planta intacta. Un tejido desorganizado (o callo) puede crecer con subcultivos y puede ser mantenido en medio sólido o líquido durante varios meses o años. Puede ser usado para iniciar suspensión de células y protoplastos.

---

## **TERMINOS PARA IDENTIFICAR LOS PRINCIPALES TIPOS DE PROPAGACION *IN VITRO***

---

### **1. Cultivo de órganos**

Corresponde al cultivo de un órgano de la planta con el fin de propagar la planta. Cultivo de meristemas o de ápices, microestacas, cultivo de embriones.

### **2. Callos**

Corresponde a un conjunto de células procedentes de la desorganización de un tejido o de una suspensión de células. El callo tiene la peculiaridad de presentar células no diferenciadas para su última función pero que conservan el poder de dividirse (célula meristemática o embriogénica).

### **3. Suspensión de células**

Las suspensiones celulares consisten de células libres y microagregado de células en medio líquido en movimiento.

### **4. Cultivo de protoplastos**

Es el cultivo de células sin pared pectoceleulósica. Es decir, células con los componentes vivos rodeados solamente por la membrana citoplásmica. Debido a la ausencia de pared celular los protoplastos son adecuados para trabajos en manipulación genética que no serían posibles con plantas o células intactas, además son muy utilizados para estudios fisiológicos, bioquímicos y biofísicos.

### **5. Cultivo de anteras**

Consiste en el cultivo de anteras enteras con polen inmaduro, el polen se divide para formar embriones o callo. Cuando éstos se transfieren a los medios de regeneración se forman plantas. Por lo general el cultivo de anteras se utiliza para la obtención de plantas haploides. Estas se regeneran a través de la embriogénesis somática a partir del polen, directamente o por la vía de organogénesis a partir de un callo. Algunas veces se cultiva el polen una vez aislado de la antera y se le llama cultivo de polen o de microesporas.

---

## **PRINCIPALES APLICACIONES DEL CULTIVO DE TEJIDOS**

---

El cultivo de tejidos puede utilizarse para diversos propósitos como son: la micropropagación, la obtención de plantas libres de virus y otros patógenos, el mejoramiento genético y la conservación de germoplasma.

### **I. MICROPROPAGACION**

La micropropagación es la técnica que ha logrado rápida aceptación en la industria y se está practicando tanto en especies hortícolas como en ornamentales y aún en leñosas. Esta metodología presenta importantes ventajas sobre los métodos tradicionales de propagación, entre ellas se puede citar:

- Incremento acelerado del número de plantas derivadas por genotipo: cuando se usan métodos de propagación convencionales un esqueje produce una planta y una semilla produce una planta, sin embargo, un explante teóricamente puede producir un infinito número de plantas. Es

por esta razón que se necesitan muy pocas plantas de donde tomar los explantes que producirán miles de plantas.

- Reducción del tiempo de multiplicación.
- Posibilidad de multiplicar grandes cantidades de plantas en una superficie reducida, a bajos costos y en un tiempo económicamente costeable.
- Mayor control sanitario del material que se propaga.
- Facilidad de transportar el material *in vitro* de un país a otro, con menos restricciones aduaneras.
- Posibilidad de multiplicar rápidamente una variedad de la cual existen pocos individuos.

Debido a que la micropropagación se refiere a un fenómeno de reproducción asexual, el riesgo de tener "variantes" fenotípicas o genéticas es bajo. Sin embargo eso puede suceder cuando no se domina el proceso *in vitro*. Las plantas que vienen de un mismo meristema, ápice, o estaca son llamadas "clones".

### **La obtención de una planta entera:**

La obtención de una planta entera puede ocurrir a través de tres vías diferentes:

- a) a partir de brotes, primordio, meristema y embriones pre-existente en el "explante" utilizado.
- b) a partir de un brote o meristema iniciado dentro de un callo o directamente sobre el explante inicial. En este caso los brotes o meristema se forman *in vitro* (brotes adventicios o *de novo*).
- c) a partir de un *embrión somático* (embrión similar al embrión cigótico o de la semilla) que se forma a partir de un tejido somático (embriogénesis somática = asexual).

Para la mayoría de las especies que se multiplican *in vitro*, las vías más usadas son las a) y b). Muy pocas especies se multiplican al nivel industrial por la tercera vía (ejemplo de la palma africana), sin embargo, la aplicación de esta técnica va en aumento.



La ventaja mayor de esta técnica es poder producir a partir de un explante de una variedad o especie un número teóricamente indefinido de plantas de esta misma variedad o especie.

## **II. OBTENCION DE PLANTAS LIBRES DE VIRUS**

El cultivo de tejidos permite en muchos casos producir plantas libres de patógenos y de virus. En general la técnica consiste en aislar el meristemo de plantas que fueron o no tratadas con termoterapia. Entre más pequeño sea el meristema inoculado más éxito se tendrá en la erradicación del virus. Es necesario establecer para cada tipo de virus y de planta unas pruebas serológicas ("Test Elisa") que permiten revelar de manera sencilla la presencia del virus en la planta *in vitro*. Estas precauciones son indispensable para el intercambio de materiales vegetales entre países.

## **III. MEJORAMIENTO GENETICO**

La creación de híbridos con las técnicas de hibridación clásicas en el campo puede ser difícil debido a problemas de esterilidad o incompatibilidad de variedades. Algunas de las técnicas del cultivo de tejidos pueden ayudar y facilitar la creación de nuevas variedades. Un incremento de la variabilidad natural puede ser logrado usando técnicas como: callogénesis, cultivo de células y el cultivo de protoplastos, asociadas o no a técnicas de ingeniería genética (introducción de genes o transformación). Ya hemos visto la definición de algunos de estos términos. La regeneración de plantas a partir de callos, células o protoplastos se hace vía organogénesis o embriogénesis somática.

### **Obtención de protoplastos:**

En el transcurso de la experimentación, los biólogos constataron que se podía lograr la agregación de células una vez eliminada la pared pectocelulósica, permitiendo así la fusión de material nuclear y citoplasmático. Así nació el principio de la hibridación somática.

El primer paso para la obtención de protoplastos es la destrucción de la pared pectinocelulósica para obtener células de forma redondeada y limitadas únicamente por la membrana citoplasmática. Para ésto se hace necesaria la utilización de enzimas pectinasas y celulasas. Una vez obtenidos los protoplastos se puede manipular el material para producir híbridos somáticos. El protoplasto puede regenerar rápidamente la pared celular y por medio de callogénesis, organogénesis o embriogénesis somática producir plantas. La

hibridación somática o fusión consiste en la agregación de protoplastos. Cuando se produce la fusión de dos protoplastos, todo el contenido celular es común y se puede alcanzar la adición total de del material genético en los tres compartimentos que lo contienen (núcleo, mitocondria y cloroplasto). Esto incrementa el nivel de ploidia, sin embargo, varios eventos pueden perturbar la fusión:

- el intercambio de material no siempre es total, se pueden obtener adiciones incompletas.
- una vez ocurrida la fusión es posible que se den competiciones y eliminaciones cromosómicas. Por ejemplo, en cada mitosis subsecuente puede suceder que algunos pares de cromosomas sean desechados.

Ejemplo de híbridos: entre tomate y papas; tomate y berenjenas; tomate y tabaco (disminuir la cantidad de nicotina); tomate y trigo; etc...) muchas veces el paso más difícil es la regeneración de la planta.

### **Introducción de partículas:**

Hoy en día existen un buen número de técnicas para introducir el ADN en las plantas y de esta manera obtener nuevos materiales (materiales transformados):

#### **a. Uso de vectores naturales**

El más común es *Agrobacterium* (*A. tumefaciens* y *A. rhizogenes*). También se han utilizado virus como vectores (ésto por medio de áfidos). El primer paso es la incorporación de un ADN foráneo por medio de una bacteria infectante que porta un virus latente "el plásmido" (porción de gen en el citoplasma de la bacteria que se duplica de manera independiente). Se provoca una herida en la planta para que las bacterias penetren, *Agrobacterium* se pega a las paredes de la herida para formar una interacción "llave-cerradura". Los genes de la bacteria son activados (los del plásmido) y transferidos a la planta (sólo los de la región T) y son incorporados al núcleo y al genoma de la planta. Decimos entonces que la planta fue transformada y se evalúa la expresión de los genes. Existe otro método en el cual se transforman directamente protoplastos, se le llama también "cocultivo". Consiste en incubar las bacterias con protoplastos, la transformación es muy lenta y el método no es muy eficiente.

## **b. Transferencia directa de genes**

Entre estas técnicas está la absorción de ADN por protoplastos mediado por procedimientos químicos (Ca-PEG, fusión de protoplastos), electroporación (Gene Pulser), bombardeo de ADN (Biolistics) y microinyección.

Sin importar la técnica usada, es necesario evaluar la transformación y por supuesto la regeneración del tejido.

### **Haplometodos:**

Consisten en el cultivo de anteras u óvulos para la obtención de plantas haploides las cuales después de doblar sus lotes de cromosomas nos llevan a la obtención de plantas homocigotas. Estos métodos presentan ciertas ventajas durante el proceso de mejoramiento:

- a) la fijación de un híbrido por haplometodos permite acortar 5 años el proceso.
- b) facilita el análisis genético debido a que los genes recesivos se expresan en la primera generación.
- c) la diploidización permite recombinaciones genéticas nuevas que no se observaban naturalmente.

La técnica más usada pero también la más difícil es la androgénesis que consiste en el desarrollo de un tejido haploide a partir del polen seguido por la formación de una planta haploide.

## **IV. CONSERVACION DE GERMOPLASMA**

La conservación de plantas es un componente integral de los sistemas de agricultura sostenible y desde la perspectiva del mejoramiento de los cultivos, la conservación de germoplasma valioso se ha considerado de alta prioridad por el Consejo Internacional de los Recursos Fitogenéticos (IBPGR, en inglés). Se ha estimado que de más de 240.000 especies de angiospermas en el mundo, algo más de 300 se han utilizado en un tiempo u otro, sin embargo, son doce cultivos principalmente los que proveen a la población mundial de alimento, lo que indica que el hombre depende para su alimentación de unas pocas especies de los miles de angiospermas en el planeta. Como resultado de conocer su importancia, se ha dado gran énfasis a la necesidad de preservar los recursos fitogenéticos como forma de mantener la biodiversidad. Más adelante se comentará sobre los métodos de conservación de germoplasma dando énfasis a la conservación *in vitro*.

## **Ventajas que presenta el cultivo de tejidos para la conservación de germoplasma:**

- a) se puede almacenar un gran número de clones en espacio reducido.
- b) el germoplasma se encuentra libre de patógenos, virus o insectos.
- c) los costos de mantenimiento se reducen sensiblemente.

---

## **FACTORES QUE INTERVIENEN EN EL CULTIVO DE TEJIDO:**

---

### **I. EL INOCULO O EXPLANTE**

Es el órgano, tejido o fragmento de tejido, células, etc. excisado del material parental para iniciar el cultivo *in vitro*. La elección del explante adecuado constituye el primer paso para el establecimiento de los cultivos, éste variará de acuerdo al objetivo perseguido. En general, factores como el genotipo, edad de la planta y su estado fisiológico son importantes de considerar.

### **II. FACTORES FISICOS**

pH, intercambios gaseosos, humedad, luz y temperatura.

- **pH:** el grado de acidez o alcalinidad (pH) del medio de cultivo es importante y específico para cada tipo de plantas, al igual que ocurre en el suelo, por lo que se hace necesario ajustarlo a los requerimientos de la especie en estudio. Sin embargo, el pH adecuado estará en un rango de 4.5 a 7 para las plantas.
- **Intercambio gaseoso:** los gases más corrientes son O<sub>2</sub> (oxígeno), CO<sub>2</sub> (dióxido de carbono), y C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> (etileno).
- **La humedad:** en condiciones *in vitro* la humedad dentro de los recipientes es casi 100 %. Por eso la planta *in vitro* en general no desarrolla adecuados sistemas de regulación hídrica tales como cera, estomas, cutícula, etc.
- **La luz:** en condiciones *in vitro* clásicas, la intensidad y calidad de la luz es muy bajo (10 W/m<sup>2</sup> en comparación de condiciones naturales donde la luz puede representar hasta 900 W/m<sup>2</sup>). La calidad de la luz también

es muy baja y se recomienda mezclar diferentes tipos de luz en una misma sala para tener diferentes longitudes de ondas. El espectro útil para los vegetales es de 400 a 700 nanómetros. Dos fenómenos importantes dependientes de la luz son: fotosíntesis y fotomorfogénesis.

**Fotosíntesis:** es el proceso por medio del cual las plantas en presencia de luz, agua y en los cloroplastos incorporan el dióxido de carbono para formar los compuestos orgánicos que le permitirán crecer y reproducirse.



**Fotomorfogénesis:** La luz es un factor importante en la morfogénesis. La morfogénesis funciona con la presencia de pigmentos susceptibles a radiación azul y roja. Las funciones más conocidas son las del pigmento susceptible al rojo: fitocromo (rojo 660 nm y rojo lejano 730 nm); expansión foliar, elongación de entrenudos, diferenciación de estomas, síntesis de clorofila, etc.

### III. FACTORES QUIMICOS

- **El medio de cultivo:** consiste de una mezcla de determinadas sustancias sobre o dentro del cual crecen los explantes (inóculos). Para su uso, el medio de cultivo se esteriliza ya sea en autoclave o por filtración a través de filtros de papel miliporosos.

---

## EL MEDIO DEL CULTIVO

---

Como se mencionó anteriormente, para mantener la viabilidad de un cultivo de tejidos, estimular su diferenciación y guiar su crecimiento, éste requerirá de una dieta balanceada de nutrientes y hormonas.

Los medios de cultivo son combinaciones de sustancias químicas que los investigadores han descrito después de numerosos experimentos y que permiten que las plantas crezcan y se multipliquen *in vitro*.

Los ingredientes de un medio de cultivo vegetal pueden clasificarse en: 1) sales inorgánicas (minerales), 2) compuestos orgánicos, 3) preparaciones naturales complejas y 4) materiales inertes.

## I. SALES INORGANICAS

Los esfuerzos realizados para optimizar las necesidades de plantas específicas, han dado como resultado numerosas fórmulas de mezclas de sales. Sin embargo, los elementos mayores esenciales que todas las plantas requieren y que están presentes en los fertilizantes comunes, también forman parte de los medios de cultivo: Nitrógeno (N), Fósforo (P), Potasio (K), Azufre (S), Calcio (Ca), Magnesio (Mg) y Hierro (Fe).

Además de los elementos menores, que también son esenciales pero que se requiere en cantidades extremadamente pequeñas: Boro (B), Molibdeno (Mo), Manganeso (Mn), Cobalto (Co), Zinc (Zn), Cobre (Cu), Cloro (Cl) y Iodo (I).

Una de las mezclas de sales más usadas es la descrita por Murashige y Skoog. Esta es conocida como fórmula MS y es descrita más adelante.

## II. COMPUESTOS ORGANICOS

En esta categoría se encuentran sustancias como carbohidratos, hormonas o reguladores de crecimiento, vitaminas y algunos otros compuestos que se han descrito como beneficiosos para el cultivo de tejidos: aminoácidos, amidas, purinas y pirimidinas y ácidos orgánicos.

- **Los carbohidratos:** son sustancias orgánicas como los azúcares que proveen tres de los elementos mayores esenciales: Hidrógeno (H), Carbono (C) y Oxígeno (O).

Los azúcares son producto de la fotosíntesis, proceso por medio del cual la planta convierte el dióxido de carbono y agua en carbohidratos con la ayuda de la clorofila y la luz. Sin embargo, las plantas que crecen *in vitro*, debido a la baja intensidad lumínica, no pueden fabricar todo el azúcar que requieren, por lo que se adicionan altas concentraciones de sacarosa al medio de cultivo.

- **Hormonas:** las sustancias hormonales críticas en el cultivo de tejidos son las auxinas y las citoquininas. Estas intervienen en la elongación y división celular, formación de brotes y raíces y en la germinación de las semillas.

Entre las auxinas más utilizadas en el cultivo de tejidos se encuentra: ácido indolacético (A.I.A.), ácido naftalenacético (ANA), 2,4-D, picloram. Entre las citoquininas se encuentra: benzilaminopurina (BA), la kinetina y zeatina.

Las giberelinas y el ácido absícico son también utilizadas en algunos casos.

- **Vitaminas:** la vitamina que se ha demostrado consistentemente como importante en el cultivo de tejidos es la tiamina. Sin embargo, otras han sido utilizadas con frecuencia por estimular procesos específicos: biotina, ácido nicotínico, piridoxina, pantolenato, riboflavina.

- **Aminoácidos:** entre los aminoácidos y amidas que se han mostrado más frecuentemente como beneficiosos está L-arginina, L-ácido aspartico, L-glutamina, L-ácido glutámico y L-tirosina.

Otros compuestos orgánicos comúnmente empleados en el cultivo de tejidos son el inositol, adenina, sulfato de adenina, el ácido cítrico y el ascórbico (para evitar la oxidación de los tejidos).

### **III. PREPARACIONES NATURALES COMPLEJAS**

Una gran variedad de sustancias de composición indefinida han sido utilizadas para enriquecer los medios de cultivo. Entre ellas se menciona: extracto de malta, agua de coco, extracto de levadura, pulpa de banano, caseína hidrolizada y jugo de naranja y tomate.

### **IV. MATERIALES INERTES**

- Geles húmedos que actúan como agentes de soporte: agar, gelrite, fitogel.
- Carbón activado que en bajas concentraciones contrarresta efectos negativos que producen algunas sustancias liberadas al medio por el cultivo (fenoles).

## FORMULACION DE SALES DE MURASHIGE Y SKOOG

Debido a que ésta fórmula es frecuentemente usada en la micropropagación de un gran número de especies vegetales, se describe a continuación:

---

### Macroelementos

Compuestos	mg/L
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1650
$\text{KNO}_3$	1900
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170

### Microelementos

$\text{H}_3\text{BO}_3$	6.2
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	16.8
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6
KI	0.83
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025

### Hierro

$\text{Na}_2\text{EDTA}$	37.3
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8

---



---

## LA PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO

---

Se explicará con detalle el procedimiento de preparación de los medios de cultivo, de manera que el estudiante que se inicia en el área del cultivo de tejidos encuentre aquí una guía. Debe tener en cuenta que existen en el mercado fórmulas completas listas para su uso que podrán usarse cuando el proceso es rutinario, sin embargo, éstas son más costosas. Debido a que el medio de cultivo es uno de los factores más importantes en el éxito del proceso es importante trabajar con cuidado y despacio al principio para poder anticipar las consecuencias de cada acción y familiarizarse con el equipo, cristalería, etc.

### **Preparación de las soluciones madre:**

Por lo general, la preparación del medio de cultivo se inicia preparando soluciones concentradas (madre) de uno o más compuestos. Determinado volumen de cada una de estas soluciones se mezclará más tarde para preparar el medio de cultivo final. Es recomendable preparar las soluciones madre en cantidades relativamente altas y con antelación para ahorrar el tiempo y el trabajo que implica pesar cada uno de los ingredientes cada vez que se prepara un medio de cultivo. Además, como muchos de los componentes (microelementos, vitaminas, hormonas) son requeridos en pequeñas cantidades, si se multiplica esa cantidad por un determinado número de veces para preparar la solución madre, la labor de pesado será más fácil y más precisa. La concentración de la solución madre debe ser un factor a considerar. Soluciones madre muy concentradas tienden a formar precipitados. En algunos casos estos precipitados son el resultado de mezclar sustancias incompatibles, por ejemplo, calcio y fosfato o sulfato, magnesio y fosfato. Es recomendable que la solución madre no sea mayor de 100 veces (100X) la concentración final del medio, sin embargo, el volumen de medio a preparar por semana en el laboratorio dará la pauta para considerar el grado de concentración de la solución madre. Si la solución madre presenta precipitados es mejor descartarla ya que no poseerá el balance adecuado de sustancias, alguna proporción de éstas estará en el fondo con el precipitado.

### **- La calidad del agua:**

Otro punto importante de tener en cuenta es el uso de agua desionizada (desmineralizada), destilada o bidestilada para la preparación de los medios de cultivo.

### **- Almacenamiento de las soluciones madre:**

Las soluciones madre deben almacenarse en el refrigerador. No se puede dar un dato exacto de cuanto tiempo pueden permanecer almacenadas sin que sufran deterioro, pero como regla general, los compuestos inorgánicos son más estables que los orgánicos, por lo que se ha recomendado almacenar auxinas y citocininas por un máximo de 2 semanas y los otros componentes por 2 meses, sin embargo, si se observa un precipitado la solución debe descartarse inmediatamente.

*Con un ejemplo se explicará como se prepara una solución madre (50X) tomando como base la fórmula de sales minerales de Murashige y Skoog.*

### **Preparación de los macroelementos y microelementos:**

$\text{NH}_4\text{NO}_3$ , la fórmula indica 1650 mg/l en el medio de cultivo, por lo tanto, para preparar una solución 50X (50 veces más concentrada, que será suficiente para preparar 50 litros de medio de cultivo) multiplique 1650 mg x 50 = 82500 mg (82.5 g). De la misma manera multiplique la cantidad indicada para cada uno de los otros macroelementos. En un balón aforado de 1 litro que contenga aproximadamente 500 ml de agua destilada agregue las cantidades pesadas de cada uno de los macroelementos, agite y llene el balón con agua hasta la marca de aforo. Vuelque el balón de manera que quede una burbuja en el fondo y agite varias veces. Repita unas 2 veces. Transfiera la solución de macroelementos a una botella para su almacenamiento en el refrigerador. Etiquete la botella. No olvide escribir la fórmula que usó (Macro MS), concentración (50X), fecha, nombre de la persona que los preparó. Para recordar la cantidad a agregar por litro de medio de cultivo a preparar recuerde dividir 1000 ml/50 = 20 ml de la solución madre/1 litro de medio de cultivo. Repita la operación pero con los microelementos.

### **Preparación del Hierro:**

Para preparar la solución madre de hierro, ponga a hervir aproximadamente 700 ml de agua bidestilada (destilada o desionizada dependiendo de las facilidades con que disponga) en un erlenmeyer de 1000 ml, cuando está hirviendo agregue la cantidad pesada de  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  y  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (recuerde que está preparando una solución madre 50X, por lo tanto, multiplique la cantidad indicada en la fórmula por 50) hasta que desarrolle color. Tápela y déjela enfriar en un lugar oscuro. Cuando esté a la temperatura ambiente transférala a un balón aforado y agregue agua hasta la marca de aforo.

Almacene en el refrigerador en una botella ámbar para evitar la fotodescomposición. Si no dispone de botella ámbar forre una botella con papel aluminio. Identifíquela.

### **Preparación de la solución madre de la hormona:**

Cada hormona se prepara por separado y las más frecuentemente usadas se preparan de manera similar. Ejemplo, Solución madre de Benciladenina: Pese 25 mg de BA, en un balón aforado de 250 ml, agregue la hormona y 5 ml de agua. Con un gotero agregue lentamente y con agitación HCl 1M hasta que el BA se disuelva. Agregue agua para completar el volumen. Esta solución provee 0.1 mg de BA por ml de solución madre. Si para el medio de cultivo que prepara se indica adicionar 1 mg de BA por litro, se deberán tomar 10 ml de la solución madre para obtener la cantidad recomendada. Para aquellas concentraciones que se indiquen en ppm (partes por millón) recuerde que 1 mg/l equivale a 1 ppm.

### **Preparación del medio de cultivo:**

Ya se han preparado las soluciones madre, ahora se procederá a preparar el medio de cultivo. Para ésto tomaremos como ejemplo el medio de iniciación para banano.

Se prepara 1 litro de medio de iniciación de banano el cual consiste en las sales MS, 100 mg/l de mio-inositol, 1 mg/l de BAP, 30 mg/l de sacarosa y 7 g/l de agar. El pH se ajusta a 5.7. En su libreta de trabajo en el laboratorio ordene cada componente de la siguiente manera y ponga una marca de visto bueno después de agregar cada uno, así podrá revisar en caso de error o duda:

Sacarosa	30 g
Macro MS	20 ml (solución madre 50X)
Micro MS	20 ml (solución madre 50X)
Fe-EDTA	20 ml (solución madre 50X)
Vitaminas	10 ml (solución madre 100X)
BAP	10 ml
(0.1 mg/l)	
pH	5.6 - 5.8
Agar	7 g

En un balón aforado de 1 litro, agregue cerca de 400 ml de agua. Pese la sacarosa y disuelva en el balón. Con la ayuda de pipetas graduadas mida el volumen de solución requerida (no debe pipetear directamente de los frascos que contienen las soluciones madre, transfiera volúmenes pequeños de éstas

a erlenmeyers y pipete de éstos). Una vez que se han agregado la sacarosa, los macro, microelementos, el hierro, las vitaminas y hormonas afore con agua. Transfiera a un erlenmeyer y ajuste el pH (puede usar HCl o KOH 1M ó 0.1M). Agregue el agar y disuélvalo calentando la solución ya sea usando el horno de microondas (aproximadamente 9 minutos por litro de medio de cultivo) o una hornilla o quemador. El medio está listo para transferir a los frascos o tubos de cultivo (el medio debe transferirse estando caliente ya que al enfriarse se solidificará). Esterilice en autoclave. Si no se va a usar el medio de cultivo inmediatamente es recomendable guardarlo en refrigeración.

## **EJEMPLOS DE MEDIOS DE CULTIVO**

A continuación se detallarán los medios de cultivo utilizados en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de CATIE para la micropropagación de bananos y plátanos, café, orquídeas, ñame, camote, tiquisque, vainilla y yuca.

### **Medios de cultivo para la micropropagación de ápices de *Musa* sp. (Bananos Y Platanos):**

	<b>Iniciación</b>	<b>Multiplicación</b>	<b>Desarrollo</b>
Sacarosa	30 g/l	30 g/l	30 g/L
Macro	MS	MS	MS
Micro	MS	MS	MS
Vitaminas	MS	MS	MS
BAP	1 mg/l	3 mg/l	-
pH	5.7	5.7	5.7
agar 7 g/l	7 g/l	7 g/l	7 g/l

## Medios de cultivo para la micropropagación de microestacas de café:

	Iniciación *	Multiplicación **	Enraizamiento ***
Sacarosa	15 g/l	30 g/l	15 g/l
Macro Microelementos	MS	MS	1/2 MS
Vitaminas	Morel	Morel	Morel
PVP	10 g/l	-	-
Benlate	1 g/l	-	-
BAP	5 mg/l	1 mg/l	-
AIB	-	-	100 mg/l
ANA	-	-	25 mg/l
Kinetina	-	-	5 mg/l
pH	4.8	5.6	5.6
Agar	7 g/l	7 g/l	

\* El benlate debe permanecer en el medio 15 días, después de este período se prepara el mismo medio pero sin benlate y el pH se ajusta a 5.6. Los explantes permanecen en la oscuridad. Una vez que brotan las estacas se transfieren al medio de multiplicación.

\*\* Este medio también se utiliza como medio de desarrollo de las microestacas, antes del enraizamiento pero la concentración de BAP se reduce a 0.3 mg/l. Durante estos períodos los explantes permanecen a la luz.

\*\*\* Las plántulas deben permanecer en este medio por 15 horas en la oscuridad.

### **Medios de cultivo para la micropropagación de vainilla:**

Para preparar este medio de cultivo se agregan 30 g/l de sacarosa, las sales minerales y vitaminas MS, 125 mg/l de carbón activado y se ajusta el pH a 5.8. Se adiciona 7 g/l de agar. Para la etapa de desarrollo se elimina el carbón activado del medio.

### **Medios de cultivo para la micropropagación de *Dioscorea* (ñame):**

Para la etapa de iniciación se prepara un medio de cultivo con las sales minerales y vitaminas de Murashige y Skoog, se agrega 0.1 mg/l de BAP. Se ajusta el pH a 5.7 y se adiciona 7 g/l de agar. Para la etapa de desarrollo se prepara el mismo medio pero se eliminan los reguladores de crecimiento.

### **Medios de cultivo para la micropropagación de ápices de *Xanthosoma* (tiquisque):**

El medio de iniciación de tiquisque consiste de las sales minerales y vitaminas MS, 30 g/l de sacarosa y 0.1 mg/l de BAP. Para el período de multiplicación se prepara el mismo medio pero con 3 mg/l de BAP y en la etapa de desarrollo se elimina la hormona. En todos los casos el pH se ajusta a 5.8 y se agrega 7 g/l de agar. Los explantes siempre permanecen en presencia de luz.

### **Medio para la micropropagación de ápices de *Ipomoea batata* (camote):**

Para la iniciación y multiplicación de camote se prepara un medio de cultivo con 30 g/l de sacarosa, sales minerales y vitaminas MS, 0.1 mg/l de ANA y 0.1 mg/l de BAP. El pH se ajusta a 5.8 y se agrega 7 g/l de agar. Para la etapa de desarrollo se eliminan las hormonas del medio de cultivo. Los explantes permanecen en condiciones de luz.

## **Medios de cultivo para la micropropagación de orquídeas (iniciando con semillas):**

Para la iniciación o germinación de las semillas se prepara un medio con 30 g/l de sacarosa y las sales minerales y vitaminas MS. Se ajusta el pH a 5.8 y se agrega 7 g/l de agar. Para la multiplicación y desarrollo de las plántulas se prepara el medio anterior pero se adicionan 200 mg/l de caseína hidrolizada y 400 mg/l de extracto de malta. Se puede adicionar 1 mg/l de BAP a este medio si se desea acelerar la multiplicación.

---

## **METODOS DE DESINFECCION**

---

El cultivo *in vitro* consiste en cultivar un explante con potencialidad de diferenciación bajo condiciones asépticas en presencia de una dieta balanceada de nutrientes y hormonas. Estas a la vez son condiciones ideales para el crecimiento y proliferación de microorganismos contaminantes, de ahí que podemos imaginar la importancia de los métodos que usamos para desinfectar superficialmente los explantes, esterilizar los medios de cultivo, desinfectar los instrumentos, la cámara de transferencia de flujo laminar y limpiar los cuartos de trabajo.

### **- Material vegetal:**

El procedimiento de desinfección superficial del explante debe eliminar los microorganismos pero a la vez debe causar el menor daño posible al explante. Varios compuestos se han recomendado y entre los más usados están el hipoclorito de sodio (cloro comercial del 2% al 5%) y de calcio (del 6% al 12%) que se recomienda como menos tóxico y el etanol (70%). También se ha recomendado la adición de un detergente (2 a 4 gotas de Tween-20) para romper la tensión superficial y permitir que el explante esté en mejor contacto con el químico. Por ejemplo, para desinfectar ramas ortotrópicas de café que se colectan en el campo, primero se enjuagan con agua corriente, se incuban en hipoclorito de calcio al 10% por 30 minutos y luego en hipoclorito de calcio al 8% por 20 minutos, en la cámara de transferencia de flujo laminar se enjuagan con agua destilada estéril al menos 3 veces antes de iniciar su cultivo *in vitro*. El uso de antibióticos se recomienda como última alternativa para limpiar los explantes, éstos pueden influir negativamente en otros procesos del cultivo.

No se puede generalizar sobre el tipo de desinfectante o la concentración de éste a utilizar ya que cada especie y tipo de explante es un caso particular lo que resalta la importancia de experimentar con diferentes métodos utilizando un número reducido de explantes. Sin embargo, se puede decir que la concentración más liviana de desinfectante que sea efectiva contra la contaminación de determinado explante es la más adecuada, si es más diluida que ésta no se eliminarán los microorganismos y si es más concentrada se quemará el explante. Para facilitar la limpieza del explante es importante considerar que los brotes nuevos son más limpios que los viejos, materiales que crecen en el invernadero son más limpios que los que se mantienen en el campo y entre más pequeño sea el explante a introducir a cultivo *in vitro* menor será la contaminación a eliminar, sin embargo, el tamaño debe ser tal que facilite el establecimiento del tejido. Otra recomendación que se ha formulado es el uso de antioxidantes si se observa coloración café en el explante durante el proceso de desinfección. Por ejemplo, 100 mg de ácido ascórbico y 150 mg de ácido cítrico en un litro de agua destilada. Esta solución de antioxidantes se esteriliza y en ella se sumergen los explantes antes de iniciar el proceso de reducción de su tamaño para iniciar el cultivo.

#### **- El medio de cultivo:**

Por lo general el medio de cultivo se esteriliza en el autoclave a una presión de 115 lb. (121°C) durante 20 minutos, sin embargo, el tiempo de esterilización dependerá del volumen de medio. Otro método muy utilizado es la esterilización en frío utilizando para esto filtros miliporosos que pueden retener hongos y bacterias. Para esta operación es necesario esterilizar primero tanto los recipientes como los filtros que se usarán. Para facilitar este tipo de esterilización una opción podría ser la utilización de aparatos de filtración previamente esterilizados y desechables que se encuentran en el mercado.

#### **- La cristalería:**

La cristalería debe lavarse con detergentes que se eliminen fácilmente con agua. Es recomendable que la cristalería que haya estado en contacto con altas concentraciones de hormonas se enjuague con etanol al 70% antes de lavarla con agua y detergente para asegurarnos de eliminar los residuos. Una vez finalizado el proceso de lavado es recomendable dar un último enjuague con agua destilada.



**- La cámara de transferencia de flujo laminar:**

La cámara de transferencia de flujo laminar está provista de un filtro HEPA (el cual no debe ser tocado debido a su fragilidad) que permite que el aire que suavemente circula a través de la cámara sea estéril. Esto permite al técnico abrir libremente los tubos y realizar las transferencias de manera razonablemente segura. Sin embargo, antes de iniciar las labores debe limpiar las superficies de la cámara (mesa y paredes interiores), para ésto se utiliza alcohol de 70°. Otra recomendación que ayudará a mejorar la técnica de trabajo en la cámara es nunca colocar beakers, frascos de cultivo u otros, al frente del área de trabajo ya que esto interrumpe el flujo de aire estéril. Utilice las 3/4 partes más internas de la cámara para trabajar y coloque cerca de donde se abren los frascos de cultivo el mechero o quemador, de manera que no tengan que permanecer abiertos por mucho tiempo. Estas prácticas le ayudarán a reducir la contaminación en los cultivos.

**- Los instrumentos de trabajo:**

La técnica comúnmente utilizada para esterilizar los instrumentos metálicos, pinzas, bisturíes, tijeras, etc. es el flameo previa inmersión en alcohol de 95°. Si se usa vidrio como base para las operaciones de transferencia éste puede asperjarse con alcohol de 95° y flamearse. Cuando se utilizan platos petri o papel, éstos deberán esterilizarse antes haciendo uso del autoclave. Otra recomendación útil es la de asperjar el exterior de los frascos de cultivo, agua estéril, etc. con etanol para así reducir las posibles fuentes de contaminación.

**- El cuarto de transferencia:**

La limpieza del cuarto de transferencia es un factor importante para lograr el éxito. Este debe limpiarse con desinfectantes y a fondo. Es recomendable hacer la limpieza al final del día de manera que a la mañana siguiente el cuarto esté libre de olores y se pueda iniciar el trabajo temprano. No debe permitirse el ingreso de alimentos a esta habitación.

**- El técnico:**

El técnico debe ser cuidadoso en las operaciones que realiza, estar atento a no hacer movimientos bruscos dentro de la cámara de transferencia para no interrumpir el flujo de aire. Antes de iniciar labores de transferencia de

cultivos es recomendable que limpie sus manos y brazos con alcohol, usar una bata de laboratorio limpia y trabajar a brazos extendidos de manera que pueda hacer las manipulaciones en la parte más interna posible de la cámara y a la vez que el aliento de su respiración no llegue a los explantes evitando con esto contaminación.

---

## **EMBRIOGENESIS SOMATICA Y SUSPENSIONES DE CELULAS**

---

Estas técnicas tuvieron su origen en el concepto de Totipotencia enunciado por Haberland en 1902. Totipotencia significa que todas las células vegetales tienen la capacidad de formar plantas completas.

La totipotencialidad de la célula vegetal se debe a la particularidad que tiene cualquier célula vegetal de perder su diferenciación (desdiferenciación).

Los primeros resultados a favor de esta teoría fueron los obtenidos por Reinert en 1958 y Steward *et al.* en 1958. Estos investigadores lograron inducir la formación de embriones somáticos a partir de raíces de zanahoria. A la fecha se han realizado cientos de estudios con diferentes plantas confirmando los resultados anteriores. Algunas revisiones sobre la embriogénesis somática se pueden encontrar en: Tisserat *et al.* 1979; Ammirato 1983; Evans *et al.* 1981; Vasil 1982.

---

## **EMBRIOGENESIS SOMATICA**

---

La embriogénesis se refiere a la formación de un embrión somático a partir de células somáticas que no son el producto de la fusión de gametos. Esta terminología fue utilizada por Tokin en 1963 para describir la formación de un individuo a partir de una o varias células somáticas. Sin embargo, este fenómeno no debe confundirse con la organogénesis.

### **Características de un embrión somático:**

Son estructuras bipolares con un eje radical-apical, y no poseen conexiones vasculares con el tejido materno (generalmente aislados por una epidermis). Esta estructura es capaz de crecer y formar una planta completa. En muchos aspectos de su desarrollo los embriones somáticos mantienen una

similitud con los embriones cigóticos. Sin embargo, pueden ocurrir anomalías en el desarrollo como por ejemplo la fusión de los cotiledones.

### **Embriogénesis directa o indirecta:**

Aunque a veces esta distinción no es admitida es importante resaltar que la embriogénesis somática puede acompañarse de un fenómeno llamado **callogénesis** o formación de un callo (un callo puede ser definido como un conjunto desorganizado de células capaces de dividirse, pudiendo ser meristemáticas o embriogénicas). Es el resultado de la totipotencialidad.

### **Factores que afectan la embriogénesis somática:**

A la fecha existen muchas teorías sobre la embriogénesis somática y los factores que favorecen este proceso, sin embargo, no parecen existir reglas ni recetas universales.

### **El Explante:**

En base a la definición de totipotencia, virtualmente todos los tejidos vegetales tienen capacidad para formar embriones somáticos *in vitro*. Sin embargo, dependiendo de las especies y de las condiciones de cultivo, pocos explantes son capaces de iniciar la embriogénesis somática. En general, los explantes utilizados con más éxito en varias especies de la mayoría de las familias de plantas son los cotiledones, los hipocótilos y los embriones. Sin embargo, también se utilizan los ápices, segmentos de hoja, raíces e inflorescencias. Por ejemplo, los embriones cigóticos inmaduros han resultado el explante más favorable para inducir la embriogénesis somática en la mayoría de los cereales. También se han utilizado las hojas en sorgo, café y palmáceas y las nucelas en cítricos y mango. En general se puede admitir que entre más joven sea el tejido utilizado (estadio juvenil poco diferenciado) más fácil será desviarlo de su programa genético y así obtener la desdiferenciación hacia la formación de embriogénesis somática.

Según Litz, 1984 y Dhed'a *et al*, 1991, un factor a considerar es que muchas veces dentro de una misma especie, las reacciones de las diferentes variedades pueden ser muy diferentes. Así, un método establecido para un cultivar o variedad podrá no aplicarse a otro individuo de la misma especie.

La semilla y sus tejidos juegan un papel muy importante en el desarrollo del embrión cigótico. Los tejidos en muchas especies crean barreras que permiten regular el intercambio gaseoso así, el oxígeno disponible para el cigoto es limitado. A nivel de nutrición, los tejidos de la semilla como la nucela

y el endospermo proveen al cigoto los elementos necesarios para su desarrollo: carbohidratos, lípidos y proteínas. Los tegumentos juegan también un papel importante en la regulación de la luz.

### **Factores Externos:**

En contraste con los esfuerzos que se han dedicado al estudio de los medios de cultivo y las sustancias de crecimiento, pocos investigadores se han dedicado a estudiar el efecto de los factores ambientales.

### **El oxígeno:**

El nivel del oxígeno en cultivo de tejidos depende de los gases presentes alrededor y dentro del recipiente de cultivo y de su proporción. El nivel de oxígeno dependerá entonces de la manera en que se cierre el frasco de cultivo, de la frecuencia de los subcultivos y del metabolismo de los tejidos que rodean al tejido embriogénico (callos). En trigo, Carman (1989) demostró que bajas dosis de oxígeno favorecían la embriogénesis somática. Por otro lado Engelmann (1990), trabajando con palma africana encontró que la conservación de cultivos embriogénicos se favoreció en presencia de una atmósfera al 1% de O<sub>2</sub> + 99% de N<sub>2</sub>, ya que el nitrógeno desplaza rápidamente el oxígeno.

### **El medio:**

Los medios semi-sólidos son los más empleados. Sin embargo, existen varios estudios que demuestran la importancia del agente gelificante : agar, gelrite, agarosa.

Aunque en la fase de iniciación de la embriogénesis somática se utiliza preferencialmente el medio sólido, el medio líquido es muy utilizado en la multiplicación a gran escala.

El cultivo en medio líquido presenta varias ventajas:

- Individualización de todos los embriones somáticos.
- Aumento del potencial embriogénico.
- Aumento en la expresión de los pro-embriones y por ende, un aumento del número de embriones somáticos
- Mejoramiento de la maduración de los embriones y como consecuencia mejoramiento de la germinación de los mismos.

El proceso consiste en transferir el cultivo embriogénico a un erlenmeyer con medio líquido con agitación o en bioreactores. También se puede utilizar el "Sistema de Inmersión Temporal", el cual ha sido desarrollado recientemente. Este sistema consiste en sumergir el cultivo en el medio a intervalos regulares, por ejemplo, 4 veces al día por un período de 1 minuto.

### **El medio de cultivo:**

Por lo general, se utiliza el medio de Murashige y Skoog o modificaciones de éste.

### **Sacarosa:**

La sacarosa se utiliza en niveles de 2 a 3% (20 a 30 g/l). Sin embargo, existen varios estudios que demuestran que altas dosis de sacarosa pueden favorecer la embriogénesis somática. Así, Wetherell (1984) reportó el uso de sacarosa a 120 g/l en zanahoria. Por otro lado, Escalant y Teisson (1989) demostraron que en *Musa* fue necesario utilizar 60 g/l de sacarosa. Según Finer (1987), otra ventaja que conlleva el utilizar altas concentraciones de sacarosa (120 g/l) es poder disminuir la dosis de auxina.

### **Nitrógeno:**

El nitrógeno es sin duda un elemento esencial en el cultivo de tejidos. Existen varias formas de suministrarlo siendo las más comunes el  $\text{NH}_4$  (amonio) y el  $\text{NO}_3$  (nitrato). También se puede complementar la dosis con el nitrógeno orgánico provisto por amino ácidos tales como glutamina y alanina, la caseína hidrolizada o por el agua de coco.

### **Carbón Activado:**

El carbón activado se utiliza principalmente para limitar los problemas de oxidación asociados al cultivo de tejidos (liberación de compuestos fenólicos que provocan la oxidación y muerte del tejido). El carbón activado adsorbe las sustancias químicas en general, limitando así su intervención con el tejido cultivado. Con respecto a las auxinas y citocininas, se cree que el carbón activado las retiene liberándolas progresivamente en el medio favoreciendo así la embriogénesis somática. Las dosis comúnmente utilizadas van de 0.1 g/l a 1g/l.

## **Reguladores del Crecimiento:**

### **- Las auxinas**

De acuerdo con Evans et al. 1981, en la mayoría de los sistemas de embriogénesis somática la inducción requiere una concentración alta auxina o equivalente: AIA; ANA; 2,4-D; 2,4,5-T; picloram (4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid); dicamba. El 2,4-D siendo el más utilizado. Las concentraciones utilizadas son muy variables (0.5 - 27.6  $\mu\text{M}$  hasta 450  $\mu\text{M}$  en presencia de carbón activado).

### **- Las citocininas:**

Las citocininas como el BAP, la kinetina y la zeatina son a veces utilizadas en el medio de inducción de la embriogénesis somática. Sin embargo son mucho más utilizadas en la fase de diferenciación y maduración del embrión somático.

### **- Otras sustancias:**

- En el caso de las especies leñosas, se ha recomendado incorporar el ácido giberélico ( $\text{GA}_3$ ) con el fin de ayudar a la maduración y germinación de los embriones somáticos.
- El ABA o ácido abscísico puede favorecer la embriogénesis somática. En trigo, se observó que en ausencia de ABA el embrión cigótico utilizado como explante primario germinaba (Javed, 1989). La adición de ABA (0.5 - 1 mg/l) al medio de cultivo permite inhibir la germinación y aumentar los porcentajes de callos embriogénicos. Otro punto importante reside en el control que tiene el ABA sobre el desarrollo del embrión somático reduciendo la producción de embriones anormales.

---

## SUSPENSIONES CELULARES

---

Los primeros ensayos de cultivo de células vegetales aisladas fueron realizados por Haberlandt. Para 1937, en un estudio con células aisladas de la cofia de raíces, Gautheret resaltó la importancia de condicionar previamente el medio de cultivo (nodriza) antes de inocular las células aisladas.

Las suspensiones celulares consisten en células libres y agregados celulares puestos en un medio líquido en movimiento. Tales suspensiones pueden ser permanentes mediante el suministro continuo de nutrientes.

### **Iniciación de las suspensiones**

**Explante:** El material comúnmente utilizado consiste en trozos de tejidos friables de tipo "callo". A veces es necesario, utilizar enzimas (pectinasas y celulasas) para liberar las células. La calidad del explante inicial es muy importante, el mejor inóculo consiste de un cultivo friable con un alto ritmo de división celular, por ejemplo, un cultivo embriogénico el cual es un tejido friable constituido por células embriogénicas y proembriones somáticos.

**Recipiente:** Por lo general el inóculo se siembra en erlenmeyers. Sin embargo, debido a la gran importancia de la relación volumen de medio y volumen del inóculo es aconsejable algunas veces utilizar recipientes de tipo "Multi-Well Tissue Culture Plates" o sea, cajas de petri con varias celditas. Para la producción masiva de células o metabolitos secundarios a nivel industrial se utiliza los "bioreactores".

Muchos de los trabajos publicados sobre suspensiones celulares resaltan la importancia de la densidad del inóculo en el éxito de las suspensiones. En general se recomienda empezar con volúmenes pequeños de medio (10 a 50 ml) y un inóculo de 2 a 5 g (peso materia fresca).

### **Características de las suspensiones celulares:**

En su fase de iniciación las suspensiones celulares constan de varios tipos de células:

- Células diferenciadas sin capacidad de división: son células alargadas y grandes con una vacuola enorme y un citoplasma reducido con un núcleo pequeño.

- Células meristemáticas: más pequeñas, con un citoplasma más denso ocupando todo el espacio intracelular.
- Células embriogénicas: con un citoplasma ocupando todo el espacio intracelular, sustancias de reservas como almidón, proteínas y lípidos.

En resumen, durante el período de iniciación la suspensiones celulares constan de varios tipos de células así como de agregados de diferentes tamaños y en ciertos casos de proembriones y embriones somáticos.

## **Desarrollo de la suspensión de células**

El desarrollo de la suspensión celular, por lo general, comprende tres fases: una fase inicial de latencia durante la cual la densidad de células no aumenta; una fase de alto crecimiento durante la cual el volumen celular aumenta y una última fase llamada "estacionaria" durante la cual el crecimiento se mantiene constante y el volumen celular no aumenta. El crecimiento de una suspensión de células es por lo tanto de tipo exponencial.

El desarrollo de la suspensión celular está relacionado con varios factores:

- Tipo de explante inicial.
- Calidad del medio de cultivo: reguladores del crecimiento, compuestos orgánicos y minerales.
- Condiciones ambientales: relación oxígeno/CO<sub>2</sub>, luz/oscuridad.
- Velocidad de agitación (60 - 100 rpm).
- Densidad en materia celular: relación volumen de células / volumen de medio.

Es difícil establecer reglas en lo que concierne a estos parámetros, sin embargo, en la gran mayoría de los casos, se recomienda un cambio de medio cada semana (en ciertos casos cada 3 días). Varios estudios han demostrado que durante la fase de crecimiento la suspensión celular puede acabar rápidamente con varios de los nutrientes. Por ejemplo, Brown y Beevers (1987) demostraron que en suspensiones de arroz, el fosfato y el azúcar del medio fueron limitantes después de 7 días de cultivo. Existe también gran evidencia de que la división celular se favorece en presencia de reguladores tipo auxina como el 2,4-D; el picloram, etc. Por el contrario, la formación de embriones somáticos requiere de una disminución en la concentración en auxina y la introducción de citocininas al medio de cultivo.



También es muy importante considerar el cultivo de células en presencia de "nodrizas". En efecto, en la mayoría de los casos, cuando se trata de suspensiones de células aisladas (es decir obtenidas a través de un filtro de 50  $\mu$ ) la división celular y el crecimiento de estas células dependen de la presencia cercana de un tejido "nodriza" que proporcione a las células los metabolitos necesarios.

Existe varios tipos de nodriza como por ejemplo: los callos embriogénicos o meristemáticos. El cultivo con nodriza puede realizarse en varias formas. Una es el cultivo de las células aisladas en presencia de nodrizas (callo) en su alrededor o también se puede precondicionar un sustrato dejando la nodriza un cierto tiempo y removiéndola al momento de inocular las células aisladas. Se piensa así que las sustancias necesarias al buen desarrollo de las células aisladas son proporcionadas a través del medio de cultivo.

Una vez que las condiciones de cultivo son establecidas, se puede multiplicar una suspensión. Para ésto se realizan divisiones sucesivas de la masa celular colocándose éstas en otros recipientes.

### **Evaluación del crecimiento:**

Existen diferentes métodos para la evaluación del crecimiento de una suspensión de células.

#### **- *Conteo de células:***

Es necesario en este caso tener una suspensión sin agregados grandes, de lo contrario se haría necesario un tratamiento con enzimas tipo pectinasa (0.1% durante 16 h a 26°C). El conteo se realiza usando un microscopio.

#### **- *Determinación del volumen celular:***

Se toma una fracción de la suspensión celular y se transfiere a un tubo graduado de centrifugación. Después de centrifugarla durante 3 minutos a 2500 rpm, el material celular sedimenta y se puede apreciar el volumen celular. Se expresa en ml de células por ml de medio. Este método de evaluación es fácil y rápido. Además, puede realizarse en condiciones estériles, lo que permite conservar la totalidad de la suspensión.

#### **- *Peso fresco***

#### **- *Peso seco***

#### **- *Turbidez:***

Usando un fotolorímetro con filtro azul (400-465 nm).

**- Índice mitótico:**

Consiste en la evaluación del número de células en estado de mitosis. Este índice se calcula de la siguiente manera:

$$IM = \frac{\text{Células en mitosis}}{\text{total de células}} \times 100$$

**Regeneración de plantas a partir de suspensiones celulares:**

La regeneración de plantas completas a partir de suspensiones celulares puede ocurrir mediante varios procesos tales como: callo + organogénesis; callo + embriogénesis somática o embriogénesis somática "directa". Por lo general, la regeneración a partir de callos ocurre después de "platear" una alícuota de la suspensión sobre un medio semi-sólido adecuado. La formación de plantas a través de la embriogénesis somática puede ocurrir directamente en el medio líquido o después del "plateo" sobre el medio semi-sólido.

En general, el desarrollo de plantas a partir de suspensiones celulares requiere una disminución de las auxinas y la introducción de citocininas. También puede ser muy útil la presencia del ácido abscísico (ABA) como regulador de las divisiones celulares. El ABA favorece la obtención de embriones somáticos bien formados (evita los problemas de embriones pluri-cotiledonarios) y también la germinación y la obtención de plantas completas.

---

## METODOS DE CONSERVACION DE LOS RECURSOS FITOGENETICOS

---

Durante los últimos años el germoplasma vegetal, al igual que otros recursos naturales, se está perdiendo en forma alarmante, en muchos casos antes de percatarnos de su existencia, su potencial y su valor real. La destrucción de los hábitat, la selección natural, los agentes bióticos y paradójicamente, el abandono de las variedades tradicionales en favor de las nuevas variedades mejoradas, han sido los factores involucrados en esta erosión genética. Recordemos que el germoplasma vegetal es un recurso irrenovable y que es vital para la seguridad alimentaria de la humanidad y por ende para un desarrollo sostenible. Debido a esta erosión genética acelerada de las especies vegetales se ha despertado gran interés por desarrollar métodos eficientes para conservar el germoplasma, esto es, preservar con la mayor integridad posible toda la variabilidad disponible en una especie dada.

### I. CONSERVACION IN SITU

Idealmente la diversidad vegetal debería conservarse *in situ* coexistiendo con otros organismos vivos en su ambiente natural. Sin embargo, diferentes experiencias señalan que a fin de garantizar la existencia del recurso, se requiere de otros métodos de preservación. Como resultado, se han desarrollado sistemas de conservación *ex situ*.

### II. CONSERVACION EX SITU

Estos métodos dependerán del tipo de propagación de la especie en particular y/o el tipo de semilla que presentan.

#### **Los bancos de semillas:**

En general los bancos de semillas son adecuados para la conservación a largo plazo de especies con semillas ortodoxas, es decir, semillas que resisten alto grado de desecación y almacenamiento a bajas temperaturas (entre 5°C y -20°C). Sin embargo, este tipo de almacenamiento es inadecuado o imposible para un alto número de cultivos debido a que poseen semillas recalcitrantes (no resisten la desecación y el almacenamiento por largos períodos sin perder rápidamente la viabilidad), o son propagados vegetativamente. Este es el caso del cacao, coco, mango, hule, banano, aguacate, yuca, piña, café, pimienta y muchos otros cultivos. Para la conservación de especies con semillas

recalcitrantes o propagadas vegetativamente las colecciones en el campo y más recientemente, las colecciones *in vitro* representan alternativas a considerar.

### **Las colecciones de campo:**

Las colecciones de campo son difíciles de implementar presentándose problemas como la decisión del tamaño adecuado de la muestra para conservar la diversidad genética. Dependiendo de la especie, ésta podría variar desde unos pocos individuos hasta miles de plantas para poder mantener la heterocigocidad. Esto implica que el espacio requerido para la conservación será considerable, más aún cuando se piensa en conservación de especies forestales. Por otra parte, cuando se piensa en conservación a largo plazo éste no sería el método más adecuado. Las plantas están expuestas a desastres naturales, agentes bióticos, errores humanos y cambios en las políticas institucionales o gubernamentales. Además, los costos de mantenimiento y labor son muy altos.

### **Conservación *in vitro*:**

Con el desarrollo de las técnicas de cultivo de tejidos es posible la conservación y el intercambio de germoplasma vegetal *in vitro*. La conservación *in vitro* ha estado sujeta a discusiones, principalmente debido a que el germoplasma debe mantenerse bajo estrictos controles de asepsia. Sin embargo, esto es precisamente lo que permite el intercambio de material vegetal entre países sin pasar por el período de cuarentena. Esta técnica ofrece muchas otras ventajas, por ejemplo, permite el almacenamiento de gran número de especies en un espacio reducido, se elimina el riesgo de ataques de plagas y enfermedades. Para aquellos materiales de ciclos cortos se puede alargar los períodos de transferencia, además, es posible producir y mantener plantas libres de virus con altas tasas de multiplicación y todo esto independiente de las condiciones climáticas.

Bajo esta modalidad la conservación puede realizarse:

**1. a mediano plazo**, modificando la tasa de crecimiento del cultivo para alargar los períodos entre transferencias y por ende, disminuir los riesgos de variación.

**2. a largo plazo o crioconservación** que consiste en suprimir totalmente el crecimiento y metabolismo del material almacenándolo a ultra bajas temperaturas (nitrógeno líquido, -196°C) por tiempo indefinido.

## **Conservación *in vitro* a mediano plazo:**

El método consiste en mantener los cultivos (yemas, plántulas o meristemos) en condiciones físicas (factores ambientales) y químicas (composición del medio de cultivo) que permitan extender al máximo el intervalo de transferencia a los medios de cultivo frescos, sin afectar su viabilidad y reduciendo la posibilidad de pérdida por manipulación y contaminación. La reducción en la tasa de crecimiento generalmente se logra disminuyendo en unos grados la temperatura del ambiente y/o la intensidad de la luz, dependiendo la temperatura de almacenamiento de la sensibilidad de la especie. Por ejemplo, la Red Internacional para el Mejoramiento del Banano y el Plátano (INIBAP, en inglés) conserva la colección mundial *in vitro* de bananos y plátanos bajo esta modalidad de crecimiento reducido almacenando los meristemos apicales a una temperatura de 15°C y una intensidad lumínica de 2000 lux. Por otro lado, el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) conserva la colección *in vitro* de yuca a 22°C, ya que temperaturas inferiores a los 18°C son perjudiciales para estos materiales a menos que la intensidad lumínica se reduzca por debajo de 500 lux. Sin embargo, modificaciones en la concentración de nutrientes, reguladores de crecimiento, presencia de osmóticos, oxigenación y el fotoperíodo son factores que también afectan el crecimiento.

## **Crioconservación o Conservación *in vitro* a largo plazo:**

La crioconservación consiste en llevar material biológico desde su temperatura fisiológicamente normal hasta ultra bajas temperaturas y de nuevo a su temperatura normal sin causar daño. Esta técnica tiene sus raíces históricas en estudios realizados sobre la sobrevivencia de especies vegetales en condiciones de temperaturas bajo cero grados centígrados, en zonas templadas y en la búsqueda de resistencia a las heladas, sin embargo, no fue sino hasta 1973 cuando se logró una verdadera crioconservación en nitrógeno líquido de células de zanahoria.

Al presente, la crioconservación se ha considerado como el único método viable para el almacenamiento de germoplasma vegetal a largo plazo bajo condiciones de alta estabilidad genética y con un mínimo de mantenimiento. Una vez que el material ha sido congelado a -196°C, las funciones metabólicas cesan, por lo tanto, no ocurre división celular, deterioro o mutaciones. Más aún, el material puede permanecer en este estado por tiempo indefinido. Otras ventajas que presenta este método de almacenamiento son los bajos costos de labor y mantenimiento y el reducido espacio requerido. Además, permite la conservación no sólo de meristemos, sino también de embriones cigóticos, somáticos, callos embriogénicos, polen y suspensiones celulares, es decir, material generado en el laboratorio y por ingeniería genética.

## **Requisitos para la crioconservación de especies vegetales:**

- Habilidad de cultivar el material *in vitro*.
- Habilidad de multiplicarlo *in vitro*.
- Los materiales deben resistir los pretratamientos y crioprotectores.
- El tejido debe regenerarse después del congelamiento.

## **Etapas en el proceso de crioconservación:**

- a) La selección y aislamiento del material a conservar. En esta etapa se debe de considerar la estabilidad genética intrínseca del sistema, por lo tanto, los meristemas y embriones son los materiales prioritarios en programas de conservación de germoplasma.
- b) Pretratamiento y crioprotección, se induce cierto grado de deshidratación en las células y tejidos para evitar daños causados por la formación de cristales de hielo durante los procesos de congelamiento y descongelamiento. El material puede cultivarse desde unos pocos minutos hasta varios días en presencia de sustancias crioprotectoras como la sacarosa, glicerol, sulfóxido de dimetilo y otras. Además de inducir una deshidratación protectora, estas sustancias disminuyen la temperatura a la cual el agua intracelular se congela e intervienen en la estabilización de membranas y en la protección de sitios de enlace de enzimas durante el proceso de congelamiento.
- c) Congelamiento, éste puede ser ultra rápido por inmersión directa en nitrógeno líquido o lento siendo necesario un congelador programable para obtener resultados precisos y reproducibles. El almacenamiento en nitrógeno líquido es recomendable ya que las fases líquida y vapor se estabilizan a  $-150^{\circ}\text{C}$ , lo que evita el deterioro progresivo del material.
- d) Descongelamiento, en la mayoría de los casos se realiza por inmersión de los viales que contienen las muestras en baños de agua a  $40^{\circ}\text{C}$ , sin embargo, se han reportado algunas excepciones donde el descongelamiento lento ha sido necesario.
- e) Recuperación, es el tratamiento a que se somete el material después del descongelamiento. Consiste en el lavado o dilución de los crioprotectores y el cultivo de las muestras en condiciones óptimas para asegurar su crecimiento.

Durante los últimos 20 años las investigaciones en esta área han generado gran número de reportes sobre técnicas desarrolladas para la crioconservación no sólo de especies vegetales de clima templado sino también de especies tropicales como *Musa spp.*, *Manihot esculenta*, *Theobroma cacao*, *Elaeis guineensis*, *Coffea spp.*, *Rubus*, *Cocos nucifera*, *Saccharum officinarum* y muchas otras. Actualmente son pocos los laboratorios que utilizan la crioconservación, sin embargo, el interés por conocer e implementar este nuevo método de preservación de germoplasma va en aumento.

## LITERATURA PARA CONSULTA

- Alvard, D.; Cote, F.; Teisson, C.** 1993. Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. Effects of temporary immersion of explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 32: 55-60
- Ammirato, P.V.** 1983. Embryogenesis. En: Evans, D.A.; Sharp, W.R.; Ammirato, P.V. and Yamada, Y. (eds.). *Handbook of plant cell culture*. Mac Millan Publishing, Nueva York. v.v 1, p. 82-123.
- Reinert, J.** 1958. Untersuchungen uber die morphogenese und gewebeulturen. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 71-15.
- Ammirato, P.V.; Steward, F.C.** 1971. Some effects of the environment on the development of embryos from cultured free cells. *Bot. Gaz.* 132: 149-158.
- Brown, D.J.; Beevers, H.** 1987. Growth and respiration of rice (*Oryza sativa* L.) cells suspension culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 10: 175-186.
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical).** 1991. Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Principios y Aplicaciones. Roca, W.M.; Mroginski, L.A. (eds.). Cali, Colombia. p.xii, 970.
- Dhed'a, D.; Dumortier, F.; Panis, B.; Vuylsteke, D.; De Langhe, E.** 1991. Plant regeneration in cell suspension cultures of the cooking banana cv.'Bluggoe' (*Musa spp.* ABB group). *Fruits* 46: 125-135.
- Dublin, P.** Embryogenese somatique directe sur fragments de feuilles de caféier Arabusta. *Café. Cacao. Thé (Paris)*, vol. XXV, n 4, Oct.-Dec. p. 237-242.
- Engelmann, F.** 1990. Utilisation d'atmosphères à teneur en oxygène réduite pour la conservation de cultures d'embryons somatiques de palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.). *C.R.Acad. Sci. Paris*, t.310, série III, p. 679-684.
- Engelmann, F.** 1991. Tropical plant germplasm conservation. *In: Conference of the International Plant Biotechnology Network.* (4, 1191, San José, Costa Rica). *Proceedings of Biotechnology for Tropical Crop Improvement in Latin America.*
- Escalant, J.V.; Teisson, C.** 1989. Somatic embryogenesis and plants regeneration from immature zygotic embryos of species *Musa acuminata* and *Musa balbisiana*. *Plant. Cell. Rep.* 7: 665-668.



- Evans, D.A.; Sharp, W.R.; Flick, C.E.** 1981. Growth and behavior of cell cultures: Embryogenesis and organogenesis. En: Thorpe, T.A. (ed.): Tissue culture: Methods and applications in agriculture. Academic. Press, Nueva York. p. 45-113.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación).** 1990. Fundamentos Teórico-Prácticos del Cultivo de Tejidos Vegetales. Rosell, C.H.; Villalobos, V.M. (eds.). Rome.
- Finer, J.** 1987. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of hybrid sunflower (*Helianthus annuus* L.) on high sucrose-containing medium. Plant. Cell. Rep. 6: 372-374.
- Herman, E.B.; Haas, G.J.** 1975. Clonal propagation of *Coffea arabica* L. from callus culture. HortScience (saint Joseph, USA), vol. 10, n 6, p. 588-589.
- Kyte, L.** 1987. Plants From Test Tubes: an introduction to micropropagation. Timber Press, Inc. Portland, Oregon.
- Litz, R.E.** 1984. *In vitro* somatic embryogenesis from nucellar callus of monoembryonic mango. HortScience 19: 715-717.
- Lu, C.; Vasil, I.K.** 1981. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf tissues of *Panicum maximum* Jacq. Theor. Appl. Genet. 59: 275-280.
- Pannetier, C.; Buffard-Morel, J.** 1982. Production of somatic embryos from leaf tissues of coconut, *Cocos nucifera* L. En: Fujiwara, A. (ed.). Plant tissue culture. Japan Assoc. Plant Tissue Culture, Tokio. p. 755-756.
- Mroginski, L.A.; Roca, W.M.; Kartha, K.K.** 1991. Crioconservación del germoplasma. In: Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Roca, W.M.; Mroginski, L.A. (Eds.). CIAT, Colombia. pp. 715-730.
- Niino, T.; Sakai, A.; Yakuwa, H.** 1992. Cryopreservation of Dried Shoot Tips of Mulberry Winter Buds and Subsequent Plant Regeneration. Cryo-Letters. 13:51-58.
- Ochoa, N.** 1990. Conservación de germoplasma. In Fundamentos teórico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales. Rosell, C. y Villalobos, V. (Eds.) FAO, Roma. pp. 55-59.
- Panis, B.J.; Withers, L.A.; De Langhe.** 1990. Cryopreservation of *Musa* suspension cultures and subsequent regeneration of plants. CryoLetters. 11:337-350.

- Gureshi, J.A.; Kartha, K.K.; Abrams, S.R.; Steinhauer, L.** 1989. Modulation of somatic embryogenesis in early and late-stage embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.) under the influence of (+/-) abscisic acid and its analogs. *Plant, Cell, Tissue and Organ Culture* 18: 55-69.
- Rangan, T.S.; Murashige, T.; Bitters, W.P.** 1968. *In vitro* initiation of nucellar embryos in monoembryonic Citrus. *HortScience* 3: 226-227.
- Reed, B.M.** 1988. Cold Acclimation as a Method to Improve Survival of Cryopreserved *Rubus* Meristems. *Cryo-Letters*. 9:166-171.
- Sondahi, M.R.; Sharp, W.R.** 1977. High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* (Stuttgart), vol. 81, p. 395-408.
- Steponkus, P.L.; Lanphear, F.O.** 1967. Refinement of the triphenyl tetrazolium chloride method of determining cold injury. *Plant Physiol.* 42:1423-1426.
- Steward, F.C.; Mapes, M.O.; Mears, K.** 1958. Growth and organized development of cultured cells; 2: Organization in cultures grown from freely suspended cells. *Amer. J. Bot.* 45: 705-708.
- Steward, F.C.; Shantz, E.M.** 1959. The chemical induction of growth in plant tissue cultures. En: Wain, R.L. and Wightman, F. (eds). *The chemistry and mode of action of plant growth substances*. Academic. Press, New York. p. 165-187.
- Steward, F.C.; Shantz, E.M.** 1959. The chemical induction of growth in plant tissue cultures. En: Wain, R.L. and Wightman, F. (eds). *The chemistry and mode of action of plant growth substances*. Academic. Press, New York. p. 165-187.
- Tisserat, B.; Esan, E.B.; Murashige, T.** 1979. Somatic embryogenesis in angiosperms: *Hort. Rev.* 1: 1-78.
- Vasil, I.K.** 1982. Plant cell culture and somatic cell genetics of cereals and grasses. En: Vasil, I.K.; Scowcroft, W.R. and Frey, K.J. (eds.). *Plant improvement and somatic cell genetics*. Academic. Press, New York. p. 179-203.
- Vasil, V.; Vasil, I.K.** 1980. Isolation and culture of cereal protoplasts; 2: Embrogenesis and plantlet formation from protoplasts of *Pennisetum americanum*. *Theor. Appl. Genet.* 56: 97-100.
- Villalobos, V.; Abdelnour, A.** 1992. Cryopreservation of *Musa* spp and Its Potential For Long-Term Storage of Other Tropical Crops. *In: Conservation of Plant Genes*. Adams, R. and Adams, E. (Eds.). Academic Press, Inc. pp.197-210.

- Vuytsteke, D.R.** 1989. Shoot-tip culture for the propagation, conservation and exchange of *Musa* germplasm. IBPGR. Rome.
- Wernicke, W.; Brettell, R.** 1980. Somatic embryogenesis from *Sorghum bicolor* leaves. *Nature* 287: 138-139.
- Wetherell, D.F.** 1984. Enhanced adventive embryogenesis resulting from plasmolysis of cultured wild carrot cells. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 3: 221-227.
- Wildom, J.M.** 1972. The use of fluorescein diacetate and phenosafranin for determining viability of cultured plant cell. *Stain Technol.* 47:189-194.
- Withers, L.A.** 1987. Long-term preservation of plant cells, tissues and organs. *Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology.* 4:221-272.