

Capítulo 1

Cultivo de Tejidos Vegetales

Eugenio Pérez Molphe Balch
Departamento de Química del Centro de Ciencias Básicas
Universidad Autónoma de Aguascalientes

Resumen

El cultivo de tejidos vegetales consiste en un conjunto de técnicas que permiten mantener y desarrollar células, tejidos, órganos o individuos completos, en un ambiente artificial y bajo condiciones controladas. Esta disciplina tiene aplicaciones muy importantes hoy en día, como la micropropagación de plantas de alto valor, la producción *in vitro* de metabolitos vegetales y otras. Además de esto, puede ser la base para otras aplicaciones biotecnológicas como la generación de plantas transgénicas y la producción de proteínas recombinantes en sistemas basados en células vegetales. En este capítulo se presentan los conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales y se describen los medios y sistemas de cultivo que se emplean. Se incluye información sobre el uso de los reguladores del crecimiento vegetal o fitohor-

monas en el contexto de esta tecnología, así como el proceso de desinfección de los tejidos con el fin de establecer cultivos *in vitro*. Finalmente, se presentan algunas de las aplicaciones más importantes de esta tecnología, con énfasis en la regeneración *in vitro* y la micropropagación. Se incluyen protocolos completos para la preparación de medio de cultivo, la desinfección de tejidos para el establecimiento de cultivos *in vitro* y la micropropagación de algunas especies ornamentales.

Conceptos básicos

El cultivo de tejidos vegetales es una de las disciplinas más ampliamente usadas dentro de la Biotecnología Vegetal. Consiste en un conjunto de técnicas que permiten mantener y desarrollar células, tejidos, órganos o individuos completos, en un ambiente artificial y bajo condiciones controladas. Esto se hace en recipientes cerrados, la mayoría de las veces aislados por completo del medio externo, los cuales contienen un medio de cultivo artificial especialmente formulado para el tipo de tejido y de desarrollo que se busca en el mismo. Estos recipientes se incuban bajo condiciones controladas de luz y temperatura. Una condición básica para que estos sistemas de cultivo funcionen es mantener en los mismos un ambiente axénico, es decir, libre de cualquier microorganismo contaminante.

Al segmento de tejido vegetal que se utiliza para iniciar un nuevo cultivo se le llama explante. El tipo de explante a utilizar varía dependiendo de la respuesta que se busque, pero de manera general los tejidos jóvenes se adaptan más fácilmente y responden mejor a las condiciones de cultivo *in vitro*. El tipo de desarrollo o respuesta que se obtenga en un cultivo depende de la interacción del explante inoculado con el medio de cultivo. Si esta interacción no es la adecuada, la respuesta observada será la necrosis o muerte del tejido. Sin embargo, si el explante se adapta al medio de cultivo y las condiciones de incubación son correctas, se iniciará la división celular y se podrán observar diferentes tipos de respuestas. Una de ellas es la generación de tejido caloso, el cual está constituido por masas de células que se dividen rápidamente, pero manteniéndose en un estado indiferenciado, sin formar tejidos u órganos reconocibles. Otra respuesta frecuente es el desarrollo del tejido. En este caso, el explante, al adaptarse a las condiciones *in vitro*, continuará desarrollándose,

siguiendo el mismo patrón que tendría dicho tejido en la planta completa en condiciones naturales. Por ejemplo, una yema brotará y producirá una nueva rama, una raíz continuará creciendo como tal o una semilla germinará y generará una plántula. Otro tipo de respuestas implican una alteración de los patrones normales del desarrollo. Ejemplos de estas respuestas son la organogénesis y la embriogénesis somática. En el primer caso, algunas de las células del explante se rediferencian produciendo estructuras que en condiciones naturales no se generarían en el tejido original. Estas estructuras pueden ser raíces o brotes adventicios. En la embriogénesis somática, ciertas células contenidas en el tejido se desdiferencian hasta llegar a un estado similar al cigoto. Posteriormente se rediferencian hasta formar un embrión completo, pasando por etapas muy similares a las de embriogénesis que ocurre en condiciones naturales. Sin embargo, estos embriones no proceden de un proceso de fecundación, sino que se originan de células somáticas y son genéticamente iguales a la planta madre. Estos embriones somáticos pueden germinar y convertirse en plantas completas. La organogénesis y la embriogénesis somática pueden ocurrir directamente sobre el explante inoculado en el medio de cultivo, o bien en un cultivo ya establecido de tejido calloso al que se le altera la composición del medio u otras condiciones de cultivo. En el primer caso se les denomina organogénesis o embriogénesis somática directas, mientras que cuando se pasa por una etapa de tejido calloso se les llama indirectas.

Muchas de las respuestas de los tejidos al cultivo *in vitro*, como las antes mencionadas, se deben a la adición al medio de fitohormonas o reguladores del crecimiento vegetal. Los más usados en el cultivo *in vitro* son los pertenecientes a los grupos de las auxinas y de las citocininas, y en menor medida se usan las giberelinas y el ácido abscísico. El cultivo de tejidos vegetales tiene varias aplicaciones, mismas que se discutirán más adelante.

Medios de cultivo para tejidos vegetales

La formulación adecuada del medio de cultivo es un elemento fundamental para el éxito del cultivo de tejidos vegetales. El medio debe aportar todos los elementos inorgánicos y moléculas orgánicas que son necesarias para mantener vivo al tejido, y además debe contener compuestos que promuevan el desarrollo del tejido en las condiciones *in vitro*, siendo los más importan-

tes en este grupo los reguladores del crecimiento vegetal o fitohormonas. En la actualidad se han formulado y reportado en la literatura una gran cantidad de medios de cultivo diferentes. Cada uno de ellos difiere de los demás en aspectos como cantidad total de solutos (fuerza iónica), forma de suministrar el nitrógeno, cantidad y forma de suministro de macro y micronutrientes, fuente de carbono y vitaminas y otras moléculas orgánicas incluidas. Algunos medios de cultivo se consideran de uso general, ya que son aptos para una amplia gama de especies y procesos. Este es el caso de los medios de Murashige y Skoog (MS), Linsmaier y Skoog (LS) y Gamborg (B5). Por otro lado, hay medios desarrollados para un tipo de planta o un proceso en específico. Por ejemplo, los medios de Lloyd y McCown (WPM) y el de Driver y Kuniyuki (DKW) se recomiendan para especies leñosas, mientras que el medio de Nitsch y Nitsch (NN) se diseñó para el cultivo de anteras para la generación de plantas haploides.

No obstante, hay una gran cantidad de medios de cultivo diferentes reportados en la literatura especializada, todos éstos contienen los siguientes grupos de compuestos:

a) Macronutrientes minerales:

Son los iones que la planta en condiciones normales toma del suelo y son requeridos en concentraciones de medias a altas.

Elemento	Cantidad presente en los medios de cultivo	Formas de suministrarlo
Nitrógeno (N)	25 - 60 mM	Nitrato (NO_3^-) en concentraciones de 25-40 mM y/o de amonio (NH_4^+) en concentraciones de 2-20 mM. La proporción entre estas dos formas de nitrógeno es una variable importante para considerar cuando se experimenta con diferentes medios de cultivo. El suministro de nitrógeno puede complementarse con alguna fuente de nitrógeno orgánico, principalmente en forma de aminoácidos.
Fósforo (P)	1 - 3 mM	Se suministra en forma de fosfatos de sodio ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) o potasio (KH_2PO_4).

Elemento	Cantidad presente en los medios de cultivo	Formas de suministrarlo
Potasio (K)	20 - 30 mM	Se suministra en forma de nitrato (KNO_3), fosfato (KH_2PO_4) o cloruro (KCl).
Calcio (Ca)	1 - 3 mM	Es adicionado en forma de cloruro ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) o de nitrato [$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$].
Magnesio (Mg)	1 - 3 mM	Es suministrado como sulfato ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).
Azufre (S)	1 - 3 mM	Se adiciona al medio de cultivo como sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Los sulfatos de manganeso, zinc, cobre y fierro suelen usarse como fuente de micronutrientes.

b) Micronutrientes minerales:

Además de los macronutrientes antes mencionados, tanto las plantas normales como los tejidos cultivados *in vitro* requieren de otros elementos inorgánicos en concentraciones generalmente mucho menores. Estos son fierro (Fe), manganeso (Mn), boro (B), cobre (Cu), molibdeno (Mo), cobalto (Co) y yodo (I). Las concentraciones de estos micronutrientes van de 0.1 hasta 100 μM , a excepción del Fe que se requiere en cantidades mayores (1 mM). Este elemento suele ser problemático por su tendencia a precipitar, por lo que normalmente se suministra en forma quelada con EDTA, o bien como citrato o tartrato de fierro.

c) Fuente de carbono:

Las plantas en condiciones naturales utilizan el CO_2 atmosférico como fuente de carbono para la síntesis de carbohidratos, esto mediante la fotosíntesis. Posteriormente, usan estos carbohidratos como precursores para la síntesis del resto de las moléculas orgánicas que requieren. Sin embargo, los tejidos vegetales cultivados *in vitro* tienen una capacidad fotosintética muy reducida o nula. Esto se debe en gran medida a la limitada concentración de CO_2 en los recipientes de cultivo y a la también baja intensidad luminosa en que son mantenidos. Esto además de que muchos de los tejidos que se cultivan *in vitro* no contienen células con capacidad fotosintética. Por lo anterior, a los tejidos mantenidos *in vitro* se les debe proveer de una fuente de carbono orgánico que compense su baja o nula capacidad fotosintética. La gran mayoría de los me-

dios de cultivo utilizan sacarosa en concentraciones del 2 al 3% (p/v), aunque esta concentración puede ser mayor para algunas especies. La sacarosa es la principal forma de transporte y almacenamiento temporal de carbono en las plantas, por lo que resulta el compuesto más adecuado para ser usado en los medios de cultivo, esto además de presentar ventajas como su gran solubilidad y su bajo costo. La sacarosa, además de servir al tejido como fuente de carbono, tiene un papel muy importante como regulador del potencial osmótico del medio de cultivo, ya que es el soluto más abundante en el mismo. Esto debe tomarse en cuenta cuando se altera su concentración o se prueban fuentes alternas de carbono. Además de la sacarosa, se ha reportado el uso de fuentes de carbono como la glucosa, fructosa, lactosa, galactosa, rafinosa, maltosa e incluso almidón, sin embargo, estos compuestos sólo son eficientes en algunos tipos de tejido y procesos particulares y no son de amplia aplicación.

d) Compuestos orgánicos:

En condiciones naturales, las plantas tienen la capacidad de sintetizar todos los compuestos orgánicos requeridos para su metabolismo, por lo que no requieren de un aporte externo de los mismos. Sin embargo, se sabe que los tejidos vegetales cultivados *in vitro* pierden total o parcialmente esta capacidad y se vuelven dependientes del suministro externo de algunos de estos nutrientes, sobre todo de algunas vitaminas. Esto puede estar relacionado con la baja capacidad fotosintética de estos tejidos. Casi todas las células o tejidos vegetales cultivados *in vitro* requieren tiamina, y en algunos casos, se ha observado que resulta benéfica la adición de piridoxina, ácido nicotínico, biotina, ácido fólico, ácido ascórbico, ácido pantoténico, riboflavina y ácido p-aminobenzoico. Otro elemento orgánico importante en los medios de cultivo es el mioinositol, cuya adición en concentraciones estimula el crecimiento de la mayoría de los tejidos. Por lo anterior, la mayoría de los medios de cultivo incorporan una mezcla de compuestos orgánicos como los antes mencionados, además de la fuente de carbono, a su formulación.

e) Otros:

Además de los ingredientes antes mencionados, que están presentes en prácticamente todos los medios de cultivo, hay algunos otros que pueden ser

incorporados al medio para incrementar la respuesta de los tejidos, o bien para cambiar algunas condiciones del propio medio. Algunos de éstos son:

- **Nitrógeno orgánico.** Además del nitrógeno inorgánico suministrado como nitrato o amonio, algunos medios de cultivo utilizan una fuente adicional de nitrógeno orgánico como complemento. Para esto se utilizan aminoácidos, ya sea en forma de mezclas complejas o como compuestos individuales. Las mezclas de aminoácidos más utilizadas son hidrolizados proteínicos, como el de caseína. Los aminoácidos individuales utilizados como fuente de nitrógeno orgánico son la glutamina, la asparagina y la glicina.
- **Complejos orgánicos.** En ocasiones se adicionan mezclas orgánicas complejas en los medios de cultivo, ya que en algunos casos estimulan el crecimiento de los tejidos o incluso son indispensables para obtener la respuesta deseada. El efecto de los complejos orgánicos se debe a la presencia en ellos de sustancias no identificadas, pero requeridas por las células. Estas pueden ser micronutrientes, compuestos orgánicos o incluso reguladores del crecimiento. Con este fin se utilizan el agua de coco, el extracto de levadura y de malta, el endospermo de maíz, el jugo de tomate, naranja o piña, y el extracto de plátano, entre otros. La utilización de este tipo de productos en el medio de cultivo debe tomarse como último recurso, dado el poco control que se tiene sobre los componentes de los mismos y la dificultad de obtener lotes homogéneos en cuanto a su composición de estos productos.
- **Gelificantes.** Cuando se trabaja con medio semisólido, debe utilizarse un gelificante para darle la consistencia adecuada. Este debe ser no reactivo y no digerible por el tejido vegetal. Los gelificantes más utilizados son el agar y el Phytigel o Gelrite (marcas comerciales). Dado que los gelificantes suelen ser uno de los ingredientes más costosos de los medios de cultivo, se han probado diversas opciones para dar soporte a los tejidos cultivados *in vitro* sin necesidad de incorporar un gelificante. Algunas opciones para esto son los soportes de poliuretano o de papel filtro.
- **Antioxidantes.** De manera natural, los tejidos vegetales heridos excretan compuestos fenólicos que al entrar en contacto con la atmósfera se oxidan obscureciendo al tejido. Este fenómeno se conoce como

oxidación y es una causa frecuente de necrosis en los tejidos recién inoculados en medios de cultivo *in vitro*. Hay especies de plantas, como las leñosas, que son especialmente proclives a oxidarse. Por este motivo es relativamente común incorporar antioxidantes con ácido cítrico y ácido ascórbico a los medios de cultivo. También se pueden incorporar resinas como la polivinilpirrolidona (PVP) y la polivinilpolipirrolidona (PVPP) que adsorben los compuestos fenólicos excretados impidiendo su oxidación sobre el tejido.

Otro factor para tomar en cuenta en el medio de cultivo es el pH, el cual generalmente se fija entre 5.5 y 5.8, ajustándolo una vez hecha la mezcla de los componentes. Cada uno de los medios de cultivo de uso común sugieren un valor de pH preciso dentro de este rango. El pH se ajusta con KOH, NaOH y HCl 0.1 N.

Finalmente, antes de su utilización, el medio deberá ser esterilizado, esto se realiza en autoclave a una temperatura de 121 °C y una presión de 1.05 kg/cm² (15 - 20 Psi). El tiempo de esterilización depende del volumen de medio colocado en cada recipiente, sin embargo, no es recomendable sobrepasar los 20 min ya que esto puede provocar la caramelización de la sacarosa contenida en el medio, cambiando las propiedades del mismo. Los componentes termolábiles, como lo son algunos compuestos orgánicos, deben ser esterilizados por filtración y añadidos al medio ya estéril. Para esto se emplean filtros de membrana de .22 a .45 µm de tamaño de poro.

Reguladores del crecimiento vegetal o fitohormonas

La adición de reguladores del crecimiento vegetal o fitohormonas es en la mayoría de las ocasiones fundamental para obtener la respuesta deseada de los tejidos vegetales cultivados *in vitro*. Los compuestos más utilizados son los pertenecientes a los grupos de las auxinas y de las citocininas, ya que son los que regulan en gran medida los procesos de crecimiento y desarrollo organizado en las plantas. En menor grado se utilizan algunos reguladores no pertenecientes a estos grupos como las giberelinas y el ácido abscísico. En cuanto a los dos primeros grupos mencionados, se utilizan tanto compuestos naturales, idénticos a los que se presentan en las plantas, como moléculas

sintéticas que por alguna similitud estructural con los reguladores naturales muestran una actividad similar a los mismos. Aunque la actividad de las auxinas y citocininas naturales es similar a la de sus equivalentes sintéticos, su comportamiento en los tejidos es diferente. Esto se debe a que las células vegetales poseen mecanismos para degradar o inactivar a los compuestos de origen natural, más no a los sintéticos. Debido a esto, la actividad de los compuestos naturales añadidos al medio de cultivo puede perderse o disminuirse con el paso del tiempo, mientras que los sintéticos tienen una permanencia mayor.

Las características más importantes de las auxinas y citocininas son:

- Auxinas. Son un grupo de compuestos derivados del triptófano, sintetizados por lo general en los ápices de las plantas, y que están implicados en varios eventos relacionados con el crecimiento y diferenciación celular. Se sabe que participan en la regulación de algunos procesos como el crecimiento celular, el inicio de la división celular, la formación de tejidos no diferenciados (tejido calloso), la diferenciación del tejido vascular y la formación de órganos (raíces). En las plantas completas las auxinas tienen que ver con la dominancia apical, afectan la senescencia y abscisión de las hojas y coordinan algunas respuestas trópicas. La auxina natural más común es el ácido indolacético (AIA), pero dependiendo de la especie, edad de la planta, estación del año y condiciones de crecimiento pueden aparecer otras auxinas naturales en los tejidos, como por ejemplo el ácido 4-cloroindol-3-acético, el ácido indol-3-acrílico o el ácido indolbutírico (AIB). El AIA y el AIB se utilizan frecuentemente en los medios de cultivo. Por ser compuestos que se encuentran naturalmente en la planta, tienden a ser metabolizados por los tejidos; además, éstos se desnaturalizan con relativa rapidez en el medio. Esto hace que la disponibilidad real de estas auxinas en el medio de cultivo disminuya paulatinamente, lo cual resulta útil en aquellos procesos que requieren altas concentraciones de auxinas sólo para la inducción inicial de los mismos (por ejemplo, el enraizamiento). Por otro lado, se conocen y utilizan varios compuestos sintéticos que tienen una fuerte actividad de auxinas, como los ácidos fenoxiacéticos, que son utilizados como herbicidas en altas concentraciones. Estos compuestos artificiales suelen ser más activos, ya que las células vegetales carecen en muchos casos de sistemas enzi-

máticos para degradarlos. Ejemplos de auxinas artificiales son el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), el ácido naftalenacético (ANA) y el ácido 4-amino-3,5,6-tricloropiridin-2-carboxílico (Picloram).

- Citocininas. Son derivados de la adenina y se sintetizan en tejidos jóvenes y raíces. Poseen dos propiedades que las hacen muy útiles para el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales; por un lado, estimulan la división celular y por otro rompen la latencia de las yemas axilares haciéndolas brotar. En las plantas completas, las citocininas promueven la brotación de yemas axilares, estimulan la expansión de las hojas y retardan la senescencia. Junto con las auxinas, las citocininas regulan la división celular. Debido a lo anterior, el balance entre auxinas y citocininas en un cultivo *in vitro* suele ser determinante para el patrón de desarrollo que siga el tejido. Las citocininas naturales más comunes son la zeatina, la isopentiladenina (2iP) y el ribósido de zeatina. Estas citocininas naturales se caracterizan por poseer un esqueleto de adenina con una cadena lateral isoprenoide. Las citocininas sintéticas benciladenina (BA) y cinetina son las más utilizadas en el cultivo de tejidos vegetales. Algunos herbicidas sintéticos como las fenilureas tienen actividad de citocinina en bajas concentraciones. Un ejemplo de esto último es el N-fenil-N'-1,2,3-tidiazolil-5-urea (Tidiazurón).
- Otros reguladores del crecimiento vegetal utilizados en cultivos *in vitro*. El ácido giberélico (GA₃) se utiliza para estimular el crecimiento (alargamiento) de los tallos. También puede ser útil para romper la dormancia estimulando así la germinación de algunas semillas y la brotación de yemas. El ácido abscísico se utiliza en la etapa de maduración de los embriones somáticos y en la inducción de la formación de microtubérculos en cultivos *in vitro* de papa.

En el cuadro siguiente se presentan algunas características de los reguladores del crecimiento vegetal más empleados en el cultivo *in vitro*.

Nombre	Abreviatura	PM	Concentración de trabajo (mg/L) ^a	Solvente ^b	Método de esterilización ^c	Usos más comunes
AUXINAS						
Ácido indolacético	AIA	175.2	0.01-3.0	NaOH 1N	Autoclave Filtración	Enraizamiento de brotes, organogénesis (combinado con una citocinina).
Ácido naftalenacético	ANA	186.2	0.1-10.0	NaOH 1N	Autoclave	Organogénesis (combinado con una citocinina).
Ácido indolbutírico	AIB	203.2	0.1-10.0	NaOH 1N	Autoclave Filtración	Enraizamiento.
Ácido 2,4-dicloro fenoxiacético	2,4-D	221.0	0.01-5.0	NaOH 1N Etanol	Autoclave	Generación de tejido calloso, embriogénesis somática.
Ácido aminotricloropicolínico	Picloram	241.5	0.1-10.0	DMSO	Autoclave	Generación de tejido calloso, embriogénesis somática.
CITOCININAS						
Benciladenina o 6-bencilamino-purina	BA	225.3	0.1-10.0	NaOH 1N	Autoclave Filtración	Brotación de yemas, organogénesis (combinada con una auxina)
Cinetina	Cin	215.2	0.1-10.0	NaOH 1N	Autoclave Filtración	Brotación de yemas, organogénesis (combinada con una auxina)
Isopentiladenina	2iP	203.2	1.0-30.0	NaOH 1N	Autoclave Filtración	Brotación de yemas, organogénesis (combinada con una auxina)
meta-Topolina	MT	241.5	0.01-5.0	NaOH 1N	Autoclave Filtración	Brotación de yemas, organogénesis (combinada con una auxina)
Feniltidiazol urea o tidiazurón	TDZ	220.2	0.001-0.1	DMSO	Autoclave Filtración	Brotación de yemas, organogénesis (combinada con una auxina)
Zeatina	Zea	219.2	0.01-5.0	NaOH 1N	Autoclave Filtración	Brotación de yemas, organogénesis (combinada con una auxina)
Ribósido de zeatina	---	351.4	0.01-5.0	NaOH 1N	Filtración	Brotación de yemas, organogénesis (combinada con una auxina)

Nombre	Abreviatura	PM	Concentración de trabajo (mg/L) ^a	Solvente ^b	Método de esterilización ^c	Usos más comunes
OTROS						
Ácido abscísico	ABA	264.3	0.1-10.0	NaOH 1N	Autoclave Filtración	Maduración de embriones somáticos, formación de microtubérculos.
Ácido giberélico	Ga ₃	346.4	0.01-5	Etanol	Autoclave Filtración	Crecimiento de tallos, rompimiento de la dormancia en semillas y yemas.

^a Se refiere al rango de concentraciones en que suele presentarse una respuesta en el tejido. Concentraciones menores al límite inferior no generan respuesta alguna, mientras que las mayores al límite superior pueden ser tóxicas para los tejidos.

^b El compuesto en polvo se disuelve en la mínima cantidad posible del solvente y luego el volumen debe completarse con agua destilada o desionizada. El NaOH puede substituirse por KOH.

^c Autoclave: Se agrega al resto de los componentes del medio y se esteriliza en autoclave. Filtración: Compuestos termolábiles que debes esterilizarse por filtración y agregar al medio después de su esterilización en autoclave. Cuando se mencionan las dos opciones significa que el compuesto soporta la esterilización por autoclave pero puede perder algo de actividad. Para experimentos que requieran concentraciones precisas se recomienda filtrar.

Tipos de cultivos *in vitro*

Los cultivos *in vitro* de vegetales pueden clasificarse con base en dos criterios. El primero de ellos se refiere al tejido o parte de la planta que se está cultivando, mientras que el segundo tiene que ver con la consistencia del medio de cultivo y el tipo de recipiente a utilizar. En cuanto al primer criterio, los tipos de cultivos *in vitro* son:

- A. *Cultivo de células*. Lo que se cultiva en este caso son células aisladas unas de otras, o bien formando pequeños acúmulos, pero nunca tejidos organizados. Esto se logra usando medios de cultivo líquidos en los que las células o acúmulos se encuentran suspendidos. Los medios se agitan permanentemente con el fin de oxigenarlos y de que las células se mantengan separadas unas de otras, sin formar tejidos, por lo que se les llama cultivos de células en suspensión (Fig. 1.1a). Este tipo de cultivos se emplea para estudios bioquímicos o fisiológicos, para la producción

de metabolitos secundarios o como etapa inicial en algunos protocolos de regeneración a través de la embriogénesis somática. Un derivado de este tipo es el cultivo de protoplastos, que son células a las que se le ha eliminado la pared celular por métodos enzimáticos.

- B. *Cultivo de tejidos*. Se trata del cultivo de masas de células unidas unas con otras formando un tejido. El más común es el tejido calloso o callo (Fig. 1.1b), el cual está formado por células poco diferenciadas que están continuamente dividiéndose, pero sin formar órganos funcionales (Fig. 1.1c). Este tejido se puede mantener y propagar por tiempo indefinido sólo fragmentándolo y resemebrándolo en medio de cultivo fresco. Se utiliza entre otras cosas para estudios bioquímicos o fisiológicos, como paso intermedio para la regeneración de plantas por organogénesis o embriogénesis somática indirectas o para el estudio y producción de metabolitos de interés. Al estar formado por células indiferenciadas en rápida división es frecuente que en el tejido calloso se presenten errores o alteraciones durante la mitosis. Estos errores se acumulan a lo largo del tiempo, por lo que en tejidos callosos mantenidos por tiempos prolongados es frecuente que se presenten cambios en el genotipo y en ocasiones en el fenotipo. A esto se le denomina variación somaclonal y se puede presentar también en otros sistemas de cultivo, aunque con una frecuencia menor a la del tejido calloso.
- C. *Cultivo de órganos o segmentos de plantas*. Se trata del cultivo de órganos diferenciados, constituidos éstos por varios tipos celulares. Es posible establecer cultivos *in vitro* usando como explantes segmentos de hojas y tallos. Sin embargo, estos órganos se diferencian rápidamente en otros tipos de tejidos y no es posible mantener cultivos de los mismos a largo plazo. En el caso de las raíces, si es posible mantener cultivos que conserven de manera indefinida sus características propias, por lo que el cultivo de raíces es el cultivo de órganos más utilizado. Las raíces que se cultivan pueden ser naturales o más comúnmente provenir de la transformación genética con *Agrobacterium rhizogenes* (Fig. 1.1d). En este caso se les llama raíces pilosas o transformadas. El uso más importante hoy en día de los cultivos de raíces es la producción en los mismos de metabolitos de alto valor.
- D. *Cultivo de plantas completas*. En este caso se mantienen plantas completas, parte aérea y raíz, en condiciones *in vitro*. En el caso de plantas

de talla pequeña (Fig.1. 1e), pueden mantenerse por largos períodos de tiempo, e incluso en algunos casos las plantas pueden completar su ciclo de vida en estas condiciones. En el caso de plantas de talla grande (Fig. 1.1f), sólo pueden mantenerse un tiempo corto en condiciones *in vitro* y luego deben ser transferidas a suelo. Normalmente, el cultivo de plantas completas es la última etapa del proceso de micropropagación, pero este sistema también puede emplearse para estudiar de una forma controlada las respuestas de la planta ante diversos fenómenos que pueden emularse bajo las condiciones *in vitro*.

- E. *Coocultivo*. Un requisito fundamental para que el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales tenga éxito es mantenerlo libre de microorganismos contaminantes. Sin embargo, en ocasiones es necesario incorporar de manera intencional un microorganismo específico como parte del proceso a realizar. Ejemplo de esto es la transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* o *A. rhizogenes*, o la inoculación de plántulas con hongos micorrícicos en la última etapa de la propagación *in vitro*. A esta etapa en la que se agrega un microorganismo al medio de cultivo se le llama coocultivo.

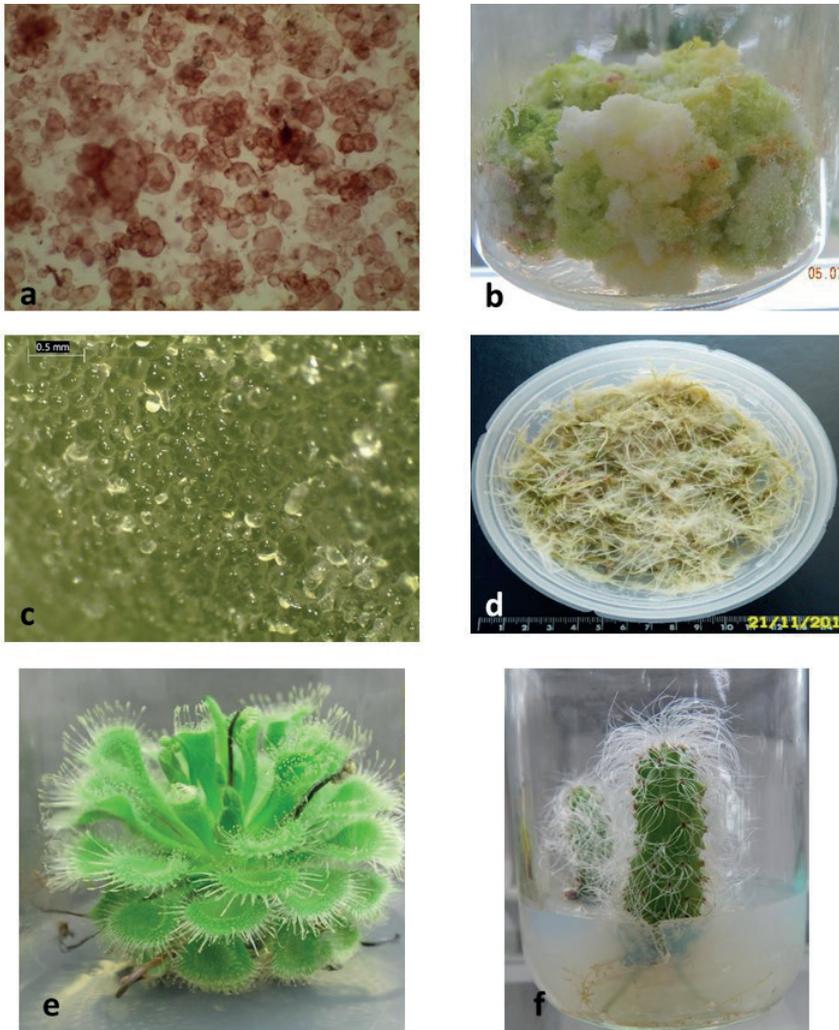


Figura 1.1. Tipos de cultivos *in vitro* de acuerdo con el tejido cultivado. a) Cultivo de células en suspensión de *Mammillaria*, la coloración rojiza se debe a la producción de pigmentos del grupo de las betalaínas; b) Cultivo de tejido calloso de *Mammillaria*; c) Vista ampliada del tejido calloso de *Mammillaria* en la que son visibles las células no diferenciadas y homogéneas que lo constituyen; d) Cultivo de raíces transformadas de *Turbinicarpus*; e) Cultivo de plantas completas de *Drosera burmanii*, y f) de *Cephalocereus senilis*.

Por lo que respecta al segundo criterio de clasificación, de acuerdo con el medio y recipiente de cultivo, los tipos de cultivo son:

- I. *Cultivo en medios semisólidos*. Consiste en el cultivo sobre medios gelificados que le den un soporte físico al explante (Fig. 1.2a). Es el tipo de cultivo más empleado hoy en día, ya que resulta fácil de realizar. Sin embargo, presenta algunos inconvenientes como el alto costo de los gelificantes, la poca disponibilidad de nutrientes para los segmentos del tejido que quedan alejados del medio de cultivo, y la dificultad para escalarlo, ya que la capacidad de los recipientes empleados es limitada.

- II. *Cultivo en medios líquidos*. El uso de medios de cultivo líquidos presenta ventajas como la mejor y más rápida distribución de los nutrientes hacia el tejido y el no requerir gelificantes. También es sencillo de escalar usando recipientes de mayores capacidades. Su desventaja principal radica en la dificultad para que el oxígeno se difunda dentro del medio y llegue a los tejidos. Esto se resuelve utilizando volúmenes muy pequeños de medio, o bien manteniendo los cultivos bajo agitación constante, lo que promueve la oxigenación. El uso de medios líquidos agitados es muy adecuado para procesos que requieren de una rápida producción de biomasa, como el cultivo de raíces (Fig. 1.2b) o de células en suspensión. Sin embargo, resulta poco adecuado para procesos en los que se requiere de desarrollo y diferenciación de los tejidos.

- III. *Cultivo en biorreactores*. Los biorreactores son recipientes de cultivo especializados que utilizan medio líquido, pero incorporan a su diseño sistemas que permiten la oxigenación de los tejidos y el control de algunos de los parámetros importantes para éxito del cultivo. Existe una gran cantidad de diseños de biorreactores que se han desarrollado con diferentes fines dentro de la tecnología del cultivo de tejidos vegetales. Sin embargo, el sistema más eficiente, y con un uso más extendido hoy en día, es el llamado biorreactor de inmersión temporal. Este dispositivo permite que los tejidos estén en contacto o dentro del medio líquido por cortos períodos de tiempo, mientras que el resto del tiempo permanece fuera del mismo. Esta inmersión frecuente permite la toma de nutrientes y reguladores del crecimiento, mientras que los períodos fuera del medio

facilitan la oxigenación. Los dos diseños de biorreactores de inmersión temporal más usados son el llamado RITA[®] (Fig. 1.2c), en el que el medio de cultivo y el tejido se encuentran en compartimentos diferentes de un solo recipiente, y el de tanques gemelos, en el que se usan recipientes separados para el medio y para el tejido (Fig. 1.2d).



Figura 1.2. Tipos de cultivos *in vitro* de acuerdo con el sistema utilizado. a) Brotes de *Yucca* cultivados sobre medios semisólidos; b) Cultivo de raíces transformadas de *Turbinicarpus* en medio líquido agitado; c) Micropropagación de piña en un biorreactor RITA[®], y; d) Micropropagación de agaves en sistemas de biorreactores de tanques gemelos.

Establecimiento de cultivos *in vitro*

En teoría, cualquier tejido vegetal que contenga células vivas puede emplearse para el establecimiento de un cultivo *in vitro*. Sin embargo, en la práctica es conveniente seleccionar tejidos jóvenes, ya que estos responderán y se adaptarán más fácilmente a las condiciones de cultivo en sistemas artificiales. Por otro lado, un paso indispensable en esta etapa es la desinfección superficial del tejido. Esto puede ser un proceso relativamente sencillo en estructuras como las semillas, o muy complejo en tejidos vegetativos tomados de condiciones de campo. La desinfección se logra lavando los tejidos varias veces con agua corriente y un jabón antiséptico. Posteriormente se tratan con agentes desinfectantes como alcoholes (etanol o isopropanol) y con desinfectantes a base de cloro (hipoclorito de calcio o de sodio). En este último caso pueden utilizarse blanqueadores comerciales ajustando la concentración de acuerdo con la cantidad de ingrediente activo en el producto. Una vez realizado el proceso de desinfección, se procede a la disección de los explantes en condiciones asépticas (campana de flujo laminar) y a su inoculación en el medio de cultivo apropiado.

Hay algunos tejidos que por su naturaleza son muy difíciles de desinfectar y los métodos convencionales como el antes descrito no resultan suficientes. En estos casos se recomienda:

- a) Extender el tiempo de los lavados previos e incorporar un fungicida comercial a la solución. Los tejidos pueden lavarse por varias horas o hasta toda la noche manteniéndolos en agitación suave.
- b) Incorporar al protocolo de desinfección otros agentes como cloruro de mercurio (con precaución por su alta toxicidad), compuestos a base de plata (nitrato de plata, plata coloidal o nanopartículas), peróxido de hidrógeno, tintura de yodo o cloruro de benzalconio. La aplicación de estos compuestos debe incorporarse como una etapa más en el protocolo de desinfección, no se recomienda mezclarlos con otros agentes.
- c) Ciertos tipos de tejidos son difíciles de desinfectar debido a su superficie irregular o porque están cubiertos de ceras, vellosidades o tricomas, lo que dificulta la penetración de los agentes desinfectantes a toda su superficie. En esta situación es recomendable realizar el proceso de desinfección en un matraz kitasato y aplicar algunos ciclos cortos de vacío (30 seg) durante los tratamientos. Con esto se elimina el aire atrapado en

las irregularidades del tejido permitiendo la penetración completa del desinfectante.

- d) Los explantes susceptibles a la contaminación deben inocularse con una densidad lo más baja posible, de preferencia uno solo por recipiente de cultivo. De esta manera el hecho de que un explante se contamine no repercutirá en la pérdida de otros. Bajo la misma lógica, entre más pequeño sea el explante, menos probable es que lleve contaminantes, por lo que se recomienda reducir su tamaño si el tejido es difícil de desinfectar.

Algunos tejidos contienen microorganismos endófitos (que habitan en el interior del tejido). Bajo esta situación la desinfección superficial antes mencionada no resulta eficiente. En este caso se pueden incorporar antibióticos o compuestos antifúngicos al medio de cultivo con el fin de inhibir el crecimiento de estos organismos. Sin embargo, esta solución no es del todo eficiente ya que es muy posible que los organismos se vuelvan a desarrollar en cuanto estos agentes sean retirados del medio. Por lo anterior, lo más recomendable en estos casos puede ser buscar una fuente alterna de tejidos que esté libre de estos organismos. Una forma relativamente sencilla para detectar la presencia de endófitos es inocular segmentos del tejido sospechoso en medios de cultivo ricos diseñados para microorganismos. En este caso el desarrollo del endófito será más rápido que en el medio de cultivo para vegetales y será fácilmente detectable.

Aplicaciones del cultivo de tejidos vegetales

En sus inicios, los cultivos *in vitro* de tejidos vegetales se emplearon como sistema para el estudio de fenómenos relacionados con la nutrición, fisiología y bioquímica de las plantas. Posteriormente surgieron aplicaciones prácticas de esta tecnología, destacando las que se ubican en las áreas de la propagación masiva *in vitro* o micropropagación, el mejoramiento de las plantas, la producción de metabolitos o moléculas de interés en cultivos *in vitro* y la conservación de germoplasma. Por su importancia, la micropropagación será descrita de forma más amplia en otra sección de este documento. En cuanto al resto de las áreas de aplicación, se puede mencionar lo siguiente:

- A. Mejoramiento de plantas a través del cultivo *in vitro*. Esto puede lograrse a través de:
- a. Selección *in vitro*. Para esto se someten tejidos o células a niveles crecientes de algún factor que genere estrés, ya sea biótico o abiótico. Esto inhibirá el desarrollo de las células sensibles, permitiendo seleccionar a las de mayor resistencia. Esto se puede hacer por varios ciclos incrementando la dosis del agente estresante y finalmente regenerando plantas completas a partir de los tejidos resistentes. Con esta estrategia ha sido posible regenerar plantas con una resistencia incrementada a la salinidad, a metales pesados y a diversos compuestos tóxicos.
 - b. Hibridación somática. Los protoplastos son células vegetales vivas a las que se les ha eliminado la pared celular por métodos enzimáticos. Al carecer de esta estructura son capaces de fusionarse unos con otros bajo ciertos estímulos. En algunas especies o combinaciones de especies es posible regenerar plantas completas a partir de las células híbridas producto de estas fusiones. A esto se le llama hibridación somática y es una forma de mezclar por una vía no sexual los genomas de dos individuos que pueden ser incluso de especies diferentes. Esta técnica ha tenido un éxito importante en el mejoramiento de varios grupos de plantas, entre ellos los cítricos.
 - c. Modificación del nivel de ploidía. Aun cuando hay varias excepciones, la mayoría de las plantas cultivadas son diploides. Las técnicas de cultivo y regeneración *in vitro* permiten generar plantas con niveles de ploidía diferentes a éste. Por ejemplo, a través de la regeneración de plantas partiendo de gametos masculinos o femeninos es posible generar plantas haploides. Por otro lado, regenerando plantas a partir de endospermo es posible obtener individuos triploides. Finalmente, la técnica de fusión de protoplastos permite duplicar en un solo evento el número de ploidía de una línea celular, y también hace posible obtener diferentes resultados finales al fusionar líneas celulares con niveles de ploidía diferentes. Algunas de las plantas que se pueden generar con niveles de ploidía alterados pueden tener un valor agronómico por sí mismas, mientras que otras, como las haploides, sólo son valiosas al integrarlas a otros esquemas de fitomejoramiento.

- d. Regeneración de plantas modificadas genéticamente. Las técnicas de transformación genética permiten la introducción de nueva información a las células vegetales, esto incluye la posibilidad no solo de incorporar nuevas características, sino de bloquear o incluso editar características existentes. Sin embargo, estos procesos normalmente se llevan a cabo sobre células, por lo que la regeneración de plantas completas que posean estas características modificadas requiere del proceso de regeneración *in vitro* mediante la organogénesis o embriogénesis somática. Estas vías permiten la obtención de plantas completas partiendo de células individuales, por lo que pueden convertir una sola célula modificada genéticamente en un individuo completo.
- B. Producción de metabolitos o compuestos de interés en cultivos *in vitro*. Algunos sistemas de cultivo de tejidos *in vitro* son capaces de generar biomasa a una tasa superior a la de las plantas creciendo en condiciones naturales. Estos sistemas pueden ser cultivos de células en suspensión, de tejido calloso o de raíces transformadas obtenidas mediante la inoculación con *Agrobacterium rhizogenes*. En algunos casos, estos tejidos conservan la capacidad biosintética de la planta completa, por lo que pueden ser usados como fuente de metabolitos de interés en lugar de la planta misma. Por lo anterior, el cultivo *in vitro* se ha convertido en una alternativa muy atractiva para la producción de metabolitos secundarios de alto valor sintetizados por las plantas, pero difíciles de obtener a partir de ejemplares completos. Esta dificultad puede deberse a la rareza o grado de amenaza de las especies, a su distribución natural limitada, o a su baja tasa de crecimiento, factores que dejan de ser limitantes cuando se cuenta con cultivos *in vitro*. Una segunda posibilidad que ofrecen los sistemas de cultivo *in vitro* es la de producir en estas moléculas de alto valor que no son propias de la especie cultivada. Esto se logra a través de la modificación genética de las células o tejidos cultivados, con el fin de que produzcan péptidos o proteínas propias de otro organismo.
- C. Conservación *in vitro* de germoplasma. La rápida pérdida de la biodiversidad vegetal es una de las mayores preocupaciones en la actualidad. El cultivo *in vitro* puede ofrecer herramientas que pueden disminuir el impacto de este problema, como por ejemplo, la creación de bancos de germoplasma *in vitro*. Éstos son colecciones de tejidos viables manteni-

dos en condiciones de cultivo *in vitro* por tiempo indefinido, y a partir de los cuales es posible regenerar y multiplicar plantas completas cuando esto es necesario. El principal obstáculo para mantener estas colecciones de tejidos viables es la necesidad de renovar periódicamente el medio de cultivo. Sin embargo, se han desarrollado ya técnicas de crecimiento retardado que permiten prolongar considerablemente el tiempo entre subcultivos, facilitando el mantenimiento de estos bancos. Este retardo en el crecimiento se puede lograr cultivando a bajas temperaturas, añadiendo agentes osmóticos que reduzcan la disponibilidad de agua en el medio, añadiendo inhibidores del crecimiento, o combinando las estrategias mencionadas. Una variante de esta tecnología es la criopreservación, que es el mantener células o tejidos congelados en Nitrógeno líquido. Esta opción sería más eficiente ya que el mantenimiento requerido es mínimo. Sin embargo, los procesos de congelación y descongelación en las células vegetales son especialmente complicados debido a la presencia de paredes celulares rígidas y vacuolas, por lo que esta tecnología sólo se ha desarrollado para un número limitado de especies.

Micropropagación

Una de las posibilidades más interesantes que brinda el cultivo de tejidos vegetales es la regeneración de plantas completas a partir de las células o tejidos cultivados *in vitro*. Esto permite generar grandes cantidades de propágulos en tiempos relativamente cortos. A esta técnica se le llama micropropagación, propagación *in vitro* o clonación *in vitro* de plantas.

La micropropagación es un proceso que consta de cinco etapas que se llevan a cabo de manera secuencial. Estas etapas son:

- A. Etapa 0. Selección y preparación de la planta madre. Se trata de una etapa previa al trabajo de laboratorio. En ésta se seleccionan las plantas madre de las que serán tomados los explantes para iniciar los cultivos *in vitro*. Esta etapa es fundamental para el éxito de la micropropagación, ya que ésta es un sistema de propagación clonal, por lo que todas las plantas generadas tendrán las características genotípicas de la planta madre. Si se parte de una planta elite con características deseables superiores

al promedio, las plantas generadas tendrán un alto valor. También debe buscarse que la planta madre se encuentre en excelentes condiciones fitosanitarias y que crezca en un ambiente limpio. Esto con la finalidad de facilitar la etapa de establecimiento de cultivos *in vitro*. Cuando esto es factible, es recomendable dar pretratamientos a la planta madre, como lavados y aplicación de fungicidas y/o bactericidas de forma periódica. Esto con el fin de que los tejidos lleven la menor cantidad posible de contaminantes potenciales al momento de hacer la desinfección superficial y establecer los cultivos *in vitro*.

- B. Etapa 1. Establecimiento de cultivos *in vitro*. Para esto es indispensable la desinfección de tejidos viables que luego son inoculados en los medios de cultivo artificiales. Este proceso se describió en un punto anterior. Para un programa de micropropagación, hay dos formas de obtener los cultivos iniciales.
 - a. Desinfectar semillas e inocularlas en medio de cultivo sin reguladores del crecimiento para que germinen. Las plántulas que así se obtienen (Fig. 1.4a) se usan como fuente de tejidos para iniciar la micropropagación, ya sin necesidad de desinfectar estos explantes ya que provienen de un cultivo axénico. Las ventajas de esta opción es la facilidad con la que se pueden desinfectar las semillas debido a que la testa protege a los tejidos susceptibles de los agentes desinfectantes, y la mayor diversidad genética que se obtiene en las plantas generadas cuando los cultivos iniciales proceden de semillas. En otro sentido, las desventajas de esta opción son la baja o nula disponibilidad de semillas en muchas especies vegetales, y el que esta técnica no es la adecuada cuando se desea conservar la totalidad de las características genéticas de un material especialmente valioso.
 - b. Colectar y desinfectar tejidos vegetativos de plantas creciendo en condiciones naturales, preferentemente brotes jóvenes. En este caso el proceso de desinfección suele ser mucho más complejo y menos eficiente que cuando se parte de semillas. Los tejidos vegetativos son mucho más sensibles que las semillas a los agentes y tratamientos desinfectantes, por lo que resulta difícil encontrar un protocolo que elimine los contaminantes de forma eficiente sin causar la necrosis del

tejido. A pesar de esto, esta es la única opción viable cuando no se dispone de semillas o cuando el objetivo es conservar las características de una variedad en particular.

C. Etapa 2. Multiplicación. La etapa anterior tiene como objetivo únicamente el disponer de algunos tejidos ya adaptados a las condiciones *in vitro* y creciendo libres de contaminantes. No es necesario contar con una gran cantidad de estos tejidos, ya que en esta etapa 2 es cuando se multiplicarán masivamente. Esta multiplicación se puede hacer por tres vías o caminos diferentes. Esto es algo que se debe tener claro al plantear un proyecto de micropropagación, ya que las características y estrategias para inducir cada una de estas vías es diferente. Estas vías de regeneración son:

- a. *A través de tejidos meristemáticos (yemas, ápices o segmentos nodales).* Los meristemas, contenidos en las yemas apicales y axilares, son los puntos de crecimiento naturales de las plantas y tienen la capacidad de formar nuevos brotes (parte aérea de la planta). Esta capacidad la mantienen cuando se establecen y cultivan *in vitro*, por lo que el cultivo de yemas apicales o axilares es una manera sencilla de obtener nuevos brotes, los cuales pueden enraizarse y producir así nuevas plantas completas. Muchas veces las yemas son capaces de brotar en un medio de cultivo basal, carente de reguladores del crecimiento. Sin embargo, la adición de citocininas al medio de cultivo romper la dormancia y estimula la división celular en el meristemo, por lo que su presencia acelera la brotación y puede provocar que se generen varios brotes en cada yema (brotación múltiple) (Fig. 1.3a, 1.4b y 1.4c).
- b. *Organogénesis.* Este término se refiere a la formación *de novo* de órganos en los explantes cultivados (organogénesis directa) (Fig. 1.3b) o en cultivos previamente establecidos de tejido calloso (organogénesis indirecta) (Fig. 1.3c). El fundamento de la organogénesis es la formación en el tejido de meristemas ectópicos a partir de los cuales se generan órganos. Los órganos que se pueden formar sobre el explante son raíces o brotes adventicios, pero sólo uno de ellos a la vez. Los brotes adventicios son estructuras muy similares a una yema que tienen la capacidad de originar toda la parte aérea de una nueva planta. Cuando estos brotes son separados del explante original y transferidos a un

medio apropiado crecen y forman raíces, convirtiéndose en un propágulo listo para ser adaptado y transferido a suelo. Entre los factores que contribuyen a la inducción de los brotes adventicios destacan los reguladores del crecimiento, en particular, las citocininas y las auxinas, que cuando se suministran combinadas en el medio de cultivo pueden desencadenar la organogénesis. Sin embargo, el tipo, cantidad y proporción de citocininas y auxinas depende de la especie y se deben determinar experimentalmente en caso de no encontrarse referencias en la literatura.

c. *Embriogénesis somática*. En esta vía, algunas de las células somáticas contenidas en el explante o en un cultivo de tejido calloso se convierten en células indiferenciadas similares a un cigoto y posteriormente inician una vía de división y diferenciación que las convierte en embriones, llamados somáticos por su origen diferente a la fecundación sexual (Fig. 1.3d). Los embriones somáticos tienen la capacidad de formar una nueva planta después de un proceso de germinación, con la diferencia de que la embriogénesis somática es un proceso asexual por lo que la nueva planta será exactamente igual a la donadora de la célula inicial. La embriogénesis somática no sucede únicamente en cultivos *in vitro*, es relativamente común en condiciones naturales en algunas familias de plantas y se conoce como apomixis. Si bien la embriogénesis somática *in vitro* puede ocurrir directamente en algunas células del explante (embriogénesis directa), lo más común es que este proceso se inicie en un cultivo de tejido calloso, o células en suspensión, previamente establecido (embriogénesis indirecta). Las etapas en las que ocurre la embriogénesis somática indirecta son:

- i. Inducción. En esta etapa la célula somática se convierte en una célula capaz de dar origen a un embrión (célula proembriónica). Los factores que más influyen en este paso son el genotipo, ya que no todas las células cultivadas *in vitro* tienen esta capacidad, así como la presencia de auxinas, sobre todo sintéticas, en el medio de cultivo.
- ii. Histodiferenciación o embriogénesis propiamente dicha. En esta etapa las células proembriónicas se multiplican y diferencian formando embriones somáticos. Para que estas células cesen su multiplicación y pasen a una fase de diferenciación normalmente

se requiere la eliminación o disminución de las auxinas exógenas. Uno de los fenómenos iniciales en esta etapa es el establecimiento de una polaridad en las masas de células proembriogénicas. Esta polaridad se mantendrá durante todo el desarrollo del embrión. Durante la etapa de histodiferenciación, los embriones somáticos pasan por una serie de estadios intermedios muy similares a los que ocurren en la embriogénesis cigótica. En las dicotiledoneas estos estadios son globular, de corazón y de torpedo, mientras que en las monocotiledoneas son globular, coleoptilar y escutelar.

- iii. Maduración. Los embriones recién formados, tanto por la vía somática como por la vía normal o cigótica, no tienen usualmente la capacidad de germinar. Para adquirirla requieren de un período de maduración, el cual en condiciones naturales ocurre al mismo tiempo que la desecación y en el que participa de manera importante el ácido abscísico (ABA). Por tanto, en la embriogénesis somática *in vitro* la maduración se puede lograr incluyendo ABA en el medio de cultivo y/o favoreciendo la desecación paulatina de los embriones.
- iv. Germinación o conversión. En esta etapa los embriones completamente formados y maduros se desarrollan convirtiéndose en plantas completas. Para que esto suceda se requieren estímulos como la luz, el ácido giberélico o citocininas. Los embriones somáticos carecen de tejidos de reserva por lo que su germinación solo ocurre *in vitro* en donde el medio de cultivo aporta los nutrientes necesarios para el proceso.

D. Etapa 3. Crecimiento y enraizamiento. Esta etapa permite que los brotes generados en la etapa anterior crezcan, adquieran vigor y formen un sistema radical que los hará capaces de sobrevivir a la última etapa del proceso, que es su adaptación y transferencia al medio externo (Fig. 1.4d). El enraizamiento sólo procede cuando la multiplicación se hace a través de meristemos o de organogénesis. Los embriones somáticos desde su origen cuentan con un polo radical por lo que el proceso por el que deben de pasar es diferente y se describe en la sección respectiva. El enraizamiento de los brotes puede lograrse en medios basales carentes de reguladores del crecimiento, ya sea a su concentración normal o diluidos

al 50-75%. La adición al medio de carbón activado o de auxinas como el ácido indolbutírico (AIB) estimulan el enraizamiento.

- E. Etapa 4. Adaptación y transferencia al medio externo. En esta etapa las plantas generadas *in vitro* son adaptadas primero, y luego transferidas, a condiciones naturales (Fig. 1.4e). Para esto se requiere de un proceso paulatino ya que las plantas generadas *in vitro* presentan varias características peculiares que dificultan su adaptación al medio externo una vez concluido el período de cultivo.

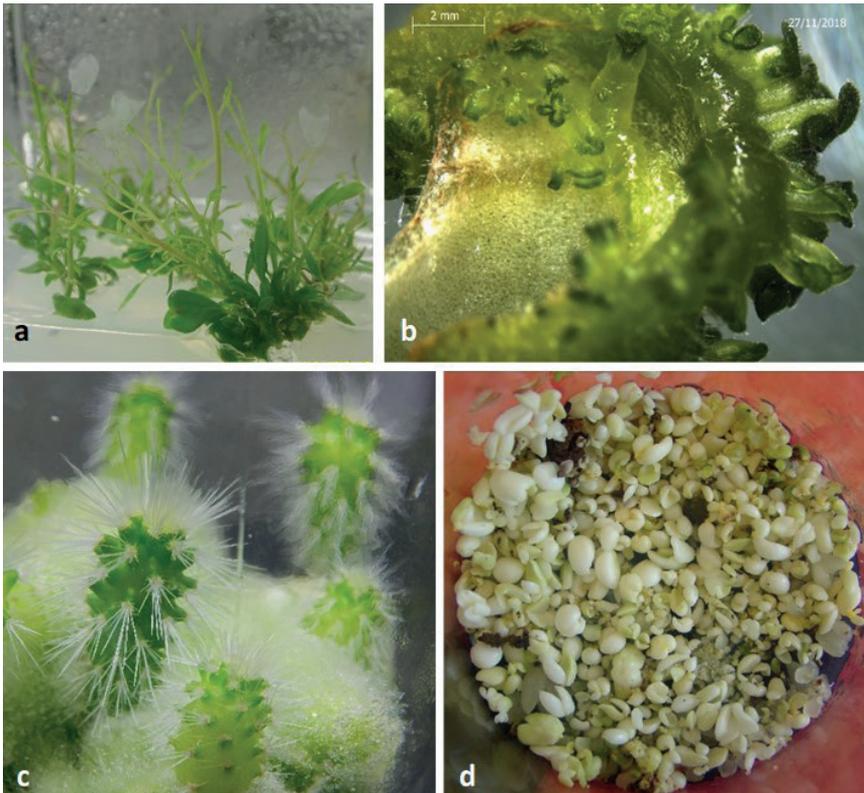


Figura 1.3. Vías para la regeneración *in vitro* de plantas. a) Propagación por yemas de alcaparro; b) Organogénesis directa sobre un segmento de hoja de violeta africana; c) Organogénesis indirecta sobre callo de *Echinocereus*, y; d) Embriogénesis somática en laurel mexicano (*Litsea*).

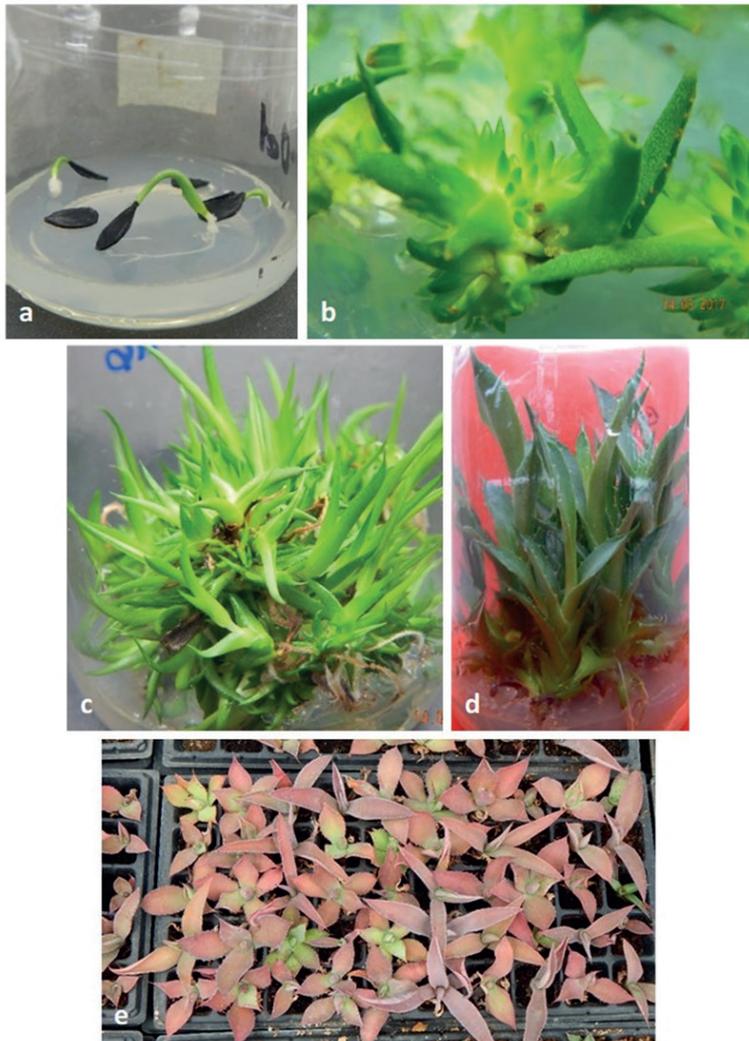


Figura 1.4. Micropropagación de Agaves. A) Establecimiento de cultivos *in vitro* de *Agave potatorum* a través de la germinación de semillas desinfectadas.; b) Multiplicación: Aspecto inicial de la generación de brotes en un meristemo basal de *A. kerchovei*; c) Aspecto avanzado de la generación de brotes en un meristemo basal de *A. peacocki*; d) Enraizamiento y crecimiento de brotes de *A. palmeri*; e) Plantas micropropagadas de *A. potatorum* desarrollándose ya en suelo.

A continuación, se detallan las más importantes:

- a. La humedad relativa dentro de los recipientes de cultivo es siempre alta, lo que provoca que las plantas carezcan de algunos de los sistemas normales para evitar la pérdida de agua. Su cutícula esta poco desarrollada y el mecanismo de cierre de los estomas está atrofiado. Por ello, el proceso de adaptación al ambiente externo de una planta generada *in vitro* debe ser lo más gradual posible. Se recomienda una reducción lenta de la humedad relativa, primero en el recipiente de cultivo y luego fuera de éste para permitir así el desarrollo paulatino de los sistemas de protección de la planta contra la desecación.
- b. Las plantas durante su cultivo *in vitro* no realizan una fotosíntesis normal, sus requerimientos de carbono son satisfechos por el medio de cultivo. El paso de estas plantas hacia la autotrofia debe ser gradual, exponiéndoseles a incrementos paulatinos en la intensidad luminosa. De cualquier forma, es de esperarse un balance negativo en la adquisición de carbono durante las primeras semanas a partir de que se eliminó el medio de cultivo, las plantas deberán ser lo suficientemente vigorosas para soportar esto.
- c. Por tratarse de sistemas de cultivo axénicos, las plantas no han generado resistencias naturales contra los microorganismos patógenos, por lo que es recomendable trabajar durante las primeras fases de la adaptación bajo las condiciones más higiénicas posibles. Asimismo, se recomienda eliminar cualquier remanente del medio de cultivo que pudiera quedar adherido a la planta, ya que este por su alto contenido de sacarosa podría favorecer el crecimiento de estos microorganismos. Darles a las plantas generadas *in vitro* un tratamiento con un enraizador comercial al momento de sembrarlas en suelo suele hacer más eficiente el proceso. Estos productos contienen como ingrediente activo auxinas que aceleran el desarrollo de las raíces ya en suelo, pero también contienen fungicidas, que evitan la penetración al tejido de hongos fitopatógenos en este momento crítico para la supervivencia de la planta.

Una evidencia para determinar el momento en que la adaptación puede considerarse exitosa es el reinicio del crecimiento después de la transferencia a las condiciones *ex vitro*. En este momento es cuando deberá reducirse la humedad e incrementarse la luz. La eficiencia de adaptación de las plantas

generadas *in vitro* a las condiciones externas es un factor determinante para la costeabilidad de un sistema de micropropagación.

- Finalmente, las ventajas de los sistemas de propagación *in vitro* con respecto a los convencionales son:
- Se trata de un sistema de propagación clonal, mantiene todas las características genotípicas del material inicial seleccionado. Debido a esto es un sistema ideal para la multiplicación masiva de plantas con características sobresalientes o para la conservación del acervo genético de las especies silvestres.
- Debido a que se realiza todo el proceso en un laboratorio bajo ambientes controlados, se trata de un sistema totalmente independiente de las condiciones externas. Por lo anterior no se ve afectado por las estaciones del año, sequías, heladas, altas temperaturas u otros factores ambientales.
- El número de plantas que se puede obtener mediante esta tecnología es prácticamente ilimitado. El único límite que se puede tener es la capacidad misma del laboratorio en que se realiza el proceso.
- El espacio que se requiere es mínimo y el tiempo en que puede realizarse el proceso es considerablemente más corto en comparación con los métodos convencionales de propagación.
- Las plantas que se obtienen están libres de bacterias, hongos y nemátodos fitopatógenos, y con técnicas más específicas se pueden liberar incluso de virus y viroides. Por este motivo, las plántulas producidas mediante sistemas de micropropagación presentan una mayor calidad si se les compara con las obtenidas por métodos tradicionales.

La micropropagación es susceptible de combinarse con otras tecnologías de vanguardia con el fin de generar sistemas productivos completos más eficientes. Ejemplo de esto son las combinaciones micropropagación-microinjerto, micropropagación-hidroponia y micropropagación-aeroponia.

Protocolos

Protocolo 1.1

Preparación de medio de Murashige y Skoog para el cultivo de tejidos vegetales.

La forma más sencilla de preparar el medio de cultivo es partir de una serie de soluciones concentradas que aportan uno o varios de los compuestos que lo integran. Estas soluciones se preparan con anticipación y se tienen disponibles en el laboratorio, almacenadas a 4-5 °C. Para preparar el medio, las soluciones se mezclan en agua destilada en la proporción que se indica más adelante. Posteriormente se añaden compuestos que van en concentraciones mayores, como los nitratos y la sacarosa. Después de esto se ajusta el pH y en caso de medios semisólidos se añade y funde el gelificante.

Soluciones concentradas para la preparación del medio MS

SOLUCION A.		
Concentración: 1 000 X. Volumen: 50 mL		
Cloruro de calcio	CaCl ₂ - 2 H ₂ O	22.000 g
SOLUCION B.		
Concentración: 1 000 X. Volumen: 50 mL		
Yoduro de potasio	KI	41.50 mg
Cloruro de cobalto	Co Cl ₂ - 6 H ₂ O	1.25 mg
SOLUCION C.		
Concentración: 400 X. Volumen: 50 mL		
Fosfato monobásico de K	KH ₂ PO ₄	3.400 g
Ac. bórico	H ₃ BO ₃	0.124 g
Molibdato de sodio	NaMoO ₄	0.005 g

SOLUCION D.

Concentración: 400 X. Volumen: 50 mL

Sulfato de magnesio	MgSO ₄ - 7 H ₂ O	7.400 g
Sulfato de manganeso	Mn SO ₄ - H ₂ O	0.340 g
Sulfato de zinc	Zn SO ₄ - 7 H ₂ O	0.172 g
Sulfato de cobre	Cu SO ₄ - 5 H ₂ O	0.50 mg

SOLUCION E.

Concentración: 200 X. Volumen: 100 mL

Sulfato ferroso	Fe SO ₄ - 7 H ₂ O	0.557 g
EDTA disódico	Na ₂ EDTA	0.745 g

Disolver ambos componentes por separado, para lo cual puede requerirse calentar. Agregar poco a poco la solución de Fe a la de EDTA y aforar. Debe quedar de color amarillo sin precipitados.

SOLUCION F.

Concentración 100 X. Volumen: 100 mL

Glicina	20.00 mg
Piridoxina HCl	5.00 mg
Ac. nicotínico	5.00 mg
Tiamina HCl	1.00 mg
Mio inositol	1.00 g

Procedimiento para preparar 1 L de medio MS*Material de laboratorio*

Vaso de precipitados de 1 L, pipetas, recipientes de cultivo y tapas.

Equipo de laboratorio

Agitador magnético y magneto, balanza analítica, potenciómetro, horno de microondas, autoclave.

Reactivos

Soluciones concentradas del medio MS, nitrato de potasio, nitrato de amonio, sacarosa, agar u otro gelificante, NaOH y HCl 0.1 N para ajustar pH.

Procedimiento

- Tomar un vaso de precipitados de 1 L con unos 850 mL de agua destilada y colocar bajo agitación suave. Agregar la cantidad indicada de las soluciones concentradas.

Solución	Volumen mL
A	1.0
B	1.0
C	2.5
D	2.5
E	5.0
F	10.0

- Pesar, añadir y agitar hasta disolver, los siguientes compuestos:

a	Sacarosa	30.00 g
b	Nitrato de potasio	1.90 g
c	Nitrato de amonio	1.65 g

- Ajustar el pH del medio a 5.7 con NaOH o HCl 0.1 N. Aforar a 1 L con agua destilada.
- Añadir 8 g L⁻¹ de Agar como gelificante¹ y agitar para suspender. En caso de que se requiera medio líquido omitir este paso.
- Disolver el gelificante calentando el medio en horno de microondas hasta el punto de ebullición y posteriormente agitando (debe hacerse en varios ciclos hasta que ya no sean visibles partículas suspendidas del gelificante).

¹ Se puede substituir por goma gellam (Phytigel, Gelrite o Gelzan, marcas comerciales) usando 2-3 g L⁻¹. Dependiendo de la especie a cultivar y la respuesta buscada un tipo de gelificante puede ser más eficiente que otro.

6. En caso de que el medio lleve reguladores del crecimiento, agregarlos en este momento².
7. Verificar el volumen del medio ya que pudo haber pérdida por evaporación. De ser así, aforar nuevamente a 1 L.
8. Distribuir el medio en los recipientes de cultivo, taparlos, marcarlos y esterilizar a 121 °C por 15-20 min³.
9. Sellar los recipientes con el medio estéril y almacenarlos hasta su uso. Si el medio no contiene reguladores del crecimiento se recomienda usarlo dentro de las siguientes 72 h, si los contiene no debe almacenarse más de 24 h.

Protocolo 1.2

Desinfección y germinación *in vitro* de semillas para el establecimiento de cultivos de tejidos vegetales

Material biológico

Semillas.

Material de laboratorio

Vaso de precipitados de 250 mL, probetas, papel aluminio, cribas metálicas y pinzas de disección.

Equipo de laboratorio

Agitador magnético y magneto, campana de flujo laminar.

Reactivos

Blanqueador comercial (Cloralex), etanol al 70%, jabón antiséptico líquido (Dermocleen), tween 20, agua destilada, agua destilada estéril.

2 En caso de reguladores termolábiles se esterilizan por filtración y se agregan al medio ya esterilizado y tibio.

3 Depende del volumen de medio en cada recipiente. Hasta 50 ml esterilizar 15 min, volúmenes mayores esterilizar 20 min.

Medio de cultivo

Medio de Murashige y Skoog (MS) pH 5.7 con 3 % de sacarosa y 0.8 % de agar como gelificante. Ver protocolo 1.1.

Procedimiento

1. Seleccionar semillas limpias y sin daño, colocarlas en un vaso de precipitados de 250 mL.
2. Dar 2 lavados de 5 min c/u con agua corriente con jabón líquido Dermoclean (10 mL L⁻¹). Los lavados se dan colocando el vaso de precipitados en el agitador magnético y agitando a velocidad media. Pasados los 5 min se elimina la solución de lavado⁴ y se substituye por solución nueva y se repite el proceso.
3. Lavar con etanol al 70% por 45 seg.
4. Enjuagar con agua corriente hasta eliminar todo el etanol.
5. Desinfectar con cloralex diluido al 15% adicionado con 5-10 gotas de tween 20 por 20 min. Tapar el vaso de precipitados con papel aluminio y no abrir hasta estar en la campana de flujo laminar.
6. Ya en la campana de flujo laminar, decantar la solución de cloralex y enjuagar las semillas 3 veces con agua destilada estéril.
7. Distribuir las semillas en los recipientes con medio MS. No colocar más de 10 semillas por recipiente de cultivo.
8. Sellar y marcar cada uno de los recipientes de cultivo anotando la fecha y nombre de la especie.
9. Llevar al cuarto de incubación. Colocar bajo fotoperíodo Luz 16:8 Oscuridad.
10. A los 5-7 días eliminar los frascos contaminados de cada tratamiento⁵.

4 En el caso de semillas pesadas al detener la agitación se acumularán en el fondo del vaso y las soluciones se eliminan por decantación. En semillas menos densas que flotan. Debe utilizarse una criba o coladera para eliminar las soluciones reteniendo a las semillas.

5 En caso de detectarse tasas de contaminación superiores al 20% de los recipientes en un lote de semillas, se recomienda usar un método de desinfección más severo en las siembras subsecuentes. Las opciones que se pueden probar son: a) Incrementar el número y/o tiempo de los lavados iniciales, puede incorporarse un fungicida y prolongar el tiempo del primer lavado hasta toda la noche; b) Incrementar el tiempo de exposición al desinfectante a base de cloro hasta 30 min, no se recomienda incrementar la concentración del desinfectante, y; c) Inocular a una densidad más baja para que una semilla contaminada no afecte a otras. Se pueden utilizar tubos de ensayo como recipientes de cultivo e inocular una sola semilla por tubo.

11. Dependiendo de la especie, la germinación puede ocurrir a las 2-8 semanas. Se debe permitir que las plántulas crezcan hasta alcanzar al menos 1 cm para utilizarlas como fuente de explantes para otros procedimientos.

Protocolo 1.3

Propagación *in vitro* de plantas ornamentales de la familia Gesneriaceae

En este protocolo se presenta el proceso completo de micropropagación de plantas de ornato de la familia Gesneriaceae, esto tomando como base las cinco etapas descritas en el texto.

A. Etapa 0. Selección de la planta madre

Este protocolo es eficiente para violeta africana (*Saintpaulia ionantha*) y gloxínea (*Sinningia speciosa*). Deben seleccionarse plantas con hojas sanas, sin manchas o heridas. Dado que el valor ornamental de estas especies radica en sus flores, es importante que se conozcan las características de las mismas en los ejemplares seleccionados. Dado que se llevará a cabo una propagación clonal, es importante partir de plantas elite de alto valor.

B. Etapa 1. Establecimiento de cultivos in vitro a partir de tejidos vegetativos

C. Etapa 2. Multiplicación (Organogénesis)

Material biológico

Plantas sanas de violeta africana o gloxínea

Material de laboratorio

Vaso de precipitados de 250 mL, probeta, papel aluminio, cajas Petri o placas de vidrio estériles y equipo de disección.

Equipo de laboratorio

Agitador magnético y magneto, campana de flujo laminar.

Reactivos

Blanqueador comercial (Cloralex), etanol al 70%, jabón antiséptico líquido (Dermocleen), tween 20, agua destilada, agua destilada estéril.

Medio de cultivo

Medio de cultivo MS con 3% de sacarosa, 2.5 g L⁻¹ de Phytigel o gelrite como gelificante y los siguientes reguladores del crecimiento: 2 mg L⁻¹ de AIA + 1 mg L⁻¹ de BA

Procedimiento

1. Seleccionar 5-7 hojas sanas (sin heridas ni decoloraciones) de violeta africana o 3-5 de gloxínea (con pecíolo). Lavar las hojas varias veces con agua corriente y jabón líquido antiséptico. El lavado se hace bajo la llave de agua, a mano y muy suavemente, sin ejercer presión sobre la hoja.
2. Colocar las hojas lavadas por 30 seg en etanol al 70 %. Verificar que queden cubiertas por completo y agitar manualmente de forma suave. Es muy importante no sobrepasar el tiempo recomendado.
3. Eliminar el etanol y enjuagar rápidamente con agua destilada estéril.
4. Colocar las hojas en una solución de blanqueador comercial a base de hipoclorito (Cloralex) al 10 % con 4-5 gotas de tween 20 por 20 min. Esto en un vaso de precipitados⁶ bien tapado con papel aluminio y bajo agitación suave con agitador magnético (cuidando que el magneto no dañe las hojas). Llevar a la campana de flujo laminar.
5. En la campana de flujo laminar, eliminar la solución desinfectante y enjuagar tres veces con agua destilada estéril. De aquí en adelante sólo se pueden tocar las hojas con equipo de disección estéril.

6 El vaso de precipitados debe ser de un tamaño suficiente para que las hojas se muevan libremente dentro del mismo sin ser golpeadas por el magneto.

6. Colocar la hoja desinfectada sobre una caja Petri o placa de vidrio estéril, con el envés hacia arriba. Con ayuda de pinzas y bistrurí estériles, cortar en el siguiente orden:
 - a. Apoyando la pinza en el peciolo, no en la lámina de la hoja, hacer una serie de cortes rectos para eliminar todo el borde de la hoja.
 - b. Hacer uno o más cortes rectos y perpendicular a la nervadura central en cada mitad de la hoja, dividiendo la lámina en dos o más partes (cada segmento de unos 20 mm de ancho, el número de segmentos dependerá del tamaño de la hoja).
 - c. Finalmente, cortar a lo largo de la vena central para liberar los segmentos de lámina foliar.
7. Los polígonos de hoja obtenidos son los explantes a inocular en el medio de cultivo. El número final de explantes a obtener por cada hoja dependerá de su tamaño. Si alguno de los explantes presenta zonas dañadas descartarlo.
8. Inocular los frascos de medio de cultivo con dos polígonos de hoja cada uno, colocarlos con el envés hacia arriba. Procurar no presionar demasiado con la pinza al tomarlos.
9. Marcar cada uno de los recipientes de cultivo y llevar al cuarto de incubación. Colocar bajo fotoperíodo Luz 16:8 Oscuridad.
10. Revisar a los cuatro días y eliminar los frascos contaminados.

El resultado esperado de este proceso es que ocurra la organogénesis en los segmentos de hoja, formándose un gran número de brotes adventicios. Normalmente la mayoría aparecen en los bordes cortados de las hojas (Figura 3b) y comienzan a ser visibles a las 2-3 semanas de incubación.

D. Etapa 3. Crecimiento y enraizamiento.

Para llevar a cabo esta etapa, los cultivos deben presentar brotes adventicios de al menos 15 mm de altura.

Material biológico

Explantes con brotes adventicios producto de la etapa anterior del protocolo.

Material de laboratorio

Cajas Petri o placas de vidrio estériles y equipo de disección.

Equipo de laboratorio

Campana de flujo laminar.

Medio de cultivo

Medio de cultivo MS con 3% de sacarosa y 2.5 g L⁻¹ de Phytigel o gelrite como gelificante.

Procedimiento

Todo el procedimiento se realiza en campana de flujo laminar con equipo de disección estéril.

1. Sacar los explantes con brotes y colocarlos sobre una caja de Petri o lámina de vidrio estéril.
2. Ubicar los brotes y separarlos del explante original cortándolos desde su base con el bisturí.
3. Inocular los brotes en posición vertical en el medio de cultivo. Introducir la base del brote al medio para que quede fijo en dicha posición. Colocar 4-6 brotes por recipiente de cultivo.
4. Marcar cada uno de los recipientes de cultivo y llevar al cuarto de incubación. Colocar bajo fotoperíodo Luz 16:8 Oscuridad.

El resultado esperado es la formación de raíces en la base de cada brote, mismas que penetrarán y crecerán hacia el medio de cultivo. Al mismo tiempo, la parte aérea de los brotes debe crecer. La aparición de raíces debe ser visible a partir de la segunda semana de incubación.

E. Etapa 4. Adaptación y transferencia al medio externo.

Material biológico

Cultivos con plántulas enraizadas generados en la etapa anterior.

Materiales

Charolas de plástico, cajas Petri, macetas, sustrato para siembra (mezcla preparada para macetas comercial), enraizador comercial (por ejemplo, Rai-zone®), bolsas de plástico.

Procedimiento

1. Llenar las macetas con el sustrato y humedecerlo.
2. Quitar el sello de los recipientes de cultivo. Quitar la tapa, pero inmediatamente volverla a colocar pero ya sólo superpuesta (sin apretar o enroscar). Dejar los frascos en estas condiciones por una o dos semanas semana. Esto con el fin de que el recipiente de cultivo pierda humedad paulatinamente y las plantas puedan adaptarse al ambiente externo. Es normal que después de varios días de haber destapado el recipiente aparezcan contaminantes como hongos. En caso de detectarse esto, proceder de inmediato con el paso 2.
3. Con ayuda de pinzas, sacar las plantas del recipiente de cultivo tomándolas desde su base y colocarlas en una charola de plástico. Hacer esto con cuidado de no dañar las raíces en el proceso. A partir de este momento las plantas deben manipularse directamente con las manos ya que las pinzas las dañan en los puntos en que se ejerce presión.
4. Lavar cuidadosamente la parte basal de las plantas bajo el chorro de agua corriente para eliminar todos los restos de medio de cultivo de las raíces⁷.
5. Pasar la parte basal/raíces de las plantas por una caja Petri con polvo enraizador de forma tal que se impregnen con el mismo y luego sacudir el exceso. Evitar que éste entre en contacto con la parte apical de la planta.

7 El medio de cultivo contiene sacarosa y otros nutrientes. Si las plantas se siembran con restos de medio esto ocasionará la proliferación de hongos en el sustrato, mismos que puede dañar y matar a la planta.

Este tratamiento acelera el establecimiento de la planta al promover el crecimiento de las raíces. Además, este producto contiene fungicidas que evitan que la planta sea infectada por hongos durante su establecimiento. Este producto es ligeramente tóxico, ver las instrucciones de manejo en el recipiente.

6. Introducir las raíces y la parte basal de las plantas en un orificio previamente hecho en el sustrato. Compactar el sustrato una vez colocada la planta.
7. Colocar las macetas dentro de bolsas de plástico y sellarlas para mantener la humedad. Llevar al invernadero o a un lugar bien iluminado pero sin sol directo.
8. Cada 3-4 días hacer algunos orificios en las bolsas plásticas para que se vaya equilibrando la humedad dentro y fuera de las mismas. Retirar por completo las bolsas a los 15 días.
9. A partir de este momento darles un manejo normal a las plantas, con riegos cada 72 h.

Abreviaturas

2,4-D: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

2iP: 2-isopentiladenina

AIA: Ácido indolacético

AIB: Ácido indolbutírico

ANA: Ácido naftalenacético

B5: Medio de cultivo de Gamborg

BA: Benciladenina

DKW: Medio de cultivo de Driver y Kuniyuki

GA3: Ácido giberélico

LS: Medio de cultivo de Linsmaier y Skoog

MS: Medio de cultivo de Murashige y Skoog

NN: Medio de cultivo de Nitsch y Nitsch

Picloram: Ácido 4-amino-3,5,6-tricloropiridin-2-carboxílico

Tidiazurón: N-fenil-N'-1,2,3-tidiazolil-5-urea

WPM: Medio de cultivo de Lloyd y McCown

Glosario

Axénico: Libre de cualquier microorganismo contaminante.

Explante: Segmento de tejido vegetal que se utiliza para iniciar un nuevo cultivo

Macronutrientes minerales: Son los iones que la planta toma del suelo y son requeridos en concentraciones de medias a altas.

Micronutrientes minerales: Son los iones que la planta toma del suelo y son requeridos en muy bajas concentraciones.

Bibliografía

Ashrafzadeh, S., Leung, D.M.W. (2015). In vitro breeding of heavy metal-resistant plants: A review. *Hortic. Environ. Biotechnol.* 56, 131-136.

Bhojwani, S.S., Dantu, P.K. (2013). *Plant Tissue Culture: An Introductory Text*. Springer, New Delhi, 309 pp.

Cardoso, J.C., Sheng-Gerald, L.T., Teixeira da Silva, J.A. (2018). Micropropagation in the Twenty-First Century. In: Víctor M. Loyola-Vargas and Neftalí Ochoa-Alejo (eds.), *Plant Cell Culture Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 1815*, Springer Science+Business Media, pp 17-46.

Cheng, Z.M., Korban, S.S. (2011). In vitro ploidy manipulation in the genomics era. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 104:281-282.

Chu, C.C., Wang, C.C., Sun, C.S., Hsu, C., Yin K.C., Chu, C.Y., Bi, F.Y. (1975) Establishment of an efficient medium for another culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci Sin* 18:659-668.

Driver, J.A., Kuniyuki, A.H. (1984). In vitro propagation of Paradox walnut rootstock. *HortSci* 19:507-509.

Elmaghrabi, A.M., Ochat, S., Rogers, H.J., Francis, D. (2013) Enhanced tolerance to salinity following cellular acclimation to increasing NaCl levels in *Medicago truncatula*. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 114:61-70.

Engelmann, F. (2011). Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. In *Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* 47:5-16.

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

- Gaspar, T., Kevers, C., Penel, C., Greppin, H., Reid, D.M., Thorpe, T.A. (1996). Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. In *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 32:272-28.
- Grosser, J.W., Ollitrault, P., Olivares-Fuster, O. (2000). Somatic hybridization in citrus: an effective tool to facilitate variety improvement. In *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* 36:434-449.
- Linsmaier, E.M. and Skoog, F. (1965). Organic Growth Factor Requirements of Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant*, 18: 100-127.
- Lloyd, G., McCown, B. (1981). Commercially feasible micropropagation of Mountain Laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *Comb Proc Int Plant Propagator Soc* 30:421-427.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497.
- Nitsch, J.P., Nitsch, C. (1969). Haploid plants from pollen grains. *Science* 163:85-87.
- Nuñez-Palenius, H.G., Cantliffe, D.J., Klee, H.H., Ochoa-Alejo, N., Ramírez-Malagón, R., Perez-Molphe-Balch, E. (2006) Methods in Plant Tissue Culture. In N.S. Pandian (Ed). *Food Biotechnology, 2nd Edition*. CRC Taylor & Francis, New York. pp. 553-601.
- Pérez-Molphe-Balch, E., Ramírez-Malagón, R., Nuñez-Palenius, H.G., Ochoa-Alejo, N. (1999). *Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales*. Universidad Autónoma de Aguascalientes. ISBN 968-6259-62-7.
- Perez-Molphe-Balch, E., Esparza-Araiza, M.J., Pérez-Reyes, M.E. (2012). Conservación *in vitro* de germoplasma de *Agave* spp. bajo condiciones de crecimiento retardado. *Revista Fitotecnia Mexicana* 35:279-287.
- Quambusch, M., Winkelmann, T. (2018). Bacterial Endophytes in Plant Tissue Culture: Mode of Action, Detection, and Control. In: Víctor M. Loyola-Vargas and Neftalí Ochoa-Alejo (eds.), *Plant Cell Culture Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 1815*, Springer Science+Business Media, pp 69-88.
- Rocha, D.I., Melo-Vieira, L., Koehler, A.D., Campos-Otoni, W. (2018). Cellular and Morpho-histological Foundations of *In Vitro* Plant Regeneration. In: Víctor M. Loyola-Vargas and Neftalí Ochoa-Alejo (eds.), *Plant Cell Culture Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 1815*, Springer Science+Business Media, pp 47-68.
- Widholm, J.M. (2017). The selection and uses of plant tissue cultures resistant to toxic compounds. In *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant*, 53:515-519.

