



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
Facultad de Ciencias Agrícolas
Especialidad en Floricultura

Propagación de Especies Ornamentales

Manual de Prácticas

Autor:
Dr. César Vences Contreras

2017

ÍNDICE DE CONTENIDOS

PRESENTACIÓN	3
REGLAMENTO DE USO DEL LABORATORIO	4
PRÁCTICA 1. Preparación de medio de cultivo	6
PRÁCTICA 2. Propagación de rosa (<i>Rosa</i> spp) por cultivo de yema axilar	13
PRÁCTICA 3. Propagación de clavel (<i>Dianthus cariofillus</i> L) por cultivo de meristemo apical	16
PRÁCTICA 4. Propagación de crisantemo (<i>Dendranthema grandiflora</i> Tzvelev) por cultivo de yema axilar	20
PRÁCTICA 5. Propagación de gerbera (<i>Gerbera jamesonii</i> Bolus) por cultivo de botón floral	24
PRÁCTICA 6. Propagación de anturio (<i>Anthurium andreanum</i> L) por cultivo de punta de brote	27
PRÁCTICA 7. Propagación de violeta africana (<i>Saintpaulia ionantha</i> W) por cultivo de sección de hoja	30
PRÁCTICA 8. Propagación de helechos (<i>Cyrtomium falcatum</i> L) por cultivo de esporas	34
PRÁCTICA 9. Propagación de orquídeas (<i>Stanhopea tigrina</i> B) por germinación de semilla	37
PRÁCTICA 10. Propagación de cactus (<i>Mammillaria</i> spp) por cultivo de semilla	40
PRÁCTICA 11. Multiplicación por segmentos nodales de clavel	43
PRÁCTICA 12. Adaptación <i>ex vitro</i> de plantas de clavel de clavel	47
BIBLIOGRAFÍA	51

PRESENTACIÓN

El primer objetivo de la asignatura es que los alumnos adquieran los conocimientos teórico prácticos relacionados con la producción de plantas ornamentales a gran escala mediante técnicas de cultivo *in vitro*. Para ello se abordarán aspectos relacionados con los fundamentos de las técnicas de micropropagación, las fases de un programa de propagación *in vitro*, las metodologías más utilizadas y los problemas más habituales en un laboratorio dedicado a la propagación de plantas mediante estas técnicas.

Se tratará como se multiplican las especies ornamentales más importantes mediante esta técnica, otras aplicaciones (saneamiento del material vegetal, conservación de germoplasma *in vitro*) y algunos aspectos económicos relacionados con las técnicas de propagación aquí planteadas.

Por otra parte, cabe destacar la importancia que en esta asignatura tienen las prácticas de laboratorio. En ellas se pretende que los alumnos relacionen estos conocimientos con las aplicaciones prácticas que ellos mismos realizarán en el laboratorio. Además, con el trabajo en laboratorio se busca, tanto la adquisición por parte de los alumnos de una serie de hábitos y habilidades necesarias, como el desarrollo de una visión crítica frente a un problema mediante el análisis de los resultados que se obtienen en las clases prácticas.

Por último, se intenta que el estudiante tenga una visión de la importancia de la propagación *in vitro* como actividad empresarial en el entorno socio-económico actual. Por citar un ejemplo, en la actualidad, el 74% de la producción de plantas ornamentales se obtienen mediante estas técnicas, lo que da una idea de la importancia de la técnica en el contexto de la producción vegetal.

REGLAMENTO DE USO DEL LABORATORIO

ANTES DE INICIAR SU PRÁCTICA:

- I. La asistencia a la práctica es obligatoria.
- II. La tolerancia para entrar al laboratorio será la que rige el reglamento escolar.
- III. Acatar las instrucciones indicadas en el Reglamento General de Laboratorios de la Facultad de Ciencias Agrícolas.
- IV. No dejar abrigos, carpetas u otros objetos sobre las mesas de trabajo, para un mejor desarrollo de la práctica y evitar riesgos.
- V. Es obligatorio llevar bata para evitar manchas y quemaduras. También es aconsejable traer un trapo de algodón para poder agarrar los recipientes calientes o limpiarlos y secarlos.
- VI. Se deben seguir en todo momento las indicaciones del profesor. No se comenzará a trabajar hasta haber recibido las instrucciones necesarias. Consultar las dudas y dificultades.
- VII. Es imprescindible leer por lo menos una vez la práctica antes de comenzar.
- VIII. Comprobar que esta todo el material necesario y en las condiciones adecuadas de conservación y limpieza. Comunicar cualquier anomalía al profesor. Cada grupo será responsable de material asignado.
- IX. Por seguridad está terminantemente prohibido fumar dentro del laboratorio, así como ingerir alimentos y bebidas.

DURANTE EL TRABAJO:

- I. No debe probarse ninguna sustancia y debe evitarse el contacto con la piel. En caso de que algún producto corrosivo caiga en la piel, se eliminará con abundante agua fría.
- II. Extremar los cuidados al trabajar con sustancias inflamables, tóxicas o corrosivas.
- III. Comunicar cualquier accidente, quemadura o corte, al responsable del laboratorio en ese momento.
- IV. La manipulación de productos sólidos se hará con ayuda de una espátula o cucharilla y para transvasar líquidos se utilizará una varilla de vidrio en los casos que sean necesarios.
- V. Nunca viertas el ácido sulfúrico concentrado al agua, debes hacerlo de manera inversa, pero con cuidado.
- VI. Tener cuidado al manejar ácidos y bases principalmente concentrados.
- VII. Para oler algún producto no debe acercarse la cara al recipiente, si no que se arrastrará el vaso hacia la nariz pasando la mano por encima de él.

- VIII. Con el fin de evitar contaminaciones, nunca se devolverá al frasco los restos de productos no utilizados.
- IX. El material de vidrio es muy frágil, por lo que se evitara los golpes y cambios bruscos de temperatura. Se deberá anotar en una hoja o cuaderno el material que se rompa y comunicarlo al responsable del laboratorio en ese momento.
- X. Cualquier experimento en el que se desprenda gas tóxico o inflamables utilizando reactivos potencialmente nocivos deberá llevarse a cabo en las campanas extractoras del laboratorio.
- XI. Los restos sólidos no metálicos deben tirarse en cestos de basura, nunca en las fregaderas. Los residuos metálicos se almacenarán en un recipiente especial. Los residuos acuosos se verterán en los fregaderos grandes, con abundante agua antes, durante y después del vertido. En cuanto a los líquidos y disolventes orgánicos, se echarán en un recipiente de plástico, para su posterior eliminación.

AL TERMINAR:

- I. El lugar y el material de trabajo debe quedar limpio y ordenado, también se deben apagar y desenchufar los aparatos.
- II. Lavarse las manos perfectamente para evitar intoxicaciones con algunos reactivos.
- III. Entregar para su revisión el reporte de la práctica elaborada.
- IV. Hasta que el profesor no de su autorización no se considerara finalizada la práctica y, por lo tanto, no podrás salir de laboratorio.

PRÁCTICA 1

PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO

INTRODUCCIÓN

El éxito que se obtenga en un cultivo de tejidos vegetales depende del uso del medio nutritivo adecuado, como también del empleo de tejidos viables, incubación, calidad de reactivos, etc. Usando las sustancias químicas necesarias y las combinaciones apropiadas de nutrimentos, así como su forma química adecuada, ha sido posible establecer cultivos para casi todas las partes de una planta en diversas especies vegetales.

Se han llevado a cabo muchas investigaciones con el fin de optimizar las necesidades de plantas específicas, lo cual ha traído como consecuencia la formulación de varias mezclas salinas. La fórmula de Murashige y Skoog (1962) se empleará como ejemplo para los propósitos de este procedimiento, pues se ha demostrado que es el medio adecuado para una gran variedad de especies, así como para diferentes partes de una planta.

OBJETIVOS

- Preparar adecuadamente medios de cultivo a partir de una especie vegetal y un objetivo o propósito de cultivo definidos.
- Conocer la función que desempeñan los distintos componentes del medio de cultivo en el desarrollo de los tejidos vegetales.

Lugar de Realización: Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales.

Tiempo de Duración: Una sesión de tres horas continuas.

Investigación Requerida: Función individual de los componentes macro-nutrientes, micro-nutrientes, vitaminas y aminoácidos en el desarrollo vegetal.

MATERIALES

Equipos:

- 1 balanza analítica
- 1 placa de agitación con calentamiento

Material de laboratorio:

- 1 matraz Erlenmyer de 2 000 ml
- 8 matraces Erlenmeyer de 250 ml
- 10 ampollitas de plástico de 250 ml
- 2 espátulas

- Charolas de pesado

Reactivos:

- Reactivos para medio de cultivo MS (1962)
- 1 000 ml de agua destilada

METODOLOGÍA

I. Preparación de Sales Minerales.

Para la preparación de las soluciones concentradas se deberán disolver las sales indicadas en las proporciones marcadas.

1. Solución **A NITRATOS**. (Concentración 10 X). Volumen/100 ml.

Nutriente	Fórmula	gL⁻¹
Nitrato de amonio	NH ₄ NO ₃	16.5
Nitrato de potasio	KNO ₃	19.0

- En un matraz Erlenmeyer de 250 ml, adicione 50 ml de agua destilada y colóquelo en una placa de agitación provista de un agitador magnético.
- Pese y adicione cada una de las sales en el orden indicado y espere a que se disuelva completamente antes de agregar la siguiente.
- Una vez concluido el proceso, afore a 100 ml y coloque la solución en un recipiente plástico y manténgalo en refrigeración hasta que se requiera.

2. Solución **B SULFATOS**. (Concentración 10 X). Volumen/100 ml.

Nutriente	Fórmula	gL⁻¹
Sulfato de magnesio	MgSO ₄ .7H ₂ O	3.7
Sulfato manganoso	MnSO ₄ .H ₂ O	0.169
Sulfato de zinc	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.086
Sulfato cúprico	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.00025

- En un matraz Erlenmeyer de 250 ml, adicione 50 ml de agua destilada y colóquelo en una placa de agitación provista de un agitador magnético.
- Pese y adicione cada una de las sales en el orden indicado y espere a que se disuelva completamente antes de agregar la siguiente.
- Una vez concluido el proceso, afore a 100 ml y coloque la solución en un recipiente plástico y manténgalo en refrigeración hasta que se requiera.

3. Solución **C HALÓGENOS**. (Concentración 10 X). Volumen/100 ml.

Nutriente	Fórmula	gL ⁻¹
Cloruro de calcio	CaCl ₂ .2H ₂ O	4.4
Yoduro de potasio	KI	0.0083
Cloruro de cobalto	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.00025

- En un matraz Erlenmeyer de 250 ml, adicione 50 ml de agua destilada y colóquelo en una placa de agitación provista de un agitador magnético.
- Pese y adicione cada una de las sales en el orden indicado y espere a que se disuelva completamente antes de agregar la siguiente.
- Una vez concluido el proceso, afore a 100 ml y coloque la solución en un recipiente plástico y manténgalo en refrigeración hasta que se requiera.

4. Solución **D PO₄: BO₃: MoO₄**. (Concentración 10 X). Volumen/100 ml.

Nutriente	Fórmula	gL ⁻¹
Fosfato de potasio	KH ₂ PO ₄	1.7
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	0.062
Molibdato de sodio	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.0025

- En un matraz Erlenmeyer de 250 ml, adicione 50 ml de agua destilada y colóquelo en una placa de agitación provista de un agitador magnético.
- Pese y adicione cada una de las sales en el orden indicado y espere a que se disuelva completamente antes de agregar la siguiente.
- Una vez concluido el proceso, afore a 100 ml y coloque la solución en un recipiente plástico y manténgalo en refrigeración hasta que se requiera.

5. Solución **E QUELATOS**. (Concentración 10 X). Volumen/100 ml.

Nutriente	Fórmula	gL ⁻¹
Etilendinitrilotetracetato	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	0.4123
Sulfato ferroso	FeSO ₄ .7H ₂ O	0.278
OBSERVACIONES: * Agregar primero para que no exista precipitación en la reacción ** Agregar después del Na ₂ EDTA Usar agua tridestilada		
Sustituciones: Na ₂ EDTA		0.373

- En un matraz Erlenmeyer de 250 ml, adicione 50 ml de agua destilada y colóquelo en una placa de agitación provista de un agitador magnético.
- Pese y adicione cada una de las sales en el orden indicado y espere a que se disuelva completamente antes de agregar la siguiente.
- Una vez concluido el proceso, afore a 100 ml y coloque la solución en un recipiente plástico y manténgalo en refrigeración hasta que se requiera.

II. Preparación de Vitaminas. (Concentración 100 X). Volumen/100 ml.

Para la preparación de las vitaminas se deberán disolver las mismas en las proporciones indicadas.

Vitaminas	gL⁻¹
Ácido nicotínico	0.05
Tiamina HCL	0.01
Piridoxina HCL	0.05
Glicina	0.2
Mio-inositol	10

- a. En un matraz Erlenmeyer de 250 ml, adicione 50 ml de agua destilada y colóquelo en una placa de agitación provista de un agitador magnético.
- b. Pese y adicione cada una de las vitaminas en el orden indicado y espere a que se disuelva completamente antes de agregar la siguiente.
- c. Una vez concluido el proceso, afore a 100 ml y coloque la solución en un recipiente plástico y manténgalo en refrigeración hasta que se requiera.

III. Preparación de Hormonas.

ÁCIDO INDOLBUTÍRICO (AIB). Concentración 10 mg/100 ml.

(C₁₂H₁₃NO₂) P.M. 203.24

En un vaso de precipitado se colocan 10 mg de AIB y se le adiciona de 2 a 3 ml de alcohol al 96% y se agita hasta disolver, después se le agrega agua tridestilada (inclinando el vaso), cuando tenga tres veces el volumen del alcohol inicial se puede vaciar agua un poco más rápido, se pasa al matraz de aforo de 100 ml y se termina de aforar con agua tridestilada. Se debe evitar que la hormona quede en las paredes, ya que si no se disuelve totalmente se precipita.

ÁCIDO 2, 4-DICLOROFENOXIACÉTICO (2,4-D). Concentración 10 mg/100 ml.

(C₆H₄Cl₂O₂) P.M. 186.59

En un vaso de precipitado se colocan 10 mg de 2, 4-D y se le adiciona de 2 a 3 ml de alcohol al 96% y se agita hasta disolver, después se le agrega agua tridestilada (inclinando el vaso), cuando tenga tres veces el volumen del alcohol inicial se puede vaciar agua un poco más rápido, se pasa al matraz de aforo de 100 ml y se termina de aforar con agua tridestilada. Se debe evitar que la hormona quede en las paredes, ya que si no se disuelve totalmente se precipita.

ÁCIDO NAFTALENACÉTICO (ANA). Concentración 10 mg/100 ml.

(C₁₂H₁₀O₂) P.M. 186.2

Se colocan 10 mg de ANA en un vaso de precipitado de 500 ml y se adicionan 3 ml de NaOH 1N ó 0.1N, esperar unos segundos a que se disuelva, posteriormente adicionar agua tridestilada lentamente tres veces el volumen del NaOH, se pasa la solución al matraz de aforo de 100 ml y se termina de aforar con agua tridestilada.

ÁCIDO INDOLACÉTICO (AIA). Conc. 10 mg / 100 ml.

(C₁₀H₉NO₂) P.M. 175.2

Colocar 10 mg de AIA en un vaso de precipitado de 50 ml y adicionar la misma cantidad de agua tridestilada, calentar sin hervir, posteriormente pasar la solución al matraz de aforo de 100 ml y agregar el restante de agua tridestilada. Prepárese un día antes que el medio de cultivo, manteniéndola en la oscuridad y en refrigeración.

BENCILAMINOPURINA O BENCILADENINA (BA). Concentración 10 mg/100 ml.

(C₁₂H₁₁N₅) P.M. 225.26

Colocar 10 mg de BA en un vaso de precipitado y adicionar HCl 1N ó 0.1N, si se agregan 3 ml y no se disuelve se adiciona agua tridestilada (20 ml) y se calienta sin hervir con agitación, ya disuelta se pasa al matraz de aforo y se adiciona el agua tridestilada restante para los 100 ml.

KINETINA O 6-FURFURILAMINOPURINA (KIN). Concentración 10 mg/100 ml.

(C₁₀H₉N₅O) P.M. 215.2

Se colocan 10 mg de K en un vaso de precipitado y se adicionan 3 ml de HCl 1N ó 0.1N con el propósito de disolver, una vez que se tiene la solución se pasa al matraz de aforo de 100 ml y se adiciona el resto de agua tridestilada.

IV. Preparación del medio de cultivo para siembra de hoja de violeta africana.

- a. Colocar 500 ml de agua destilada en un matraz Erlenmeyer de 2000 ml.
- b. Pesar y añadir la sacarosa o el equivalente (30 g).
- c. Añadir el volumen correcto de cada una de las soluciones de los macro y microelementos (10 ml c/u).
- d. Añadir inositol (100 mg).
- e. Incorporar al medio las hormonas y complejos naturales que sean parte de la técnica (0.1 mgL⁻¹ de AIA; 10 mgL⁻¹ de K; 80 mgL⁻¹ de Sulfato de Adenina).
- f. Disolver y aforar a 1000 ml.
- g. Ajustar el pH = 5.6 +/- 0.1
- h. Para un medio sólido agregar agar (6.5 g).
- i. Disolver a fuego.
- j. Incorporar carbón activado si la técnica lo requiere.
- k. Vaciar el medio a los frascos de cultivo (20 ml/frasco) y tapar.
- l. Esterilizar los recipientes con medio en un autoclave a 1.5 atm de presión (120°C) durante 20 minutos.
- m. Una vez fríos colocar los recipientes de cultivo en refrigeración hasta su empleo en la siembra.

RESULTADOS

1. Haga un diagrama sobre la secuencia seguida en la preparación de medios de cultivo

ACTIVIDADES DE INTEGRACIÓN

1. Realice una reseña histórica de los medios de cultivo empleados en trabajos de investigación
2. Fundamente ¿por qué el medio de cultivo de Murashige y Skoog es uno de los más empleados en la actualidad pese a haber sido desarrollado en 1962?

EVALUACIÓN

La evaluación se realizará con base a la obtención de resultados correctos (preparación de medios de cultivos asépticos solidificados) y reporte de prácticas.

BIBLIOGRAFÍA

- Barba AA; Luna RB; Romero AJ. 2001. Micropropagación de plantas. México, Ed. Trillas. 107 p.
- Edwin BH. 2008. Media and Techniques for Growth, Regeneration and Storage 2005-2008. Volume 12 of Recent Advances in Plant Tissue Culture.
- George EF; Hall MA; De Klerk G. 2008. Plant Propagation by Tissue Culture" 3rd Edition, Volume 1, Springer Verlag.
- Hurtado MD; Merino ME. 2014. Cultivo de Tejidos Vegetales. México, Ed. Trillas. 232 p.
- Mujib A; Cho M; Predieri S; Banerjee S. 2004. *In vitro* application in crop improvement. Science Publishers.

PRÁCTICA 2

PROPAGACIÓN DE ROSA (*Rosa spp*)

POR CULTIVO DE YEMA AXILAR

INTRODUCCIÓN

Las rosas (*Rosa sp*) constituyen plantas muy apreciadas en todo el mundo, tanto en la jardinería como en el sector de las flores de corte. Entre las técnicas más utilizadas para la propagación *in vitro* de distintas especies y variedades de rosas se encuentran el cultivo de yemas y brotes, callos y nudos. Otros métodos, como el cultivo de embriones y protoplastos, presentan una mayor especificidad y complejidad, por lo que son menos utilizados con este fin. De manera general, los rosales modernos son los más propagados, con excepción de las rosas en miniatura, que aún representan un amplio campo a investigar.

Lugar de Realización: Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales.

Tiempo de Duración: Una sesión de tres horas continuas.

Investigación Requerida: Técnicas de propagación de rosa.

OBJETIVOS

- Conocer la morfología de la yema axilar de la rosa.
- Observar el desarrollo de la yema axilar y su diferenciación en una planta completa.
- Valorar el potencial regenerativo que tiene este tipo de explante en la micropropagación de plantas.

MATERIALES

Biológicos:

- 1 tallo de rosa

Equipos:

- Campana de flujo laminar

Material de laboratorio:

- 2 cajas de Petri
- 1 bola de algodón
- 2 bisturí
- 2 pinzas de disección
- Bata

- Cubrebocas

Reactivos:

- 250 ml de agua jabonosa
- 250 ml de etanol (70%)
- 250 ml de solución de solución de clorox 40 % (v/v)
- 250 ml de agua destilada estéril
- 5 frascos con medio de cultivo MS (1962) específico para la especie y explante a utilizar.
- 2 gotas de tween 20.

METODOLOGÍA

Utilizar secciones de tallo con yema, de 3 – 4 cm de longitud, que no estén dañados.

- a) Lavar las secciones de tallo con agua jabonosa.
- b) Sumergirlos en etanol al 70% durante 10 – 20 segundos.
- c) Inmersión en la solución de clorox (40 %) con 2 gotas de tween 20, por 20 minutos. A partir de este momento trabajar en la cámara de flujo laminar.
- d) Enjuagar el material vegetal tres veces con agua destilada esterilizada.
- e) Cortar los extremos del tallo dejando una sección de 1 cm de longitud con la yema al centro y sembrar un explante por frasco de cultivo.
- f) Colocar los frascos de cultivo en el cuarto de incubación, con fotoperiodo de 16 horas luz, por 8 horas de oscuridad, a temperatura de 24°C.
- g) Observar cada tercer día el desarrollo de sus cultivos. Anotar los cambios en la apariencia de los explantes. Separar los frascos con explantes necrosados y contaminados y registrar si se trata de contaminación bacteriana o fúngica.

OBSERVACIONES

Emplear en los frascos de cultivo sales del medio MS (1962), suplementado con 0.003 mgL⁻¹ de ANA, 3.0 mgL⁻¹ de BA, 30 g de sacarosa, 6.5 g de agar y un pH= 5.7^{+/-}0.1. Transferir cada 4 semanas en el mismo medio. Mantener el cultivo a una temperatura de 5°C durante una semana para incrementar el porcentaje de enraizamiento y longitud de raíz.

ACTIVIDADES DE INTEGRACIÓN

Incluir en el informe escrito los siguientes puntos:

1. Incluir al menos un artículo científico reciente sobre el tema de la práctica.
2. El informe de la práctica debe contener los resultados, discusión y conclusiones sobre el trabajo realizado, de una manera bien estructurada y sustentado en la literatura consultada.

EVALUACIÓN

La evaluación se realizará con base a la obtención de resultados correctos (cultivos asépticos) y reporte de prácticas.

BIBLIOGRAFÍA

- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Ibrahim R., Debergh P.C. 2001. Factors controlling high efficiency of adventitious bud formation and plant regeneration from *in vitro* leaf explants of roses (*Rosa hybrida*). *Scientia Horticulturae* 88: 41-57.
- Kumar A., Sood A., Plani U.T., Gupta A.K., Plani L.M.S. 2001. Micropropagation of *Rosa damascene* Mill. from mature bushes using thidiazuron. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 76: 30-34.
- Kim S.W., Oh S.C., In D.S., Liu J.R. 2003. Plant regeneration of rose (*Rosa hybrida*) from embryogenic cell-derived protoplasts. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 73: 15-19.
- Hameed N., Shabbir A., Ali A., Bajwa, R. 2006. *In vitro* micropropagation of disease free rose (*Rosa indica* L.). *Mycopath* 4: 35-38.
- Rout G.R., Mohapatra A., Mohan J.S. 2006. Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospect. *Biotechnology Advances* 24: 531-560.
- Vu N.H., Anh P.H., Nhut D.T. 2006. The role of sucrose and different cytokinins in the *in vitro* floral morphogenesis of rose (hybrid tea) cv. 'First Prize'. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 87: 315-320.
- Drefahl A., Quoirin M.G., Cuquel F.L. 2007. Micropropagation of *Rosa x hybrida* cv. Vegas via axillary buds. *Acta Horticulturae* 751: 407-411
- Khosh K.M., Jabbarzadeh Z. 2007. Effects of several variables on *in vitro* culture of Damask Rose (*Rosa damascena* Mill.) *Acta Horticulturae* 751: 389-393.
- Previati A., Benelli C., Da R.F., Ozudogru A., Lambradi M. 2008. Micropropagation and *in vitro* conservation of virus-free rose germplasm. *Propagation of Ornamental Plants* 8: 93-98.
- Naphaporn N.U., Kantamaht K., Kamnoon K. 2009. Micropropagation from cultured nodal of rose (*Rosa hybrida* L. cv. "Perfume Delight"). *Songklanakarini J. Sci. Technol.* 31: 583-586.

PRÁCTICA 3

PROPAGACIÓN DE CLAVEL (*Dianthus cariofillus* L)

POR CULTIVO DE MERISTEMO APICAL

INTRODUCCIÓN

Al grupo de células que retienen su actividad embrionaria durante toda la vida de la planta se denominan meristemos. El meristemo apical de tallo da lugar a diversos tipos de células, tejidos y órganos, es decir, esta región indiferenciada da origen al crecimiento de la planta.

Hoy en día el cultivo de meristemos representa una valiosa herramienta para la propagación masiva de plantas sanas (libres de virus), debido a que en esta región meristemática prácticamente no existe la presencia de agentes patógenos, dado que es una zona en constante división celular que impide la multiplicación de cualquier partícula vírica.

Por otro lado, el clavel es una especie vegetal representativa para la obtención relativamente fácil de meristemos, además de ser considerada como un cultivo básico para quienes se dedican a la producción de flores.

Lugar de Realización: Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales.

Tiempo de Duración: Una sesión de dos horas continuas.

Investigación Requerida: Aplicaciones del cultivo in vitro de meristemo apical.

OBJETIVOS

- Conocer la morfología del meristemo apical del clavel.
- Observar el desarrollo del meristemo y su diferenciación en una planta completa.
- Valorar el potencial regenerativo que tiene este tipo de explante en la micropropagación de plantas.

MATERIALES

Biológicos:

- 10 esquejes jóvenes de clavel

Equipos:

- Campana de flujo laminar

Material de laboratorio:

- 2 cajas de Petri
- 1 bola de algodón
- 2 bisturí
- 2 pinzas de disección
- Bata
- Cubrebocas

Reactivos:

- 250 ml de agua jabonosa (1%)
- 250 ml de etanol (70%)
- 250 ml de solución de hipoclorito de sodio (4.0 %)
- 250 ml de solución de hipoclorito de calcio (0.5%)
- 250 ml de agua destilada estéril
- 5 frascos con medio de cultivo MS (1962) específico para la especie y explante a utilizar.

METODOLOGÍA

Utilizar esquejes jóvenes de clavel (10-15 cm) y eliminar las hojas superiores y parte del tallo para obtener ápices de aproximadamente 5 cm de longitud.

- a) Lavar los esquejes en la solución jabonosa al 1.0% durante tres minutos.
- b) Enjuagar con agua de la llave eliminando los residuos de jabón.
- c) Sumergir las puntas (dentro de una gasa) en alcohol etílico al 70% durante 30 segundos.
- d) Inmersión en la solución de hipoclorito de calcio al 4% durante 15 minutos.
- e) Sumergir en la solución de hipoclorito de sodio al 0.5% durante 15 minutos. A partir de este momento trabajar en la cámara de flujo laminar.
- f) Enjuagar el material vegetal cuatro veces con agua destilada estéril, tratando de eliminar los residuos del hipoclorito.
- g) Separar la gasa con pinzas de disección.
- h) Extraer los meristemas (con 1-2 primordios de hoja) con ayuda del microscopio estereoscópico y sembrar en los frascos de cultivo, como se muestra en la Figura 2.
- i) Colocar los frascos con los explantes en el cuarto de incubación, con fotoperiodo de 16 horas luz, por 8 horas de oscuridad, a temperatura de 24°C.
- j) Observar cada tercer día el desarrollo de sus cultivos. Anotar los cambios en la apariencia de los explantes. Separar los frascos con explantes necrosados y contaminados y registrar si se trata de contaminación bacteriana o fúngica.

OBSERVACIONES

Emplear en los frascos de cultivo sales del medio MS (1962) suplementado con 0.3 mgL^{-1} de AIA, 10 mgL^{-1} de K, 30 g de sacarosa, 6.5 g de agar y un $\text{pH} = 5.7^{+/-0.1}$. Transferir cada 4 semanas en el mismo medio.

ESQUEMA DE TRABAJO

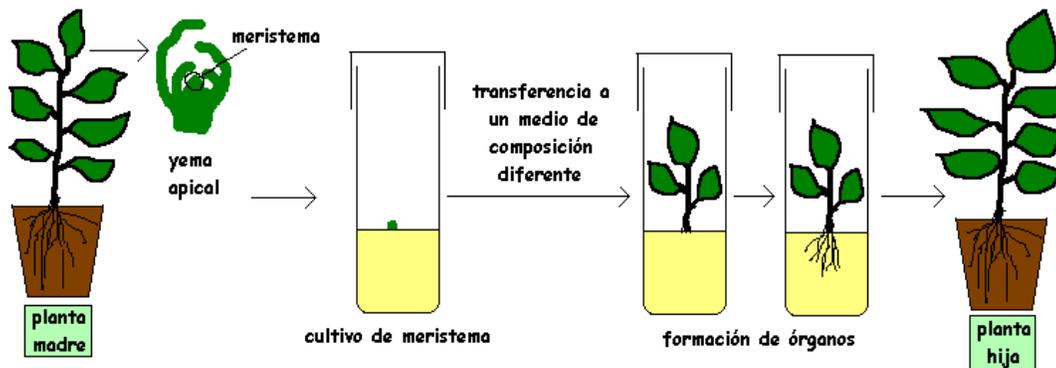


Figura 2. Extracción y siembra del meristemo apical de clavel.

ACTIVIDADES DE INTEGRACIÓN

Incluir en el informe escrito los siguientes puntos:

1. Cuál es el significado de meristemo apical.
2. Discutir la diferencia entre plantas libres de virus y plantas resistentes a virus.
3. Relacionar la técnica con la obtención de plantas libre de virus.
4. Incluir al menos un artículo científico reciente sobre el tema de la práctica.
5. El informe de la práctica debe contener los resultados, discusión y conclusiones sobre el trabajo realizado, de una manera bien estructurada y sustentado en la literatura consultada.

EVALUACIÓN

La evaluación se realizará con base a la obtención de resultados correctos (cultivos asépticos) y reporte de prácticas.

BIBLIOGRAFÍA

- Azcon B. J, Talon M. 2001. Fundamentos de fisiología vegetal. Mc Graw Hill Interamericana. España. 522 p.

- Benson E. E. 2000. Special symposium: *in vitro* plant recalcitrance. In vitro Cell. & Dev. Biol. Plant 36:141-148.
- Fal M.A, Sánchez T.R. 2002. Physical environment in non-ventiled culture vessels affects *in vitro* growth and morphogenesis of several cultivars of *Dianthus caryophyllus* L. In Vitro Cell. & Dev. Biol. Plant. 38:589-594.
- Hayashi T.K., Moreira A.F., Amaral C., Melo M. 2002. Tratamiento de metrizes de cravo (*Dianthus caryophyllus* L.) com nitrogenio e calogenese *in vitro*. Scientia Agricola 59: 47-52.
- Helliat, B., Panis B., Michel C., Swennen R., Lepoivre P. 2001. Development of *in vitro* techniques for elimination of virus diseases from Musa. Acta Horticulturae. 560: 535-538.
- Kevers C., Frank T., Strasser R.J., Dommès J., Gaspar T. 2004. Hiperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress – induced change of physiological state. Plant Cell, Tissue and organ Culture. 77: 181-191.
- Majada J.P., Fal M.A., Tadeo F., Sánchez T.R. 2002 Effects of natural ventilation on leaf ultrastructure of *Dianthus caryophyllus* L. Cultured *in vitro*. In Vitro Cell. & Dev. Biol. 38: 272-278.
- Yadav M.K., Gaur A.K., Garg G.K. 2003. Development of suitable protocol to overcome hyperhydricity in Carnation during micropropagation. Plant Cell. Tissue and Organ Culture. 72: 153-156.
- Rodríguez N.C., Pretel S.O., Sánchez W.R., Mercado P.D. 2010. Efecto de 6-bencilaminopurina y ácido indolacético en la micropropagación *in vitro* de yemas de *Dianthus caryophyllus* L. Rev. Med. Vallejana. 4: 132-138.

PRÁCTICA 4

PROPAGACIÓN DE CRISANTEMO

(*Dendranthema grandiflora* Tzvelev)

POR CULTIVO DE YEMA AXILAR

INTRODUCCIÓN

El crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) es una de las flores cultivadas más antiguas para maceta y flor cortada con alta demanda en el mercado, la variación del color de la flor es su máxima atracción. Su producción para flor de corte, requiere de la provisión continua, en tiempo y forma, de material inicial, de excelente calidad fisiológica y sanitaria.

La regeneración e crisantemo por cultivo de tejidos se ha logrado al utilizar medios basales, diferentes reguladores del crecimiento y concentraciones, aditivos como antioxidantes y otros. La organogénesis se desarrolla a partir de una gran variedad de explantes como tallos (nodal e internodal), yemas axilares, hojas, ápices o meristemos apicales, protoplastos, raíces, pedicelos y floretes; todos con la finalidad de generar material vegetativo de calidad y en gran cantidad para el abastecimiento de la demanda por los cultivadores.

Lugar de Realización: Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales.

Tiempo de Duración: Una sesión de tres horas continuas.

Investigación Requerida: Aplicaciones del cultivo *in vitro* de yemas axilares.

OBJETIVOS

- Observar el desarrollo de yemas axilares de crisantemo y su diferenciación en una planta completa.
- Valorar el potencial regenerativo que tiene este tipo de explante en la micropropagación de plantas.

MATERIALES

Biológicos:

- 10 plantas jóvenes de crisantemo generadas por cultivo de meristemos apicales.

Equipos:

- Campana de flujo laminar

Material de laboratorio:

- 2 cajas de Petri
- 1 bola de algodón
- 2 bisturí
- 2 pinzas de disección
- Bata
- Cubrebocas

Reactivos:

- 20 frascos con medio de cultivo MS (1962) específico para la especie y explante a utilizar.

METODOLOGÍA

Utilizar plántulas jóvenes de crisantemo propagadas a partir del cultivo *in vitro* de meristemo apical.

- k) Tomar una plántula del frasco de cultivo, de treinta días de edad, y colocarla en la caja de Petri.
- l) Utilizar pinzas y bisturíes estériles para seccionar la planta cortando a la mitad de cada entrenudo y así obtener secciones de entrenudo con yema axilar.
- m) Una vez realizados los cortes, colocar las secciones en frascos de medios de cultivo fresco. Sellar y etiquetar el frasco de cultivo.
- n) Colocar los frascos con los explantes en el cuarto de incubación, con fotoperiodo de 16 horas luz, por 8 horas de oscuridad, a temperatura de 24°C.
- o) Observar cada semana el desarrollo de sus cultivos. Anotar los cambios en la apariencia de los explantes. Separar los frascos con explantes necrosados y contaminados y registrar si se trata de contaminación bacteriana o fúngica.

OBSERVACIONES

Emplear en los frascos de cultivo sales del medio MS (1962) suplementado con 0.1 mgL⁻¹ de ANA, 1.0 mgL⁻¹ de K, 30 g de sacarosa, 6.5 g de agar y un pH= 5.7^{+/-}0.1. Transferir cada 4 semanas en el mismo medio.

ESQUEMA DE TRABAJO

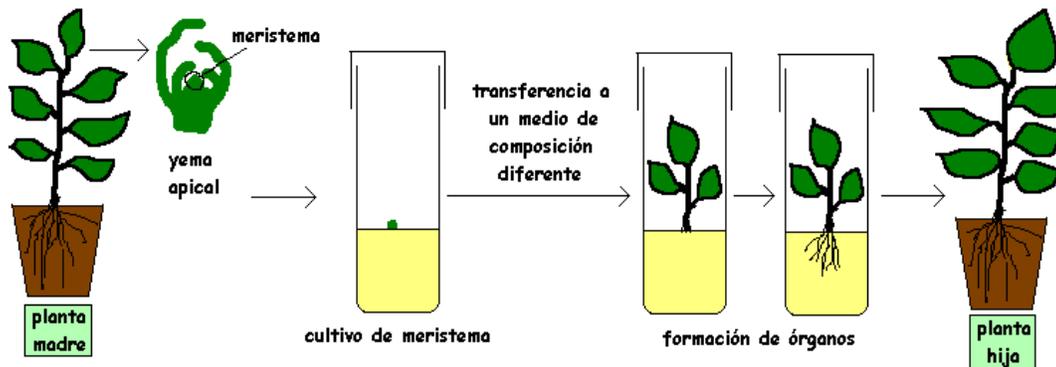


Figura 2. Extracción y siembra del meristemo apical de clavel.

ACTIVIDADES DE INTEGRACIÓN

Incluir en el informe escrito los siguientes puntos:

6. Cuál es el significado de meristemo apical.
7. Discutir la diferencia entre plantas libres de virus y plantas resistentes a virus.
8. Relacionar la técnica con la obtención de plantas libre de virus.
9. Incluir al menos un artículo científico reciente sobre el tema de la práctica.
10. El informe de la práctica debe contener los resultados, discusión y conclusiones sobre el trabajo realizado, de una manera bien estructurada y sustentado en la literatura consultada.

EVALUACIÓN

La evaluación se realizará con base a la obtención de resultados correctos (cultivos asépticos) y reporte de prácticas.

BIBLIOGRAFÍA

- Azcon B. J, Talon M. 2001. Fundamentos de fisiología vegetal. Mc Graw Hill Interamericana. España. 522 p.
- Benson E. E. 2000. Special symposium: *in vitro* plant recalcitrance. *In vitro Cell. & Dev. Biol. Plant* 36:141-148.
- Fal M.A, Sánchez T.R. 2002. Physical environment in non-ventiled culture vessels affects *in vitro* growth and morphogenesis of several cultivars of *Dianthus caryophyllus* L. *In Vitro Cell. & Dev. Biol. Plant.* 38:589-594.
- Hayashi T.K., Moreira A.F., Amaral C., Melo M. 2002. Tratamiento de metrizes de cravo (*Dianthus caryophyllus* L.) com nitrogenio e calogenese *in vitro*. *Scientia Agricola* 59: 47-52.

- Helliart, B., Panis B., Michel C., Swennen R., Lepoivre P. 2001. Development of *in vitro* techniques for elimination of virus diseases from Musa. Acta Horticulturae. 560: 535-538.
- Kevers C., Frank T., Strasser R.J., Dommès J., Gaspar T. 2004. Hiperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress – induced change of physiological state. Plant Cell, Tissue and organ Culture. 77: 181-191.
- Majada J.P., Fal M.A., Tadeo F., Sánchez T.R. 2002 Effects of natural ventilation on leaf ultrastructure of *Dianthus caryophyllus* L. Cultured in vitro. In Vitro Cell. & Dev. Biol. 38: 272-278.
- Yadav M.K., Gaur A.K., Garg G.K. 2003. Development of suitable protocol to overcome hyperhydricity in Carnation during micropropagation. Plant Cell. Tissue and Organ Culture. 72: 153-156.
- Rodríguez N.C., Pretel S.O., Sánchez W.R., Marcado P.D. 2010. Efecto de 6-bencilaminopurina y ácido indolacético en la micropropagación *in vitro* de yemas de *Dianthus caryophyllus* L. Rev. Med. Vallejana. 4: 132-138.

PRÁCTICA 5

PROPAGACIÓN DE GERBERA (*Gerbera jamesonii* Bolus)

POR CULTIVO DE BOTÓN FLORAL

INTRODUCCIÓN

La gerbera se puede propagar por medio de semilla, división de planta, esqueje o mediante técnicas *in vitro*. La selección del método de propagación depende del material disponible así como de la demanda de plantas.

La propagación *in vitro* permite obtener plantas homogéneas, en mayor cantidad y libres de patógenos.

Lugar de Realización: Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales.

Tiempo de Duración: Una sesión de tres horas continuas.

Investigación Requerida: Variación somaclonal.

OBJETIVOS

- Observar los diferentes estados de desarrollo y la formación de órganos, tales como brotes y raíces, en respuesta al desarrollo del capítulo floral de gerbera.
- Demostrar el potencial morfogénico del tejido de capítulo floral en esta especie vegetal.

MATERIALES

Biológicos:

- 5 capítulos florales de gerbera

Equipos:

- Campana de flujo laminar

Material de laboratorio:

- 2 cajas de Petri
- 1 bola de algodón
- 2 bisturí
- 2 pinzas de disección
- Bata
- Cubrebocas

Reactivos:

- 250 ml de agua jabonosa
- 250 ml de etanol (70%)
- 250 ml de solución de hipoclorito de sodio (1.5 %)
- 250 ml de agua destilada estéril
- 5 frascos con medio de cultivo MS (1962) específico para la especie y explante a utilizar.

METODOLOGÍA

Utilizar capítulos florales completamente cerrados (0.5 – 0.7 cm de diámetro aproximadamente), que no estén dañados.

- a) Lavar los capítulos florales con agua jabonosa.
- b) Sumergirlos en etanol al 70% durante 2 minutos.
- c) Inmersión en hipoclorito de sodio al 1.5% durante 90 minutos. A partir de este momento trabajar en la cámara de flujo laminar.
- d) Enjuagar el material vegetal tres veces con agua destilada esterilizada durante 45 minutos.
- e) Eliminar las brácteas que cubren el capítulo floral y seccionarlo en 20 – 25 partes.
- f) Colocar los frascos con los explantes en el cuarto de incubación, con fotoperiodo de 16 horas luz, por 8 horas de oscuridad, a temperatura de 24°C.
- g) Observar cada tercer día el desarrollo de sus cultivos. Anotar los cambios en la apariencia de los explantes. Separar los frascos con explantes necrosados y contaminados y registrar si se trata de contaminación bacteriana o fúngica.

OBSERVACIONES

Emplear en los frascos de cultivo sales del medio MS (1962) al 50%, suplementado con 0.1 mgL⁻¹ de AIA, 1.0 mgL⁻¹ de BA, 80 mgL⁻¹ de Sulfato de Adenina, 30 g de sacarosa, 6.0 g de agar y un pH= 5.7^{+/-}0.1. Transferir cada 5 semanas en el mismo medio

ACTIVIDADES DE INTEGRACIÓN

Incluir en el informe escrito los siguientes puntos:

1. Cuál es el significado de organogénesis.
2. Incluir al menos un artículo científico reciente sobre el tema de la práctica.
3. El informe de la práctica debe contener los resultados, discusión y conclusiones sobre el trabajo realizado, de una manera bien estructurada y sustentado en la literatura consultada.

EVALUACIÓN

La evaluación se realizará con base a la obtención de resultados correctos (cultivos asépticos) y reporte de prácticas.

BIBLIOGRAFÍA

- Aswath C., Choudary M.L. 2002. Rapid plant regeneration from *Gerbera jamesonii* Bolus callus cultures. *Acta Botanica Croatica* 61: 125–134.
- Aswath C., Deepa S.M., Choudhary M.L. 2003. Commercial multiplication of gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus) through *in vitro* shoot tip culture. *Journal of Ornamental Horticulture* 6: 303–309.
- Aswath C., Deepa S.M., Noorjahan J.A. 2002. Morphogenetic response of *in vitro* gerbera shoots to IAA and BAP. *Floriculture trends in India*. In: Proceedings of National Symposium on Indian Floriculture in the Millennium, Lal Bagh, Bangalore 310–312.
- Aswath C., Wazneen S. 2004. An improved method for *in vitro* propagation of gerbera. *Journal of Ornamental Horticulture* 7: 141–146.
- Aswayh C., Choudhary M.L. 2002. Mass propagation of gerbera (*Gerbera jamesonii*) through shoot culture. *Indian Journal of Horticulture* 59: 95–99.
- Chen X.J., Li M.T., Lin X. 2006. *In vitro* propagation of *Gerbera jamesonii*. *Journal of Fujian Agricultural and Forestry University of Natural Sciences* 35: 169–172.
- Kanwar J.K., Kumar S. 2008. *In vitro* propagation of gerbera. *Hort. Sci.* 35: 35-44
- Kuan H.C., Yueh C.S., Tsay J.S., Lee T.C. 2002. Effects of carbon source and concentration on growth of *Gerbera jamesonii in vitro*. *Journal of Chinese Society for Horticultural Sciences* 48: 133–142.
- Kumar S., Kanwar J.K. 2005. Plant regeneration from callus and cell suspension cultures of *Gerbera jamesonii* Diablo. *European Journal of Horticultural Science* 70: 265–270.
- Kumar S., Kanwar J.K. 2006. Regeneration ability of petiole, leaf and petal explants in gerbera cut flower cultures *in vitro*. *Folia Horticulturae* 18: 57–64.
- Kumar S., Kanwar J.K., Sharma D.R. 2004. *In vitro* regeneration of *Gerbera jamesonii* from leaf and petiole explants. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 13: 73–75.
- Mandal A.K., Datta S.K., 2002. Introduction of gerbera cultivation in Lucknow agro-climate through tissue culture of young flower buds. *Indian Journal of Biotechnology* 1: 212–214.
- Pedraza S.M., Jaen C.D., Gutiérrez E.A., Colinas L.T., López P.C. 2001. Crecimiento y nutrición de microplantas de gerbera inoculadas con hongos micorrízicos arbusculares. *Agrociancia* 35: 149-158.

PRÁCTICA 6

PROPAGACIÓN DE ANTURIO (*Anthurium andreanum* L.)

POR CULTIVO DE PUNTA DE BROTE

INTRODUCCIÓN

Anthurium andreanum Lind. es una planta herbácea perenne, nativa de los trópicos de América Central y del Sur. Sus miles de cultivares son muy apreciados por sus coloridas y atractivas flores de lujo y follaje exótico. *A. andreanum* se explota comercialmente como flor cortada y planta en maceta en todo el mundo debido principalmente a su larga vida en florero.

Se propaga tanto por semillas como por medios vegetativos (estacas y retoños). La contaminación y la germinación de las semillas a menudo imponen un problema y registran un bajo nivel de germinación. Las semillas de *A. andreanum* requieren una condición de luz continua que apenas está disponible en condiciones de campo natural. La propagación vegetativa convencional es lenta, y lleva mucho tiempo desarrollar cantidades comerciales de clones de elite. Las técnicas de cultivo *in vitro* son una alternativa para la producción de material vegetativo de alta calidad y en grandes cantidades.

Lugar de Realización: Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales.

Tiempo de Duración: Una sesión de tres horas continuas.

Investigación Requerida: Organogénesis, clonación.

OBJETIVOS

- Demostrar los principios de la micropropagación y regeneración de plantas.
- Observar los diferentes estados de desarrollo y el potencial morfogénico de la yema apical, empleada como explante, en esta especie vegetal.

MATERIALES

Biológicos:

- 1 maceta con una planta de anturio (*Anthurium andreanum* L.)

Equipos:

- Campana de flujo laminar

Material de laboratorio:

- 2 cajas de Petri

- 1 bola de algodón
- 2 bisturí
- 2 pinzas de disección
- Bata
- Cubrebocas

Reactivos:

- 250 ml de agua jabonosa
- 250 ml de etanol (70%)
- 250 ml de solución de hipoclorito de sodio (0.5 %)
- 250 ml de agua destilada estéril
- 5 frascos con medio de cultivo MS (1962) específico para la especie y explante a utilizar.

METODOLOGÍA

Utilizar plantas jóvenes, sanas. Seleccionar brotes apicales de 2 cm de longitud.

- a) Colocar los brotes dentro de un vaso de precipitados, lavar con agua jabonosa (3 %) agitando manualmente durante tres minutos.
- b) Sumergirlas en la solución de etanol al 70% durante 20 segundos.
- c) Realizar inmersión en la solución de hipoclorito de sodio al 0.5% durante 5 minutos. A partir de este paso trabajar en la cámara de flujo laminar.
- d) Enjuagar el material vegetal con agua destilada estéril cuatro veces, con agitación, tratando de eliminar los residuos del hipoclorito.
- e) Del vaso de precipitados, tomar una punta de brote, y en una caja Petri estéril y con la ayuda de unas pinzas de disección, eliminar las hojas externas asta dejar el meristemo apical con tres pares de hojas.
- f) Colocar las yemas una por frasco, procurando insertar la parte del tallo en el medio de cultivo.
- g) Colocar los frascos con los explantes en el cuarto de incubación, con fotoperiodo de 16 horas luz, por 8 horas de oscuridad, a temperatura de 24°C.
- h) Observar cada tercer día el desarrollo de sus cultivos. Anotar los cambios en la apariencia de los explantes. Separar los frascos con explantes necrosados y contaminados y registrar si se trata de contaminación bacteriana o fúngica.

OBSERVACIONES

Emplear en los frascos de cultivo sales del medio MS (1962) suplementado con 0.1 mgL⁻¹ de ANA, 0.25 mgL⁻¹ de BAP, 60 mgL⁻¹ de Sulfato de Adenina, 30 g de sacarosa, 6.5 g de agar y pH= 5.7^{+/-}0.1. Transferir cada 4 semanas en el mismo medio

ACTIVIDADES DE INTEGRACIÓN

Incluir en el informe escrito los siguientes puntos:

- a) Fundamentar la relación que tiene el cultivo de yemas apicales y la estabilidad genética del material vegetativo generado.
- b) El informe de la práctica debe contener los resultados, discusión y conclusiones sobre el trabajo realizado, de una manera bien estructurada y sustentado en la literatura consultada.

EVALUACIÓN

La evaluación se realizará con base a la obtención de resultados correctos (cultivos asépticos) y reporte de prácticas.

BIBLIOGRAFÍA

- Anis M., and N. Ahmad. 2016. Plant Tissue Culture: Propagation, Conservation and Crop Improvement. Ed. Springer. 621 pp.
- Benítez B.A. 2005. Avances recientes en biotecnología vegetal en ingeniería genética. Barcelona Reverté 236 pp.
- Desai C., R. Inghalihalli and R. Krishnamurthy. 2015 Micropropagation of *Anthurium andreanum* -An important tool in floriculture. J. Pharm. and Phytop. 4(3):112-117.
- Martin KP, Joseph D, Madassery J, Philip VJ. 2007. Direct shoot regeneration from lamina explants of two commercial cut flower cultivars of *Anthurium andranum* Hort. J *in Vitro* Cell. Dev. Biol. – Plant. 39:500-504.
- Murashige T., Skoog. 1962. A revised medium of rapid growth and bioassays with tobacco tissue. *Physiol.Plantarum*. 15:473-497.
- Nowbuth P, Khittoo J, Bahorun T, Venkatasamy S. 2005. Assessing genetic diversity of some *Anthurium andraeanum* Hort. Cut-flower cultivars using RAPD markers. *Afr. J Biotechnol*. 4(10):1189-1194.
- Trigiano R.N., Gray D.J. 2000. Plant tissue culture concepts and laboratory exercises. CRC Press, Boca Ratón.
- Saran S.B., and P.D. Kumar. 2013. Plant Tissue Culture: An Introductory Text. Ed. Springer. 309 pp.

PRÁCTICA 7

PROPAGACIÓN DE VIOLETA AFRICANA (*Saintpaulia ionantha* W.)

POR CULTIVO DE SECCIÓN DE HOJA

INTRODUCCIÓN

La técnica de micropropagación de especies vegetales, utiliza diversas porciones de órganos, tejidos, etc. y proporciona una herramienta capaz de producir un gran número de plantas en cada cultivo como consecuencia de la totipotencialidad de las células vegetales.

La violeta africana (*Saintpaulina ionantha* W.) fue descubierta por el barón Walter von Saint Paul St. Claire en las montañas de Usambara, en la provincia del Cabo (Sudáfrica), a finales de siglo pasado. Cultivada por primera vez como planta de interior hará unos cincuenta años, hoy es una de las plantas de flor de interior más populares, conociéndose más de 20 especies y cientos de variedades. Inicialmente se reproducía por semilla o, sobre todo, por esqueje foliar. Hoy la forma más habitual de reproducirla es el cultivo *in vitro* de secciones de hoja y pecíolo para obtener brotes y posteriormente enraizarlos para una multiplicación clonal rápida.

Lugar de Realización: Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales.

Tiempo de Duración: Una sesión de tres horas continuas.

Investigación Requerida: Micropropagación. Organogénesis.

OBJETIVOS

- Demostrar los principios de la micropropagación y regeneración de plantas.
- Observar los diferentes estados de desarrollo y el potencial morfogénico del tejido de hoja en esta especie vegetal.

MATERIALES

Biológicos:

- 1 maceta con una planta de violeta africana (*Saintpaulia ionantha* W.)

Equipos:

- Campana de flujo laminar

Material de laboratorio:

- 2 cajas de Petri
- 1 bola de algodón

- 2 bisturí
- 2 pinzas de disección
- Bata
- Cubrebocas

Reactivos:

- 250 ml de agua jabonosa
- 250 ml de etanol (70%)
- 250 ml de solución de hipoclorito de sodio (0.5 %)
- 250 ml de solución de hipoclorito de calcio (2.0%)
- 250 ml de agua destilada estéril
- 5 frascos con medio de cultivo MS (1962) específico para la especie y explante a utilizar.

METODOLOGÍA

Utilizar hojas de violeta africana, de la planta madre o una planta sana. Escoger varias hojas desarrolladas, jóvenes (2-3 cm de diámetro) dejando un centímetro de peciolo.

- a) Colocar las hojas dentro de un vaso de precipitados, lavar con agua corriente y jabón agitando manualmente durante tres minutos.
- b) Enjuagar con agua de la llave.
- c) Sumergirlas en la solución de etanol al 70% durante 30 segundos.
- d) Sumergir las hojas en la solución de hipoclorito de calcio al 2.0% durante 15 minutos.
- e) Realizar inmersión en la solución de hipoclorito de sodio al 0.5% durante 15 minutos. A partir de este paso trabajar en la cámara de flujo laminar.
- f) Enjuagar el material vegetal con agua destilada estéril cuatro veces, con agitación, tratando de eliminar los residuos del hipoclorito.
- g) Del vaso de precipitados, tomar una a una las hojas, transferir a una caja Petri estéril y con la ayuda de unas pinzas de disección, eliminando el peciolo, cortar en fracciones de un centímetro cuadrado como se muestra en la Figura 1.
- h) Colocar las fracciones foliares de una hoja por frasco, procurando que el envés foliar quede en contacto con la superficie del medio de cultivo.
- i) Colocar los frascos con los explantes en el cuarto de incubación, con fotoperiodo de 16 horas luz, por 8 horas de oscuridad, a temperatura de 24°C.
- j) Observar cada tercer día el desarrollo de sus cultivos. Anotar los cambios en la apariencia de los explantes. Separar los frascos con explantes necrosados y contaminados y registrar si se trata de contaminación bacteriana o fúngica.

OBSERVACIONES

Emplear en los frascos de cultivo sales del medio MS (1962) suplementado con 0.1 mgL⁻¹ de AIA, 10 mgL⁻¹ de K, 80 mgL⁻¹ de Sulfato de Adenina, 30 g de sacarosa, 8.0 g de agar y pH= 5.7[±]0.1. Transferir cada 5 semanas en el mismo medio

ESQUEMA DE TRABAJO

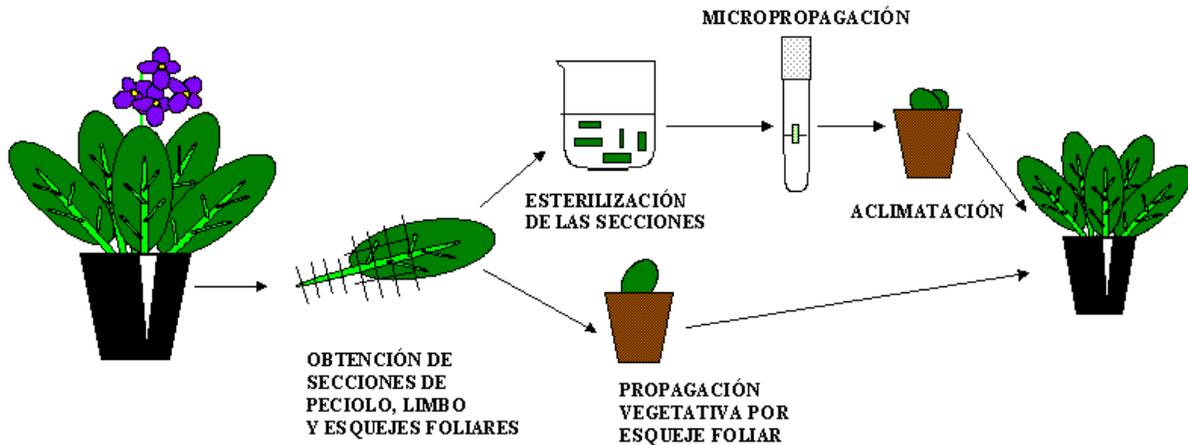


Figura 1. Corte y siembra de sección de hojas en la micropropagación de violeta africana.

ACTIVIDADES DE INTEGRACIÓN

Incluir en el informe escrito los siguientes puntos:

- Cuál es el significado del término totipotencia celular.
- Incluir al menos un artículo científico reciente sobre el tema de la práctica.
- El informe de la práctica debe contener los resultados, discusión y conclusiones sobre el trabajo realizado, de una manera bien estructurada y sustentado en la literatura consultada.

EVALUACIÓN

La evaluación se realizará con base a la obtención de resultados correctos (cultivos asépticos) y reporte de prácticas.

BIBLIOGRAFÍA

- Benítez B.A. 2005. Avances recientes en biotecnología vegetal e ingeniería genética. Barcelona Reverté 236 p.

- Boschi C. 2008. El manejo del vivero vol. 2. "el manejo de la propagación"
ISBN
978-987-05-978-987-05-4159-2.
- Murashige T., Skoog. 1962. A revised medium of rapid growth and bioassays
with tobacco tissue. *Physiol. Plantarum*. 15:473-497.
- Trigiano R.N., Gray D.J. 2000. Plant tissue culture concepts and laboratory
exercises. CRC Press, Boca Ratón.

PRÁCTICA 8

PROPAGACIÓN DE HELECHOS (*Cyrtomium falcatum* L.)

POR CULTIVO DE ESPORAS

INTRODUCCIÓN

La gran variedad de helechos, que existen en México, no ha sido aprovechada racionalmente en la horticultura ornamental; tal es el caso del género *Cyrtomium* que es muy utilizado como planta de interior y bien aceptado para decorar jardines y arreglos florales. Este helecho se propaga como la mayoría de los helechos comerciales, mediante el cultivo de rizomas, zonas de crecimiento de frondas y por ápices de estolones, pero la propagación asexual es un método que, desde el punto de vista comercial, resulta difícil y muy lento.

La propagación por medio de la germinación de esporas es un método, que si bien, puede producir variación fenotípica en las plántulas que se obtienen, también es la forma de propagación que presenta algunas ventajas sobre la manera tradicional: la producción de plántulas se realiza en tiempos cortos y en mayor cantidad; representa una forma segura de intercambiar germoplasma y, propagar aquellas especies difíciles.

Lugar de Realización: Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales.

Tiempo de Duración: Una sesión de tres horas continuas.

Investigación Requerida: Gametofito. Esporofito.

OBJETIVOS

- Observar los diferentes estados de desarrollo y la formación de órganos, tales como brotes y raíces.
- Identificar el potencial morfogénico de la germinación de esporas en esta especie vegetal.

MATERIALES

Biológicos:

- 5 pinas con soros maduros de *Cyrtomium*

Equipos:

- Campana de flujo laminar

Material de laboratorio:

- 2 cajas de Petri
- 1 bola de algodón
- 2 bisturí
- 2 pinzas de disección
- Bata
- Cubrebocas

Reactivos:

- 250 ml de agua jabonosa (1 %)
- 250 ml de etanol (70%)
- 250 ml de solución de hipoclorito de sodio (1.5 %)
- 250 ml de agua destilada estéril
- 5 frascos con medio de cultivo MS (1962) específico para la especie y explante a utilizar.

METODOLOGÍA

Utilizar pinas del helecho que no presenten daños.

- a) Sumergir las pinas en agua jabonosa por tres minutos.
- b) Enjuagar con agua de la llave a fin de eliminar los residuos de jabón.
- c) Sumergirlas en etanol al 70% durante 10 segundos.
- d) Realizar una inmersión por 15 min. en la solución de hipoclorito de sodio (1.5 %). A partir de este momento trabajar en la cámara de flujo laminar.
- e) Enjuagar el material vegetal tres veces con agua destilada esterilizada.
- f) Aislar los soros de las pinas usando pinzas de disección y sembrar en los frascos de cultivo.
- g) Repita el procedimiento con el resto del material vegetativo.
- h) Selle y etiquete el frasco de cultivo antes de colocarlos en el cuarto de incubación, con fotoperiodo de 16 horas luz, por 8 horas de oscuridad, a temperatura de 24°C.
- i) Observar cada tercer día el desarrollo de sus cultivos. Anotar los cambios en la apariencia de los explantes. Separar los frascos con explantes necrosados y contaminados y registrar si se trata de contaminación bacteriana o fúngica.

OBSERVACIONES

Emplear en los frascos de cultivo sales del medio MS (1962), suplementado con 0.1 mgL⁻¹ de ANA, 2.0 mgL⁻¹ de K, 30 g de sacarosa, 6.5 g de agar y un pH= 5.7^{+/-}0.1. Transferir cada 4 semanas a medio de cultivo fresco con la misma composición.

ACTIVIDADES DE INTEGRACIÓN

Incluir en el informe escrito los siguientes puntos:

1. Indique qué otras técnicas se pueden emplear para la propagación masiva de helechos.
2. Incluir al menos un artículo científico reciente sobre el tema de la práctica.
3. El informe de la práctica debe contener los resultados, discusión y conclusiones sobre el trabajo realizado, de una manera bien estructurada y sustentado en la literatura consultada.

EVALUACIÓN

La evaluación se realizará con base a la obtención de resultados correctos (cultivos asépticos) y reporte de prácticas.

BIBLIOGRAFÍA

- Bosworth S; Hudson JEN. 2000. Partial purification of an antheridiogen from the fern *Asplenium platyneuron*. Texas Academy of Sciences Annual Meeting 1999. Seguin, Texas pp 172.
- Fernández H; Revilla MA. 2009. *In vitro* culture of ornamental ferns. Plan Cell, Tissue and Organ Culture 73: 1-13.
- González RH; Herrera MJA; Ramos VAC. 2006. Multiplicación *in vitro* de *Nephrolepis exaltata* (L.) Schott, a partir de esporas. Revista Chapingo Serie Horticultura 12(1): 142-146.
- Khan S; Raziq M; Afzal HK. 2008. *In vitro* propagation of Bird's Nest Fern (*Asplenium nidus*) from spores. Pak J. Bot. 40(1). P 91-97.
- Renner GDR.; Randi AM. 2004. Effect of sucrose and irradiance on germination and early gametophyte growth of the endangered tree fern *Dicksonia sellowiana*. Dicksoniaceae. *Acta Bot. bras* 18(2):375-380.

PRÁCTICA 9

PROPAGACIÓN DE ORQUÍDEAS (*Stanhopea tigrina* B.)

POR GERMINACIÓN ASIMBIÓTICA DE SEMILLA

INTRODUCCIÓN

Las semillas de orquídeas son minúsculas y contienen pocas o ninguna reserva para llevar a cabo su germinación. Usualmente estas semillas no germinan en el medio natural a menos que sean infectadas por un hongo micorriza, el mismo que abastece a las plantas jóvenes con azúcares y nutrientes que necesitan hasta que sean lo suficientemente grandes para fabricar su propio alimento. Aunque las semillas contenidas en una cápsula de orquídea pueden ser numerosas (2-3 millones), se considera que sólo un 2-3 % de semillas pueden germinar en condiciones naturales.

Debido a las limitaciones anteriores, la germinación y el desarrollo en condiciones *in vitro*, se plantea como una alternativa más eficiente en la regeneración de plantas, ya que se realiza en condiciones controladas y asépticas logrando hasta un 100 % de germinación.

OBJETIVOS

- Llevar a cabo la germinación asimbiótica de semillas de orquídea.
- Observar los diferentes estados de desarrollo y la formación de protocormos, característicos de la familia Orchidaceae.
- Identificar el potencial morfogénico de la germinación de semillas en esta especie vegetal.

Lugar de Realización: Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales.

Tiempo de Duración: Una sesión de tres horas continuas.

Investigación Requerida: Germinación asimbiótica.

MATERIALES

Biológicos:

- Semillas de orquídeas

Equipos:

- Campana de flujo laminar

Material de laboratorio:

- 2 cajas de Petri
- 1 bola de algodón
- 2 bisturí
- 2 pinzas de disección
- 1 mechero
- 1 atomizador con alcohol al 90%
- Cubrebocas

Reactivos:

- 250 ml de agua jabonosa (1 %)
- 250 ml de etanol (70%)
- 250 ml de solución de clorox (15 %)
- 250 ml de agua destilada estéril
- 5 frascos con medio de cultivo MS (1962) específico para la especie y explante a utilizar.

METODOLOGÍA

Utilizar semillas que no presenten daños.

- a) Enjuagar con agua de la llave a fin de eliminar los residuos de jabón.
- b) Sumergirlas en etanol al 70% durante 10 segundos.
- c) Realizar una inmersión en la solución de clorox (15 %) por 15 minutos. A partir de este momento trabajar en la cámara de flujo laminar.
- d) Enjuagar el material vegetal tres veces con agua destilada esterilizada.
- e) Sembrar las semillas colocándolas sobre el medio de cultivo y dos por frasco de cultivo.
- f) Repita el procedimiento con el resto del material vegetativo.
- g) Selle y etiquete el frasco de cultivo antes de colocarlos en el cuarto de incubación, con fotoperiodo de 16 horas luz, por 8 horas de oscuridad, a temperatura de 24°C.
- h) Observar cada tercer día el desarrollo de sus cultivos. Anotar los cambios en la apariencia de los explantes. Separar los frascos con explantes necrosados y contaminados y registrar si se trata de contaminación bacteriana o fúngica.

OBSERVACIONES

Emplear en los frascos de cultivo sales del medio MS (1962), suplementado con 100 mL⁻¹ de agua de coco, 30 g de sacarosa, 6.5 g de agar y un pH= 5.7^{+/-}0.1. Transferir cada 4 semanas a medio de cultivo fresco con la misma composición.

ACTIVIDADES DE INTEGRACIÓN

Incluir en el informe escrito los siguientes puntos:

1. Mencione qué factores afectan la germinación de semillas de orquídea *in vitro*.
2. Indique qué otras técnicas se pueden emplear para la propagación masiva de orquídeas.
3. Incluir al menos un artículo científico reciente sobre el tema de la práctica.
4. El informe de la práctica debe contener los resultados, discusión y conclusiones sobre el trabajo realizado, de una manera bien estructurada y sustentado en la literatura consultada.

EVALUACIÓN

La evaluación se realizará con base a la obtención de resultados correctos (cultivos asépticos) y reporte de prácticas.

BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez-Pardo, V. M.; Ferreira, A. G; y Nunes, V. F. 2006. Seed disinfestation methods for *in vitro* cultivation of epiphyte orchids from Southern Brazil. *Hortic. Bras.* 24:217 - 220.
- Cancino, G. O y Salazar, S. A. 2011. Evaluación del efecto de suplementos orgánicos en la germinación *in vitro* de dos especies de orquídeas de la provincia de Pamplona, Norte de Santander, Colombia. Memorias. VI Congreso Colombiano de Botánica Biodiversidad, Desarrollo y Cultura: Una Visión Integradora. Cali, 11-15 de agosto (CD-rom).
- Coello, C.; Miceli, C.; Orantes, C.; Dendooven, L.; y Gutiérrez, A. 2010. Plant growth regulators optimization for *in vitro* cultivation of the orchids. *Gayana Bot.* 67(1):19 - 26.
- Deb, C. y Pongener, A. 2011. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw.: a multipurpose orchid. *J. Plant Biochem. Biotechnol.* 20(1):90 - 95.
- Ruíz B.C., C.A. Laguna, A.L.G. Iglesias, A. Damon, H.T.N.J. Marín, R.H.S. Aspíroz, M.J.L. Moreno. 2008. Germinación *in vitro* de semillas de *Encyclia adenocaula* (La Llave & Lex.) Schltr (Orchidaceae). *FYTON* 77: 203-215.
- Seaton, P. & Ramsay, M. 2009. Cultivo de orquídeas por semilla. Royal Botanic Garden Kew. England.
- Vásquez, Ch.,R. & P. L. Ibisch. 2004. Orquídeas de Bolivia / Orchids of Bolivia. Diversidad y estado de conservación/ Diversity and conservation status. Vol II. Subtribu: Pleurothallidinae. Editorial FAN., Santa Cruz de la Sierra, Bolivia.

PRÁCTICA 10

PROPAGACIÓN DE CACTUS (*Mammillaria spp*)

POR CULTIVO DE SEMILLA

INTRODUCCIÓN

En México se localizan 55 géneros de la familia Cactácea. El género *Mammillaria* cuenta con 200 especies, siendo México su principal centro de diversificación, y con un alto grado de endemismos.

La multiplicación de cactáceas puede realizarse por medio del cultivo de tejidos *in vitro*, por propagación vegetativa y por semilla. La propagación por semilla es una forma tradicional y convencional. Las semillas se pueden obtener de dos maneras, una es la colecta en el campo y la otra es por la polinización natural o artificial de un cultivo. Las ventajas de este método son: obtención de individuos con nuevas características genéticas, único medio de reproducción cuando una especie tiene limitantes para su propagación vegetativa y disminución del costo de operación. Las desventajas son: difícil obtención de semillas y la lentitud en el crecimiento y desarrollo de las plantas.

Un aspecto importante que se debe considerar en las estrategias de conservación de Cactáceas, es el lento crecimiento que presentan algunas especies, lo que influye no solo en que algunas plantas alcancen su madurez hasta una edad muy avanzada, sino también en una de las etapas del ciclo de vida más críticas para la sobrevivencia de los individuos (fase de plántula), consecuentemente el tamaño que alcancen los individuos en los primeros meses de vida es fundamental para su establecimiento y desarrollo. Cuando la reproducción ocurre por medio de semillas y en condiciones de invernadero, debe tomarse en cuenta para estas especies cuáles serán los mecanismos que incrementen la velocidad de crecimiento de sus plántulas, entre las sustancias que pueden cumplir este papel se encuentran las hormonas de crecimiento, que van a controlar sus procesos de desarrollo.

OBJETIVOS

- Observar los diferentes estados de desarrollo y la formación de órganos, tales como brotes y raíces, en respuesta al cultivo *in vitro* de semillas de *Mammillaria spp*.
- Identificar el potencial morfogenético de la germinación de semillas en esta especie vegetal.

Lugar de Realización: Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales.

Tiempo de Duración: Una sesión de tres horas continuas.

Investigación Requerida: Germinación. Hormonas vegetales.

MATERIALES

Biológicos:

- 10 semillas de *Mammillaria*

Equipos:

- Campana de flujo laminar

Material de laboratorio:

- 2 cajas de Petri
- 1 bola de algodón
- 2 bisturí
- 2 pinzas de disección
- 1 mechero
- 1 atomizador con alcohol al 90%
- Cubrebocas

Reactivos:

- 250 ml de agua jabonosa (1 %)
- 250 ml de etanol (70%)
- 250 ml de solución de hipoclorito de sodio (0.5 %)
- 250 ml de agua destilada estéril
- 5 frascos con medio de cultivo MS (1962) específico para la especie y explante a utilizar.

METODOLOGÍA

Utilizar semillas que no presenten daños.

- a) Lavar las semillas en la solución jabonosa durante tres minutos.
- b) Enjuagar con agua de la llave a fin de eliminar los residuos de jabón.
- c) Sumergirlas en etanol al 70% durante 3 minutos.
- d) Realizar una inmersión en la solución de hipoclorito de sodio (0.5 %) por 10 minutos. A partir de este momento trabajar en la cámara de flujo laminar.
- e) Enjuagar el material vegetal tres veces con agua destilada esterilizada.
- f) Sembrar las semillas colocándolas sobre el medio de cultivo y dos por frasco de cultivo.
- g) Repita el procedimiento con el resto del material vegetativo.
- h) Selle y etiquete el frasco de cultivo antes de colocarlos en el cuarto de incubación, con fotoperiodo de 16 horas luz, por 8 horas de oscuridad, a temperatura de 24°C.
- i) Observar cada tercer día el desarrollo de sus cultivos. Anotar los cambios en la apariencia de los explantes. Separar los frascos con explantes necrosados y contaminados y registrar si se trata de contaminación bacteriana o fúngica.

OBSERVACIONES

Emplear en los frascos de cultivo sales del medio MS (1962), suplementado con 0.1 mgL⁻¹ de ANA, 2.0 mgL⁻¹ de K, 30 g de sacarosa, 6.5 g de agar y un pH= 5.7^{+/-}0.1. Transferir cada 4 semanas a medio de cultivo fresco con la misma composición.

ACTIVIDADES DE INTEGRACIÓN

Incluir en el informe escrito los siguientes puntos:

1. Mencione qué factores afectan la germinación de semillas *in vitro*.
2. Indique qué otras técnicas se pueden emplear para la propagación masiva de cactus.
3. Incluir al menos un artículo científico reciente sobre el tema de la práctica.
4. El informe de la práctica debe contener los resultados, discusión y conclusiones sobre el trabajo realizado, de una manera bien estructurada y sustentado en la literatura consultada.

EVALUACIÓN

La evaluación se realizará con base a la obtención de resultados correctos (cultivos asépticos) y reporte de prácticas.

BIBLIOGRAFÍA

- Sánchez SJ; Flores J; Martínez EG. 2006. Efecto del tamaño de semilla en la germinación de *Astrophytum myriostigma*. *Interciencia* 31(5):371-37.
- Ruvalcaba RD; Rojas BD; Valencia BA. 2010. *In vitro* propagation of *Coryphantha retusa* an endemic and endangered cactus. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 12: 139-143.
- Aíra ML.; Ribeiro RC; Gallo LA; Tiago OE; Payáo ES. 2006. *In vitro* propagation of *Notocactus magnificus*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 84: 165-169.
- Dávila CA; Carrillo ML; Pérez MB. 2005. *In vitro* propagation of eight species or subspecies of *Turbinicarpus* (Cactaceae). *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 41: 540-545.
- Dicht RF; Lüthy AD. 2005. *Coryphantha* Cacti of Mexico and Southern USA. Springer-Verlag. Germany. 200 p.
- Ruedas M; Valverde T; Castillo S. 2000. Respuesta germinativa y crecimiento de plántulas de *Mammillaria magnimamma* (Cactáceae) bajo diferentes condiciones ambientales. *Bol. Soc. Bot.* 66: 25-35.
- Giusti P; Vitti D; Fiocchetti F; Colla G; Saccardo F; Tucci M. 2002. *In vitro* propagation of three endangered cactus species. *Scientia Horticulturae* 95: 319-332.

PRÁCTICA 11

MULTIPLICACIÓN POR SEGMENTOS NODALES DE CLAVEL

INTRODUCCIÓN

Durante esta fase se espera que los explantes que sobrevivieron de la fase de siembra originen brotes (de procedencia axilar o adventicia) con varios entrenudos. Periódicamente estos nuevos brotes se deben subcultivar en un nuevo medio mediante divisiones y resiembras en tubos de cultivo u otros recipientes adecuados. Estas operaciones se realizan en la cámara de flujo laminar.

El objetivo de esta etapa es mantener y aumentar la cantidad de brotes para los nuevos ciclos de multiplicación sucesivos y poder destinar parte de ellos a la siguiente etapa de producción (enraizamiento, bulbificación, etc.). Es importante señalar que en esta etapa, cualquiera que sea la vía de regeneración empleada, es conveniente evitar la formación de callo para disminuir el riesgo de variación somaclonal. En esta etapa, los medios de cultivo, los reguladores de crecimiento como auxinas, citocininas y ácido giberélico y las condiciones de crecimiento juegan un papel crítico sobre la multiplicación clonal de los explantes.

OBJETIVOS

- Incrementar la cantidad de brotes generados en la etapa de siembra de la especie seleccionada a partir de segmentos nodales.

Lugar de Realización: Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales.

Tiempo de Duración: Una sesión de tres horas continuas.

Investigación Requerida: Etapa II de la micropropagación.

MATERIALES

Biológicos:

- 2 frascos con plántulas de clavel de 4 semanas de edad

Equipos:

- Campana de flujo laminar

Material de laboratorio:

- 2 cajas de Petri
- 1 bola de algodón

- 2 bisturí
- 2 pinzas de disección
- 1 mechero
- 1 atomizador con alcohol al 90%
- Cubrebocas

Reactivos:

- 10 frascos con medio de cultivo MS (1962) específico para la especie y explante a utilizar.

METODOLOGÍA

Utilizar frascos no contaminados y plántulas que no presenten daños.

- a) De las plántulas *in vitro* seccionar, dentro de la caja de petri, los entrenudos a fin de obtener porciones de tallo con yema.
- b) Sembrar cinco porciones colocándolas sobre un frasco con medio de cultivo fresco.
- c) Repita el procedimiento con el resto del material vegetativo.
- d) Selle y etiquete el frasco de cultivo antes de colocarlos en el cuarto de incubación, con fotoperiodo de 16 horas luz, por 8 horas de oscuridad, a temperatura de 24°C.
- e) Observar cada semana el desarrollo de sus cultivos. Anotar los cambios en la apariencia de los explantes. Separar los frascos con explantes necrosados y contaminados y registrar si se trata de contaminación bacteriana o fúngica.

OBSERVACIONES

Emplear en los frascos de cultivo sales del medio MS (1962) suplementado con 0.3 mgL⁻¹ de AIA, 10 mgL⁻¹ de K, 30 g de sacarosa, 6.5 g de agar y un pH= 5.7^{+/-}0.1. Transferir cada 4 semanas en el mismo medio

ESQUEMA DE TRABAJO

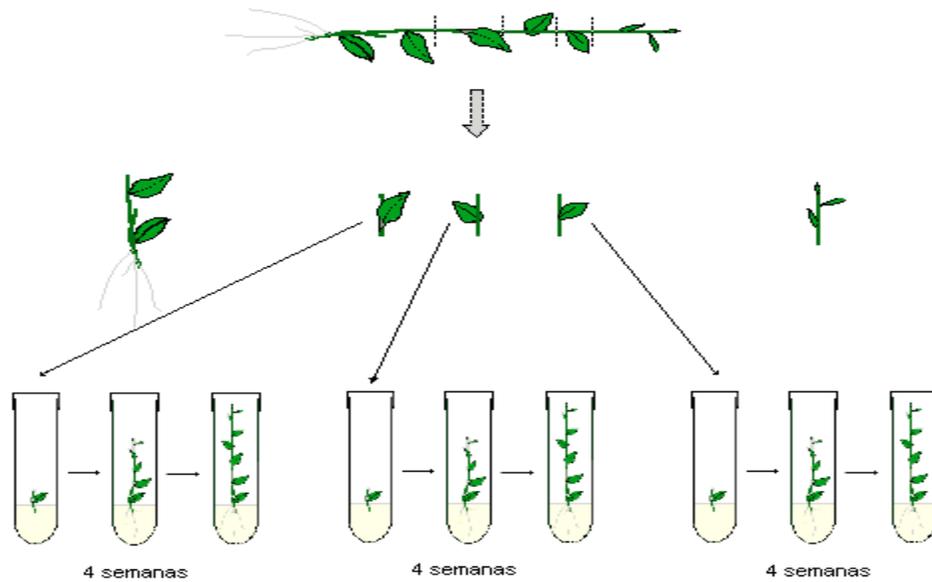


Figura. Representación esquemática del método de explantes nodales, para la propagación vegetativa de plantas

ACTIVIDADES DE INTEGRACIÓN

Incluir en el informe escrito los siguientes puntos:

1. Mencione qué factores afectan la etapa de multiplicación *in vitro*.
2. Indique qué otras técnicas se pueden emplear en esta etapa.
3. Incluir al menos un artículo científico reciente sobre el tema de la práctica.
4. El informe de la práctica debe contener los resultados, discusión y conclusiones sobre el trabajo realizado, de una manera bien estructurada y sustentado en la literatura consultada.

EVALUACIÓN

La evaluación se realizará con base a la obtención de resultados correctos (cultivos asépticos) y reporte de prácticas.

BIBLIOGRAFÍA

- Azcon B. J, Talon M. 2001. Fundamentos de fisiología vegetal. Mc Graw Hill Interamericana. España. 522 p.
- Benson E. E. 2000. Special symposium: *in vitro* plant recalcitrance. In vitro Cell. & Dev. Biol. Plant 36:141-148.

- Fal M.A, Sánchez T.R. 2002. Physical environment in non-ventiled culture vessels affects in vitro growth and morphogenesis of several cultivars of *Dianthus caryophyllus* L. In Vitro Cell. & Dev. Biol. Plant. 38:589-594.
- Kevers C., Frank T., Strasser R.J., Dommès J., Gaspar T. 2004. Hiperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress – induced change of physiological state. Plant Cell, Tissue and organ Culture. 77: 181-191.
- Rodríguez N.C., Pretel S.O., Sánchez W.R., Marcado P.D. 2010. Efecto de 6-bencilaminopurina y ácido indolacético en la micropropagación *in vitro* de yemas de *Dianthus caryophyllus* L. Rev. Med. Vallejana. 4: 132-138.

PRÁCTICA 12

ADAPTACIÓN *EX VITRO* DE PLANTAS DE CLAVEL

INTRODUCCIÓN

Los explantos recién enraizados son muy sensibles a los cambios ambientales, de manera que el éxito o el fracaso de todo el proceso dependen de la aclimatación.

Tanto si los explantos fueron enraizados *in vitro* como *ex vitro*, en el momento en que se extraen los explantos de los recipientes de enraizamiento están poco adaptados a crecer en un invernadero, ya que estos explantos han enraizado y crecido en ambientes con una humedad relativa muy elevada y generalmente tienen estomas perezosos para responder al descenso de la humedad relativa, demasiado lentos para evitar la desecación del explanto. Por otra parte crecer en ambientes tan húmedos también suele implicar la falta de una cutícula cérea bien desarrollada, la barrera para evitar la pérdida de agua a lo largo de toda la superficie de la planta.

Los explantos deben ser aclimatados a las condiciones de humedad del invernadero disminuyendo progresivamente la humedad relativa e incrementando progresivamente la intensidad de luz.

OBJETIVOS

- Adaptar o aclimatar plantas producidas vía *in vitro*.

Lugar de Realización: Invernadero.

Tiempo de Duración: Una sesión de tres horas continuas.

Investigación Requerida: Adaptación *ex vitro* de plantas de clavel.

MATERIALES

Biológicos:

- 2 frascos con plántulas de clavel de 4 semanas de edad

Infraestructura:

- Cuarto de nebulización ubicado dentro del invernadero No. 4.
- Cama enraizadora con agrolita.

Material de laboratorio:

- 1 cajas de Petri
- 3 recipientes de plástico con cap. De 2.0 L.

Reactivos:

- 0.6 g de fungicida Prozycar 50 PH.
- 10 g de enraizador Radix 1500.

METODOLOGÍA

Utilizar frascos no contaminados y plántulas que no presenten daños.

- a) De las plántulas *in vitro* seccionar aquellas que presentan cuatro semanas de edad, listas para la fase de adaptación.
- b) Dentro del cuarto de nebulización colocar los tres recipientes de plástico en el siguiente orden: el primero, de izquierda a derecha, conteniendo 1 L de agua limpia; el segundo con la solución de fungicida; el tercero conteniendo 1 L de agua limpia.
- c) Sacar las plántulas de los frascos de cultivo eliminando con la mano la mayor cantidad posible de medio de cultivo que contengan las raíces.
- d) Lavar las plántulas en el primer recipiente de agua limpia a fin de eliminar de las raíces los residuos de medio de cultivo.
- e) Colocarlas en el recipiente con solución fungicida por un periodo de cinco minutos.
- f) Realizar un ligero enjuague de las plántulas en el tercer recipiente con agua limpia.
- g) Colocar las plántulas en la cama enraizadora.
- h) Observar cada semana el desarrollo de sus cultivos. Anotar los cambios en la apariencia de las plántulas.

OBSERVACIONES

Aplicar tres riegos diarios de quince minutos cada uno durante la primera semana, posteriormente ir reduciendo el número o el tiempo de riego hasta llegar al día 30, con la finalidad de lograr su adaptación total para su traslado a su destino final de las plantas.

ESQUEMA DE TRABAJO

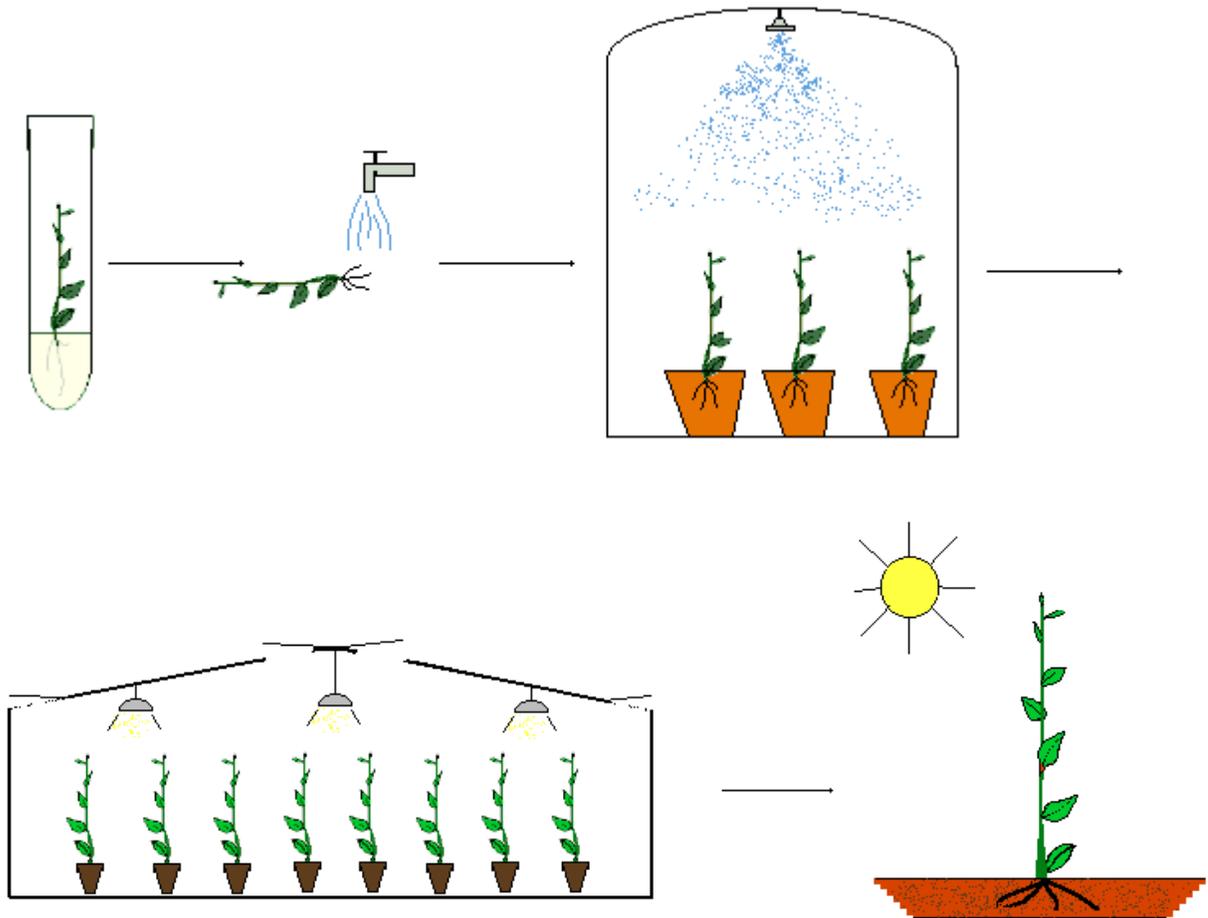


Figura 4. Representación esquemática del método de explantes nodales, para la propagación vegetativa de plantas

ACTIVIDADES DE INTEGRACIÓN

Incluir en el informe escrito los siguientes puntos:

1. Mencione qué factores afectan la etapa de multiplicación *in vitro*.
2. Indique qué otras técnicas se pueden emplear en esta etapa.
3. Incluir al menos un artículo científico reciente sobre el tema de la práctica.
4. El informe de la práctica debe contener los resultados, discusión y conclusiones sobre el trabajo realizado, de una manera bien estructurada y sustentado en la literatura consultada.

EVALUACIÓN

La evaluación se realizará con base a la obtención de resultados correctos (plantas adaptadas) y reporte de prácticas.

BIBLIOGRAFÍA

- Azcon B. J, Talon M. 2001. Fundamentos de fisiología vegetal. Mc Graw Hill Interamericana. España. 522 p.
- Benson E. E. 2000. Special symposium: *in vitro* plant recalcitrance. In vitro Cell. & Dev. Biol. Plant 36:141-148.
- Fal M.A, Sánchez T.R. 2002. Physical environment in non-ventiled culture vessels affects in vitro growth and morphogenesis of several cultivars of *Dianthus caryophyllus* L. In Vitro Cell. & Dev. Biol. Plant. 38:589-594.
- Kevers C., Frank T., Strasser R.J., Dommès J., Gaspar T. 2004. Hiperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress – induced change of physiological state. Plant Cell, Tissue and organ Culture. 77: 181-191.
- Rodríguez N.C., Pretel S.O., Sánchez W.R., Marcado P.D. 2010. Efecto de 6-bencilaminopurina y ácido indolacético en la micropropagación *in vitro* de yemas de *Dianthus caryophyllus* L. Rev. Med. Vallejana. 4: 132-138.

BIBLIOGRAFÍA

- Aíra ML.; Ribeiro RC; Gallo LA; Tiago OE; Payáo ES. 2006. *In vitro* propagation of *Notocactus magnificus*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 84: 165-169.
- Alvarez-Pardo, V. M.; Ferreira, A. G; y Nunes, V. F. 2006. Seed disinfection methods for *in vitro* cultivation of epiphyte orchids from Southern Brazil. Hortic. Bras. 24:217 - 220.
- Anis M., and N. Ahmad. 2016. Plant Tissue Culture: Propagation, Conservation and Crop Improvement. Ed. Springer. 621 pp.
- Aswath C., Choudary M.L. 2002. Rapid plant regeneration from *Gerbera jamesonii* Bolus callus cultures. Acta Botanica Croatica 61: 125–134.
- Aswath C., Deepa S.M., Choudhary M.L. 2003. Commercial multiplication of gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus) through *in vitro* shoot tip culture. Journal of Ornamental Horticulture 6: 303–309.
- Aswath C., Deepa S.M., Noorjahan J.A. 2002. Morphogenetic response of *in vitro* gerbera shoots to IAA and BAP. Floriculture trends in India. In: Proceedings of National Symposium on Indian Floriculture in the Millennium, Lal Bagh, Bangalore 310–312.
- Aswath C., Wazneen S. 2004. An improved method for *in vitro* propagation of gerbera. Journal of Ornamental Horticulture 7: 141–146.
- Aswayh C., Choudhary M.L. 2002. Mass propagation of gerbera (*Gerbera jamesonii*) through shoot culture. Indian Journal of Horticulture 59: 95–99.
- Azcon B. J, Talon M. 2001. Fundamentos de fisiología vegetal. Mc Graw Hill Interamericana. España. 522 p.
- Barba AA; Luna RB; Romero AJ. 2001. Micropropagación de plantas. México, Ed. Trillas. 107 p.
- Benítez B.A. 2005. Avances recientes en biotecnología vegetal e ingeniería genética. Barcelona Reverté 236 p.
- Benson E. E. 2000. Special symposium: *in vitro* plant recalcitrance. In vitro Cell. & Dev. Biol. Plant 36:141-148.
- Boschi C. 2008. El manejo del vivero vol. 2. “el manejo de la propagación” ISBN 978-987-05-978-987-05-4159-2.
- Cancino, G. O y Salazar, S. A. 2011. Evaluación del efecto de suplementos orgánicos en la germinación *in vitro* de dos especies de orquídeas de la provincia de Pamplona, Norte de Santander, Colombia. Memorias. VI Congreso Colombiano de Botánica Biodiversidad, Desarrollo y Cultura: Una Visión Integradora. Cali, 11-15 de agosto (CD-rom).
- Chen X.J., Li M.T., Lin X. 2006. *In vitro* propagation of *Gerbera jamesonii*. Journal of Fujian Agricultural and Forestry University of Natural Sciences 35: 169–172.
- Coello, C.; Miceli, C.; Orantes, C.; Dendooven, L.; y Gutiérrez, A. 2010. Plant growth regulators optimization for *in vitro* cultivation of the orchids. Gayana Bot. 67(1):19 - 26.

- Dávila CA; Carrillo ML; Pérez MB. 2005. *In vitro* propagation of eight species or subspecies of *Turbinicarpus* (Cactaceae). In *Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 41: 540-545.
- Deb, C. y Pongener, A. 2011. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw.: a multipurpose orchid. *J. Plant Biochem. Biotechnol.* 20(1):90 - 95.
- Desai C., R. Inghalihalli and R. Krishnamurthy. 2015 Micropropagation of *Anthurium andreanum* -An important tool in floriculture. *J. Pharm. and Phytop.* 4(3):112-117.
- Dicht RF; Lüthy AD. 2005. *Coryphanta* Cacti of Mexico and Southern USA. Springer-Verlag. Germany. 200 p.
- Drefahl A., Quoirin M.G., Cuquel F.L. 2007. Micropropagation of *Rosa × hybrida* cv. Vegas via axillary buds. *Acta Horticulturae* 751: 407-411
- Edwin BH. 2008. Media and Techniques for Growth, Regeneration and Storage 2005-2008. Volume 12 of Recent Advances in Plant Tissue Culture.
- Fal M.A, Sánchez T.R. 2002. Physical environment in non-ventiled culture vessels affects *in vitro* growth and morphogenesis of several cultivars of *Dianthus caryophyllus* L. *In Vitro Cell. & Dev. Biol. Plant.* 38:589-594.
- George EF; Hall MA; De Klerk G. 2008. *Plant Propagation by Tissue Culture*" 3rd Edition, Volume 1, Springer Verlag.
- Giusti P; Vitti D; Fiocchetti F; Colla G; Saccardo F; Tucci M. 2002. *In vitro* propagation of three endangered cactus species. *Scientia Horticulturae* 95: 319-332.
- Hameed N., Shabbir A., Ali A., Bajwa, R. 2006. *In vitro* micropropagation of disease free rose (*Rosa indica* L.). *Mycopath* 4: 35-38.
- Hayashi T.K., Moreira A.F., Amaral C., Melo M. 2002. Tratamiento de metrizes de cravo (*Dianthus caryophyllus* L.) com nitrogenio e calogenese *in vitro*. *Scientia Agricola* 59: 47-52.
- Helliart, B., Panis B., Michel C., Swennen R., Lepoivre P. 2001. Development of *in vitro* techniques for elimination of virus diseases from Musa. *Acta Horticulturae.* 560: 535-538.
- Hurtado MD; Merino ME. 2014. Cultivo de Tejidos Vegetales. México, Ed. Trillas. 232 p.
- Ibrahim R., Debergh P.C. 2001. Factors controlling high efficiency of adventitious bud formation and plant regeneration from *in vitro* leaf explants of roses (*Rosa hybrida*). *Scientia Horticulturae* 88: 41-57.
- Kanwar J.K., Kumar S. 2008. *In vitro* propagation of gerbera. *Hort. Sci.* 35: 35-44
- Kevers C., Frank T., Strasser R.J., Dommès J., Gaspar T. 2004. Hiperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress – induced change of physiological state. *Plant Cell, Tissue and organ Culture.* 77: 181-191.
- Khosh K.M., Jabbarzadeh Z. 2007. Effects of several variables on *in vitro* culture of Damask Rose (*Rosa damascena* Mill.) *Acta Horticulturae* 751: 389-393.

- Kim S.W., Oh S.C., In D.S., Liu J.R. 2003. Plant regeneration of rose (*Rosa hybrida*) from embryogenic cell-derived protoplasts. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 73: 15-19.
- Kuan H.C., Yueh C.S., Tsay J.S., Lee T.C. 2002. Effects of carbon source and concentration on growth of *Gerbera jamesonii* *in vitro*. *Journal of Chinese Society for Horticultural Sciences* 48: 133–142.
- Kumar A., Sood A., Plani U.T., Gupta A.K., Plani L.M.S. 2001. Micropropagation of *Rosa damascene* Mill. from mature bushes using thidiazuron. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 76: 30-34.
- Kumar S., Kanwar J.K. 2005. Plant regeneration from callus and cell suspension cultures of *Gerbera jamesonii* Diabolo. *European Journal of Horticultural Science* 70: 265–270.
- Kumar S., Kanwar J.K. 2006. Regeneration ability of petiole, leaf and petal explants in gerbera cut flower cultures *in vitro*. *Folia Horticulturae* 18: 57–64.
- Kumar S., Kanwar J.K., Sharma D.R. 2004. *In vitro* regeneration of *Gerbera jamesonii* from leaf and petiole explants. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 13: 73–75.
- Majada J.P., Fal M.A., Tadeo F., Sánchez T.R. 2002 Effects of natural ventilation on leaf ultrastructure of *Dianthus caryophyllus* L. Cultured *in vitro*. *In Vitro Cell. & Dev. Biol.* 38: 272-278.
- Mandal A.K., Datta S.K., 2002. Introduction of gerbera cultivation in Lucknow agro-climate through tissue culture of young flower buds. *Indian Journal of Biotechnology* 1: 212–214.
- Martin KP, Joseph D, Madassery J, Philip VJ. 2007. Direct shoot regeneration from lamina explants of two commercial cut flower cultivars of *Anthurium andraeanum* Hort. *J in Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant.* 39:500-504.
- Mujib A; Cho M; Predieri S; Banerjee S. 2004. *In vitro* application in crop improvement. Science Publishers.
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15. 473-497.
- Naphaporn N.U., Kantamaht K., Kamnoon K. 2009. Micropropagation from cultured nodal of rose (*Rosa hybrida* L. cv. "Perfume Delight"). *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 31: 583-586.
- Nowbuth P, Khittoo J, Bahorun T, Venkatasamy S. 2005. Assessing genetic diversity of some *Anthurium andraeanum* Hort. Cut-flower cultivars using RAPD markers. *Afr. J Biotechnol.* 4(10):1189-1194.
- Pedraza S.M., Jaen C.D., Gutiérrez E.A., Colinas L.T., López P.C. 2001. Crecimiento y nutrición de microplantas de gerbera inoculadas con hongos micorrízicos arbusculares. *Agrociencia* 35: 149-158.
- Previati A., Benelli C., Da R.F., Ozudogru A., Lambradi M. 2008. Micropropagation and *in vitro* conservation of virus-free rose germplasm. *Propagation of Ornamental Plants* 8: 93-98.
- Rodríguez N.C., Pretel S.O., Sánchez W.R., Marcado P.D. 2010. Efecto de 6-bencilaminopurina y ácido indolacético en la micropropagación *in vitro* de yemas de *Dianthus caryophyllus* L. *Rev. Med. Vallejana.* 4: 132-138.

- Rout G.R., Mohapatra A., Mohan J.S. 2006. Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospect. *Biotechnology Advances* 24: 531-560.
- Ruedas M; Valverde T; Castillo S. 2000. Respuesta germinativa y crecimiento de plántulas de *Mammillaria magnimamma* (Cactáceae) bajo diferentes condiciones ambientales. *Bol. Soc. Bot.* 66: 25-35.
- Ruíz B.C., C.A. Laguna, A.L.G. Iglesias, A. Damon, H.T.N.J. Marín, R.H.S. Aspíroz, M.J.L. Moreno. 2008. Germinación *in vitro* de semillas de *Encyclia adenocaula* (La Llave & Lex.) Schltr (Orchidaceae). *FYTON* 77: 203-215.
- Ruvalcaba RD; Rojas BD; Valencia BA. 2010. *In vitro* propagation of *Coryphantha retusa* an endemic and endangered cactus. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 12: 139-143.
- Sánchez SJ; Flores J; Martínez EG. 2006. Efecto del tamaño de semilla en la germinación de *Astrophytum myriostigma*. *Interciencia* 31(5):371-37.
- Saran S.B., and P.D. Kumar. 2013. *Plant Tissue Culture: An Introductory Text*. Ed. Springer. 309 pp.
- Seaton, P. & Ramsay, M. 2009. *Cultivo de orquídeas por semilla*. Royal Botanic Garden Kew. England.
- Trigiano R.N., Gray D.J. 2000. *Plant tissue culture concepts and laboratory exercises*. CRC Press, Boca Ratón.
- Vásquez, Ch.,R. & P. L. Ibsch. 2004. *Orquídeas de Bolivia / Orchids of Bolivia. Diversidad y estado de conservación/ Diversity and conservation status. Vol II. Subtribu: Pleurothallidinae*. Editorial FAN., Santa Cruz de la Sierra, Bolivia.
- Vu N.H., Anh P.H., Nhut D.T. 2006. The role of sucrose and different cytokinins in the *in vitro* floral morphogenesis of rose (hybrid tea) cv. 'First Prize'. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 87: 315-320.
- Yadav M.K., Gaur A.K., Garg G.K. 2003. Development of suitable protocol to overcome hyperhydricity in Carnation during micropropagation. *Plant Cell. Tissue and Organ Culture*. 72: 153-156.