

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS

PROGRAMA EDUCATIVO:  
INGENIERO AGRÓNOMO FITOTECNISTA

## Manual de Prácticas



UNIDAD DE APRENDIZAJE:

## Biotecnología

Clave: L31214

**AUTOR:**

César Vences Contreras

**FECHA DE APROBACIÓN POR LOS HH. CONSEJOS  
ACADÉMICO Y DE GOBIERNO:**

27 septiembre 2016



# ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>PRESENTACIÓN</b> .....	3
<b>REGLAMENTO DE USO DEL LABORATORIO</b> .....	4
<b>PRÁCTICA 1</b>	
Esterilización por superficie y cultivo de material vegetal .....	6
<b>PRÁCTICA 2</b>	
Preparación de soluciones stock y medio de cultivo .....	7
<b>PRÁCTICA 3</b>	
Brotación múltiple axilar .....	12
<b>PRÁCTICA 4</b>	
Inducción y mantenimiento de callo.....	14
<b>PRÁCTICA 5</b>	
Cultivo de células en suspensión.....	16
<b>PRÁCTICA 6</b>	
Embriogénesis somática .....	18
<b>PRÁCTICA 7</b>	
Microinjerto.....	20
<b>PRÁCTICA 8</b>	
Variación somaclonal .....	23
<b>PRÁCTICA 9</b>	
Selección de mutantes .....	25
<b>PRÁCTICA 10</b>	
Transformación genética .....	27
<b>PRÁCTICA 11</b>	
Criopreservación .....	30
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	34

## **PRESENTACIÓN**

El concepto de que las células individuales de un organismo multicelular son totipotentes se encuentra implícito en la teoría celular y representa la piedra angular de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales. Utilizando estos principios podemos garantizar que a partir de una célula vegetal aislada se puede regenerar la planta completa de la cual proviene mediante una serie de técnicas de cultivo donde se le provea de las condiciones apropiadas. El uso de técnicas de cultivo permite al científico separar células, tejidos y órganos de un organismo madre para estudios subsecuentes como unidades biológicas aisladas, con propósitos tan distintos como multiplicar material vegetativo (micropropagación) u obtener metabolitos secundarios de importancia en medicina.

La Biotecnología aplicada a la agricultura a través de técnicas específicas tales como el cultivo de tejidos, células y órganos, la fusión de protoplastos, saneamiento, ADN recombinante y otras, representan una atractiva alternativa para el desarrollo sostenido de recursos renovables del sector agrícola.

La producción de alimentos y la conservación de los recursos naturales, constituyen grandes retos que pueden ser enfrentados con la aplicación de técnicas biológicas competitivas e innovadoras que permitan el desarrollo del país.

### **OBJETIVO**

Formar recursos humanos de excelencia académica en Biotecnología Vegetal, capaces de realizar actividades de docencia, investigación y producción; generando, innovando o adecuando tecnologías que permitan una alternativa en la solución a la problemática agrícola del país.

# REGLAMENTO DE USO DEL LABORATORIO

## ANTES DE INICIAR SU PRÁCTICA:

1. La asistencia a la práctica es obligatoria.
2. La tolerancia para entrar al laboratorio será la que rige el reglamento escolar.
3. Acatar las instrucciones indicadas en el Reglamento General de uso de los Laboratorios de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la UAEM.
4. No dejar abrigos, carpetas u otros objetos sobre las mesas de trabajo, para un mejor desarrollo de la práctica y evitar riesgos.
5. 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.
6. Se deben seguir en todo momento las indicaciones del profesor. No se comenzara a trabajar hasta haber recibido las instrucciones necesarias. Consultar las dudas y dificultades.
7. Es imprescindible leer por lo menos una vez la práctica antes de comenzar.
8. 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.
9. Por seguridad está terminantemente prohibido fumar dentro del laboratorio, así como ingerir alimentos y bebidas.

## DURANTE EL TRABAJO:

1. 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.
2. Extremar los cuidados al trabajar con sustancias inflamables, tóxicas o corrosivas.
3. Comunicar cualquier accidente, quemadura o corte, al responsable del laboratorio en ese momento.
4. La manipulación de productos sólidos se hará con ayuda de una espátula o cucharilla y para transvasar líquidos se utilizara una varilla de vidrio en los casos que sean necesarios.
5. Nunca viertas el ácido sulfúrico concentrado al agua, debes hacerlo de manera inversa pero con cuidado.
6. Tener cuidado al manejar ácidos y bases principalmente concentrados.
7. 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.
8. Con el fin de evitar contaminaciones, nunca se devolverá al frasco los restos de productos no utilizados.
9. 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.
10. 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.

11. 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:**

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

# PRÁCTICA 1

## ESTERILIZACIÓN POR SUPERFICIE Y CULTIVO DE MATERIAL VEGETAL

### INTRODUCCIÓN

El éxito del cultivo *in vitro* de células, tejidos u órganos vegetales requiere fundamentalmente del establecimiento aséptico de los inóculos en el medio de cultivo. Para este propósito, se requiere primeramente que el instrumental, cristalería y medios de cultivo a utilizar sean esterilizados previamente en autoclave. El área de trabajo es generalmente desinfectada con etanol al 70% (v/v) y el instrumental utilizado deberá permanecer inmerso en etanol al 80% (v/v) y pasarse a través de la flama del mechero constantemente. El aislamiento del inóculo deberá realizarse bajo los más estrictos controles de limpieza antes de proceder a esterilizarse por superficie.

La esterilización por superficie de material vegetativo debe ser realizado primeramente con una solución de etanol al 70% (v/v) por unos segundos hasta menos de 15 min, dependiendo de las características del inóculo. Posteriormente debe de tratarse con una solución acuosa de hipoclorito de sodio o de calcio con una concentración residual de cloro activo de 0.6-1% (v/v). El trabajo para el aislamiento aséptico del inóculo y establecimiento del cultivo deberá realizarse dentro de una campana de flujo laminar para eliminar cualquier contaminación por esporas sobre los medios de cultivo o los tejidos.

### OBJETIVO

Que el alumno sea capaz de seleccionar la mejor técnica de esterilización por superficie de los inóculos y manipularlos para el establecimiento del cultivo.

### INVESTIGACIÓN REQUERIDA

Métodos de esterilización con utilización de calor seco, humedad y presión, luz ultravioleta, microondas y filtración.

### MATERIALES

- Material vegetal (Semilla)
- Malla de tela sintética de 10 cm<sup>2</sup>
- Campana de flujo lamina
- Cristalería común
- Alcohol etílico al 70% (v/v)
- Cloro comercial al 10% (v/v)
- Champo
- Agua destilada

- Recipiente con medio de cultivo
- Pinza, espátula, mechero, atomizador, algodón, etc.

## **METODOLOGÍA**

1. En la malla de tela colocar la cantidad de semillas a esterilizar y sujetar sin hacer presión.
2. Colocar el saco con semillas en un vaso de precipitado de 250 ml previamente esterilizado.
3. Agregar al vaso primeramente la solución de alcohol al 70% y una gota de shampoo y tapar el vaso con una hoja de papel aluminio. Agite por 5 minutos. Posteriormente retire la solución.
4. Agregue la solución de hipoclorito (cloro comercial), vuelva a tapar el vaso y agite por 15 minutos. Remueva la solución.
5. NOTA: Es importante los tiempos de contacto de las anteriores soluciones con el material vegetal, así como el mismo material.
6. Bajo campana de flujo laminar, previamente esterilizada con etanol al 70% (v/v) se realizarán 5 enjuagues con agua destilada esterilizada al material.
7. Posteriormente el material vegetal será colocado en la superficie del medio de cultivo en cajas magenta con ayuda de pinzas, espátulas, etc.
8. Finalmente se etiquetará la caja y se sellará con kleen-pack y será colocada en cámara bioclimática a una temperatura de  $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  y un fotoperíodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad.
9. Realice las observaciones a partir del tercer día del establecimiento del cultivo.

## **ACTIVIDADES DE COMPRESIÓN O EVALUACIÓN**

1. ¿Cuáles son los métodos de esterilización más empleados para la desinfección del instrumental de disección en un laboratorio de cultivo de tejidos?
2. Describe el proceso de desinfección de tejido de cinco especies distintas.
3. De las sustancias empleadas en la desinfección de tejidos, ¿qué papel juegan el jabón y el alcohol?

## PRÁCTICA 2

### PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO Y SOLUCIONES STOCK

#### INTRODUCCIÓN

Los componentes de los medios para el cultivo de tejidos incluyen macronutrientes, micronutrientes, un suplemento de hierro, vitaminas, una fuente de carbono y usualmente, reguladores de crecimiento. Aparte del carbono, hidrógeno y oxígeno los constituyentes esenciales requeridos en relativamente grandes cantidades (macros) son el nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg) y azufre (S). Trazas de ciertos elementos (micros) minerales son requeridos por todas las células vegetales, se incluyen el hierro (Fe), manganeso (Mn), zinc (Zn), boro (B), cobre (Cu), molibdeno (Mo), cobalto (Co), níquel (Ni) y Cloruro.

Las vitaminas tienen funciones catalizadoras en ciertos sistemas enzimáticos por lo que también son necesarias en pequeñas cantidades. La tiamina es la única vitamina esencial para todos los cultivos pero el ac. nicotínico y la piridoxina pueden también estimular el crecimiento. El ac. ascórbico (vit. C) en combinación con el ac. cítrico es utilizado como antioxidante.

Todos los medios de cultivo requieren la presencia de una fuente de carbono y energía. Una respuesta óptima de crecimiento es determinante cuando se utiliza sacarosa o d-glucosa como fuente de carbón en el medio de cultivo, mientras que con otros sacáridos la respuesta es considerablemente variable. El myo-inositol es adicionado en algunos suplementos vitamínicos como un factor de crecimiento. Aunque este compuesto es un carbohidrato, tiene funciones especiales principalmente en la formación de fosfoinosítidos y fosfatidilinositol.

Los reguladores de crecimiento son utilizados en el medio de cultivo cuando se desea forzar la dirección de la morfogénesis o bien potenciar la multiplicación de tejido. Las Auxinas son compuestos que estimulan la elongación de las células de brotes- Son usadas para estimular la formación de raíces adventicias, inhibir la formación de yemas y juegan un rol importante en la embriogénesis. Las principales son el ácido indol-acético, ácido indol-butírico y ácido naftalenacético. El ácido 2,4-D es un regulador sintético que cumple funciones sobresalientes substituyendo auxinas, principalmente en la formación de tejido de callos, sin embargo, suprime la organogénesis, y no deben ser usados en medios que involucren la formación de brotes o raíz. Las citocininas promueven la división células de los tejidos bajo ciertas condiciones de ensayo. En el cultivo de callo estimulan la formación de brotes e inhiben la formación de raíz. Las citocininas son principalmente derivados de amino purinas. La combinación axino-citocininas regulan la división, elongación y diferenciación celular así como la formación de órganos. Otro grupo de reguladores de crecimiento son las giberelinas las cuales son usadas raramente, como en el caso de cultivos de meristemas.

Debido a la facilidad de manejo, los constituyentes de los medios de cultivos son preparados como soluciones stock de cada grupo, los cuales pueden variar desde concentraciones 10x para los macros, 100x para los micros y 1000x para las vitaminas. Para la preparación de un medio en particular que se deberán utilizar alícuotas de las soluciones stock en la cantidad necesaria para alcanzar la concentración de cada constituyente. Es recomendable mantener las soluciones stock en refrigeración hasta su uso.

El medio de cultivo de tejidos vegetales más utilizado, son las sales de Murashige y Skoog (MS) (1962).

## **OBJETIVO**

El alumno conocerá la función que tienen los distintos componentes del medio de cultivo en el desarrollo de inóculos vegetales, así como su preparación.

## **INVESTIGACIÓN REQUERIDA**

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

## **MATERIALES**

- Material de cristalería
- Reactivos
- Espátula
- Balanza analítica
- Placa de agitación y calentamiento
- Autoclave
- Agar
- Sacarosa
- Agitador magnético
- Agua destilada
- Recipientes para el medio de cultivo y soluciones stock.

## **DESARROLLO**

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

### 1. Preparación del stock de macronutrientes (10x):

Macronutrientes (10x)	Fórmula	gr·l <sup>-1</sup>
Nitrato de amonio	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	16.5
Nitrato de potasio	KNO <sub>3</sub>	19.0
Cloruro de calcio	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	4.4
Sulfato de magnesio	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	3.7
Fosfato diácido de potasio	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.7

- En un matraz erlenmeyer de 1000 ml, adicionar 250 ml de agua destilada. Colocarlo en una placa de agitación provista de un agitador magnético.
- Pesar y adicionar cada una de las sales en el orden indicado y esperar que se disuelva completamente antes de agregar la siguiente.
- Una vez concluido el proceso, aforar a un litro y colocarlo en un recipiente plástico y dejarlo en refrigeración hasta que se requiera.

### 2. Preparación del stock de microelementos (100x):

Micronutrientes (100x)	Fórmula	gr·l <sup>-1</sup>
Yoduro de potasio	KI	0.083
Ácido bórico	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.620
Sulfato de magnesio	MnSO <sub>4</sub> ·4 H <sub>2</sub> O	1.690
Sulfato de zinc	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.860
Molibdato de sodio	NaMoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.025
Sulfato cúprico	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.0025
Cloruro de cobalto	CoCl <sub>2</sub> ·6 H <sub>2</sub> O	0.0025

- En un matraz erlenmeyer de 1000 ml, adicionar 250 ml de agua destilada, colocar un agitador magnético y colocarlo en una placa de agitación.
- Adicionar cada una de las sales en el orden indicado, esperar que se disuelva completamente la sal antes de agregar el siguiente.
- Una vez concluido, aforar a un litro y colocarlo en un recipiente plástico y dejarlo en refrigeración hasta que se requiera.

### 3. Preparación del stock de vitaminas B5G:

- En un matraz de 1000 ml, colocar un agitador magnético y 250 ml de agua destilada.
- Pesar y agregar cada una de las vitaminas y esperar a que se disuelva cada una completamente antes de adicionar la próxima.
- Aforar hasta la marca del matraz.
- Colocarlo en refrigeración en un frasco ámbar.
- Cuando se necesite, calentar un poco para disolver los cristales.

#### 4. Preparación del stock de Hierro-EDTA (50x):

Fierro-EDTA	Fórmula	gr·l <sup>-1</sup>
Sulfato ferroso	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.325
EDTA	Na <sub>2</sub> EDTA	0.465

- En un matraz erlenmeyer de 500 ml, colocar un agitador magnético y calentar 100 ml de agua destilada.
- Pese y adicione el EDTA en el agua caliente, espere a que se disuelva completamente, antes de agregar el próximo químico.
- Pesar y agregar el sulfato ferroso y esperar a que se disuelva.
- Aforar a 250 ml y colocarlo en un frasco ámbar en refrigeración hasta su utilización.

#### **ACTIVIDADES DE COMPRENSIÓN O EVALUACIÓN**

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

## **PRÁCTICA 3**

### **BROTACIÓN MÚLTIPLE AXILAR**

#### **INTRODUCCIÓN**

La inducción de brotes múltiples a partir de segmentos nodales de inóculos vegetales es la técnica más frecuente en los sistemas de micropropagación, esto es debido a que el inóculo inicial contiene el material vegetativo diferenciado en forma de yema, el cual, mediante la acción de reguladores de crecimiento inducirá la formación de múltiples brotes. Una vez que un grupo de brotes ha sido formado, éste es subdividido en nuevos segmentos nodales, transfiriéndose a medio fresco para repetir el proceso. El continuo subcultivo continuará hasta la obtención del número deseado de propágulos. La tasa de micropropagación varía grandemente de especie a especie. Este proceso de propagación *in vitro* tiene la ventaja de que el material obtenido mantiene las características genéticas del material madre, teniendo mínimas probabilidades de mutaciones indeseables. La principal desventaja es que los propágulos obtenidos tendrán que ser sujetos a un siguiente proceso de enraizamiento *in vitro* o *ex vitro* para obtener la plántula completa.

#### **OBJETIVO**

Que el alumno realice cortes de segmentos nodales de material vegetal aséptico, y multiplique el material utilizando diferentes arreglos de reguladores de crecimiento, observando su comportamiento.

#### **INVESTIGACIÓN REQUERIDA**

Los reguladores de crecimiento y sus mecanismos de actividad.

#### **MATERIALES**

- El Material vegetal consistirá de plántulas desarrolladas *in vitro*, conteniendo de 4-8 segmentos nodales
- Campana de flujo laminar
- Mechero
- Bisturí
- Pinzas
- Cajas petri esterilizadas
- Recipiente con medio de cultivo
- Material de uso diario (algodón, alcohol, cerillos, atomizador)

## **METODOLOGÍA**

Realizar el procedimiento en la campana de flujo laminar:

1. A partir de cultivos asépticos, seleccionar plántulas conteniendo 4-6 segmentos nodales. Separarlas cuidadosamente del medio de cultivo mediante pinzas y colocarlas dentro de cajas de petri esterilizadas (3 por operación), cerrando nuevamente el frasco de cultivo.
2. Con ayuda de un bisturí eliminar la raíz y el brote apical colocándolos fuera en otra caja. Disectar los segmentos nodales dejando 1 cm de tallo en la base y 0.5 cm por encima del nodo.
3. Con pinza tomar uno a uno de los segmentos y colocarlos en el medio en la caja con medio de cultivo MS basal en un arreglo de 4x4, procurando que el nodo quede fuera de la superficie del medio.
4. Después de 10 días y verificar la asepsia del cultivo, transferir los segmentos al medio de brotación múltiple proporcionado por el instructor.
5. Colocar los frascos de cultivo en cámara bioclimática a las condiciones marcadas por el instructor
6. Hacer las observaciones cada tercer día.

## **ACTIVIDADES DE COMPRENSIÓN O EVALUACIÓN**

1. ¿Qué importancia tiene la técnica de brotación múltiple en la micropropagación?
2. ¿Qué papel juegan los reguladores del crecimiento en la técnica de brotación múltiple axilar?

# PRÁCTICA 4

## INDUCCIÓN Y MANTENIMIENTO DE CALLO

### INTRODUCCIÓN

El tejido de callo consiste de una masa celular amorfa producida en los inóculos sometidos a la acción de reguladores de crecimiento *in vitro* que inducen la división celular a una velocidad tal que este proceso es mayor que el de diferenciación o morfogénesis. Mediante esta técnica se pueden obtener grandes cantidades de material vegetativo que puede ser utilizado en la organogénesis indirecta de propágulos cuando no se cuenta con suficiente material vegetativo original o bien cuando se desea recurrir a la técnica de embriogénesis somática o a la de búsqueda de variantes somaclonales de material élite con el propósito de obtener marcadas diferencias en resistencias o tolerancias en estrés biótico o abiótico. Esta técnica también es de gran utilidad en la búsqueda de cultivos celulares en suspensión con características embriogénicas ya sea para procesos de micropropagación, obtención de metabolitos secundarios o de ingeniería genética.

### OBJETIVO

Que el alumno conozca las opciones de la inducción de tejido de callo para los diferentes procesos biotecnológicos.

### INVESTIGACIÓN REQUERIDA

Variación somaclonal, embriogénesis somática, ingeniería metabólica, semillas artificiales.

### MATERIALES

- Material vegetal aséptico
- Campana de flujo laminar
- Recipientes con medio de cultivo M2.5 sólido y líquido
- Bisturí, pinzas, cajas petri estériles
- Mechero, alcohol, algodón, atomizador, etc.
- Agitador orbital
- Equipo de detección

## **METODOLOGÍA**

El siguiente procedimiento deberá realizarse en la campana de flujo laminar:

1. A partir cultivos *in vitro*, separar plántulas completas y colocarlas dentro de cajas de petri esterilizadas (2 por operación), asegurándose de no arrastrar medio de cultivo en la raíz.
2. Disectar sobre la caja de petri esterilizada segmentos de 0.5 cm de hoja, tallo y raíz.
3. Colocarlas separadamente sobre la superficie del medio de cultivo M 2.5 (MS + 2.5 mg·l<sup>-1</sup> de 2,4-D), procurando que las superficie de corte del tejido quede sobre el medio.
4. Colocar los frascos de cultivo en cámara bioclimática a las condiciones marcadas por el instructor.
5. Realizar las observaciones semanalmente.

## **ACTIVIDADES DE COMPRESIÓN O EVALUACIÓN**

1. ¿Qué aplicaciones tiene la técnica de inducción y mantenimiento de callos a nivel comercial?
2. Define los términos de variación somaclonal, embriogénesis somática y semilla artificial.
3. Desarrolla una propuesta metodológica para la obtención de metabolitos secundarios en zarzamora.

# **PRÁCTICA 5**

## **CULTIVO DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN**

### **INTRODUCCIÓN**

El cultivo de suspensión celular es una extensión del cultivo de callo. Consiste del cultivo de células o grupo de ellas dispersas creciendo en un medio líquido agitado. El inicio de los cultivos celulares en suspensión deberá proceder de los cultivos de callo con características friables, capaces de mantener en suspensión los agregados celulares necesarios para iniciar el cultivo. La suspensión celular tiene la ventaja sobre el cultivo de callo en cuanto a que las células crecen individualmente dispersas, así como, tener más acceso al medio nutritivo. El propósito fundamental de este medio es potenciar la cantidad de material vegetativo para los fines biotecnológicos deseados. Esta herramienta es deseable en procesos involucrados en la obtención de cultivos embriogénicos para propagación, obtención de metabolitos secundarios, ingeniería metabólica, procesos de selección de mutantes sometidos a variaciones somaclonales, o bien a transformación genética.

### **OBJETIVO**

Que el alumno identifique los tejidos de callo con características friables capaces de iniciar los cultivos celulares, los aísle e inicie el cultivo en suspensión.

### **INVESTIGACIÓN REQUERIDA**

Metabolismo secundario vegetal, precursores e inductores moleculares de metabolitos secundarios.

### **MATERIAL**

- Cultivos de tejido de callo
- Recipientes con medio de cultivo M 2.5 líquido y sólido
- Inductores y/o precursores
- Campana de flujo laminar
- Agitador orbital
- Instrumental esterilizado: Pinzas, espátula, mechero, algodón
- Atomizador, alcohol

### **DESARROLLO**

El desarrollo de la práctica se realizará en la campana de flujo laminar:

1. A partir de un cultivo de tejido de callo disectar fracciones friables con ayuda de una espátula esterilizada, tallando suavemente la superficie del tejido.
2. Una parte del tejido aislado (aprox. 1 cm<sup>3</sup>) se colocará dentro de 2 frascos con medio de cultivo M 2.5 sólido. Distribúyalo sobre toda la superficie con ayuda de la espátula esterilizada.
3. Un frasco se colocará en cámara bioclimática con un foto período de 16:8 h luz:oscuridad a una temperatura de 27° C. Mientras que el otro se mantendrá en completa oscuridad (forrar con papel aluminio) a las mismas condiciones.
4. La otra parte del tejido aislado se colocará dentro de un matraz EM con medio M 2.5 líquido y se colocará dentro de un agitador orbital a 100 rpm bajo condiciones ambientales.
5. Hacer las observaciones semanalmente.

### **ACTIVIDADES DE COMPRENSIÓN O EVALUACIÓN**

1. ¿Qué importancia tiene la agitación durante el cultivo de células en suspensión?
2. Define qué es un metabolito secundario y su importancia económica.

# PRÁCTICA 6

## EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

### INTRODUCCIÓN

La producción de embriones somáticos a partir de células, tejido y cultivo de órganos puede ocurrir de manera directa e indirecta. La embriogénesis somática directa involucra la formación de embrión asexual a partir de una sola célula o de un grupo de células sobre una parte del tejido sin la intervención de la fase de callo; y la embriogénesis indirecta consiste en el establecimiento de un inóculo en cultivo, la subsiguiente proliferación de callo y el inicio de pro-embryones (usualmente sobre un medio con alta concentración de auxinas) y la transferencia del callo a un medio nutritivo con reguladores de crecimiento en orden a inducir la formación de embriones bipolares a partir de pro-embryones iniciales.

### OBJETIVO

Que el alumno desarrolle la producción de embriones somáticos de manera directa e indirecta.

### INVESTIGACIÓN REQUERIDA

Organogénesis, morfogénesis y etapas de la embriogénesis vegetal.

### MATERIAL

- Cultivo de suspensión celular
- Semillas
- Recipientes con medio de cultivo
- Campana de flujo laminar
- Cámara bioclimática
- Instrumental esterilizado: pinzas, espátulas, bisturí, cajas petri.
- Mechero, alcohol, algodón, etc.

### DESARROLLO

El procedimiento se realizará en la campana de flujo laminar:

#### Experimento A

1. A partir de un cultivo de células en suspensión, separar del medio líquido aproximadamente 1 cm<sup>3</sup> de tejido con ayuda de una malla esterilizada y realizar cuidadosamente 3 lavados con medio MS líquido.

2. Transferir la masa de células lavadas y drenadas a la superficie del medio de regeneración proporcionado por el instructor. Hacer el procedimiento por duplicado.
3. Una de las repeticiones colocarla dentro de cámara bioclimática con un foto período de 16:8 h luz:oscuridad a una temperatura de  $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .
4. El frasco con la otra repetición deberá ser forrado con papel aluminio (oscuridad) y se colocara junto al frasco anterior.
5. Realizar las observaciones semanalmente

#### Experimento B

1. Esterilizar por superficie las semillas proporcionadas por el instructor.
2. Dentro de campana de flujo laminar y sobre una caja de petri, aislar el embrión cigótico de las semillas esterilizadas.
3. Colocar los embriones sobre la superficie del medio de regeneración proporcionado por el instructor. Hacerlo por duplicado-
4. Colocar los dos frascos bajo las mismas condiciones de cultivo del experimento A.
5. Realizar las observaciones semanalmente.

#### **ACTIVIDADES DE COMPRENSIÓN O EVALUACIÓN**

1. Define los términos: organogénesis, morfogénesis.
2. ¿Cuáles son las etapas de la embriogénesis vegetal?

# PRÁCTICA 7

## MICROINJERTO

### INTRODUCCIÓN

El proceso de microinjerto, es utilizado como una técnica de propagación y conservación de especies vegetales que son propagadas vegetativamente o bien que requieren de un portainjerto para su mejor desarrollo o conservación fuera de su sitio de origen o distribución. Consiste en unir bajo condiciones de cultivo de tejidos dos porciones de plantas de diferentes especies. La planta inferior llamada patrón o portainjerto proporcionará el sistema radicular al inóculo que será la planta superior (injerto). Las especies seleccionadas a microinjertar son aquellas amenazadas en su supervivencia o bien aquellas que se desea sanear por esta técnica. Esta técnica también es importante para acelerar el desarrollo o salvar especies raras o en peligro de extinción que han perdido su sistema radicular, o bien para emplearse en procesos de saneamiento en los que el inóculo a utilizar son los meristemos provenientes de vegetales con características agronómicas u ornamentales sobresalientes.

### OBJETIVO

Evaluar el proceso de injerto *in vitro* como una técnica de conservación de especies amenazadas o en peligro de extinción utilizando distintos portainjertos.

### INVESTIGACIÓN REQUERIDA

Tipos de injerto y portainjerto.

### MATERIAL

- Material vegetal aséptico (patrón e injerto)
- Recipiente con medio de cultivo
- Campana de flujo laminar
- Cámara bioclimática
- Mechero de alcohol, pinzas, bisturí, algodón, cajas petri, consumibles, etc.

### DESARROLLO

El proceso de microinjerto requiere de plántulas de portainjerto y variedad a injertar germinadas *in vitro*, o bien de aislar y esterilizar por superficie el inóculo de la variedad a injertar.

Para esta práctica se desarrollará el microinjerto de especies de cactáceas amenazadas o en riesgo de extinción.

#### *1. Selección de portainjertos:*

Las especies que son utilizadas como portainjerto son aquellas cactáceas de crecimiento relativamente rápido y que soporten variadas condiciones edafoclimáticas para que garanticen la supervivencia al liberarse en jardines botánicos o para intercambio. Las principales especies que han sido utilizadas con éxito son el garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*), la biznaga (*Echinocactus platyacanthus*) y pitaya (*Stenocereus griseus*).

#### *2. Germinación aséptica del portainjerto:*

En un vaso de precipitados de 100 ml esterilizar por superficie las semillas proporcionadas por el instructor con etanol al 70% (v/v) por 5 min, seguido por 30 min en una solución de cloro comercial al 10% (v/v). Bajo campana de flujo laminar realizar 3 enjuagues de las semillas con agua destilada esterilizada y colocarlas sobre la superficie del medio MS. Mantener las cajas de cultivo en cámara bioclimática a 27°C hasta su germinación.

#### *3. Especies a microinjertar:*

Esterilizar por superficie como en el punto anterior las semillas de las especies proporcionadas por el instructor y germinarlas asépticamente.

#### *4. Disección de plántulas:*

Disectar con bisturí bajo condiciones asépticas los portainjertos y variedades a microinjertar. Se seleccionarán aquellas plántulas con tallas de 1 cm de altura y que coincidan con el diámetro de las especies que se montarán sobre el patrón. Deberá tener especial cuidado de que los cortes se efectúen perpendicularmente a la base del tallo para que coincidan al momento de acoplar las superficies de contacto.

#### *5. Acoplamiento del injerto:*

Bajo la campana de flujo laminar acoplar la variedad disectada sobre la superficie del portainjerto decapitado. Procure realizar esta operación sosteniendo ambos inóculos con pinzas y deslizando por unos segundos ambas superficies en contacto a fin de eliminar burbujas de aire y formar el conjugado. Este injerto de cara plana es el más recomendado.

#### *6. Cultivo de microinjertos:*

Una vez desarrollado el acoplamiento deberá colocarse el conjugado (portainjerto con variedad) en el medio de cultivo procurando que quede insertado el portainjerto en el medio y mantenga inmóvil la caja de cultivo por espacio de 30 días en cámara bioclimática a las condiciones marcadas por el instructor a fin de que cicatrice la zona de injerto y desarrolle un buen sistema radicular el portainjerto. Deberá tener precaución de eliminarse la formación de rebrotes del portainjerto para fortalecer el rápido desarrollo de la variedad.

#### *7. Aclimatación:*

Para este proceso se seleccionarán plántulas microinjertadas con sistema radicular claramente regenerado. Deberá tenerse especial cuidado de eliminar completamente los restos de medio de cultivo en la raíz bajo la corriente del grifo. Las plántulas se colocarán sobre un sustrato pasteurizado y se mantendrán bajo condiciones controladas de

humedad, la cual se irá disminuyendo progresivamente a fin de aclimatarlas a las condiciones ambientales.

### **ACTIVIDADES DE COMPRESIÓN O EVALUACIÓN**

1. ¿Cuáles son los diferentes tipos de injerto y porta injerto empleados en la micropropagación?
2. ¿Qué importancia comercial tiene la técnica de micro injerto?

# PRÁCTICA 8

## VARIACIÓN SOMACLONAL

### INTRODUCCIÓN

Una de las aplicaciones del cultivo de tejidos en el fitomejoramiento *in vitro* es la variación somaclonal. Esta puede ser inducida en la búsqueda de tolerancia a diferentes tipos de estrés. Los principales son tolerancia a salinidad, diversas condiciones de sequía y temperaturas, así como, resistencia a ciertas toxinas de bacterias y hongos fitopatógenos. Para esta técnica se requiere que una vez seleccionada el material élite se proceda a generar tejido de callo en suficiente cantidad para establecer los tratamientos. La variación esperada es en base a que los tejidos desdiferenciados por la acción de los reguladores de crecimiento y otros compuestos genera variantes somaclonales por lo cual dichos tejidos son sometidos a los estrés referidos para efectuar posteriormente una selección de aquellos tejidos que han soportado dichas condiciones.

### OBJETIVO

Que el alumno conozca las sustancias y condiciones de cultivo necesarias para que establezca los tratamientos de selección de variantes con distinto tipo de estrés.

### INVESTIGACIÓN REQUERIDA

Mecanismo de acción molecular de los reguladores de crecimiento.

### MATERIAL

- Cultivo de tejido de callo
- Medio de cultivo con tratamientos
- Cristalería esterilizada
- Equipo de disección esterilizado
- Etanol

### DESARROLLO

#### 1. Elaboración de los medios de cultivo:

- Preparar 1 litro de medio de cultivo MS sin agregar el agar.
  - En cada caja magenta colocar 100 ml del medio.
  - Preparar una solución de NaCl 1 M.
- Establecer los tratamientos de NaCl en el medio MS a las diluciones marcadas por el instructor.

- Ajustar el pH de cada bloque de tratamientos a 5.7.
- Agregar el agar a cada caja y disolver.
- Distribuir los tratamientos en cajas de cultivo debidamente etiquetadas.
- Esterilizar en autoclave los medios a 15 lb-in<sup>2</sup> por 20 min.

9

### *2. Establecimiento de los experimentos:*

- Los cultivos de callo a utilizar se disectarán asépticamente en fracciones volumétricas de aproximadamente 1 cm<sup>3</sup> y se mantendrán dentro de cajas de petri hasta su uso.
- Colocar una fracción volumétrica de callo en cada una de las repeticiones de los tratamientos, procurando que el tejido mantenga en contacto la mayor superficie de tejido sobre el medio.

### *3. Mantenimiento de los cultivos:*

- Todos los tratamientos se deberán mantener en cámara bioclimática a 27°C ± 2°C con un termoperíodo de 16:8 h luz:oscuridad.
- Se realizarán las observaciones cada tercer día.
- Después de 6-8 semanas realizar la selección de variantes y regenerar los tejidos.

## **ACTIVIDADES DE COMPRENSIÓN O EVALUACIÓN**

1. Define el término variación somaclonal y su aplicación comercial de esta técnica.
2. Comenta en clase cinco trabajos exitosos desarrollados con esta técnica.

# PRÁCTICA 9

## SELECCIÓN DE MUTANTES

### INTRODUCCIÓN

Los procesos de fitomejoramiento *in vitro* cuentan también con la utilización de mutágenos con propósito de seleccionar mutantes con características deseables aditivas al material élite. En la actualidad el más importante método empleado es la inducción de mutantes mediante la radiación de material vegetativo con rayos ultravioleta de Cobalto 60. Esta técnica puede ser empleada desde cultivos celulares hasta yemas y semillas. El efecto de la radiación provoca daños a nivel cromosómico en proporción a la intensidad y tiempo de radiación, por lo que la búsqueda de mutaciones deseables debe efectuarse sobre grandes poblaciones grandes de material.

### OBJETIVO

Que el alumno establezca los parámetros de selección de mutantes de acuerdo al tipo de inóculo utilizado.

### INVESTIGACIÓN REQUERIDA

Inducción de mutantes químicos y tipos de energía radiante ionizante.

### MATERIAL

- Semillas irradiadas previamente con rayos gamma proporcionadas por el instructor.
- Etanol
- Solución de Cloro
- Equipo de disección esterilizado
- Cristalería esterilizada
- Medio de cultivo MS

### DESARROLLO

#### *1. Germinación aséptica:*

- Esterilizar por superficie el material vegetativo proporcionado de acuerdo a la práctica N° 1.
- Germinar sobre medio de cultivo MS y mantener el cultivo a las condiciones de la práctica N° 1.

#### *2. Selección de mutantes:*

- Las plántulas germinadas con la presencia de hojas verdaderas se someterán al proceso de aclimatación para seleccionar en invernadero las variantes somaclonales deseables.

Deberá dejarse una réplica de cada tratamiento en condiciones *in vitro* para posteriores estudios.

- Las plántulas seleccionadas para aclimatación se les deberá de eliminar en agua corriente los restos de medio de cultivo, antes de establecerse en el sustrato hasta su progresiva aclimatación.
- Los parámetros a evaluar semanalmente en invernadero serán: altura, diámetro de tallo, n° de entrenudos, distancia internodal, área foliar, n° de flores, cuajado, características organolépticas del fruto.

### **ACTIVIDADES DE COMPRESIÓN O EVALUACIÓN**

1. ¿Qué métodos de inducción de mutantes se conocen en el mejoramiento genético de plantas?
2. Comenta en clase cinco trabajos exitosos desarrollados con esta técnica.

# PRÁCTICA 10

## TRANSFORMACIÓN GENÉTICA

### INTRODUCCIÓN

*Agrobacterium tumefaciens*, una bacteria gram-negativa del suelo induce tumores en muchas especies de plantas conocidos como agallas de la corona. Esto es debido a la capacidad natural de esta bacteria para introducir segmentos oncogénicos de ADN, colonizando las células vegetales por invasión de heridas en los tejidos. Derivado de este gran (Ti)-plásmido inductor de tumoraciones introduciéndose a las células de las plantas a través de heridas. El (T)-DNA transferido es integrado en el genoma de la planta vía una recombinación ilegítima. Los genes en el T-DNA codifican enzimas envueltas en la producción de una auxina y una citocinina, compuestos esenciales para el desarrollo y crecimiento de la planta. Otros genes T-DNA determinan enzimas que catalizan la formación de compuestos tumor-específicos llamados opinas. Genes de interés pueden ser introducidos en las plantas mediante ligación de ellos a la T-región vía recombinación (vector de integración) o por clonación entre los bordes repetidos presentes en un replicón independiente (vector binario). El *Agrobacterium* puede introducir la región T-DNA dentro de muchas especies diferentes de plantas, aunque algunas no responden con la formación de tumor. Sin embargo la eficiencia del T-DNA transferido puede variar dramáticamente para diferentes especies de plantas, cultivares o tipos de tejidos blanco.

*Arabidopsis thaliana*, una crucífera caracterizada por su corto ciclo de vida ha sido generalmente aceptada como un modelo experimental para el estudio de Biología Molecular y desarrollo de la Genética, representando un eficiente sistema para transformación. En esta práctica se reproducirá un procedimiento para la transformación de *Arabidopsis* usando *Agrobacterium tumefaciens* como el sistema de introducción de genes utilizando las raíces de plántulas crecidas *in vitro* como fuente de inóculo. Los inóculos de la raíz de *Arabidopsis* tienen un alto potencial de regeneración para la rápida formación de brotes. Para lograr la formación de brotes sobre toda la superficie de la raíz es necesario realizar un precultivo de 7 días máximo, en un medio conteniendo 2,4-D antes de cultivarlas en un medio con alta concentración de la citosina 6( $\gamma,\gamma$ -dimetilamino) purina [2-ip].

### OBJETIVO

Que el alumno compruebe mediante reacciones moleculares la integración de genes reporteros dentro del genoma vegetal.

### INVESTIGACIÓN REQUERIDA

Ácidos nucleicos, Ingeniería genética, microinyección, electroporación, biolística.

## MATERIAL

- Campana de flujo laminar
- Tubos de ensayo
- Cajas de petri
- Cajas magenta
- Cristalería de apoyo
- Instrumental
- Medio de germinación
- Medio de inducción de callo
- Medio de inducción de brotes
- Antibióticos: vancomicina, canamicina
- Material vegetal: Plántulas de *Arabidopsis thaliana* de 4-6 semanas de edad
- Cepa de *Agrobacterium tumefaciens*, ecotipo C24

## DESARROLLO

1. Esterilice por superficie las semillas de *Arabidopsis* y enjuague con agua esterilizada.
2. Coloque las semillas en medio de germinación e incúbelas por 7 días. Algunas especies de *Arabidopsis* antes de germinarse requieren de un tratamiento con frío almacenándose por una semana en refrigeración a 4°C. Esto puede ser realizado antes o después del cultivo aséptico.
3. Saque suavemente con pinzas las plántulas del medio de germinación, procurando obtener completo el sistema radicular y colóquelas en una caja de petri esterilizada.
4. Corte el sistema radicular del resto de la plántula en una caja de petri, eliminando la parte aérea. Para prevenir la desecación de las raíces manténgalas en la caja con un poco de agua esterilizada.
5. Incube el sistema radicular por tres días en el medio de cultivo para inducción de callo a temperatura ambiente. Cuide que las raíces se mantengan inmersas completamente.
6. Remueva las raíces del medio anterior y colóquelas en una caja de petri esterilizada. Corte las raíces en inóculos de 0.5 cm.
7. Transfiera los inóculos de raíz a cajas de petri conteniendo a 10-20 ml de medio líquido para cultivo de callo. Por conveniencia, en este paso puede colocar los inóculos en una malla tul o cedazo antes de colocarlos en el medio líquido, para que puedan ser infectados o lavados separándolos eficientemente de los tratamientos para evitar hacerlo uno a uno.
8. Adicione de 0.5-1 ml del cultivo de *Agrobacterium* crecido la noche anterior. Agite suavemente por 2 min. Únicamente, cultivos de *Agrobacterium* que fueron crecidos en medio LB no selectivo deberán ser usados.
9. Retire los inóculos y remueva el líquido colocándolos brevemente en un papel filtro esterilizado dentro de caja petri. Enseguida colóquelos dentro de las cajas con agar para cultivo de callo.
10. Incube los inóculos (50 por caja de petri) en cámara de cultivo por dos días para permitir la infección de *Agrobacterium*.

11. Transfiera los inóculos a dentro de 10-20 ml de medio líquido para inducción de callo. Agite vigorosamente para eliminar la agrobacteria. Secar los inóculos colocándolos por unos pocos segundos en un papel de filtro esterilizado.
12. Transfiera los inóculos al medio sólido selectivo 1 (V750, K50) conteniendo vancomicina y canamicina, tomando cuidado de que los inóculos estén en completo contacto con el agar.
13. Incube por dos semanas en cámara bioclimática. Después de 2-3 semanas aparecerá un tejido de callo verde sobre la superficie de los inóculos.
14. Transfiera los inóculos a medio selectivo 2 (V500, K50). Dos semanas después los callos empezarán a formar brotes. Estos brotes son a menudo vítreos debido a la presencia de la vancomicina. Bajar las dosis de vancomicina gradualmente desde 250 hasta 0 mg/l después de 5-6 semanas de cultivo.
15. Transfiera brotes no-vítreos normales a medio de germinación y cultívelos a baja densidad para permitir su establecimiento. 50 % de los brotes regenerados producirán raíz y podrán ser transferidos a suelo para su establecimiento. Sin embargo, ambos brotes enraizados o sin enraizar producirán semillas *in vitro* con igual eficiencia.
16. Para probar una estable transformación genética la expresión y segregación mendeliana de los marcadores genéticos introducidos se analiza en la progenie T2 de los brotes T1 transformados. Las semillas T2 serán germinadas en el medio GM K50 en cajas de petri e incubadas por dos semanas en cámara bioclimática. Germinados sensitivos no formarán raíz u hojas y desarrollarán cotiledónes blancos mientras que los germinados resistentes (germinados transgénicos) serán fenotípicamente normales.

## **ACTIVIDADES DE COMPRENSIÓN O EVALUACIÓN**

1. Comenta en clase cinco trabajos exitosos desarrollados con esta técnica.

# PRÁCTICA 11

## CRIOPRESERVACIÓN

### INTRODUCCIÓN

La criopreservación es el almacenamiento de material biológico a ultra-bajas temperaturas, usualmente en nitrógeno líquido (-196°C). Es el único método seguro actualmente disponible y rentable para la conservación a largo plazo de recursos genéticos.

Una multitud de factores influyen en la efectividad de la criopreservación de células, tejidos u órganos vegetales; por ejemplo, especie, tipo y tamaño de inóculo, edad y etapa de crecimiento, composición, pH y osmolaridad del medio de cultivo, contenido de agua del inóculo, composición y contenido de lípidos de la célula, densidad celular al congelamiento, tasa de enfriamiento, temperatura y duración del almacenamiento, adición de crioprotectores, tasa de descongelación y composición del medio de recuperación. La adición de agentes crioprotectores generalmente incrementa la tasa de supervivencia, sin embargo, existen casos de supervivencia sin aditivos protectores

En vegetales, la criopreservación de meristemas, brotes apicales, o brotes son potencialmente utilizados para colecciones de clones. Se utilizan dos metodologías generalmente. La primera es utilizar la habilidad de algunas especies para aclimatarse al frío o temperaturas muy bajas, considerando que la segunda utiliza la adicción de crioprotectores para reforzar la sobrevivencia de especies que no son resistentes al frío; los crioprotectores más utilizados son: el Dimetilsulfoxido (DMSO) o combinaciones de DMSO con sacarosa, glucosa, polietileno glicol o prolina.

Las primeras técnicas de criopreservación [clásicas] comprenden una serie de combinaciones de tratamientos crioprotectivos seguidos por el congelamiento y almacenamiento usando congeladores programables.

Para el congelamiento de tejidos y órganos diferenciados tales como ápices, embriones somáticos y cigóticos han sido desarrolladas nuevas técnicas recientemente. Estas están basadas en la remoción de la mayor parte del agua del tejido sin causar daños. Se pueden identificar los siguientes procedimientos de criopreservación: (I) encapsulación-deshidratación, (II) vitrificación; (III) encapsulación-vitrificación; (IV) deshidratación; (V) precultivo; (VI) precultivo-deshidratación, y (VII) congelamiento en micro-gotas.

### OBJETIVOS

- Evaluar el efecto de preacondicionamiento en distintos niveles de sacarosa en la regeneración de brotes apicales de *C. sinensis* (L.) Osbek var. valencia criopreservados.
- Establecer los niveles óptimos de vitrificación-deshidratación de los brotes encapsulados para la supervivencia de brotes criopreservados.

- Evaluar el efecto de la citocinina benciladenina (BA) en el recrecimiento de los brotes criopreservados.

## INVESTIGACIÓN REQUERIDA

Mecanismos naturales de resistencia a la congelación, criopreservadores

## MATERIAL

- Soluciones de sacarosa
- Solución de alginato de sodio al 3%
- Micro pipetas y puntas esterilizadas
- Filtros micropore de 0.22um
- Cristalería esterilizada: cajas de petri, matraces erlenmeyer, vasos de precipitado
- Instrumental esterilizado: pinzas, bisturí, espátulas

## DESARROLLO

### *1. Material vegetativo:*

Se utilizarán como fuente de brotes, baretas provenientes de árboles donadores de yemas de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck var. valencia conteniendo un promedio de 10 yemas cada una.

### *2. Preparación del inóculo:*

Después de lavarse con jabón líquido, las baretas se esterilizarán por superficie con una solución de etanol al 70% por 30 segundos y posteriormente en una solución de cloro activo al 0.06% por 20 minutos. Se enjuagarán con agua destilada esterilizada y se incubarán en probetas conteniendo agua esterilizada para la obtención de brotes de las yemas vegetativas. El proceso se desarrollará en cámara bioclimática a 27°C con un fotoperiodo de 16/8 h luz/oscuridad con una intensidad de 45  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  proporcionado por lámparas de luz fluorescente blanca.

### *3. Aislamiento y cultivo de brotes apicales:*

Después de 5 semanas de cultivo de las baretas, se seleccionarán arbitrariamente brotes con una longitud promedio de 1 cm. Se separarán de la baretas y se esterilizarán por superficie con una solución de etanol al 70% por 10 segundos y posteriormente con una solución de cloro activo al 0.06% por 15 minutos. Se enjuagarán en campana de flujo laminar con agua destilada esterilizada por 4 veces y se colocarán dentro de cajas de petri esterilizadas hasta su uso. Con ayuda de un estéreomicroscopio se disertarán los primordios de hoja hasta alcanzar a visualizar solo la presencia de 2-3 primordios cubriendo el domo meristemático, antes de aislar el brote apical (aprox. 1 mm.) con una navaja.

#### *4. Medios de cultivo:*

A todos los medios de cultivo se ajustará el pH a 5.7, se solidificarán con 8 gr·l<sup>-1</sup> de agar, y se esterilizarán a 120°C por 15 min. a 15 lb. de presión.

#### *5. Medio de cultivo de preacondicionamiento:*

Para el proceso de pre-acondicionamiento de brotes apicales se utilizará el medio de cultivo Murashige-Skoog (MS) al 50%, adicionado de sacarosa 0.22 M, 100 mg·l<sup>-1</sup> de mio-inositol, 0.2 mg·l<sup>-1</sup> de tiamina, 1 mg·l<sup>-1</sup> de piridoxina-HCl, 1 mg·l<sup>-1</sup> de ac. nicotínico.

#### *6. Medio de cultivo de regeneración:*

Para la regeneración de brotes encapsulados se utilizará el medio de cultivo MS (1962), adicionado de las vitaminas del medio de Gamborg (1963), 2 µM de BA, y 30 gr·l<sup>-1</sup> de sacarosa.

#### *7. Ensayos de preacondicionamiento a la sacarosa:*

Para evaluar los efectos de la sacarosa en el crecimiento y desarrollo después de la criopreservación, un grupo de brotes disectados se colocaron sobre la superficie del medio de cultivo de preacondicionamiento probándose concentraciones de sacarosa desde 0.09, 0.15, 0.22, 0.29 y 0.44 M. El grupo de brotes se mantuvo a temperatura constante de 27 °C y a un fotoperiodo de 16/8 h (luz/oscuridad) con una intensidad de 45 µEm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> proporcionado por lámparas de luz fluorescente blanca. Los parámetros a evaluar fueron altura de brotes, número de hojas expandidas completamente y porcentaje de materia seca de los brotes, 8 semanas después de iniciado el preacondicionamiento.

#### *8. Encapsulación-vitrificación:*

Para el proceso de encapsulación, los ápices fueron inmovilizados por inmersión directa en medio de cultivo MS adicionado con 3% (p/v) de alginato de sodio, 2 M de glicerol, y 0.4 M de sacarosa de acuerdo a la metodología descrita por Wang *et al.* (2000). Los ápices fueron removidos de esta solución con ayuda de una pipeta de 10 ml. esterilizada y fueron adicionados por goteo (1 ápice por gota) a una solución 0.1 M de CaCl<sub>2</sub> conteniendo glicerol 2 M y sacarosa 0.4 M a temperatura ambiente. Las esferas formadas (4 mm. de diámetro) conteniendo dentro el ápice se mantuvieron en la solución por 30 min. en agitación suave para consolidar la polimerización. Para la vitrificación, las esferas se removieron de la mezcla y se enjuagaron tres veces con medio MS de regeneración y se precultivaron paso a paso, en medio sólido enriquecido con incrementos de concentración de sacarosa de 0.3, 0.5, 0.7 y 1 M, por 4 días, un día en cada paso, en agitación continua de 100 rpm.

Las condiciones de cultivo fueron a temperatura constante de 27 °C y a un fotoperiodo de 16/8 h (luz/oscuridad) con una intensidad de 45 µEm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> proporcionado por lámparas de luz fluorescente blanca. Se evaluó el porcentaje de supervivencia.

#### *9. Deshidratación:*

Las esferas precultivadas se colocaron sobre papel filtro esterilizado dentro de cajas de petri y se deshidrataron en la corriente de aire de la campana de flujo laminar a temperatura y humedad ambiente por 8 h. Después de la deshidratación, diez esferas precultivadas fueron transferidas dentro de un vial de 2 ml y se almacenaron directamente

en nitrógeno líquido [NL] por 1 h. Para determinar el tiempo óptimo de deshidratación, se deshidrataron esferas precultivadas conteniendo el brote, tomadas del grupo de brotes preacondicionadas con 0.09 M de sacarosa por periodos de 0-10 h. El contenido de humedad de las esferas fue medido secándolas en estufa a 80°C por 48 h. Después de la deshidratación, se colocaron 10 esferas por tubo de 2 ml y se almacenaron directamente en el NL. El descongelamiento se desarrolló por inmersión de los viales sacados directamente del NL en agua a 40°C por 3 min. Se evaluó el porcentaje de supervivencia.

#### *10. Protocolo estandarizado:*

De acuerdo a los resultados preliminares de los efectos en la supervivencia de los brotes debidos al precultivo en sacarosa, encapsulación, vitrificación y deshidratación se estableció el siguiente protocolo:

Los grupos de brotes preacondicionados con 0.09, 0.15, 0.22 y 0.29 M de sacarosa en el medio respectivamente y encapsulados, fueron precultivados independientemente en medio sólido enriquecido con incrementos diarios de concentraciones de sacarosa desde 0.3, 0.5, 0.7, y 1.0 M por 4 días y entonces deshidratados hasta un 17% de humedad antes de almacenarse en NL por 1 h. Los brotes criopreservados se descongelaron rápidamente en agua a 40°C por 3 min. Se evaluó el porcentaje de supervivencia.

#### *11. Cultivo de regeneración:*

Las esferas descongeladas fueron postcultivadas en cajas de petri conteniendo el medio de regeneración en la oscuridad por 48 horas para posteriormente ser transferidos a las condiciones de cultivo del preacondicionamiento y evaluar la supervivencia. La supervivencia fue determinada por el porcentaje del número total de brotes que mostraron color verde después de 2 semanas de postcultivo. En la regeneración fue observada la formación de callo, elongación del brote y el número de hojas abiertas completamente después de 8 semanas de cultivo. Los efectos de las concentraciones de BA desde 0-4  $\mu$ M en la supervivencia y regeneración fue evaluada.

## **ACTIVIDADES DE COMPRENSIÓN O EVALUACIÓN**

1. ¿Qué es un crio preservador y cuántos tipos conoces?
2. ¿Qué mecanismos de resistencia a la congelación emplean los vegetales?

## BIBLIOGRAFÍA

- Cárdenas, B. A., 2013. La Biotecnología aplicada en la agricultura. Cultivo de Tejidos Vegetales. CDB-ITESM. Módulo III. ITA No.9. DGETA-SEP.
- Echenique V., Rubinstein C., Mroginski L. 2004. Biotecnología y mejoramiento vegetal. Ediciones INTA.
- Kole C.; Michler C., Abbott A.G.; Hall T.C. 2010. Transgenic crop plants. Volume 1: principles and development. Springer.
- Kole C.; Michler C., Abbott A.G.; Hall T.C. 2010. Transgenic crop plants. Volume 2: utilization and biosafety. Springer.
- Levitus G., Echenique V, Rubinstein C., Hopp E. Mroginski L. 2010. Biotecnología y mejoramiento vegetal II. Ediciones INTA.
- Martos N.M., y García G.L., 2005. Prácticas de biotecnología vegetal. Universidad de Granada, España. 68 p.
- Slater A., Scott N.W., Fowler M.R. 2008. Plant biotechnology: the genetic manipulation of plants, 2nd ed. New York: Oxford Univ. Press.