



**"Obtención de Células en
Suspensión a partir de Callos de**

DALEOPSIS GONCALVES"

**TITULACIÓN POR TESIS
PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**INGENIERA BIOTECNÓLOGA
PRESENTA**

MARIA DEI CARMEN GAI AZ GARCIA

CD. OBREGÓN, SONORA

NOVIEMBRE DE 2005

DEDICATORIAS

A Dios:

Por que tengo la seguridad que todo lo que he logrado ha sido por que tu lo has decidido así y nunca me dejaste de la mano para que no me sintiera sola ni derrotada infinitas Gracias por todo Señor

A mis Padres:

Que con su amor cuidado y apoyo me han mostrado su ejemplo de rectitud y respeto y me han guiado y me han brindado la confianza y apoyo para lograr lo que me proponga

A mi Mamanina: †

Por que me acompañaste y me permitiste acompañarte a pesar de todos los regaños, pero que se que me sigues cuidando desde donde estés junto con mis demás abuelitos los quiero mucho y ocupan en mi corazón en un lugar muy especial

A mis Hermanos:

Collo, Quinito, Diego, Andita y Susy, Por que cada uno es parte importante y mi vida no seria la misma sin ustedes y todos los recuerdos lindos que guardo a su lado, los quiero mucho

También a sus respectivas familias por que han venido a alegrar y enriquecer la familia

Y como no incluirte a ti Pupi que siempre has estado conmigo desde que tenia 1 mes de vida y hasta ahora siempre juntas, T. Q. M. pimita

A la Familia Ontiveros Galaz:

Por todo su apoyo y hospitalidad, por hacerme sentir una mas de la familia y por aguantarme tanto... Gracias no se como pagarles L.Q.M. mi pequeña gran familia Dios los bendiga

A Juan Carlos:

Por que me enseñas cada día que se puede ser feliz en la vida sin muchas complicaciones y me acompañas en cada momento apoyándome y dándome ánimos para seguir adelante... por que eres la fuerza y la ilusión de mi vida **TE AMO** ♡

A mis Amigos:

En especial a Vicky, por que me acompañaste desde siempre y me brindaste te cariño y confianza incondicional, por demostrarme que puedo contar contigo en cualquier momento... te quiero mucho Amiga

Mirsha, Tomas, David, Marissa, Canche, Peña, Yaya Claudia e Hiram y demás compañeros de carrera que ocupan un lugar importante en mi corazón y en la historia de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A mi *Alma Mater*, el Instituto Tecnológico de Sonora, por abrirme sus puertas y darme excelentes maestros que me dieron sus conocimientos y las armas para enfrentarme con valor a la batalla de la vida

A mi asesora Ing. Lorena Tineo García, por el tiempo dedicado aun cuando es lo que menos tiene, por su amistad, sus consejos su paciencia y por confiar en mi, para usted mi respeto y cariño

A mis revisores Mucio Osorio Sanchez, Amada Tamayo y Marco Antonio Gutiérrez, por regalarme un poco de su tiempo y por los comentarios oportunos que ayudaron a que este trabajo fuera mejor.

A mis Maestros, que me dieron las alas y la confianza para emprender el vuelo

Por ultimo a todo aquel que confió en mi me brindo su apoyo y estuvo presente tanto en los momentos difíciles como en los alegres a lo largo de este camino, quiero compartir con ustedes este logro por que sin su ayuda no podría haberlo hecho igual.

INDICE GENERAL

INDICÉ DE FIGURAS	
INDICÉ DE TABLAS	
INDICÉ DE GRÁFICAS	
RESUMEN	xii
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 JUSTIFICACIÓN	3
1.2 OBJETIVO GENERAL	4
1.2.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS	4
1.3 HIPÓTESIS	5
1.4 SUPUESTOS	5
II. REVISIÓN DE LITERATURA	6
2.1 GENERALIDADES DEL PALO FIERRO (Olneya tesota)	6
2.2.- CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES	14
2.3.- ETAPAS DEL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES	15
2.4.- TIPOS DE CULTIVOS IN VITRO	17
2.5.- FACTORES AMBIENTALES	18
2.5.1 La temperatura	17
2.5.2 La luz	19
2.6.-MEDIO DE CULTIVO	20
2.6.1 Composición Química	21
Sales inorgánicas	21
Vitaminas	22
Carbohidratos	22
2.6.2 Propiedades físicas	24
2.6.3 Medio Líquido	25
2.7.- REGULADORES DE CRECIMIENTO	26

Auxinas	26
Citocininas	27
Giberelinas	28
Ácido abcísico	29
2.8.- DIFERENCIAS ENTRE LA PROPAGACIÓN IN VITRO DE PLANTAS HERBÁCEAS CONTRA LEÑOSAS	30
2.9.- VENTAJAS Y DESVENTAJAS DEL CLONADO IN VITRO	31
2.10.- APLICACIONES DE LOS CULTIVOS IN VITRO	34
2.10.1 Obtención de clones	35
2.10.2 Mejoramiento genético	36
2.10.3 Obtención de productos naturales	36
2.11.- CULTIVO DE CELULAS EN SUSPENSIÓN	37
III. MATERIAL Y METODOS	42
3.1.- Localización del experimento	42
3.2.- Diseño Experimental	42
FASE I: Establecimiento aséptico del explante	42
Desinfección de las semillas.	43
FASE II: Obtención de las células en suspensión	43
PRIMER ENSAYO	43
3.3.- Tratamientos	44
SEGUNDO ENSAYO	46
TERCER ENSAYO	47
3.4.- Variables analizadas	47
3.4.1.- Contaminación	47
3.4.2.- Color	47
3.4.3.- Oxidación	48
3.4.4.- Decoloración	48
3.4.5.- Análisis Histológico	48
1. Fijación y deshidratación	48
2. Inclusión en parafina	49
3. Cortes en microtomo	50
4. Tinción	51
5. Montaje de las muestras	52

IV. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	54
4.1 Contaminación	54
4.2 Color	54
4.2.1 COLOR ENSAYO I	55
4.2.2 COLOR ENSAYO II	55
4.2.3 COLOR ENSAYO III	56
4.3 Oxidación	58
4.3.1 SEMANA 1 DE OBSERVACIONES (Ensayo 1)	59
4.3.2 RESULTADOS OBSERVADOS DE LA ENSAYO 1 (15 DÍAS)	60
4.3.3 RESULTADOS OBSERVADOS EN LA ENSAYO 2 (1 SEMANA)	63
4.3.4 OVBSERVACIONES DE LA ENSAYO 3 (1 SEMANA)	66
4.4 Decoloración	68
4.5 Peso	69
4.5.1 PESO ENSAYO I	69
4.5.2 PESO ENSAYO II	70
4.5.3 PESO ENSAYO III	70
4.6 Análisis Histológico	71
CONCLUSIONES	72
BIBLIOGRAFIA	74
ANEXOS	79

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: Componentes del Árbol de Palo Fierro	6
FIGURA 2: Flor de Palo fierro	8
FIGURA 3: Mujer Seri trabajando el Palo fierro	9
FIGURA 4: Árbol de Palo fierro (<i>Olneya tesota</i>)	9
FIGURA 5: Siembra en campana de flujo laminar. ITSON, 2005	12
FIGURA 6: Frasco con medio de cultivo estéril. ITSON 2005	12
Figura 7: Principales tipos de cultivo in vitro	18
FIGURA 8: Frasco con medio Líquido. ITSON 2005	25
FIGURA 10: Agitador para mantener los cultivos en suspensión. ITSON 2005.	38
FIGURA 11: Obtención de callos de Palo Fierro (<i>Olneya tesota</i>). ITSON 2005	42
FIGURA 12: Callo friable de Palo Fierro (<i>Olneya tesota</i>). ITSON, 2005	43
FIGURA 13: Siembra de los callos en medio líquido. ITSON 2005	45
FIGURA 14: Cultivo de células en suspensión. ITSON 2005	45
FIGURA 15: Filtrado y lavado de las células para resiembra. ITSON 2005	46
FIGURA 16: Resiembra de células a medio fresco. ITSON 2005	46
FIGURA 17: Equipo empleado para procesar la muestra. Cápsula de muestra 1) y Procesador de tejidos 2). ITSON 2005	49
FIGURA 18: Inclusión de la muestra en parafina. ITSON 2005	50
FIGURA 19: Microtomo para realizar los cortes a los cubos de parafina con la muestra, a la izquierda, a la derecha: Microtomo 1) y Plancha platina de microtomo 2). ITSON 2005	51
FIGURA 20: Proceso de tinción de la técnica "Peryodic acid shiff" (PAS). ITSON, 2005	52

FIGURA 21: Montaje de las muestras, sellado con bálsamo de Canadá. ITSON, 2005	53
FIGURA 22: Células en Suspensión de palo fierro (<i>Olneya tesota</i>). ITSON 2005	57
FIGURA 23: Células en suspensión, tratamientos 1 y 2 respectivamente, a la primer semana. ITSON 2005	59
FIGURA 24: Células en suspensión, tratamientos 3 y 4 respectivamente, a la primer semana. ITSON 2005.	59
FIGURA 25: Células en suspensión, tratamientos 5 y 6 respectivamente, a la primer semana. ITSON 2005	60
FIGURA 26: Células en suspensión tratamiento 7 a la primer semana. ITSON 2005	60
FIGURA 27: Células en suspensión, tratamientos 1 y 2 respectivamente, a los 15 días. ITSON 2005	62
FIGURA 28: Células en suspensión, tratamientos 3 y 4 respectivamente, a los 15 días. ITSON 2005	62
FIGURA 29: Células en suspensión, tratamientos 5 y 6 respectivamente, a los 15 días. ITSON 2005	63
FIGURA 30: Células en suspensión tratamiento 7 a los 15 días. ITSON 2005	63
FIGURA 31: Tratamiento 5 (4,0), repetición 3, que presento mas oxidación en el ensayo 1. ITSON 2005	64
FIGURA 32: Tratamiento 1(0,2) repetición 2, que presento menor oxidación en el primer ensayo. ITSON 2005	64
FIGURA 33: Células en suspensión, tratamientos 1 y 2 respectivamente, al terminar el segundo ensayo (Día 19). ITSON 2005	65
FIGURA 34: Células en suspensión, tratamientos 3 y 4 respectivamente, al terminar el segundo ensayo (Día 19). ITSON 2005	65
FIGURA 35: Células en suspensión, tratamientos 5 y 6 respectivamente, al terminar el segundo ensayo (Día 19). ITSON 2005	65
FIGURA 36: Células en suspensión tratamiento 7 a los al terminar el segundo ensayo (Día 19). ITSON 2005	66

FIGURA 37: Tratamiento 6 (4,0), repetición 3 y Tratamiento 7 (0,0) repetición 4 que presentaron mas oxidación al final del segundo ensayo. ITSON 2005	66
FIGURA 38: Tratamiento 4 (0,3) repetición 1, que presento la menor oxidación al final del segundo ensayo. ITSON 2005	66
FIGURA 39: Células en suspensión, tratamientos 1 y 2 respectivamente, al término del experimento, ensayo 3 (Día 30). ITSON 2005	67
FIGURA 40: Células en suspensión, tratamientos 3 y 4 respectivamente, al término del experimento, ensayo 3(Día 30). ITSON 2005	67
FIGURA 41: Células en suspensión, tratamientos 5 y 6 respectivamente, al término del experimento, ensayo 3 (Día 30). ITSON 2005	68
FIGURA 42: Células en suspensión, tratamiento 7 al término del experimento, ensayo 3 (Día 30). ITSON 2005	68
FIGURA 43: a) Tratamiento 3 (3,0) repetición 2, b) Tratamiento 6 (4,0), repetición 3 y c) Tratamiento 7 (0,0) repetición 4 que presentaron mas oxidación al final del experimento ensayo 3 (Día 30). ITSON 2005	69
FIGURA 44: Tratamiento 2 (0,2) repetición 3, que presento la menor porcentaje de oxidación al final del experimento ensayo 3 (Día 30). ITSON 2005	69
FIGURA 45: Células en suspensión de palo fierro (<i>Olneya tesota</i>) en crecimiento activo, con tinción PAS a 4X, 10X y 40X, respectivamente. Tomada en el Laboratorio de Histopatología veterinaria. ITSON 2005	72
FIGURA 46: Células en suspensión de palo fierro (<i>Olneya tesota</i>) Oxidadas, con tinción PAS a 4X, 10X y 40X, respectivamente. Tomada en el Laboratorio de Histopatología veterinaria. ITSON 2005	72

INDICE DE TABLAS

TABLA 1: Generalidades del Palo Fierro	8
TABLA 2: composición nutricional del medio de cultivo	24
TABLA 3: Dosis de Auxina y Citosinina utilizadas en el medio de cultivo para la obtención de células en suspensión	45
TABLA 4: Procesador de tejidos	50
TABLA 5: Procedimiento de tinción "Peryodic acid shiff"(PAS)	52
TABLA 7: Respuesta de las células a los tratamientos. ITSON 2005	59

INDICE DE GRÁFICAS

GRAFICA 1: Respuesta de la variable color a los tratamientos a través del tiempo, (Resiembra 1 - Primer Ensayo). ITSON 2005	56
GRAFICA 2: Respuesta de la variable color a los tratamientos a través del tiempo, (Resiembra 2 - Segundo Ensayo). ITSON 2005	56
GRAFICA 3: Respuesta de la variable color a los tratamientos a través del tiempo, (Resiembra 3 - Tercer Ensayo). ITSON 2005	57
GRÁFICA 4: Respuesta del peso a través del tiempo en los diferentes tratamientos, (Resiembra 1 - Ensayo 1). ITSON 2005	70
GRÁFICA 5: Respuesta del peso a través del tiempo en los diferentes tratamientos, (Resiembra 2 - Ensayo 2). ITSON 2005	71
GRÁFICA 6: Respuesta del peso a través del tiempo en los diferentes tratamientos, (Resiembra 3 - Ensayo 3). ITSON 2005	71

RESUMEN

El palo fierro es una especie con múltiples usos; Por lo tanto muy demandada actualmente. Se considera una especie endémica del desierto sonorense y por su lento crecimiento, la tala excesiva, crecimiento acelerado de la zona urbana y falta de protección esta en peligro de extinción; por lo que es importante cuidar su conservación.

Las técnicas de cultivo *in vitro*, se caracterizan por ocurrir a micro escala, en condiciones ambientales optimizadas, en un ambiente estéril y generalmente no responden al patrón normal de desarrollo de una planta. Las suspensiones celulares ofrecen ventajas como sistema de propagación masiva de plantas por las altas tasas de multiplicación que presentan y una mayor homogeneidad en las condiciones de cultivo.

En el presente estudio se probaron distintas dosis de fitorreguladores así como las condiciones óptimas para el establecimiento de suspensiones celulares de palo fierro (*Olneya tesota*). El diseño de este experimento fue completamente al azar, los datos se analizaron con el paquete estadístico SPSS y se realizó un análisis de varianza (ANOVA), el cual indico que los tratamientos fueron iguales estadísticamente ($P < 0.5$).

Se concluyo que el tratamiento que presento un mejor comportamiento fue el tratamiento 1 (2-0 mg/L de Ácido Naftalen Acético y Bencil Amiono Purina respectivamente), al observarse una menor oxidación, resultando también eficiente el tratamiento 2 (0,2).

En las resiembras en medio fresco, las células experimentaron estrés al cambio, sin embargo, unos días después se estabilizaron.

CAPITULO I

INTRODUCCION

Siempre que escuchamos la palabra palo fierro, pensamos en figuras artesanales de diferentes tamaños formas y figuras. Sin embargo, detrás de una figura artesanal existen aspectos interesantes que nos pueden dar una idea de que a nuestros recursos naturales no solo hay que utilizarlos, sino que hay que conservarlos y cuidarlos para que puedan permanecer por muchos años en nuestra naturaleza.

El Palo Fierro es conocido también como tesota y palo de hierro, es uno de los árboles más altos y frondosos que siempre se observa verde, alcanza a medir de 10 - 18 metros de altura y 4 m de ancho, sus flores aparecen de Mayo a Junio y son de color blancas a rosa púrpura. Es un árbol de lento crecimiento, se estima que, su ciclo de vida es entre 600-800 años y posiblemente hasta 1000. Su distribución es amplia, se considera endémica del desierto sonorense, ya que solo podemos encontrarla en Sonora, Baja California y Baja California Sur dentro de nuestro país y en los estados de Arizona y California, en los Estados Unidos. Actualmente es una especie protegida por el Gobierno Federal, ya que es considerada como una especie Sujeta a Protección especial debido a su aprovechamiento y al deterioro de su hábitat natural.

Es una especie de importancia ecológica dentro del ecosistema desértico, ya que un gran número de plantas vasculares depende de la especie, esto es, funciona como planta nodriza, principalmente durante sus etapas de

establecimiento y desarrollo inicial. El micro ambiente que se crea debajo de esta planta, permite a otras especies mitigar el estrés provocado por las variaciones ambientales extremas, tales como: cambios en la temperatura y humedad del suelo y radiaciones directas. Asimismo, proporcionan protección contra depredadores, mediante su cobertura espinosa.

Es utilizada como hábitat, forraje y sitio de anidación por diferentes insectos, aves, mamíferos y reptiles. El venado bura (*Odocoileus hemionus*), especie cinegética distribuida en el norte del país, que se alimenta de los renuevos de las ramas, así como el Berrendo Sonorense (*Antilocapra americana sonoriensis*) en la región de El Pinacate. Otras especies de fauna silvestre utilizan en alguna medida el follaje o alguna otra parte del palo fierro tales como la codorniz mascarita; algunos roedores y varias especies de aves del desierto.

Por todo lo anterior el Palo Fierro es considerado como una planta con protección especial de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana, bajo la clave NOM-059-ECOL-2001, esta especie vegetal se encuentra en la categoría de amenazada en peligro de extinción, debido a que es explotada irracionalmente por todas sus propiedades (López, 1990).

Por otra parte, existen pocos estudios en el noroeste de México, enfocados a evaluar a las poblaciones naturales de palo fierro, que determinen las necesidades para su protección y conservación. Tomando en cuenta la necesidad de realizar acciones urgentes de evaluación y protección de este importante recurso natural.

1.1 JUSTIFICACIÓN

El Palo Fierro (*Olneya tesota*), al igual que todas las especies vegetales que crecen en las zonas áridas o semiáridas del país, es de gran valor para la conservación de los ecosistemas. Es una fuente de forraje de excelente calidad tanto para la fauna silvestre como para el ganado bovino, ofrece sombra y protección para los mamíferos, así como áreas para la anidación para aves y reptiles. Bajo la copa de esta planta, se conserva más la humedad, y la acumulación de materia orgánica mejora las características químicas del suelo. El problema es que el uso que ha tenido el Palo Fierro no es bajo un plan de conservación del recurso y no considera el deterioro del medio ambiente. Muchas de las personas que utilizan la madera o leña de esta especie, no están concientes del daño ocasionado, además de que por parte de las instituciones encargadas no existe una adecuada promoción y vigilancia.

El cultivo *in vitro* representa una posibilidad de conservación de esta especie amenazada; Sin embargo es una técnica de detalles. Otra técnica que nos ofrece el Cultivo de Tejidos Vegetales es el Cultivo de Células en suspensión que por sus características a diferencia del cultivo en medio sólido, podría representar una alternativa mas eficiente y rápida para regeneración de plantas completas.

1.2 OBJETIVO GENERAL

Establecimiento de células en suspensión a partir de callos de la planta de palo fierro (*Olneya tesota*) utilizando fitorreguladores, auxina y citonina en el medio de cultivo.

1.2.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

-  Determinar la concentración y combinación óptima de fitorreguladores en células callosas de palo fierro (*Olneya tesota*) para la obtención de células en suspensión.

-  Evaluar la necesidad del cambio de medio de cultivo respecto al tiempo en que se agotan los nutrientes a las células cultivadas en suspensión.

1.3 HIPÓTESIS

- 🖨️ Existe una concentración y combinación óptima de fitorreguladores ANA y BAP para la obtención de células en suspensión de palo fierro (*Olneya tesota*).

- 🖨️ Para disminuir la oxidación de las células en suspensión de palo fierro (*Olneya tesota*) y lograr su establecimiento es necesario renovar el medio de cultivo.

Las técnicas, los materiales y métodos empleados son los adecuados para probar la hipótesis planteada en la presente investigación.

CAPITULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 GENERALIDADES DEL PALO FIERRO (*Olneya tesota*)

El palo fierro es un árbol de desierto (Tabla 1). Desde tiempos remotos su madera dura y de color oscuro ha servido de materia prima a las comunidades indígenas del desierto de Sonora. Los Mayos, Yaquis, Pápagos y Seris la han utilizado tradicionalmente para elaborar utensilios e instrumentos musicales. (<http://images.google.com.mx/images?q=palo+fierro>)

Antiguamente los Seris fabricaban con esta dura madera las puntas de sus arpones de pesca y zumbadores rituales para las ceremonias en las cuevas. (Figura 1)



FIGURA 1. Componentes del Árbol de palo fierro

(FUENTE:http://redescolar.ilce.edu.mx/redescolar/publicaciones/publi_biosfera/flora/palo_fierro/galeria.htm)

TABLA 1. Generalidades del palo fierro.

Nombre común	Palo fierro, Palo de hierro, Tesota.
Reino	Vegetal
División	Angiospermas
Clase	Dicotiledóneas
Orden	Fabales
Familia	Fabaceae
Nombre científico (género y especie)	<i>Olneya tesota</i>
Tipo de reproducción (sexual o asexual)	Sexual, por semillas.
Medio donde habita (acuático o terrestre)	Terrestre.
Tipo de ecosistema donde se encuentra	Desierto. Crece en las zonas áridas o semiáridas del país.
Distribución geográfica de la especie	Su distribución abarca el desierto de Sonora, la península de Baja California y el suroeste de los Estados Unidos (Arizona y California).
Factores ambientales o físicos: (luz, temperatura, agua, humedad, salinidad, altitud, etc.)	Habita en áreas de clima cálido y desértico.
Mecanismos de adaptación	El palo fierro y el mezquite viven cerca de los arroyos. Sus raíces son muy profundas y con ellas pueden tomar agua cuando no hay cerca de la superficie.
Categoría de protección o estatus (rara, amenazada, en peligro de extinción, extinta, sujeta a protección especial, etc.)	Es una especie muy longeva.
Factores que provocan que se encuentre en esta categoría	Amenazada, y según la Norma Oficial Mexicana, es un árbol que necesita Protección Especial. Se considera una especie endémica del Desierto Sonorense.
Factores que provocan que se encuentre en esta categoría	Tala excesiva de la especie, contaminación, crecimiento acelerado de la zona urbana y falta de protección.

(FUENTE: <http://images.google.com.mx/images?q=palo+fierro>)

Árbol de hoja perenne que crece lentamente y puede llegar a vivir hasta mil años. Su altura es de 6 a 9 m. y tiene ramas delgadas con espinas en la base de las hojas, las cuales son alternas, pinnadas y de color verde grisáceo. Sus flores, que aparecen de mayo a junio, son de color blancas a rosa púrpura o lavanda, tienen cinco pétalos y aparecen en racimos (Figura 2). La madera de este árbol se distingue por su dureza, es de color café tabaco y con ella se fabrican preciosas esculturas.



FIGURA 2. Flor de palo fierro

(FUENTE:<http://images.google.com.mx/images?q=palo+fierro>)

Del árbol de palo fierro también se hacen postes para cercas y horcones para sostener las viviendas, además de que tradicionalmente se ha usado como combustible. Otras partes del árbol se han aprovechado de diversas maneras: las flores en infusión para aliviar males del estómago y de los riñones, y con las semillas -tostadas y molidas- se hace una harina con la que se elabora pan, tortillas y atole. Según algunos estudiosos del tema, la calidad de la proteína y del aceite de las semillas es adecuada para la alimentación; además las semillas tienen un potencial comercial comparable al de la soya, del girasol, de la canola y del cártamo (<http://www.conabio.gob.mx>).

No obstante, la popularidad del palo fierro se debe a las figuras que desde hace algunos años empezaron a tallar los seris, quienes representan magistralmente en la negra madera las plantas y animales que habitan en sus territorios de arena y mar. (Figura 3) (<http://www.conabio.gob.mx>)



FIGURA 3. Mujer Seri trabajando el palo fierro

(FUENTE:<http://images.google.com.mx/images?q=palo+fierro>)

El palo fierro (*Olneya tesota*) es una especie endémica, y única dentro del género *Olneya*. Su distribución abarca el Desierto de Sonora, la península de Baja California y regiones desérticas de Arizona y California, en Estados Unidos, donde ofrece sombra, refugio y alimento a otras especies, por lo que se le considera como una planta nodriza.(Figura 4) Bajo su sombra se crea un ambiente más fértil y húmedo que mitiga el extremoso clima del desierto y propicia la germinación y crecimiento de otras plantas. Es, además, sitio de anidación de aves y hábitat de insectos, reptiles y pequeños mamíferos. Este árbol crece lentamente y puede vivir hasta 1000 años. (<http://www.conabio.gob.mx>)



FIGURA 4. Árbol de palo fierro (*Olneya tesota*)

(FUENTE: <http://images.google.com.mx/images?q=palo+fierro>)

Los seris llaman a esta planta Coomitin. Empezaron a tallar su madera seca y muerta a principios de la década de los años sesenta para elaborar figuras. Cuando se vio el éxito comercial de estas artesanías, otras personas, fundamentalmente los mestizos que habitan también la región, comenzaron a trabajar sus propias artesanías de palo fierro, aunque de manera más mecanizada, mediante el uso de sierras eléctricas, fresas, tornos y cepillos. Se estima que se utilizan alrededor de 5000 toneladas de madera de palo fierro para la elaboración de artesanías. Uno de los mayores peligros para tan valioso árbol es la siembra de pastizales en las regiones donde este habita. Muchas hectáreas del desierto sonorense se han desmontado para plantar una especie exótica de pasto, el zacate buffel, que sirve de alimento al ganado. Se habla de convertir también otras muchas hectáreas del desierto en pastizales (<http://www.conabio.gob.mx>).

Hay quienes consideran que esta es una de las grandes amenazas para el palo fierro y la biodiversidad del desierto, y piensan que la acumulación de materia seca de estos pastizales favorece los incendios y la introducción de especies no deseables; ambas cosas perjudiciales para el palo fierro (<http://www.imades.org/entorno/entorno05/olneya.htm>).

Otro de los grandes peligros para tan longevo árbol es su uso como carbón vegetal. La bióloga Rafaela Paredes, del Centro de Investigación y desarrollo de los Recursos Naturales de Sonora, nos explica: "Los productores de carbón prefieren utilizar la madera del mezquite junto con cierta cantidad de palo fierro, porque afirman que así el carbón tarda más en convertirse en ceniza. En Sonora se comenzó a fabricar carbón con fines comerciales en los años setenta. Allí existen, según algunos registros, 157 carboneras artesanales, aunque se sabe que existen otros muchos que operan ilegalmente. Sonora exporta el carbón a Arizona y a California, en Estados Unidos (<http://www.imades.org/entorno/entorno05/olneya.htm>).

Son necesarios recursos para llevar a cabo las investigaciones sobre el palo fierro y es importante realizar una adecuada campaña de educación ambiental que ofrezca información científica a los ganaderos, artesanos y carboneros acerca del valor ecológico de la especie (Conabio, 2002).

Cada vez que se corta un árbol de palo fierro para convertirlo en carbón, para plantar pastos o para elaborar artesanías, se está acabando con algo más que un ejemplar de una especie. "Es la piedra angular ecológica y cultural del desierto sonorense", dice Gary Nabhan, uno de los principales estudiosos de tan peculiar leguminosa arborescente. La protección de este viejo árbol que puede haber vivido la mitad de los años de nuestra era, es símbolo de cultura (Gurrola, 2005).

La Norma Oficial Mexicana que determina las especies en alguna categoría de peligro de extinción, ubica al palo fierro como una especie necesitada de protección especial. Un árbol de palo fierro puede vivir hasta 1000 años (Conabio, 2002).

Según el estudio de mercado realizado por la Asociación Mexicana de Arte y Cultura Popular, A.C., los centros de mayor venta de palo fierro son Nogales, La Paz, Cabo San Lucas, San Carlos, Mazatlán, Obregón y Álamos (http://www.conafor.gob.mx/programas_nacionales_forestales).

Los comerciantes de estos lugares compran las figuras de palo fierro a los intermediarios, que ganan en la transacción entre 15 y 25% del precio original (http://www.conafor.gob.mx/programas_nacionales_forestales).

2.2. CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

La historia del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales se remonta a unos 200 años, con la "Teoría de la Totipotencia" formulada por Schwann y Schleiden (1838). A partir de esta teoría nació el cultivo de tejidos y células vegetales (Ocampo, 1993).

Un siglo después, Nobécourt, Gautheret y White (1939) consiguieron el primer cultivo de tejidos vegetales auténtico *in vitro*. A partir de ése entonces y con los descubrimientos de las fitohormonas auxina y citoquinina (1955), el desarrollo en este campo ha sido meteórico (Hurtado y Merino, 1987).



FIGURA 5. Siembra en campana de flujo laminar. ITSON, 2005.

El cultivo *in vitro* se define como "El cultivo sobre un medio nutritivo, en condiciones estériles, de plantas, semillas, embriones, órganos, explante, tejidos, células y protoplastos de plantas superiores", (Figura 5)(Pierick, 1990).



FIGURA 6. Frasco con medio de cultivo estéril. ITSON 2005

Las técnicas de cultivo in vitro, se caracterizan por ocurrir a micro escala, en condiciones ambientales optimizadas, en un ambiente estéril y generalmente no responden al patrón normal de desarrollo de una planta, pudiendo un tejido aislado originar un callo o embriogénesis somática, por ejemplo, (Figura 6) Hoy en día, en nuestro país, la propagación in vitro, embriogénesis somática y organogénesis son las principales técnicas de propagación vegetativa para árboles de interés forestal. Se han logrado importantes avances, como por ejemplo la micropropagación de especies recalcitrantes a estas metodologías. (Tineo, 2001)

Estas técnicas comenzaron en los años 40 y representan una útil herramienta porque permite:

- Manipular genotipos en un periodo más corto de tiempo.
- Requerir de pequeñas cantidades de material de partida
- Superar las dificultades que presenta la propagación vegetativa en algunas especies.
- Obtener plantas libres de enfermedades
- No estar condicionados por las estaciones del año
- Obtener un alto número de individuos en un corto período de tiempo.
- En genética se puede utilizar en:
 - Conservación de germoplasma
 - Cultivo de embriones inmaduros

- Obtención de haploides
- Embriogénesis somática
- Mejoramiento genético de especies
- Recuperación de clones no viables

(Hurtado y Merino, 1987, Ocampo, 1993)

La reproducción asexual de plantas por cultivo de tejidos es posible gracias a que cada una de las células de un individuo vegetal, posee la capacidad necesaria como para permitir el crecimiento y desarrollo de un nuevo individuo, sin que medie ningún tipo de fusión de células sexuales o gametos, (Tineo, 2001).

Esta capacidad está dada por la información genética contenida en el ADN nuclear de cada célula somática y se denomina totipotencialidad celular. Básicamente la reproducción asexual se puede realizar debido a que las células poseen un mecanismo de división mitótico, mediante el cual, los vegetales cumplen sucesivas etapas de crecimiento y desarrollo. La división celular mitótica implica una replicación de los cromosomas de las células hijas, por lo que las mismas poseen un genotipo idéntico al de la célula madre. Así, las células vegetales crecidas en condiciones asépticas sobre medios de cultivo adicionados con reguladores del crecimiento (también llamados hormonas vegetales), pueden dividirse dando dos tipos de respuesta (Bidwell, 1990).

i) una desdiferenciación celular acompañada de crecimiento tumoral, que da lugar a una masa de células denominada callo, la cual si se crean las condiciones adecuadas es capaz de generar órganos o embriones somáticos,

ii) una respuesta morfogénica por la cual o se forman directamente órganos (organogénesis) o embriones (embriones somáticos), (Hurtado y Merino, 1987, Ocampo, 1993).

La primera respuesta se conoce como organogénesis o embriogénesis indirecta (mediada por un estado de callo) mientras que la segunda respuesta se considera organogénesis o embriogénesis directa. Cuando el órgano originado es un brote, el proceso se denomina caulogénesis (directa o indirecta). Básicamente el cultivo in vitro consiste en tomar una porción de una planta (ápice, hoja, segmento de tallo, meristemo, embrión, nudo, semilla, antera, etc.) y colocarla en un medio nutritivo estéril (usualmente gelificado, semisólido) donde se regenerarán una o muchas plantas, (Gurrola 2005).

La formulación del medio cambia según se quiera obtener un tejido desdiferenciado (callo), crecer yemas y raíces, u obtener embriones somáticos para producir semillas artificiales, (Sivori *et al* 1986).

Para lograr éxito en la propagación de una planta, deberá tenerse en cuenta la composición del medio nutritivo, ya que de ello dependerá, en gran medida, que se logre la expresión de la potencialidad celular total, es decir, que algunas células recuperen su condición meristemática. Para que ello ocurra, debe conseguirse la desdiferenciación y luego la rediferenciación. Un proceso de éste carácter sucede durante la formación de las raíces adventicias en el enraizamiento de estacas, la formación de yemas adventicias o cuando se busca la propagación de Begonias, Violeta africana o Peperonias mediante porciones de hojas, (Tineo, 2001).

No existen dudas que en todo intento de propagación vegetal, ya sea *in vitro*, o *in vivo*, el carácter del proceso de diferenciación está codificado en el genoma de la especie, pero dicha expresión está regulada por el balance hormonal propio del estado fisiológico del órgano, tejido o célula puesta en cultivo. Sin embargo, también se sabe que ese balance puede ser modificado por el agregado exógeno de compuestos que imiten la acción de las hormonas vegetales; esos compuestos denominados reguladores del crecimiento son los que se emplean en los medios de cultivo para conseguir la micropropagación de una planta, (Tineo, 2001).

2.3. ETAPAS DEL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES.

- 1) Elección de la planta y/o tejido donante de explantes.
- 2) Establecimiento: consiste en la desinfección de los explantes y su posterior adaptación al medio artificial de modo de inducir callo, brote, raíz o embrión somático según se desee.
- 3) Multiplicación: busca generar una masa vegetal suficiente para la regeneración del número de plantas necesarias.
- 4) Enraizamiento: durante esta etapa se busca la formación de raíces con el fin de convertir los brotes o embriones somáticos en plántulas completas.
- 5) Rusticación: es la adaptación de las plántulas obtenidas *in vitro* a las condiciones medioambientales *ex vitro*, (Hurtado Y Merino 1987, Bidwell, 1990).

El cultivo de tejidos ha sido considerado durante mucho tiempo como una mezcla de ciencia y arte. Fue considerada inicialmente como una técnica particularmente difícil de aprender. Sin embargo, estas dificultades de los comienzos están hoy en día prácticamente superadas gracias a factores como la disponibilidad de antibióticos, los medios de composición definida, las

instalaciones asépticas (salas de cultivo limpias, cabinas de flujo laminar, incubadores estériles,), dispositivos de cultivo (botellas con tapones filtrantes, placas de Petri ventiladas,). Los avances técnicos y la aparición de un buen número de compañías comerciales de suministro de medios, sueros, equipo y líneas celulares han hecho del cultivo celular una tecnología con buena reproducibilidad, (Pierik, 1990).

Podemos dividir el cultivo de tejidos en dos grupos de técnicas: el cultivo de órganos y el cultivo de células. El cultivo de órganos se puede definir como el mantenimiento de pequeños fragmentos de tejido u órganos completos *in vitro*, (Tineo, 2001).

El cultivo celular es la propagación de células dispersas tanto en suspensión como en monocapas sobre cristal o plástico, (Tineo, 2001).

2.4. TIPOS DE CULTIVOS IN VITRO

El material vegetal con el que se inicia un cultivo *in vitro* puede ser cualquier célula, tejido u órgano de la planta. Se puede partir de fragmentos de tallo, raíz, hoja, meristemas, embriones, es decir de tejidos somáticos, pero también se puede iniciar a partir de células o tejidos no somáticos: anteras, polen, microsporas, óvulos, etc. Según sea el explante utilizado se hablará de cultivo de secciones nodales, cultivo de hoja, de meristemo, de polen, de embriones, etc. Las condiciones de cultivo pueden pretender la proliferación desorganizada de las células del explante hasta dar lugar a un callo o incluso a un cultivo de células cuando se separan éstas del callo. Si se elimina la pared celular de las células se obtiene un cultivo de protoplastos, (Pierik, 1990).

En otros casos se puede pretender la regeneración de la planta completa (morfogénesis) mediante la formación de raíces (rizogénesis) y/o de tallos. La morfogénesis se produce a partir del explante inicial mediante la formación de raíces y/o tallos en posición normal o en posición no normal (adventiciasos), (Hurtado Y Merino, 1987).

Sí la morfogénesis se produce después de la formación de un callo, entonces se habla de morfogénesis indirecta, mientras que si se produce directamente del explante sin que este pase por una fase de callo, entonces se habla de morfogénesis directa. Una situación particular surge cuando en el explante se producen unas estructuras bipolares que presentan las propiedades morfológicas de los embriones zigóticos. Estas estructuras se denominan embriones somáticos. Según que estos embriones somáticos surjan directamente del explante o bien de un callo se habla de embriogénesis directa indirecta, respectivamente, (Figura 7),(<http://www.etsea2.udl.es/invitro/tipus.htm>).

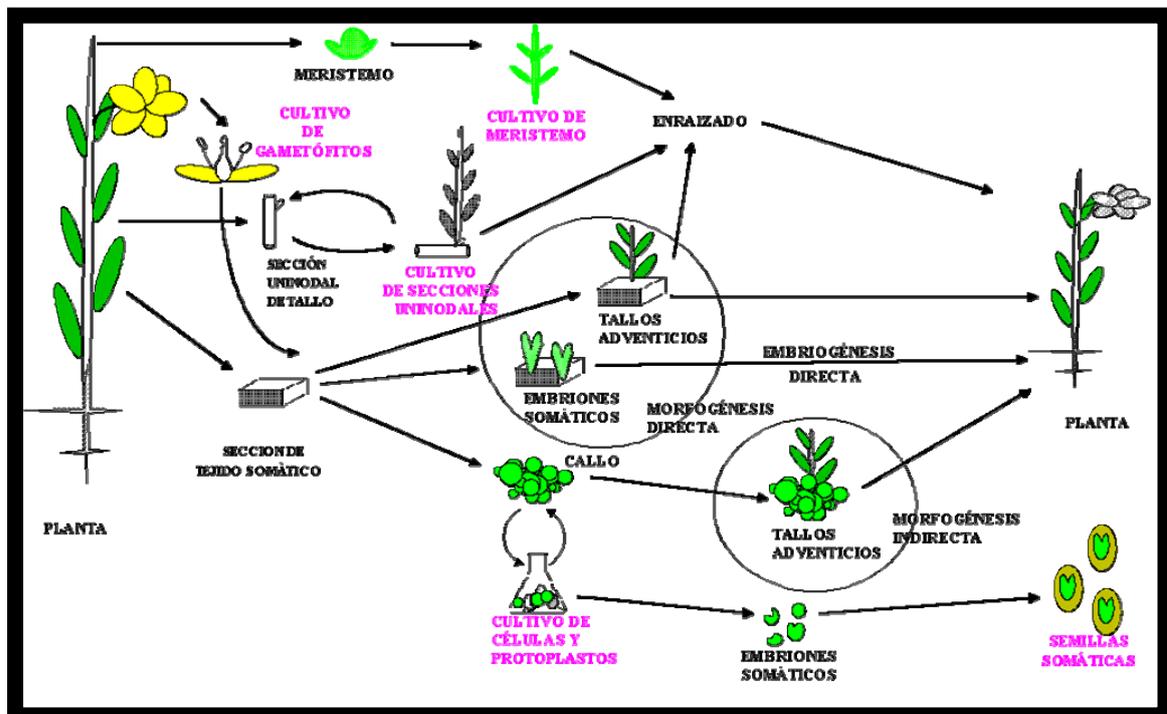


Figura 7. Principales tipos de cultivo in vitro.

(FUENTE: <http://www.etsea2.udl.es/invitro/tipus.htm>)

2.5. FACTORES AMBIENTALES

2.5.1 La temperatura

La temperatura a la que está expuesto el explante cultivado in vitro afecta a la mayoría de procesos fisiológicos y por consiguiente es un factor fundamental a controlar. En general, cada especie tiene un intervalo de temperaturas en el que se produce el crecimiento óptimo. Este intervalo puede variar en función del genotipo, del órgano del que se ha obtenido el explante, de la época del año, de la edad de la planta madre, del fotoperíodo, etc. Una complicación adicional se produce por el hecho de que puede existir interacción entre la temperatura óptima de crecimiento y otros factores como la luz, la composición del medio (p. ejemplo: en algunos casos se ha comprobado que se obtiene mayor rendimiento haciendo fluctuar la temperatura según el fotoperíodo), (Salisbury *et al* 1994).

Determinar la temperatura óptima de crecimiento para cada cultivo in vitro puede ser un proceso muy laborioso que, además, exige gran cantidad de cámaras de cultivo reguladas de forma diferente. Afortunadamente, y para la mayoría de situaciones, se pueden obtener resultados satisfactorios con temperaturas de incubación que oscilan entre los 20 y 28 ° C, (Tineo, 2001).

El control de la temperatura no es solamente importante porque pueda afectar al crecimiento del cultivo sino también porque puede ser un factor que induzca determinados procesos fisiológicos. Así, temperaturas bajas (del orden de 4-5°C) permiten superar los periodos de dormición de algunas leñosas y la conservación prolongada de determinados cultivos in vitro; mientras que una temperatura constante de 20° C induce la formación de raíces en la mayoría de coníferas, (Ocampo, 1993).

2.5.2 La luz

La luz, definida como una forma de energía radiante que se nos manifiesta mediante la visión es, en realidad, parte de un fenómeno físico más amplio: la energía radiante (radiación), que puede ser descrito según dos modelos diferentes: el modelo ondulatorio (radiación electromagnética) y el modelo corpuscular, (Bidwell, 1983).

Los diferentes tipos de radiación electromagnética se pueden clasificar según sea su longitud de onda, así podemos obtener un espectro electromagnético formado por las diferentes longitudes de onda de la radiación electromagnética, que van desde los 10^{-16} m hasta los 10^4 m. De todas estas longitudes de onda sólo las comprendidas entre 380 y 775 nm pueden ser percibidas por el ojo humano: ese conjunto de radiaciones es el que denominamos luz en el lenguaje coloquial. Como quiera que sólo una parte de la energía radiante (la luz y algunas de las radiaciones infrarrojas y ultravioletas próximas) tiene influencia conocida sobre el desarrollo de las plantas, a veces, se usa el término luz para referirse a ese conjunto de radiaciones cuando en realidad se refiere al conjunto de radiaciones electromagnéticas con efectos fisiológicos. La luz es uno de los factores principales que determinan el desarrollo de los organismos autótrofos, en ello radica la importancia de controlar el factor luz en los cultivos *in vitro*, (<http://www.etsea2.udl.es/invitro/indice.htm>).

Los aspectos relacionados con la luz que son importantes en los cultivos *in vitro* son:

La cantidad de luz: la irradiación

La calidad de la luz: el espectro

La alternancia de los ciclos de luz con los de oscuridad: el fotoperíodo, (Tineo, 2001).

2.6 MEDIO DE CULTIVO

El medio de cultivo es la combinación sólida o líquida de nutrientes y agua. Usualmente incluye sales inorgánicas, carbohidratos y vitaminas y aminoácidos. A menudo se denomina Medio Basal y puede ser suplementado con algún regulador de crecimiento y ocasionalmente con otras sustancias varias, (Hurtado Y Merino, 1987).

Los nutrientes son esenciales para el crecimiento y desarrollo de la planta: sin agua y nutrientes minerales una planta no puede vivir ni *in vitro* ni *in vivo*. También se debe añadir azúcares al medio de cultivo, ya que las plantas (o sus fragmentos) no son completamente autotróficas cuando se desarrollan en estas condiciones, (<http://www.etsea2.udl.es/invitro/medios.htm>).

2.6.1 Composición química.

➤ Sales inorgánicas

Los elementos minerales son muy importantes para la vida de las plantas. Por ejemplo: el Magnesio es parte de la molécula de clorofila, el Calcio es constituyente de la pared celular, el Nitrógeno forma parte de aminoácidos, vitaminas, proteínas y ácidos nucleicos. En forma similar, el Hierro, Zinc y Molibdeno son parte de ciertas enzimas. Además del C, H y O se conocen otros 12 elementos esenciales para el crecimiento de la planta: Nitrógeno, Fósforo, Azufre, Calcio, Potasio, Magnesio, Hierro, Manganeso, Cobre, Zinc, Boro y Molibdeno. Los 6 primeros son requeridos en cantidades relativamente

grandes y se los conoce como macro elementos, los 6 últimos son requeridos en cantidades pequeñas (<de $0,5 \text{ mmol l}^{-1}$) y se les denomina micro elementos. Cuando se elige una mezcla de macro y micro sales, se deben tener en cuenta los siguientes aspectos: La concentración total de sales puede ser importante. Existen medios "ricos" en sales (p. ejemplo. MS) y medios "pobres" en sales (p. ejemplo. White)

La forma más frecuente de añadir Nitrógeno (N) es en forma de iones NH_4^+ y NO_3^- . Las necesidades totales de N, varían entre $12 - 60 \text{ mmol l}^{-1}$. La mayor parte de las plantas prefieren el NO_3^- al NH_4^+ .

(<http://www.etsea2.udl.es/invitro/medios.htm>, Tineo, 2001).

➤ Vitaminas

La mayor parte de las plantas sintetizan casi todas las vitaminas esenciales, pero aparentemente lo hacen en cantidades infraóptimas. Para lograr un buen crecimiento es necesario a menudo suplementar al medio con una o más vitaminas. La tiamina (B1) es la que más se utiliza y se la considera un ingrediente esencial. Otras vitaminas también han demostrado tener un efecto positivo en el crecimiento in vitro, como son: pidiroxina (B6), ácido nicotínico (B3), pantotenato cálcico (B5), (Tineo, 2001).

➤ Carbohidratos

Normalmente para el cultivo in vitro de células, tejidos u órganos es necesario adicionar una fuente de carbono en el medio, debido a que el crecimiento in vitro tiene lugar en condiciones poco apropiadas para la fotosíntesis o incluso en oscuridad. La sacarosa es la más utilizada para propósitos de micropropagación. Generalmente se usan concentraciones de 1-6% de sacarosa en el medio, aquí es convertida rápidamente en glucosa y fructosa; la glucosa es la que primero se utiliza seguida de la fructosa. La Glucosa es la

fuelle de energía en muchos medios. Metabolizada preferentemente vía glucólisis hacia piruvato que puede ser convertido en lactato o acetoacetato que entra el ciclo de Krebs, y genera CO₂, (Tabla 2).

(Sivori *et al*, 1986, <http://www.etsea2.udl.es/invitro/indice.htm>)

TABLA 2. Composición nutricional del medio de cultivo.

Necesidades nutricionales y hormonales de los cultivos de órganos y tejidos vegetales		
Agua		
Sustancias orgánicas	Macro	Micro
	elementos	
Azúcares	N	Fe
Aminoácidos	P	Zn
Auxinas	K	B
Citoquininas	Ca	Mn
Giberelinas	Mg	Cu
Acido abcísico	S	Ni
		Co
		Al
		Mo
		I
Mezclas de sustancias poco definidas:		
Extracto de levadura		
Leche de coco		
Extractos vegetales		
Hidrolizados de caseína		
Peptona y triptona		

FUENTE: <http://www.etsea2.udl.es/invitro/medios.htm>

2.6.2 Propiedades físicas

El metabolismo de los tejidos se puede modificar por completo, dependiendo de que se encuentren en un medio sólido o en un medio líquido; por lo tanto es muy importante seleccionar el tipo de medio. En lo que respecta a los medios sólidos, la concentración de agar-agar y la calidad de este puede tener efectos muy claros, por ejemplo el crecimiento de Callos de papa pasa de sencillo a doble cuando la concentración aumenta de 0.8% a 1.0% (Anstis, 1973, citado por Vidaile et al, 1986) y las colonias de yemas de alcachofa presentan hiperhidricidad (las hojas jóvenes de alcachofas se vuelven muy turgentes y manifiestan un repentino crecimiento de 5 a 6 veces mas largas que las hojas normales, estas hojas se hacen translúcidas y luego mueren) en el agar-agar al 0.6%, mientras que desaparece cuando se aumenta la concentración hasta 1.1%. (Pierik , 1990).

La concentración adecuada de agar-agar presentará una variación de acuerdo al tipo de órgano cultivado, la calidad de agar-agar utilizado y el pH del medio. Por lo general mientras mas bajo es el pH, más líquido será el agar-agar, (<http://www.etsea2.udl.es/invitro/indice.htm>).

El medio líquido puede ser una fase necesaria en un proceso de multiplicación vegetativa: tal es el caso de los embriones somáticos de zanahoria y de los meristemos de clavel para obtener colonias de yemas laterales. La velocidad de agitación de los medios líquidos suele ser baja en el caso de cultivo de órganos (casi 1 rpm) y mayor para los cultivos celulares (de 100 a 150 rpm), (Hurtado Y Merino, 1987).

Los intercambios gaseosos son muy importantes. Estos cambios se hacen por difusión en el espacio existen entre la tapadera y el recipiente; las diferencias de concentraciones de gas entre el recipiente y el exterior determinan estos intercambios, así como las variaciones de temperatura, (<http://www.etsea2.udl.es/invitro/indice.htm>).

Algunas investigaciones demuestran que la libre difusión de oxígeno libre hasta los tejidos puede influir de manera significativa en la organogénesis; otras señalan que una modificación de los intercambios gaseosos pueden provocar una modificación de la morfología de las plántulas, (<http://www.etsea2.udl.es/invitro/indice.htm>).

2.6.3 Medio Líquido

Medio líquido es aquel en el que la solución de nutrientes y reguladores no ha sido solidificada por la adición de ningún agente gelificante, (Figura 8).



FIGURA 8. Frasco con medio Líquido. ITSON 2005

El uso de medio líquido ofrece las siguientes ventajas e inconvenientes respecto al uso de medio sólido:

Facilita la absorción de nutrientes por parte del explante.

Es más fácil la manipulación para cambiar medios.

Cualquier exudado de la planta se diluye con mayor facilidad.

Se puede utilizar como medio puente para agregar algún compuesto en una determinada etapa del cultivo en medio sólido.

Existen algunas especies que crecen mal en medio líquido.

Si resulta posible el cultivo en medio líquido, se debe considerar el problema de la aireación. Se puede cultivar el explante parcialmente sumergido, y si se necesita una inmersión total se debe utilizar un agitador, (López, 2000, Ocampo, 1993, Tineo, 2001).

2.7. REGULADORES DE CRECIMIENTO

Un regulador de crecimiento vegetal es un compuesto orgánico que se sintetiza en alguna parte de la planta y que se trasloca a otra parte donde concentraciones muy bajas causan una respuesta fisiológica, (Sivori *et al* 1986).

Adicionalmente a los nutrientes, generalmente es necesario agregar una o más sustancias reguladoras; frecuentemente auxinas y/o citoquininas, pero a veces también giberelinas o ácido abscísico, para mejorar el desarrollo del cultivo in vitro de tejidos y órganos. Por otro lado, los requerimientos de estas sustancias varían considerablemente con los tipos de tejidos y los niveles endógenos de estos reguladores, así como con la finalidad del cultivo in vitro, (Sivori *et al* 1986).

✓ Auxinas

Se relacionan con la elongación, tropismo, dominancia apical, abscisión, enraizamiento y otros. En cultivo in vitro las auxinas son utilizadas principalmente para la diferenciación de raíces y la inducción de callo. Las auxinas más utilizadas son: IBA (ácido indol-3-butírico), NAA (ácido naftalenacético), IAA (ácido indolacético) y 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético). El IBA y el NAA son usados frecuentemente para enraizamiento. El 2,4-D es muy efectivo para la inducción de callos. Las auxinas se disuelven usualmente en etanol diluido o en una solución de Hidróxido de Sodio, (<http://www.etsea2.udl.es/invitro/indice.htm>).

Lugares principales de formación

- Meristemos
- Embriones
- Hojas verdaderas

Transporte dentro de la planta

- Difusión adireccional
- En el tallo en coleóptilos : desde el ápice hasta la base
- En la raíz hacia el ápice

Efectos que Favorece

- Crecimiento de elongación
- División del cambium
- Dominancia apical
- Formación de raíces laterales.
- Enraizamiento

(Sivori *et al* 1986, Salisbury , 1994)

✓ Citocininas

Están implicadas en la división celular, modificación de la dominancia apical, diferenciación de tallos y otros. En los medios para cultivo *in vitro* se incorporan

citoquininas para promover la división celular y la inducción de yemas adventicias en callos y órganos. Además se usan estos compuestos para la proliferación de tallos axilares por la ruptura de la dominancia apical. Las citoquininas más usadas son: BAP (bencilamino purina), quinetina y 2-ip (isopentenil-adenina). Generalmente son diluidas con Ácido Clorhídrico o Hidróxido de Sodio, (Tineo, 2001, Hurtado Y Merino, 1986).

Lugares principales de formación

- Semillas en germinación
- Ápices radiculares
- Tejidos en crecimiento

Transporte dentro de la planta

- Apolar

Efectos que Favorecen

- Metabolismo en general
- División celular
- Elongación celular
- Desarrollo de yemas laterales
- Anulan el letargo de las semillas
- Retardan la senescencia

(Hurtado Y Merino, 1986, Salisbury *et al* 1994)

✓ Giberelinas

Existen multitud de giberelinas conocidas. La de mayor uso es el GA3, pero debe tenerse en cuenta que es muy sensible al calor (pierde el 90% de su

actividad después del auto clavado). Comparado con las auxinas y citoquininas, las giberelinas se utilizan raramente. La mayoría de los explantes sintetizan cantidades suficientes de este grupo de hormonas. Cuando se aportan giberelinas al medio de cultivo, su función principal es el alargamiento de las regiones subapicales. El GA3 es soluble en agua fría hasta 1000 mg l⁻¹, (Salisbury, 1994).

Lugares principales de formación

- Meristemos primarios
- Semillas y frutos inmaduros
- Hojas jóvenes

Transporte dentro de la planta

- Apolar
- En algunas raíces polar del ápice a la base

Efectos que Favorecen

- Crecimiento de elongación
- División del cambium
- Dominancia apical
- Inducen la floración
- Detienen los estados de reposo en semillas y yemas

(Salisbury, 1994).

✓ Ácido abscísico

El Ácido Abscísico (ABA) en la mayor parte de los casos produce un efecto negativo en los cultivos in vitro, pero en determinados casos promueve la maduración de embriones, y en cultivos de células en suspensión facilita la sincronización de la división celular, (<http://www.etsea2.udl.es/invitro/indice.htm>).

Lugares principales de formación

- Hojas
- Semillas maduras
- Diversas partes de la planta

Transporte dentro de la planta

- En tallos jóvenes y entrenudos de arriba a abajo

Efectos

- Favorece abscisión de frutos
- Activa estados de reposo
- Compensa efectos de IAA y GA3
- Regula cierre de estomas (falta de H₂O)
- Promueve la floración en plantas de día corto y la inhibe en las de día largo, (Ocampo, 1993).

2.8.- DIFERENCIAS ENTRE LA PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE PLANTAS HERBÁCEAS CONTRA LEÑOSAS

Una de las diferencias más notables entre las especies herbáceas y leñosas es que estas últimas son mucho más difíciles de clonar *in vitro*. Las razones para que esto ocurra son (Kunneman-Kooij, 1984; Pierik, 1975; Bonga y Durzan, 1982, citados por Bidwell, 1990):

1. las especies leñosas tiene una capacidad regenerativa relativamente débil, si se compara con las especies herbáceas
2. la investigación con árboles y arbustos se inició más tarde
3. la inducción del rejuvenecimiento es por lo general extremadamente difícil en las especies leñosas

4. la velocidad de multiplicación es mucho más baja en las especies leñosas que en las herbáceas
5. la dormición juega un papel en el caso de los árboles y arbustos, ya que las yemas pueden no abrirse y no tiene lugar el alargamiento de los tallos
6. la topófisis juega un papel más importante en las especies leñosas
7. las especies leñosas son más propensas a ser afectadas por la excreción de sustancias tóxicas en los medios nutritivos
8. la esterilización es mas difícil en leñosas, que generalmente crecen en el exterior
9. los árboles y arbustos son por lo general sólo pueden ser seleccionados para el clonado, cuando son adultos. Debido a que el material adulto es normalmente muy difícil, si no imposible de propagar *in vitro*, los problemas que surgen son muchas veces insuperable
10. la variación genética en los árboles suele ser mas grande que en los cultivados agrícolas , dando lugar a resultados variables
11. habitualmente no se dispone de material de invernadero en el caso de las especies leñosas, teniéndose que tomar los explantes de árboles desarrollados en el campo. También existe una variación considerable en los explantes, debido a las diferentes condiciones de crecimiento y a las variaciones anuales del clima

(Bidwell, 1990, Tineo, 2001)

2.9. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DEL CLONADO *IN VITRO*

Ventajas:

1. La multiplicación *in vitro* es más rápida que la multiplicación *in vivo*
2. A veces es posible propagar especies *in vitro*, que no pueden ser multiplicadas *in vivo*, esto es posible en muchos casos debido al fenómeno del rejuvenecimiento, que sólo es posible realizarlo *in vitro*
3. El crecimiento de las planta propagadas *in vitro* es frecuentemente más vigoroso que el de las clonadas *in vitro*; esto se debe sobre todo al rejuvenecimiento y/o al hecho de que las plantas *in vitro* se encuentran libres de enfermedades. Cameron y otros (1986) demostraron que la mayor productividad y vigor de las plantas de fresa micropropagadas estaban relacionadas con sus propiedades de intercambio gaseoso
4. Utilizando el cultivo *in vitro* es posible, en principio, conseguir una multiplicación libre de enfermedades, bien por una rigurosa selección del material inicial, o bien liberando el material inicial de enfermedades.
5. También resulta posible el transporte de plantas libres de enfermedades, en las condiciones *in vitro* (sin suelo)
6. Ya que se necesita una cantidad de material relativamente pequeña para iniciar un cultivo *in vitro*, se puede realizar una cuidadosa selección del mismo antes de iniciar el cultivo, la pronta iniciación de ensayos de campo
7. Permite en cualquier caso una posterior selección

8. La propagación *in vitro* puede suponer elevados ahorros en combustible, espacio de invernadero, etc. El área que se necesita para el cultivo de portainjertos y lechos de multiplicación queda disminuida en el caso del cultivo *in vitro*
9. Debido a la existencia de condiciones perfectamente controladas (medio nutritivo y medio físico), que permite una gran precisión en el calendario de una producción homogénea a lo largo del año
10. La propagación *in vitro* implica que las plantas son cultivadas con un propio sistema radical, haciendo, por tanto, innecesario el injertado y ahorrando una gran cantidad de trabajo. Esto resulta especialmente importante en especies como la rosa y el lilo,
(Bidwell, 1990, Tineo, 2001, Ocampo, 1993).

No cabe duda que en algunas ocasiones el clonado *in vitro* puede tener desventajas:

1. En algunos sistemas de propagación *in vitro* la estabilidad genética es débil
2. Las plantas producidas *in vitro* pueden mostrar características poco convenientes *in vivo*: Excesiva producción de ramas laterales y paso total a la fase juvenil
3. En el caso de las plantas leñosas especialmente, la inducción de raíces es con frecuencia muy difícil. En otra ocasiones las raíces formadas *in vitro* pueden resultar no funcionales y necesitar ser reemplazadas *in vivo* por nuevas raíces adaptadas al suelo

4. La transferencia de las plantas desde el tubo de ensayo al suelo es muy difícil de conseguir
5. Cuando las plantas, que deberán ser cultivadas en el exterior, han sido clonadas in vitro y después transplantadas al suelo, existe el peligro de que el clon muera por la acción de patógenos, tan pronto como surja una nueva cepa de microorganismos, a la que la planta no sea inmune
6. Se puede perder la capacidad regeneración por cultivos de callos o de células en suspensión, repetidos
7. En algunos casos el aislamiento estéril es extremadamente difícil de realizar
8. El clonado in vitro exige una aportación de mano de obra importante, lo que redundará en precios relativamente altos para las plantas que se producen de esta forma, (Bidwell, 1990, Hurtado Y Merino, 1986).

2.10. APLICACIONES DE LOS CULTIVOS IN VITRO

Las aplicaciones del cultivo de células, tejidos y órganos se puede resumir de la siguiente manera:

CULTIVO DE MERISTEMOS (Propagación clonal, obtención de plantas libres de virus y conservación de germoplasma)

CULTIVO DE ANTERAS, POLEN Y OVULOS (Obtención de mutantes y plantas haploides)

CULTIVO DE "CALLOS" (Selección de variantes y mutantes)

CULTIVO DE CELULAS EN SUSPENSION (Selección de variantes o mutantes y producción de metabolitos secundarios)

CULTIVO DE PROTOPLASTOS (Selección de mutantes, hibridación somática e ingeniería genética de plantas)

(<http://www.etsea2.udl.es/invitro/medios.htm>, Tineo, 2001).

Los cultivos in vitro han sido utilizados para la realización de estudios bioquímicos, fisiológicos y genéticos

Obtención de clones

Esta es una aplicación de suma importancia pues nos permite obtener organismos genéticamente iguales a aquellos que estamos clonando. Esto es de un impacto tremendo en la industria de alimentos, dado que sólo es necesario obtener un solo individuo con las características que necesitamos comercializar, y posteriormente clonar todos los individuos que necesitemos para producir determinada cantidad de productos. La clonación es un método usual de reproducción en la naturaleza en el caso de muchos vegetales, y que es una práctica agrícola habitual en la reproducción vegetativa de muchas plantas leñosas (estacas, injertos.) y en algunas herbáceas (esquejes, tubérculos). El mercado internacional pide anualmente un volumen de 600 a 700 millones de plántulas, lo que plantea un interesante nicho para todas las empresas especializadas en la biotecnología vegetal,

(<http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/cap1.htm#arriba>, Pierik, 1990).

Mejoramiento genético

Esta aplicación nos permite seleccionar las mejores características de varias especies vegetales y conjuntarlas todas en uno o más individuos. Esto se ha hecho ya con una gran variedad de alimentos, ayudando a mejorar su consistencia, resistencia a enfermedades, sabor, color, textura, propiedades nutritivas, tasa de producción por hectárea, etc. La FAO reconoce que la Ingeniería Genética puede contribuir a elevar la producción y productividad en la agricultura, silvicultura y pesca. Puede dar lugar a mayores rendimientos en tierras marginales de países donde actualmente no se pueden cultivar alimentos suficientes para alimentar a sus poblaciones. Existen ya ejemplos de la ayuda que la Ingeniería Genética presta para reducir la transmisión de enfermedades humanas y de los animales gracias a nuevas vacunas. Se ha aplicado la Ingeniería Genética al arroz para que contenga pro vitamina A y hierro, lo que mejora la salud de muchas comunidades de bajos ingresos, (Pierik, 1990, Dodds, 1986).

Otros métodos biotecnológicos han dado lugar a organismos que mejoran la calidad y consistencia de los alimentos o que limpian derrames de hidrocarburos y eliminan metales pesados en ecosistemas frágiles. El cultivo de tejidos ha producido plantas que elevan los rendimientos de los cultivos proporcionando a los agricultores material de plantación más sano. La selección con la ayuda de marcadores y la caracterización del ADN permiten desarrollar genotipos mejores de todas las especies vivientes de forma mucho más rápida y selectiva, (Tineo, 2001).

Proporcionan también nuevos métodos de investigación que pueden contribuir a la conservación y caracterización de la biodiversidad. Las nuevas técnicas permitirán a los científicos reconocer y centrar los esfuerzos en lugares de caracteres cuantitativos para incrementar así la eficiencia del mejoramiento

genético en relación con algunos problemas agronómicos tradicionalmente inabordables, como la resistencia a la sequía o mejores sistemas radiculares, (Hurtado Y Merino, 1986).

Obtención de productos naturales

Esta aplicación nos permite obtener cada vez más y mejores productos para satisfacer nuestras necesidades. Plantas como la soya, el amaranto, etc. tienen cada vez más aplicaciones. También es necesario continuar estudiando los principios activos de muchas plantas tradicionales usadas como remedios regionales pues aún quedan muchos principios activos que pueden en un momento dado dar origen a medicinas de patente. La variedad de compuestos y sustancias presentes en los vegetales permiten, que si se procesan adecuadamente, se aprovechen de manera completa pues todas las partes son susceptibles de volverse bienes de consumo. En la actual crisis económica por la que pasa México, es de vital importancia que el país sea autosuficiente en la producción de las materias primas que son necesarias en la industria farmacéutica, con el objeto de eliminar gastos de importación, los cuales encarecen notablemente los precios de los medicamentos. Un caso particular es la adquisición de los alcaloides derivados del tropano tales como la atropina, hiosciamina y escopolamina, los cuales se usan en más de 75 presentaciones farmacéuticas, (<http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/cap1.htm#arriba>, Hurtado Y Merino, 1986).

2.11. CULTIVO DE CELULAS EN SUSPENSIÓN

El cultivo de células en suspensión consiste en un conjunto de células aisladas, así como de pequeños racimos celulares, distribuidos en un medio de cultivo líquido en constante movimiento (Figura 10). Este sistema de cultivo de células vegetales en suspensión fue ideado con base en métodos microbiológicos.

Este sistema es un poderoso implemento para llevar a cabo tantos estudios sobre embriogénesis, crecimiento y diferenciación, organogénesis, ciclo celular, genética, nutrición y metabolismo, así como para la obtención de diversos productos secundarios, (Hurtado Y Merino, 1986).

En 1954 W.H.Muir, Hildebrandt y Riker transfirieron fragmentos de tejido de callo a medio líquido en agitación y obtuvieron un contenido de células aislada y pequeñas masas celulares. Dos años más tarde L. Nickell describió el crecimiento continuo de células de fríjol en suspensión. Desde entonces este tipo de cultivos se ha empleado con éxito en gran número de especies vegetales, (Tineo, 2001).



FIGURA 10. Agitador para mantener los cultivos en suspensión. ITSON 2005

Cuando los "callos" se inoculan en medios líquidos y se mantienen en agitación continua, las células se separan del tejido formando una suspensión constituida por células individuales o por pequeños agregados celulares, (Trang *et al* 2004).

El establecimiento de los cultivos en suspensión depende en gran medida del grado de disgregabilidad del "callo". Generalmente la disgregabilidad del "callo" puede aumentarse con altas concentraciones de auxinas en el medio de cultivo. En ciertos casos aparecen zonas o regiones disgregables en "callos" compactos que pueden ser utilizados también para el establecimiento posterior de las suspensiones celulares. En ocasiones la adición de hidrolizado de caseína o extracto de levadura promueve la dispersión y crecimiento celulares. Las suspensiones también se pueden iniciar a partir de explantes primarios de tejido diferenciado, empero, el establecimiento es más lento, (Tineo, 2001).

Las suspensiones celulares se mantienen a través de subcultivo sucesivo en medio fresco. Después de 2 o 3 subcultivos la suspensión celular llega a estabilizarse, (Falcón *et al*, 1994).

El número de células o la masa celular durante el subcultivo es un factor importante para el mantenimiento de la suspensión. Generalmente el inóculo inicial debe estar alrededor de 0.5 a 2.5×10^5 células/ml de medio fresco, (Falcón *et al*, 1994).

Las células en suspensión muestran una tasa de crecimiento mayor que los "callos" debido a que se encuentran bañados con el medio de cultivo, lo cual favorece la absorción de nutrientes, (Tineo, 2001).

En la evaluación del crecimiento de células en suspensión debe tenerse en cuenta que bajo esta condición el comportamiento que ellas presentan es típicamente sigmoideal, apreciándose cuatro fases:

a) Fase de retraso: en la cual no existe señal de división celular, sólo ocurre adaptación a las nuevas condiciones nutricionales; se observa cuando en un medio fresco se subcultivan suspensiones celulares que están en la fase

estacionaria, los cultivos crecen lentamente durante 1 a 3 días. Esta fase no se presenta si las suspensiones se subcultivan en período de crecimiento.

b) Fase exponencial y lineal: en la misma se inicia e incrementa la velocidad de división celular.

c) Fase de disminución progresiva: se reduce la velocidad de división celular.

d) Fase estacionaria: ocurre en el momento en que se han agotado los nutrimentos o al menos alguno de ellos, (Trang *et al* 2004, Hurtado Y Merino, 1986, Dodds, 1986).

Las células en suspensión pueden ser manipuladas de manera semejante a los microorganismos. Este sistema celular facilita la adición o remoción de compuestos del medio de cultivo y permite el mejor control de las condiciones ambientales. Las células de las suspensiones pueden desarrollar pequeñas colonias cuando se inoculan en medio semisólido. Esta metodología permite el aislamiento de células mutantes en medios que contienen algún factor de selección. Las colonias producidas en los medios semisólidos llegan a formar callosidades que pueden a su vez regenerar tejidos, órganos o plantas completas en presencia de combinaciones y concentraciones apropiadas de reguladores de crecimiento, (Dodds, 1986).

.

Las suspensiones celulares se pueden cultivar en matraces que contengan volúmenes definidos de medio de cultivo en donde crecerán hasta agotar uno o alguno de los nutrientes. Utilizando equipo más sofisticado es factible

establecer cultivos continuos, en los cuales la adición de medio fresco, es balanceada por la salida del volumen equivalente de la suspensión. Este sistema es recomendable para la producción de compuestos naturales de las plantas. (Evans *et al*, 1983).

CAPITULO III

MATERIAL Y METODOS

3.1. LOCALIZACIÓN DEL EXPERIMENTO

El presente trabajo de investigación se llevo a cabo en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, localizado en el edificio LV-700, del Instituto Tecnológico de Sonora, Unidad Obregón campus Náinari.

3.2. Diseño Experimental

En esta investigación se empleo el diseño experimental con distribución completamente al azar, con 4 repeticiones, en el cual los tratamientos se asignaron de manera aleatoria a todas las unidades experimentales.

FASE I. Establecimiento aséptico del explante

Para la ejecución de la investigación se requirió previamente de la obtención de callos (Figura 11 y 12), a partir de semillas de palo fierro (*Olneya tesota*), el proceso se describe a continuación:



FIGURA 11. Obtención de callos de Palo Fierro (*Olneya tesota*). ITSON 2005

Desinfección de las semillas.

1. Las semillas se limpiaron y lavaron con agua jabonosa, se tallaron con un pequeño cepillo.
2. Posteriormente se sumergieron en etanol (al 70%) por 30 segundos, seguido por un tratamiento con hipoclorito de sodio (al 9%) por 25 minutos y después se realizaron tres lavados en agua destilada estéril.
3. Una vez desinfectadas las semillas, éstas se sembraron, en medio MS (1962) adicionado con 100 mg/L de Inositol, 20 g/L de Sacarosa, 8 g de Agar – Agar y 2 mg/L de 2,4-D como Fitorregulador y el pH se ajustó a 5.6 ± 0.1
4. El cultivo se mantuvo en el cuarto de crecimiento a una temperatura de $25 \pm 1^{\circ}$ C, Fotoperiodo de 16/8 horas luz se realizaron cambios de medio cada 3 meses.



FIGURA 12. Callo friable de Palo Fierro (*Olneya tesota*). ITSON, 2005.

FASE II. Obtención de las células en suspensión

PRIMER ENSAYO:

La suspensión celular fue iniciada colocando 0.5 g de callo friable de 3 meses de edad (Figura 13), en 20 ml de medio MS líquido (1962) complementado con 20 mg/L de sacarosa,

100 mg/L de inositol, así como las diferentes dosis de los fitorreguladores ANA y BAP (Tabla 3).

3.3. Tratamientos

Se aplicaron diferentes concentraciones de ANA y BAP empleando los tratamientos anotados en la tabla 3.

TABLA 3. Dosis de Auxina y Citosinina utilizadas en el medio de cultivo para la obtención de células en suspensión.

TRATAMIENTO	A(ANA) – C (BAP) mg / L
1	2-0
2	0-2
3	3-0
4	0-3
5	4-0
6	0-4
7	0-0



FIGURA 13. Siembra de los callos en medio líquido. ITSON 2005

Los cultivos se mantuvieron en matraces Erlenmeyer de 250ml con 20ml de medio y se colocaron en agitación a 120 rpm, a $25 \pm 1^\circ$ C y fotoperiodo de 16 horas luz y 8 oscuridad (Figura 14).



FIGURA 14. Cultivo de células en suspensión. ITSON 2005.

Este primer ensayo tuvo una duración de 15 días en el cual mantuvo las condiciones antes mencionadas, posteriormente se cambió a medio fresco cada semana, esto para observar la respuesta al cambio de medio fresco a través del tiempo.

SEGUNDO ENSAYO:

El segundo ensayo consistió en resembrar las células en medio fresco con la misma composición del primer ensayo. Las células se filtraron y lavaron (Figura 15) posteriormente se pasaron a los frascos con medio fresco, con la misma formulación y mismas dosis de fitorreguladores (Figura 16), se sellaron y mantuvieron en las mismas condiciones del primer ensayo.



FIGURA 15. Filtrado y lavado de las células para resiembra. ITSON 2005.



FIGURA 16. Resiembra de células a medio fresco. ITSON 2005

TERCER ENSAYO:

Una vez transcurrida la semana, las células fueron tratadas y transferidas a un medio fresco con idéntica concentración que el ensayo 1 y 2, con el procedimiento antes mencionado y se dejaron en las mismas condiciones.

3.4. Variables analizadas

Durante el crecimiento de las células en suspensión se observaron contaminación, color, oxidación, decoloración, estas variables fueron monitoreadas cada 2 días. También se llevo a cabo el análisis celular al microscopio este fue realizado después de cada cambio de medio, es decir, el primero a los 15 días y posterior mente cada semana.

3.4.1. Contaminación

Para esta variable también fue monitoreada con mucho cuidado ya que se evaluó subjetivamente, con la ayuda de la vista y al ser en medio líquido la dificultad aumenta, esto por que la turbiedad del medio podría significar tanto contaminación como crecimiento de las células deseadas. (Dodds, Y Roberts, 1986.)

3.4.2. Color

Esta variable se observo a lo largo del experimento con la ayuda de una carta de color (Anexo 1), la cual muestra una gama de verde, beige y café en diferentes tonalidades a las cuales se les asignó una escala del 1 al 17 respectivamente que nos sirvió para unificar o estandarizar los posibles tonos de colores que se podrían presentar.

3.4.3. Oxidación

Al igual que en el caso del cambio de color, la oxidación también fue medida por medio de la carta de color (Anexo 1), tomando como oxidación si presentaba colores por arriba del número 9.

3.4.4. Decoloración

Esta variable fue medida en base a la carta de color (Anexo 1), considerando como decoloración si presentaba colores más claros a los de la tabla o bien si se observaban células blanquizcas o cristalinas.

3.4.5. Análisis Histológico

El análisis de tejidos y células se realizó con la técnica de tinción de PAS (Peryodic acid shiff) esto fue para observar los cambios que se presentaran en el desarrollo de las suspensiones celulares y se llevó a cabo en el Laboratorio de Histopatología Veterinaria del ITSON, Unidad Obregón campus Náinari.

1. FIJACIÓN Y DESHIDRATACIÓN.

Primero se prepararon las muestras en el procesador de tejidos, introduciéndolas 14 hrs. antes para la fijación y deshidratación del tejido (Figura 17) como se muestra a continuación, (Tabla 4):

TABLA 4. PROCESADOR DE TEJIDOS

1. Formol 10%	1Hr
2. Formol 10 %	1Hr
3. Agua	1Hr
4. Alcohol 96°	1Hr
5. Alcohol 96°	1Hr
6. Alcohol 96°	1Hr
7. Alcohol absoluto	1Hr
8. Alcohol absoluto	1Hr
9. Xilol	1Hr
10. Xilol	1Hr
11. Parafina	2Hrs
12. Parafina	2Hrs

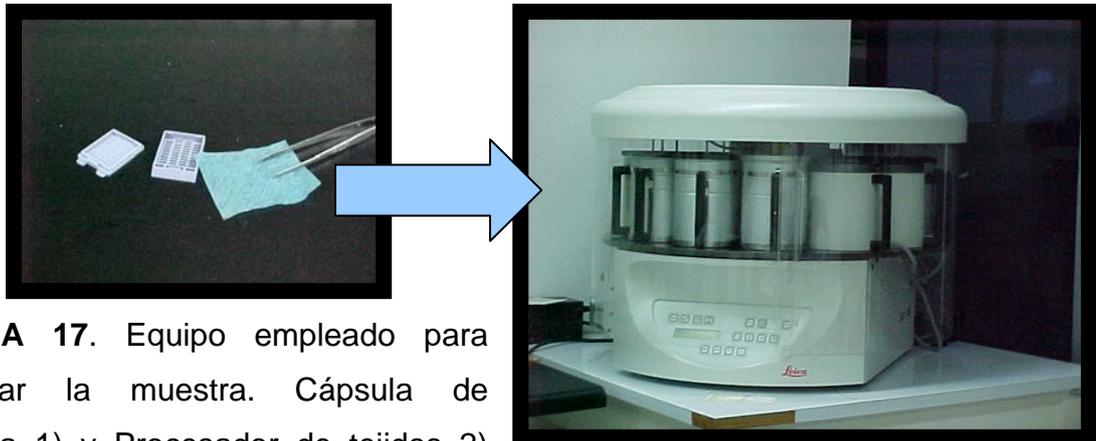


FIGURA 17. Equipo empleado para procesar la muestra. Cápsula de muestra 1) y Procesador de tejidos 2) ITSON 2005.

2. INCLUSIÓN EN PARAFINA.

Una vez realizado el proceso se sacan las muestras para la inclusión en parafina (Figura 18) con el procedimiento siguiente:

- Flamear la pinza y sacar la cápsula de la parafina
- Vaciar la parafina líquida en el molde
- Acomodar en el fondo del molde la muestra y etiquetar
- Dejar que se enfríe y guardar en refrigerador por unos minutos
- Desmoldar y cortar



FIGURA 18. Inclusión de la muestra en parafina. ITSON 2005.

3. CORTES EN MICROTOMO.

Seguido del montaje se cortó una laminita del cubo de parafina con las muestras de 5 micras de grosor y se montaron en la platina del microtomo.

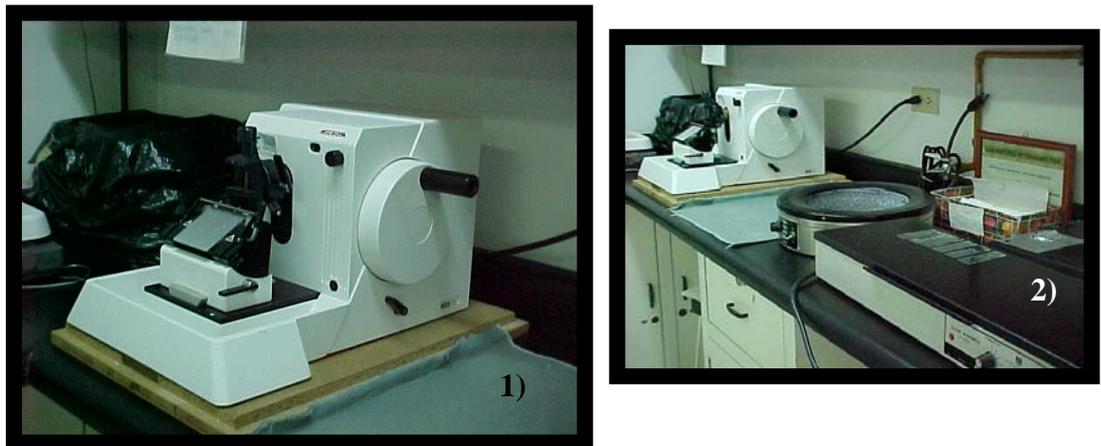


FIGURA 19. Microtomo para realizar los cortes a los cubos de parafina con la muestra, a la izquierda Microtomo 1) y a la derecha: Plancha o platina de microtomo 2). ITSON 2005.

4. TINCION.

Una vez que las muestras han sido tratadas y montadas en parafina y cortadas se procede a teñir con la técnica de PAS (Figura 20), (Tabla 5).

TABLA 5. PROCEDIMIENTO DE TINCIÓN “Peryodic acid shiff”(PAS)

- i. Desparafinar e hidratar hasta agua destilada *
- ii. Oxidar en ácido periódico por 5min.
- iii. Lavar en agua destilada
- iv. Reactivo de Schiff o Solución teolgen de coleman por 15min
- v. Lavar en agua corriente por 10min para que se desarrolle un color rosa
- vi. Hematox de Harris por 6min o verde Luz por pocos segundos para contrarrestar

- vii. Lavar en agua corriente
- viii. Desinfectar en alcohol ácido 1% (de 3 a 10 inmersiones rápidas)
- ix. Lavar en agua corriente
- x. Lavar en agua corriente por 10min
- xi. Deshidratar en alcohol de 95°, alcohol absoluto y aclarar con Xilol (dos cambios de cada uno)
- xii. Montar en Resina

* PARA DESPARAFINAR E HIDRATAR:

- | | |
|---------------------------|----------|
| 1) Xilol | 10min |
| 2) Xilol | 10min |
| 3) alcohol absoluto | 10 baños |
| 4) alcohol absoluto | 5 baños |
| 5) alcohol 96° | 10 baños |
| 6) alcohol 96° | 10 baños |
| 7) alcohol 96° | 10 baños |
| 8) agua destilada estéril | 10 baños |



FIGURA 20. Proceso de tinción de la técnica “Peryodic acid shiff” (PAS).

ITSON, 2005

5. MONTAJE DE LAS MUESTRAS.

Posterior a la tinción se agrega una gota de bálsamo de Canadá sobre la tinción para poner el cubreobjetos, dejar secar y observar al microscopio (Figura 21).



FIGURA 21. Montaje de las muestras, sellado con bálsamo de Canadá.
ITSON, 2005.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Contaminación:

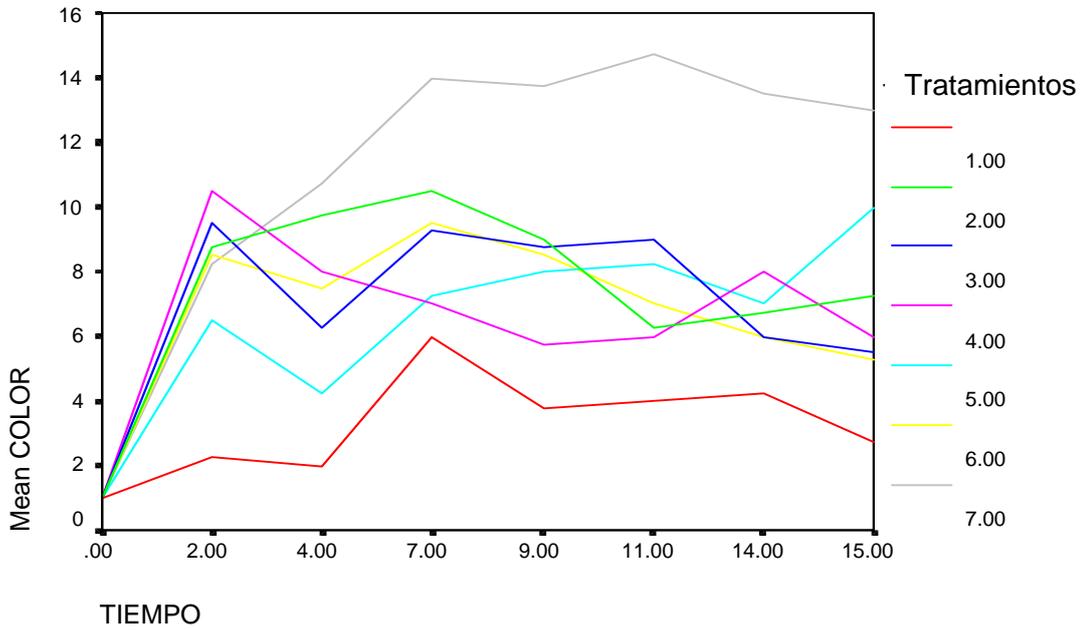
Se logró el establecimiento aséptico al 100% al no presentarse contaminación en ninguno de los tratamientos durante todo el experimento, esto debido a que se cuidó en todo momento de mantener las condiciones de total asepsia y limpieza tanto del área de trabajo como del aseo personal, desde el momento de la preparación del medio de cultivo, la desinfección de la semilla, así como durante la siembra con el empleo adecuado de la campana de flujo laminar, uso de tapa bocas y siguiendo todas las indicaciones mencionadas en las notas del curso de cultivo de tejidos vegetales, Gurrola, 2005, obtuvo los mismos resultados con esta especie; Gutierrez-Rosati *et al.*, 2000 con Camu camu (*Myrciaria dubia*) obtuvo también 100% de asepsia.

4.2 Color:

El color fue observado cada tres días con la ayuda de una carta de color (Anexo 1). Los resultados de esta variable en los tres ensayos se muestra en las gráficas 1, 2, y 3.

4.2.1 COLOR ENSAYO I

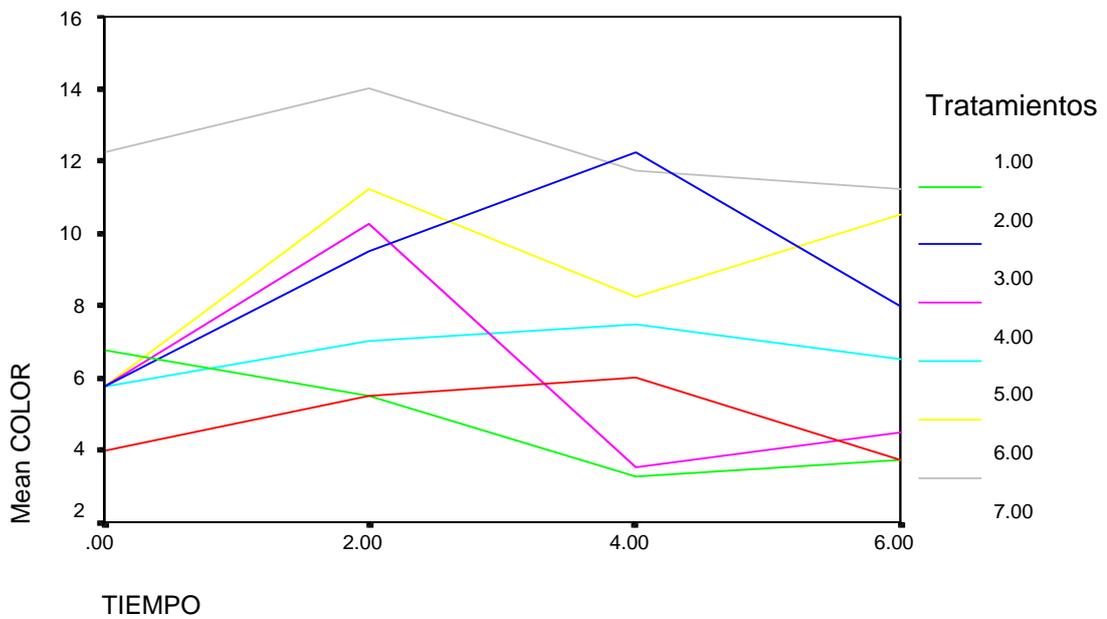
RESIEMBRA 1



GRAFICA 1. Respuesta de la variable color a los tratamientos a través del tiempo, (Resiembra 1 - Primer Ensayo). ITSON 2005.

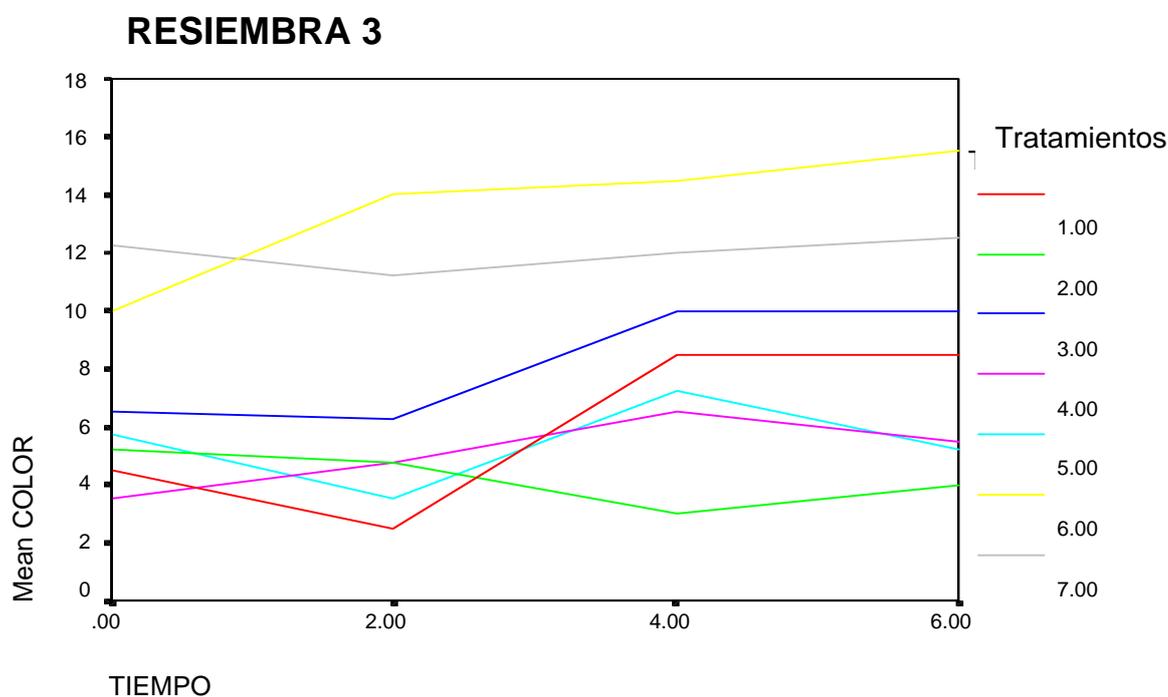
4.2.2 COLOR ENSAYO II

RESIEMBRA 2



GRAFICA 2. Respuesta de la variable color a los tratamientos a través del tiempo, (Resiembra 2 - Segundo Ensayo). ITSON 2005.

4.2.3 COLOR ENSAYO III



GRAFICA 3. Respuesta de la variable color a los tratamientos a través del tiempo, (Resiembra 3 - Tercer Ensayo). ITSON 2005.

En estas gráficas se observa que al inicio del cultivo, todos los tratamientos tienden a la oxidación, debido a que en los primeros días las células pasan por un proceso de adaptación al medio de cultivo. En la gráfica 1, se muestran los resultados sin resiembra y se observa un pico muy marcado a diferencia de los otros dos ensayos a causa del cambio de medio sólido a líquido; sometiendo con esto a un estrés de las células (Cassells 2001). En las gráficas 2 y 3, del segundo y tercer ensayo, respectivamente, se puede ver como este fenómeno de estrés disminuye ya que el cambio solo es a medio fresco con la misma composición química.

En el primer ensayo de 15 días, el mejor comportamiento en cuanto al color lo reporto el tratamiento 1 (2,0), sin embargo se realizó una resiembra para hacer el cambio por medio fresco a los 15 días, Falcón, *et al* 1992, reporta que el tiempo óptimo de cambio de medio es en intervalos de 7 días, según los resultados obtenidos también se encontró que el tratamiento 7(0,0) fue el que presento mayor oxidación.

A pesar de no encontrar diferencias significativas, se tomo el tratamiento 1(2,0) como el mejor (Figura 22), como se muestra en las gráficas 1, 2 y 3 presenta un mejor comportamiento, es decir menos tendencia a la oxidación en los tres ensayos, aun cuando el cambio de medio no presento resultados positivos en cuanto a la disminución de la oxidación, se mantuvo en rango aceptable, junto con los tratamientos 2 (0,2) y 5 (4,0) que presentaron valores cercamos al tratamiento 1, por lo que podrían ser recomendados para tomarse en cuenta en futuras investigaciones.



FIGURA 22. Células en Suspensión de palo fierro (*Olneya tesota*).
ITSON 2005.

4.3 Oxidación:

Esta variable se relaciona con el color por lo que se tomaron como referencia las mismas graficas, 1,2 y 3, observándose que el tratamiento 1(2,0) fue el que presento menor oxidación seguido del tratamiento 2 (0,2) y el 5 (4,0) que tiene un comportamiento aceptable, siendo el testigo el que indiscutiblemente se oxido desde el principio y aun que algunos tratamientos se observaban en buen estado con el paso de los días y el efecto de las resiembras se oxidaron como es el caso del tratamiento 6 (0,4) que se encontraba aceptable, hasta la ultima etapa donde se oxido de una manera drástica.

Se observó la formación de conglomerados en la mayoría de los tratamientos, este comportamiento también fue reportado por Trang *et al.*, 2004, en la especie de banano 'cau man' y a continuación se indica como se desarrollo en esta investigación:

TABLA 7. Respuesta de las células a los tratamientos. ITSON 2005.

TRATAMIENTO	RESPUESTA CELULAR
1 (2,0)	Repetición 1.1 y 1.2 conglomerados moderadamente grandes, 1.3 y 1.4 sedimento con muy pocos conglomerados
2 (0,2)	En este tratamiento todas las repeticiones presentan este comportamiento de conglomerados tipo hojuelas, rep. 2.1 y 2.2 mejor color y mas cantidad de grumos
3 (3,0)	Todos presentan conglomerados, pero en distinta cantidad, 3.3 pocos conglomerados y sedimento oxidado, 3.4 conglomerados y sedimento
4 (0,3)	Repetición 4.3 y 4.4 pocos conglomerados, 4.1 pocos pero de buen tamaño y 4.2 solo presento formación de sedimento
5 (4,0)	En este tratamiento se presento poca formación de conglomerados y mayormente sedimento en las rep. 5.3 y 5.4
6 (0,4)	Muy oxidados pero poca presencia de conglomerados pequeños, solo en rep. 6.3 y 6.4 mas grandes
7 (0,0)	Solo presento formación de sedimento y oxidado

4.3.1 SEMANA 1 DE OBSERVACIONES (Ensayo 1)

En la primera semana no se dieron muchos cambios y el color fue un tanto uniforme así como en la consistencia y crecimiento de las suspensiones celulares como podemos ver en las figuras 23, 24, 25 y 26.



FIGURA 23. Células en suspensión, tratamientos 1 y 2 respectivamente, a la primer semana. ITSON 2005.



FIGURA 24. Células en suspensión, tratamientos 3 y 4 respectivamente, a la primer semana. ITSON 2005.



FIGURA 25. Células en suspensión, tratamientos 5 y 6 respectivamente, a la primer semana. ITSON 2005.



FIGURA 26. Células en suspensión tratamiento 7 a la primer semana. ITSON 2005.

4.3.2 RESULTADOS OBSERVADOS DEL ENSAYO 1 (15 DÍAS)

Como se observa en las figuras de la 33 a la 38 del final de la primera etapa, se puede ver que el color es aceptable en la mayoría de los tratamientos, sin embargo se realizó el cambio de medio ya que al estar las células más en contacto con el medio al encontrarse embebidas en él es más fácil de aprovechar los nutrientes de este (Pierik *et al*, 1990), por lo que se agotan con mas rapidez que en el caso del medio sólido, aun que también son mas susceptibles a los compuestos fenólicos y en ocasiones tóxicos producidos por

ellas mismas, por lo que, como menciona anteriormente se debe hacer el cambio de medio y en líquido con mas frecuencia. (Falcón *et al*, 1994)



FIGURA 27. Células en suspensión, tratamientos 1 y 2 respectivamente, a los 15 días. ITSON 2005.



FIGURA 28. Células en suspensión, tratamientos 3 y 4 respectivamente, a los 15 días. ITSON 2005.



FIGURA 29. Células en suspensión, tratamientos 5 y 6 respectivamente, a los 15 días. ITSON 2005.



FIGURA 30. Células en suspensión tratamiento 7 a los 15 días. ITSON 2005.

En resumen fueron dos los tratamientos que destacaron al final del primer ensayo el primero por presentar mayor oxidación (Figura 31) y el otro por presentar un excelente color y consistencia de las suspensiones celulares (Figura 32).



FIGURA 31. Tratamiento 5 (4,0), que presento mas oxidación en el primer ensayo. ITSON 2005.



FIGURA 32. Tratamiento 1(0,2) que presento menor oxidación en el primer ensayo. ITSON 2005.

4.3.3 RESULTADOS OBSERVADOS EN EL ENSAYO 2 (1 SEMANA)

En el final del segundo ensayo se puede ver un cambio drástico de color comparado con el observado en el ensayo anterior y una tendencia mayor a la oxidación en casi todos los tratamientos.

Al final de este ensayo fueron los tratamientos 6 y 7 los que presentaron más oxidación como se muestra en la figura 37 lo contrario del tratamiento 4 que se observo menos oxidado (Figura 38).



FIGURA 33. Células en suspensión, tratamientos 1 y 2 respectivamente, al terminar la segundo ensayo (Día 19). ITSON 2005.



FIGURA 34. Células en suspensión, tratamientos 3 y 4 respectivamente, al terminar la segundo ensayo (Día 19). ITSON 2005.



FIGURA 35. Células en suspensión, tratamientos 5 y 6 respectivamente, al término de la segundo ensayo (Día 19). ITSON 2005.



FIGURA 36. Células en suspensión tratamiento 7 a los al término del Segundo ensayo (Día 19). ITSON 2005.

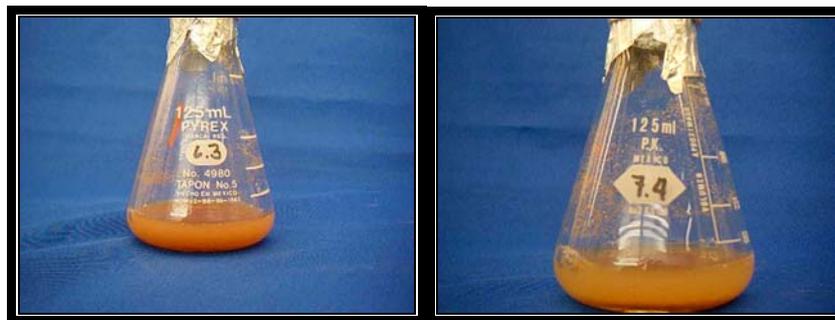


FIGURA 37. Tratamiento 6 (4,0), y Tratamiento 7 (0,0) que presentaron mas oxidación al final del segundo ensayo. ITSON 2005.



FIGURA 38. Tratamiento 4 (0,3), que presento la menor oxidación al final del segundo ensayo. ITSON 2005.

4.3.4 OBSERVACIONES DEL ENSAYO 3 (1 SEMANA)

Al final del ensayo tres se observa a simple vista que la mayoría de los tratamientos tiene un aspecto oxidado sin embargo en algunos tratamientos las células se encuentran en buenas condiciones y con buen tamaño.



FIGURA 39. Células en suspensión, tratamientos 1 y 2 respectivamente, al término del experimento, ensayo 3 (Día 30). ITSON 2005.



FIGURA 40. Células en suspensión, tratamientos 3 y 4 respectivamente, al término del experimento, ensayo 3 (Día 30). ITSON 2005.



FIGURA 41. Células en suspensión, tratamientos 5 y 6 respectivamente, al término del experimento, ensayo 3 (Día 30). ITSON 2005.



FIGURA 42. Células en suspensión, tratamiento 7 al término del experimento, ensayo 3 (Día 30). ITSON 2005.

En la figura 43 se puede observar los tratamientos que se encontraban mas oxidados al finalizar el ensayo 3 los cuales son los tratamientos 3, 6 y tratamiento 7, y mas abajo podemos ver el tratamiento 2 que fue el que presento la menor oxidación en al finalizar este ensayo (Figura 44).



FIGURA 43. a) Tratamiento 3 (3,0), b) Tratamiento 6 (4,0), y c) Tratamiento 7 (0,0) que presentaron mas oxidación al final del experimento ensayo 3 (Día 30). ITSON 2005.



FIGURA 44. Tratamiento 2 (0,2), que presento la menor porcentaje de oxidación al final del experimento ensayo 3 (Día 30). ITSON 2005.

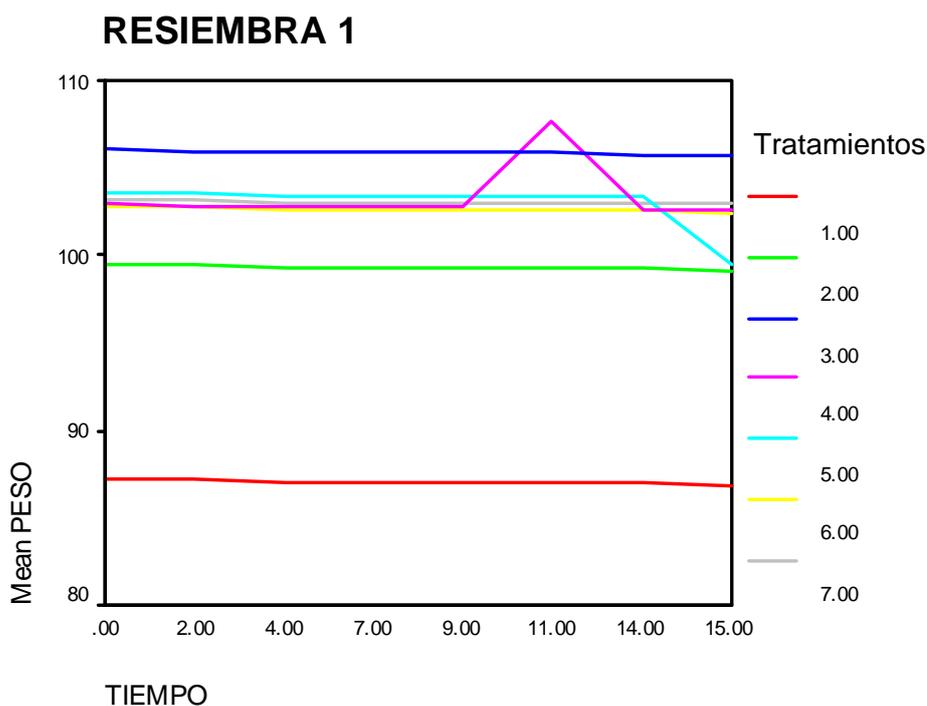
4.4 Decoloración:

Al inicio del primer ensayo se observaron células color verde muy claro, casi blancas por efecto del cambio de medio provocando un estrés celular. Una vez adaptadas a las nuevas condiciones las células cambiaron de color ya que la dosis de nutrientes era la adecuada en el medio nutritivo y permitió el óptimo desarrollo de estas, Rodríguez *et al* 1999, reporta el mismo problema en la especie de Aguacatero (*Persea americana Mill.*)

4.5 Peso:

Los resultados de esta variable no fueron los esperados ya que los incrementos no fueron significativos, e incluso, en vez de incrementos se presentaron decrementos de peso, en algunos días de medición, esto posiblemente a que las células se oxidaron mas rápido de lo que crecieron (Cassells, 2001), por lo que como se observa en las gráficas 4, 5 y 6, que corresponden el primer, segundo y tercer ensayo respectivamente, la diferencia de peso fue casi constante.

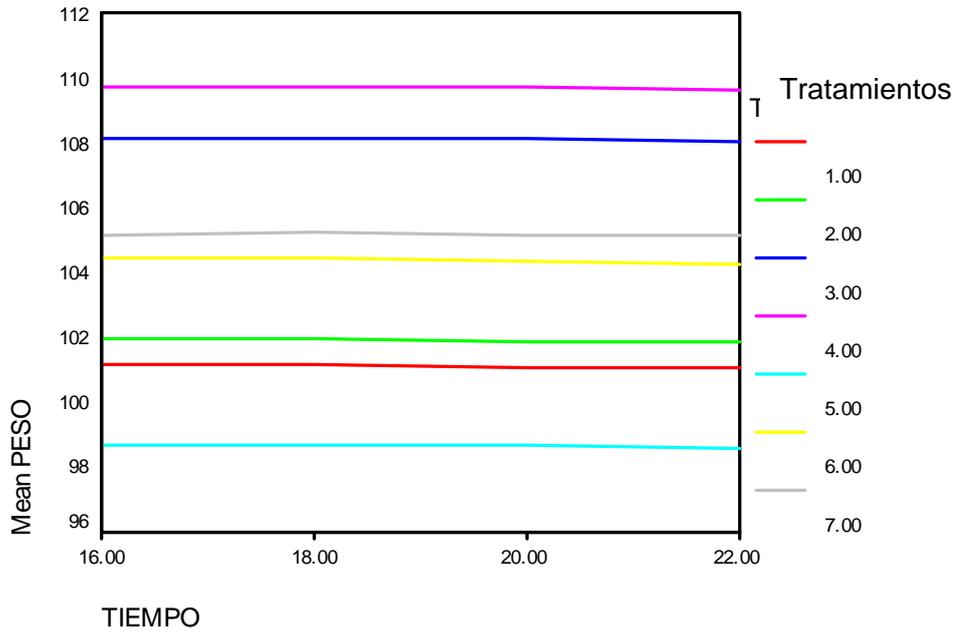
4.5.1 PESO ETAPA I



GRÁFICA 4. Respuesta del peso a través del tiempo en los diferentes tratamientos, (Resiembra 1 - Ensayo 1). ITSON 2005.

4.5.2 PESO ETAPA II

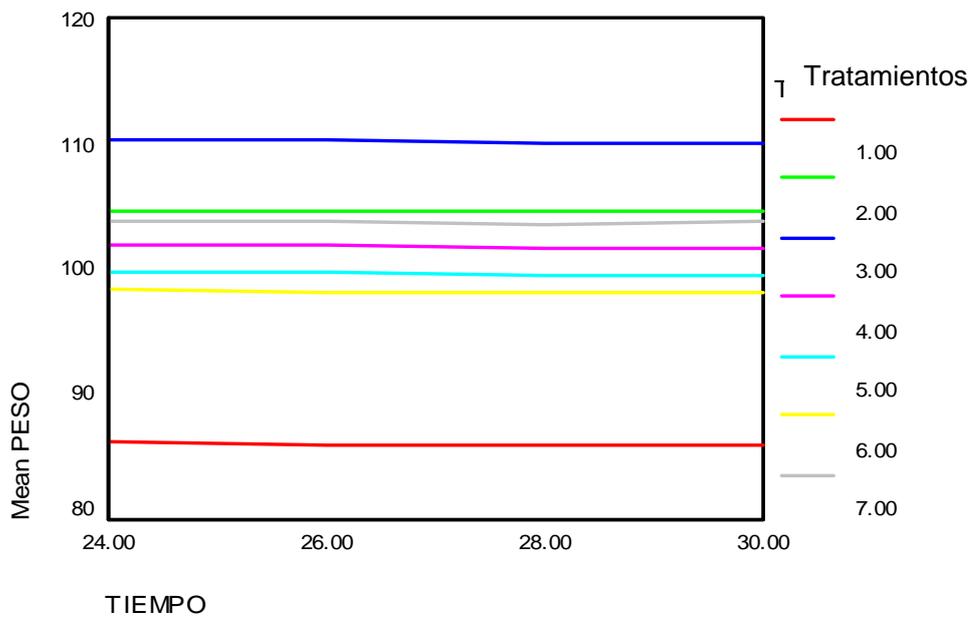
RESIEMBRA 2



GRÁFICA 5. Respuesta del peso a través del tiempo en los diferentes tratamientos, (Resiembra 2 - Ensayo 2). ITSON 2005.

4.5.3 PESO ETAPA III

RESIEMBRA 3



GRÁFICA 6. Respuesta del peso a través del tiempo en los diferentes tratamientos, (Resiembra 3 - Ensayo 3). ITSON 2005.

4.6 Análisis Histológico:

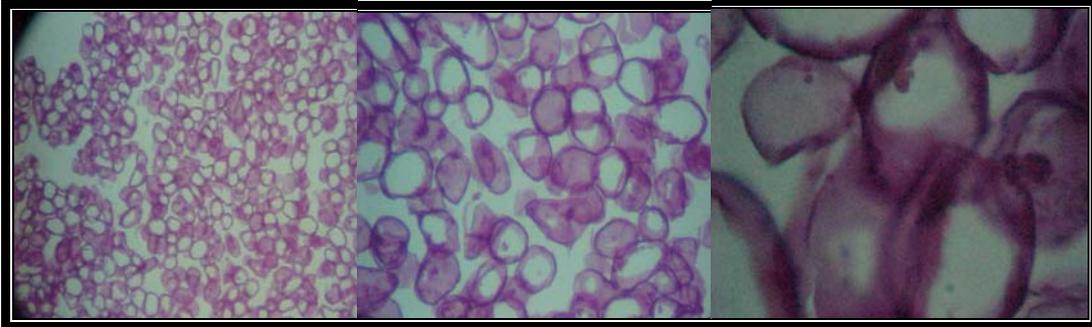


FIGURA 45. Células en suspensión de palo fierro (*Olneya tesota*) en crecimiento activo, con tinción PAS a 4X, 10X y 40X, respectivamente. Tomada en el Laboratorio de Histopatología veterinaria. ITSON 2005



FIGURA 46. Células en suspensión de palo fierro (*Olneya tesota*) Oxidadas, con tinción PAS a 4X, 10X y 40X, respectivamente. Tomada en el Laboratorio de Histopatología veterinaria. ITSON 2005

CAPITULO V

CONCLUSIONES

Con base a los objetivos planteados y los resultados obtenidos, puede concluirse lo siguiente:

-  La desinfección de las semillas para la fase de establecimiento aséptico se logro con éxito ya que no se presento contaminación y todas las semillas germinaron.

-  Las combinaciones de fitoreguladores ácido naftalen acético (ANA) y bencil amino purina (BAP) empleadas en esta investigación para lograr el establecimiento de suspensiones celulares, fueron adecuadas en los rango manejados (0-4 mg/L) aun cuando no hubo diferencias estadísticas entre los tratamientos; sin embargo, como se mencionó en la discusión de resultados, esto fue por la variabilidad entre las repeticiones.

-  Se encontró la concentración óptima de ANA y BAP al obtenerse buenos resultados en el tratamiento 1 (2 mg/L de Ana y 0 mg/L de BAP) en la obtención y crecimiento de las células en suspensión.

- 🖼 Las resiembras en medio fresco tiene un efecto positivo en las suspensiones celulares; aunque se observó que al inicio del cambio produce la oxidación de éstas. Sin embargo, las suspensiones se mantienen por más tiempo al evitar la oxidación por agotamiento de los nutrientes del medio.

- 🖼 La composición del medio empleado es la adecuada para la proliferación de las suspensiones celulares. Sin embargo, se recomienda en futuras investigaciones emplear antioxidantes ya que la oxidación fue el principal problema para el crecimiento y supervivencia de las células.

- 🖼 La variable peso no se consideró para decidir el crecimiento ya que no se presento incremento aceptable que nos indicara aumento de masa celular, sin embargo a la vista si se observo aumento de esta y formación de conglomerados grandes y de buen color.

BIBLIOGRAFÍA

BIDWELL R. G. S., 1983, "Fisiología Vegetal". Editorial AGT Editor, S. A. México D.F.

BIDWELL G. 1990, Cultivo in vitro de plantas superiores. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. Pág. 37, 57, 125, 214

CARRILLO, J. C., V. A. OJEDA, H. CAMPOS DE QUIROZ, *et al.* 2004 Optimization of a protocol for direct organogenesis of red clover (*Trifolium pratense* L.) meristems for breeding purposes. . Biol. Res.. [online], vol.37, no.1 [citado 27 Enero 2005], p.45-51. Disponible en la World Wide Web:
(Ver:<http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S071697602004000100005&lng=es&nrm=iso>. ISS)

CASSELLS A.C.1; Curry R.F.1, 2001, Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, vol. 64, no. 2-3, pág. 145-157(13). Kluwer Academic Publishers.

CONABIO, 2002, Palo Fierro Madera del desierto.

DODDS, J.H. y L.W. Roberts. 1986, Experiments in Plant Tissue Culture. Cambridge Univ. Press Cambridge. Pág. 650,651,652,653

EVANS, D., W. R. SHARP, P. B. AMMIRATO. 1983, Handbook Plant Cell Culture, Techniques for Propagation and Breeding. Editorial Macmillan Publishing Company. N.Y. USA. 970

FALCÓN V. Y ZAMBRANO R. A. 1994, "Tiempo óptimo para el cambio de medio en suspensiones celulares de cuatro cultivares de caña de azúcar *saccharum* spp: b6749, cp5659, v58-4 y v64-10". Laboratorio de Biotecnología del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (FONAIAP). Edit. Agronomía Tropical.

(Ver: http://www.redpav-fpolar.info.ve/agrotrop/v44_2/v442a020.html)

GURROLA, M. 2005, Obtención de células callosas del árbol de Palo Fierro (*Olneya tesota*) a partir de hipocotilo. Tesis Licenciatura, ITSON, Cd. Obregón Sonora, México. pág 74, 75.

GUTIÉRREZ-ROSATI, A.; INGUIL, E.; MICKY, M.; RODRIGUEZ, M. 2000. Avances en la Introducción de Genotipos de Camu camu (*Myrciaria dubia* H.B.K. Mc Vaugh), a condiciones *In Vitro*. Resúmenes del Cuarto Congreso Peruano de Genética. 9 al 12 de Agosto.p 57-61. Lima-Perú.

HURTADO, D. y M.E. MERINO, 1987, Cultivo de Tejidos Vegetales. Editorial Trillas, México D. F. pág. 44,45, 48, 57, 58, 67, 75, 122, 123.

JULIANA, F., Murilo M, Marli K., Soares, M. y Appezzato-da-Glória, B. 2001. "Anatomy of Somatic Embryogenesis in *Carica papaya* L." Brazilian archives of Biology and Technology an International Journal. Vol. 44, N. 3: pp. 247 – 255, Septiembre.

LÓPEZ T. J. 2000, Establecimiento de suspensiones celulares en plátanos vianda del grupo (AAB) Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT), Biotecnología Vegetal. Editorial Info Musa. pág. 59, 60 (Ver: <http://www.cuba.cu/ciencia/ibp/trabajo10.pdf>)

- OCAMPO R. GUADALUPE, 1993 "Cultivo de Tejidos Vegetales en Hortalizas y Ornamentales". Escuela superior de horticultura, CESUES. México. pág. 9,10,11.
- PIERIK R.L.M 1990 "CULTIVO IN VITRO DE PLANTAS SUPERIORES", Departamento De Horticultura Y Agricultura, Universidad De Wageningen, Edit. Ediciones mundi-Prensa.
- REYES CASTAÑEDA PEDRO. 1983 "Bioestadística aplicada", Editorial Trillas, México. pág. 47, 345, 346, 347, 348.
- RODRÍGUEZ; M. CAPOTE, V. ZAMORA, 1999, "CULTIVO in vitro DEL AGUACATERO (Persea americana Mill.)", Instituto de Investigaciones de Cítricos y otros Frutales, Revista Chapingo Serie Horticultura 5: 231-237. Cuba
- SALISBURY F., C. W. ROSS. 1994, "FISIOLOGIA VEGETAL" Edit. Iberoamérica S. A. de C. V., México D. F. pág. 395, 399, 401, 407, 411,
- SIVORI E., E. MONTALDI, O. CASO, 1986, "FISIOLOGÍA VEGETAL Tomo II" Edit. Hemisferio Sur. S. A. Buenos Aires, Argentina. Pág. 181, 84, 29, 30.
- TINEO, G. L. Mayo de 2001, Antología del Curso de Biotecnología VI "Cultivo de Tejidos Vegetales", Cd. Obregón Sonora, México.
- TINEO, G. L. 2001 Notas Del Curso de Biotecnología VI "Cultivo de tejidos vegetales", Cd. Obregón, Sonora, México.
- TRANG T. H. Y BUI T. V. 2004, Crecimiento de las suspensiones Celulares del cv. "Cau man". La Revista Internacional sobre Bananos y Plátanos Info Musa. 2, 3 pág.
(Ver: <http://www.ipgri.cgiar.org/publications/pdf/966.pdf>)

WAYNE W. DANIEL. 1999, "Bioestadística". Editorial Limusa S. A., México.
pág. 283, 284, 285, 286.

FUENTES ELECTRÓNICAS

http://www.conabio.gob.mx/institucion/conabio_espanol/doctos/palofier.html

http://us.f2.yahoofs.com/bc/4051303b_2710/bc/Reporte+cultivpo+de+tejidos/12

Embriogenesis Somática Héctor Lozoya Saldaña

<http://www.fbmc.fcen.uba.ar/A>

<http://www.google.com.mx/search?hl=es&q=palo+fierro+olneya+tesota&btnG=B%C3%BAsqueda+en+Google&meta=>

<http://www.altavista.com/web/results?itag=wrx&q=celulas+en+suspension+&kg s=1&kls=0>

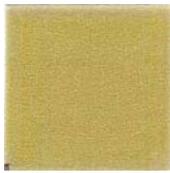
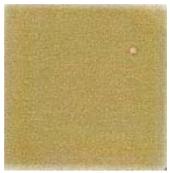
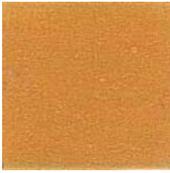
<http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/cap1.htm#arriba>

<http://www.google.com.mx/search?hl=es&q=palo+fierro+olneya+tesota&btnG=B%C3%BAsqueda+en+Google&meta=>

http://www.conafor.gob.mx/programas_nacionales_forestales/imasd/proyectos_2002/1.htm

ANEXOS

ANEXO 1. CARTA DE COLOR

					
1	2	3	4	5	6
					
7	8	9	10	11	12
					
13	14	15	16	17	18

ANEXO 2. COMPOSICIÓN Y PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

COMPOSICIÓN. Para preparar 1L de medio de cultivo:

20g de Sacaros
8g de agar-agar
100mg de mio-inositol

Soluciones inorgánicas:

10ml de solución de nitratos
10ml de solución de sulfatos
10ml de solución de halógenos
10ml de solución de PO_4 , BO_3 , MoO_4
10ml de solución de NaFe-EDTA

(Murashige y Skoog, 1962).

Preparación:

Colocar en un matraz Erlenmeyer de 1L, aproximadamente 500ml de agua destilada, agregar los 8g de agar-agar y calentar con el mechero hasta que el agar-agar este cocido, cuidando que la temperatura no pase de 90° C

Agregar la sacarosa el inocitol y las soluciones inorgánicas, aforar a 950ml

Ajustar el pH a 5.6 ± 0.1 , utilizando NaOH y/o HCl al 0.01N

Aforar a 1L y calentar para homogenizar

Distribuir en frascos "Gerber" (20 ml por unidad), tapar y esterilizar en autoclave a 16 lb/in^2 durante 15 minutos

Guardar en un lugar fresco seco y oscuro, dejar pasar tres días como prueba de esterilidad.

**ANEXO 3. SOLUCIONES CONCENTRADAS DE LOS COMPUESTOS
INORGÁNICOS Y ORGÁNICOS.**

Soluciones concentradas de las sales inorgánicas:

COMPUESTO	SOLN. CONCENTRADA (g/l)	VOLUMEN (ml/L) *
NITRATOS:		
Nitrato de amonio (NH_4NO_3)	165.0	10
Nitrato de potasio (KNO_3)	190.0	
SULFATOS:		
Sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	37.0	10
Sulfato de manganeso ($\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	1.69	
Sulfato de Zinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.86	
Sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	0.0025	
HALÓGENOS:		
Cloruro de potasio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)		10
Yoduro de potasio (KI)	44.0	
Cloruro de cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.083	
	0.0025	
PO₄, BO₃, MoO₄:		
Fosfato de potasio (KH_2PO_4)		10
Ácido bórico (H_2BO_3)	17.0	
Molibdato de Sodio ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.62	
	0.025	
NaFe-EDTA:		
	2.784	
Sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)		10
Ácido etilindinitrotetra acetato disódico (Na_2 - EDTA)	3.724	

* = Volumen a utilizarse para preparar 1L de medio de cultivo.

Fuente: Murashige, T. y F. Skoog, 1962.

ANEXO 4. ABREVIATURAS

ANA	ácido naftalenacético
BAP	bencilaminopurina
° C	grados Celsius
2,4-D	ácido 2,4-diclorofenoxiacético
EDTA	ácido etilendiamino tetraacético
mg/L	miligramos por litro
MS	Murashigine y Skoog (1962)

ANEXO 5. GLOSARIO

Agar: producto de origen vegetal (obtenido a partir de algas), que se utiliza para solidificar medios nutritivos.

Agua destilada: agua producida por destilación que no contiene compuestos orgánicos o inorgánicos.

Alcohol: alcohol etílico (CH_2OH), también llamado etanol.

Antioxidantes: grupo de sustancias químicas que impide la oxidación, por ejemplo, la vitamina C o el ácido cítrico.

Apical: pertenece al ápice, extremo superior del tallo.

Asepsia: conjunto de métodos destinados a preservar de gérmenes infecciosos el material biológico, el instrumental y el equipo.

Aséptico: libre de cualquier microorganismo (hongos, bacterias, levaduras, virus, microplasma, etc.), estéril.

Autoclave: aparato en el cual se esterilizan, por medio de vapor a presión, los medios, instrumentos de vidrio, etc.

Auxinas: grupo de hormonas vegetales (naturales o sintéticas), que producen elongación celular y en algunos casos división celular; frecuentemente inducen la aparición de raíces adventicias e inhiben el desarrollo de yemas adventicias (en los vástagos).

Biotecnología: ciencia multidisciplinaria que consiste en la utilización y transformación de microorganismos, células vegetales o animales, en fin de cualquier organismo vivo para la obtención de productos benéficos para el hombre.

Callo: crecimiento amorfo e indiferenciado de las células.

Contaminación: alteración nociva de una sustancia u organismo por efecto de residuos procedentes de la actividad humana o por la presencia de determinados microorganismos.

Crecimiento: incremento de la masa (peso y/o tamaño) de un organismo que acompaña los proceso de desarrollo.

Cultivo de tejidos: cultivo de protoplastos, células, tejidos, órganos, embriones o semillas in vitro.

Cultivo en suspensión: cultivo en el que las células aisladas y/o agregados celulares crecen y se multiplican, suspendidos en un medio líquido.

Desinfectante: sustancia o proceso que destruye los gérmenes patógenos de alguna superficie, sustancia u organismo.

Diferenciación: el desarrollo de células o tejidos con una función específica y/o la regeneración de órganos o estructuras orgánicas (raíces, vástagos, etc.) o proembriones.

EDTA: ácido etilendiamino tetraacético, compuesto quelante a cual el hierro queda unido de tal manera, que es asimilable por la planta.

Esterilización: destrucción total de gérmenes.

Explante (o inóculo): fragmento extraído de la planta donadora o planta madre para cultivarlo en condiciones artificiales y asépticas.

Fitorregulador (Fitohormona): sustancia producida por las mismas plantas, que en bajas concentraciones regulan los procesos fisiológicos de éstas.

In vitro: designa a los procesos biológicos o las investigaciones que se realizan fuera de los organismos vivos, tradicionalmente en tubos de ensaye.

Macroelementos: grupo de elementos esenciales como N, P, K, Ca y Mg, que son necesarios normalmente en cantidades relativamente altas (nutrición inorgánica de la planta).

Medio nutritivo: mezcla de sustancias en las cuales pueden crecer células, tejidos u órganos, con o sin agar.

Metabolismo: suma de cambios físicos y químicos que tienen lugar constantemente en los seres vivos; estos cambios incluyen la síntesis de moléculas (anabolismo) y la degradación de moléculas que proveen de energía (catabolismo).

Microelementos: grupo de elementos como el Fe, B, Zn, Mo, Mn, etc., que son importantes en cantidades relativamente pequeñas para la nutrición inorgánica de las plantas.

Micropropagación: multiplicar por generación in vitro una especie vegetal.

pH: logaritmo de la concentración de iones hidrógeno cambiado de signo.

Plántula: plantita recién nacida.

Regulador: sustancia que regula el crecimiento y desarrollo de células vegetales, órganos, etc.

Tejido: conjunto organizado de células que tienen la misma estructura y misma función.

Totipotencia: capacidad que tiene las células vivas de reproducir las características de los organismos de los cuales proviene.