
**PROFUNDIZACIÓN DE CONOCIMIENTOS TEÓRICOS Y ADQUISICIÓN
DE NUEVAS DESTREZAS EN DIFERENTES TÉCNICAS DE CULTIVO *IN*
VITRO DE TEJIDOS VEGETALES**

SAMARA IRINA CONTRERAS ARROYO

**UNIVERSIDAD DE SUCRE
FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
SINCELEJO**

2008

**PROFUNDIZACIÓN DE CONOCIMIENTOS TEÓRICOS Y ADQUISICIÓN
DE NUEVAS DESTREZAS EN DIFERENTES TÉCNICAS DE CULTIVO *IN*
VITRO DE TEJIDOS VEGETALES**

SAMARA IRINA CONTRERAS ARROYO

**RODRIGO HOYOS SANCHEZ. Ph.D
DIRECTOR**

**LABORATORIO DE CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE LAS PLANTAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE MEDELLIN**

**JAVIER DARÍO BELTRÁN. Ph.D
CODIRECTOR
DIRECTOR DEL LABORATORIO DE CULTIVOS VEGETALES
UNIVERSIDAD DE SUCRE**

**UNIVERSIDAD DE SUCRE
FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
SINCELEJO**

2008

“Únicamente los autores son responsables de las ideas expuestas en el presente trabajo” artículo 12 resolución 02 de 2003

Nota de aceptación

Firma del presidente del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

Sincelejo, 2008

INTRODUCCIÓN

Las técnicas que permiten manipular cualquier tejido de una planta, hasta un organismo completo, a partir de una célula, bajo condiciones artificiales *in vitro* se les denomina Técnicas de Cultivo *in Vitro* de Tejidos Vegetales que, en contraste con las técnicas de cultivo tradicionales, permiten la propagación de plantas en menor tiempo y en espacios reducidos. Además, este método es beneficioso para la obtención de plantas libres de patógenos, plantas homocigotas, multiplicación de plantas en peligro de extinción, estudios de ingeniería genética, entre otros.

En el laboratorio de Crecimiento y Desarrollo de las plantas de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, se emplea el cultivo de tejidos vegetales *in vitro* como una herramienta para el desarrollo de las líneas de investigación en estudios de suspensiones celulares para la producción de metabolitos secundarios, transformación genética de plantas, selección vegetal *in vitro*, mejoramiento genético, micropropagación clonal masiva, crioconservación y también en estudios de patosistemas, entre otros.

En virtud del convenio Marco de Cooperación entre la Universidad Nacional de Colombia y la Universidad de Sucre, se logró la realización de una pasantía por un período de 12 meses, enfocada en la profundización de conocimientos teóricos y adquisición de nuevas destrezas en diferentes técnicas de cultivo *in Vitro* de tejidos vegetales.

Durante este período se alcanzaron metas propuestas tales como la preparación de medios, obtención de callos embriogénicos, aislamiento y purificación de hongos patógenos, extracción de filtrados crudos, montaje de sistemas de inmersión temporal, así como también el conocimiento de la

rutina administrativa y académica de un laboratorio de investigación científica.

En este trabajo se presenta un informe crítico sobre la labor desarrollada durante dicha pasantía, las actividades prácticas y académicas realizadas; además, un artículo de revisión sobre técnicas aplicadas al cultivo *in Vitro* de tejidos vegetales.

OBJETIVOS

GENERAL:

Profundizar los conocimientos teóricos y adquirir nuevas destrezas en diferentes técnicas de cultivos *in Vitro* de tejidos vegetales

ESPECÍFICOS:

- Preparar medios de cultivo para la regeneración de plántulas a partir de las suspensiones celulares.
- Obtener callos embriogénicos para la iniciación de suspensiones celulares.
- Adquirir destrezas en el manejo del sistema de inmersión temporal.
- Adquirir conocimiento en el aislamiento y purificación de hongos patógenos para la extracción de filtrados crudos aplicados en la selección celular.
- Familiarizarse con la rutina administrativa y académica de un laboratorio de investigación científica.
- Profundizar en la teoría científica con la asistencia a un curso en el área de cultivo de tejidos vegetales *in Vitro* dictado para el postgrado en biotecnología.

CÁPITULO 1: INFORME CRÍTICO

PASANTÍA REALIZADA EN EL ÁREA DE CULTIVO IN VITRO DE TEJIDOS VEGETALES DEL LABORATORIO DE CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE LAS PLANTAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA, SEDE MEDELLIN

MICROPROPAGACIÓN

Las técnicas de cultivo de Tejidos Vegetales son una herramienta invaluable para la resolución de problemas básicos tales como la investigación en bioquímica, genética, fisiología, estudios moleculares, y estructurales. Tales investigaciones pueden ser aplicadas ya sea para la propagación, conservación o manipulación *in vitro* de material vegetal en cultivos, forestales, plantas medicinales y ornamentales. Dentro de este conjunto de técnicas se encuentra la denominada: micropropagación, un término empleado para describir la propagación asexual de plantas. La micropropagación, de una especie, permite a partir de diversos explantes (embriones, cotiledones, raíz, hipocotilo, epicotilo, tallos, hojas), generar plantas completas idénticas en mayor cantidad y calidad a las obtenidas a partir de semillas. Este tipo de técnicas, son de gran utilidad para la conservación de especies en peligro de extinción o para la propagación de especies vía semillas, en los que los porcentajes de germinación son bajos o cuya viabilidad es muy corta, permitiendo solucionar así la disponibilidad de material vegetal para siembra (Pérez *et al*, 1999). Para la micropropagación de cualquier especie vegetal, se debe tener en cuenta los siguientes aspectos

El medio de cultivo; es uno de los factores más importantes para la respuesta del tejido (explante) *in vitro* y contiene los requerimientos mínimos nutricionales tanto para que se logre la regeneración de las plantas, como para su crecimiento y desarrollo. Por tal razón, es necesario adicionar al medio de cultivo sales minerales, fuentes de los macronutrientes (N, P, K, Mg, etc...) y micronutrientes (Cu, Mn, Zn, Co, S, B, etc.). Debido a que las plantas bajo estas condiciones son semi-autótrofas, se hace necesario adicionar al medio de cultivo una fuente de carbono (sacarosa, sucrosa, fructosa etc.). Adicionalmente, es imprescindible incorporar en el medio de cultivo hormonas o reguladores de crecimiento, vitaminas y aminoácidos. Las cantidades de los elementos, variarán dependiendo del tipo de planta. Los medios de cultivo pueden ser líquidos o sólidos; para el caso de los sólidos se debe adicionar un agente gelificante (Agar, fitigel, gelrite etc.)(George et al, 2008).

Las plantas madres; es un aspecto muy importante a tener en cuenta, dado que es una etapa preparativa en la que se seleccionan y acondicionan las plantas fuente del material vegetal a utilizar en el cultivo de tejidos *In Vitro*. El acondicionamiento de estas plantas debe ser tanto en el aspecto nutricional, como en el fitosanitario. Las plantas madres que se seleccionen deben cumplir con unas mínimas exigencias de calidad ya que si se parte de una planta con mejores características deseables superiores al promedio, las plantas regeneradas tendrán un alto valor (Hall, 1999).

La micropropagación; es el proceso en el cual se clona el tejido; aquí la planta es multiplicada a través de brotes, yemas, injertos o estacas. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el éxito del proceso esta determinado por factores, tales como el genotipo de la especie, la edad de la planta y el tipo de explante, y las condiciones de crecimiento bajo la cual se mantuvo la planta madre. Para esta etapa se debe desinfectar superficialmente el

explante, por lo que en el medio de cultivo pueden crecer microorganismos, principalmente bacterias y hongos, que competirán ventajosamente con el explante. Para la desinfección se han empleado diferentes compuestos, siendo los más comunes las soluciones de hipoclorito de sodio y de calcio, el cloruro de mercurio, el peróxido de hidrógeno, el nitrato de plata, el cloro comercial, el alcohol a diferentes porcentajes, y otros. La selección y concentración de éstos compuestos y el tiempo de desinfección se determinan, en gran medida, por las características del explante; en la práctica, se establecen experimentalmente por ensayo y error (Villalobos y Thorpe, 1991).

Las plantas obtenidas en el proceso de micropropagación son pequeños brotes, en la mayoría de los casos carentes de raíz y con poca probabilidad de adaptarse con éxito a las condiciones ambientales externas. Para lograr que los brotes crezcan y formen un sistema radical, y facilitar su manipulación y adaptación al medio externo es necesario modificar la relación de las hormonas auxinas y citoquininas. De tal manera que para favorecer la multiplicación y crecimiento se emplean medios de cultivos suplementados con una relación hormonal mayor para citoquininas (BAP, Kin, Zeatina) o libre de reguladores de crecimiento; mientras que para inducir el **enraizamiento** de los brotes, se emplea una relación más tendiente al efecto de las auxinas. Sin embargo, es menester decir que, es conveniente para el buen desarrollo de los tejidos la presencia de éstas dos hormonas de crecimiento en los medios de cultivo (Villalobos y Thorpe, 1991).

El paso siguiente al enraizamiento, es el proceso de adaptación a las condiciones de ex-vitro. Esta adaptación es imprescindible, ya que las plantas enraizadas *in vitro* presentan alta humedad relativa dentro de los recipientes, lo que provoca que carezcan de mecanismos para evitar la pérdida de agua, ya que tienen la cutícula poco desarrollada y el sistema de

cierre de estomas está atrofiado. Estas plantas no realizan fotosíntesis normal, porque sus requerimientos de carbono son satisfechos por el medio de cultivo, lo que hace que las hojas sean más delgadas y con menos contenido de clorofila. Por lo anterior las plantas son sometidas a un periodo de **adaptación**, en la que se desarrolla la autotrofia de forma paulatina (Mroginski et al, 2004).

En todas las etapas y en general en la práctica del cultivo de tejidos vegetales, la **asepsia** se constituye en un factor determinante e imprescindible, ya que evitar la contaminación con microorganismos permite el establecimiento de los cultivos, su ulterior incubación y manipulación y, en el caso de una investigación, continuidad de los experimentos (Villalobos y Thorpe, 1991).

El laboratorio de Crecimiento y Desarrollo de las plantas de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, cuenta con tres secciones: una sección de producción, una de investigación y otra de docencia. Las tres secciones se encuentran físicamente separadas entre sí, por razones de seguridad fitosanitaria. En la primera, se maneja todo el proceso de propagación vegetal, desde la selección de las plantas madres hasta la adaptación al medio externo, pasando por la preparación de medios, desinfección del explante, multiplicación y enraizamiento. Las especies vegetales mantenidas en esta sección son:

- Ornamentales: violeta africana (*Saintpaulia ionantha*), gardenias (*Gardenia jaminoides*), clavellinas (*Dianthus deltoides*), orquídeas (*Orquidaceae*), millonaria (*Plectranthus australis*), anturio blanco (*Anthurium*)
- Frutales: tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*), mora (*Rubus glaucus*), pitahaya (*Hylocereus undatus*), lulo (*Solanum quitoense*)

- Cultivos: yuca (*Manihot esculenta*), papa (*Solanum tuberosum*), ñame (*Dioscorea alata*), plátano, banano (*Musa sp*).

Para el caso particular de banano y plátano (imagen1) el procedimiento utilizado es el siguiente:

Los cormos traídos del campo se someten a un proceso de desinfección escalonado. A los cormos se les reduce su tamaño hasta en un 80% e inmediatamente se sumergen en una solución de benomil al 0.2%. Luego se lavan muy bien con agua y se sumergen en alcohol al 70% durante 5 minutos y nuevamente son lavados con agua, pero esta vez destilada y autoclavada. Posteriormente los cormos son depositados en una solución de hipoclorito de sodio al 2% durante 30 minutos, se lavan 3 veces con agua destilada autoclavada. Después son trasladados a la cámara de flujo laminar, en donde se les reduce el tamaño y nuevamente son sometidos a hipoclorito de sodio al 2%, pero solo por 10 minutos, se enjuagan bien con agua destilada autoclavada. En seguida se realiza un segundo corte y se sumergen en una solución de hipoclorito de sodio, pero con una concentración del 1% durante 10 minutos; se vuelven a lavar bien con agua destilada autoclavada. Para terminar el proceso de desinfección los cormos son nuevamente cortados y se usa hipoclorito de sodio al 0.6% también por 10 minutos, lavando bien con agua destilada autoclavada. Antes de ser sembrados en el medio de cultivo se vuelven a cortar hasta obtener el meristemo.

El medio de cultivo contiene las sales básicas de Murashige y Skoog (MS) 4.4 g/l, azúcar 30g/l, piridoxina 0.0005 g/l, ácido nicotínico 0.0005 g/l, ácido glutámico 0.05 g/l, glicina 0.0005 g/l, tiamina 0.0005 g/l, Mioinositol 0.05 g/l, BAP 0.0003 g/l, adenina 0.0005 g/l, cisteina 0.002g/l, KI 0.5 g/l, agar 8 g/l pH 5.8. Para la etapa de enraizamiento las plantas son subcultivadas en un medio libre de hormonas y cuando han alcanzado el estado óptimo de

crecimiento son transferidas a un sustrato inerte (turba) autoclavado, lavándolas muy bien para eliminar los restos de agar y así empezar el proceso de adaptación.

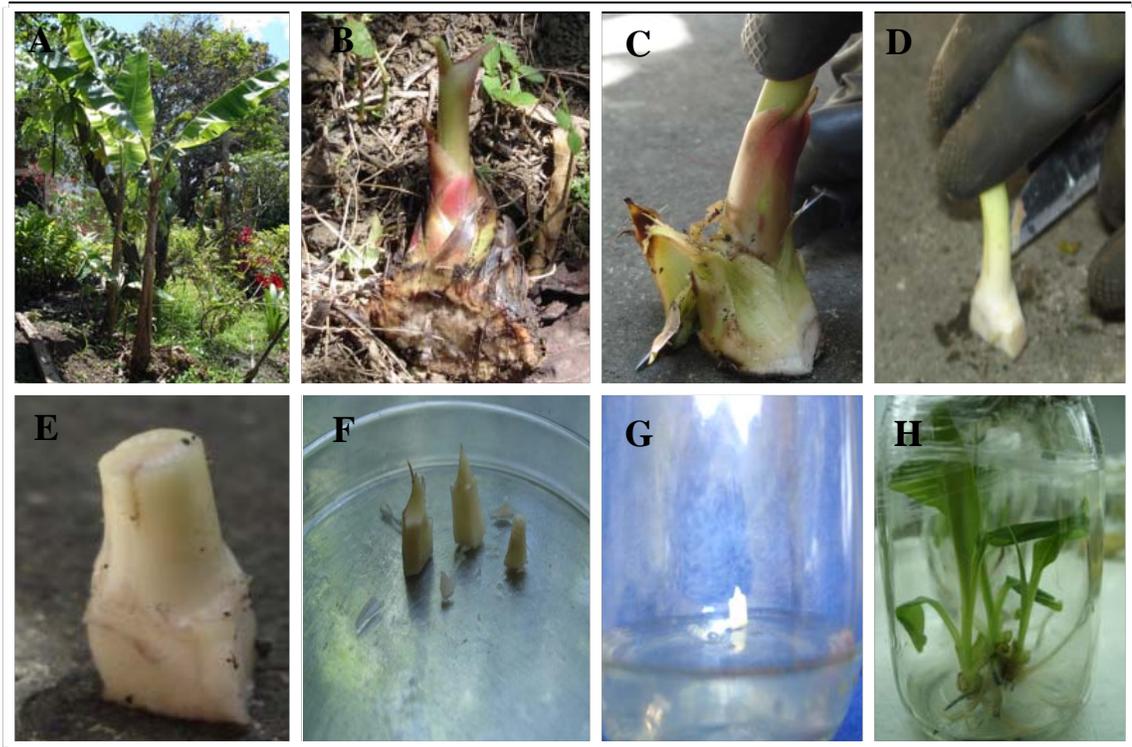


Imagen1. Proceso de propagación vegetal del banano *musa sp.* A. Planta madre. B. Cormo extraído de la planta madre. C, D, E y F. Obtención del meristemo por medio de cortes. G. Meristemo sembrado en medio semisólido. H. Plántula de banano *musa sp*

SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL.

El principio en que se basa este método consiste en someter los tejidos a intervalos regulares de inmersión y drenaje del medio de cultivo líquido, el cual puede llevarse a cabo en un solo recipiente, o en recipientes separados. El sistema de un solo recipiente, fue originalmente desarrollado por los científicos franceses que lo denominaron RITA[®] (CIRAD, Francia – récipient á immersion temporaire automatisé) (Teisson y Alvard, 1995). Este recipiente está dividido en dos compartimentos, uno superior y otro inferior; en el superior se coloca el tejido y en la parte inferior el medio de cultivo. El recipiente esta complementado con dos filtros hidrófobos de 0.2 μm reutilizables: uno central (entrada del aire) y uno lateral (salida del aire). El filtro central se conecta al sistema de aireación (bomba) a una presión de salida de 0.2 bares para que impulse el medio del compartimento inferior al superior durante un periodo corto (periodo de inmersión). Este “baño” temporal que reciben los explantes se controla por un reloj temporizador (automatización), que permite la abertura de una electroválvula que controla el sistema (Etienne y Berthouly, 2002).

El sistema de recipientes separados consta de dos frascos en los cuales, los tejidos se alojan en uno y el medio de cultivo se deposita en el otro. Los recipientes están conectados entre sí por mangueras plásticas, por donde se evacuará el medio de un recipiente, a otro por intervalos de tiempo definidos. La evacuación del medio está determinada, como en el anterior caso, por medio de una bomba y electroválvulas (Etienne y Berthouly, 2002).

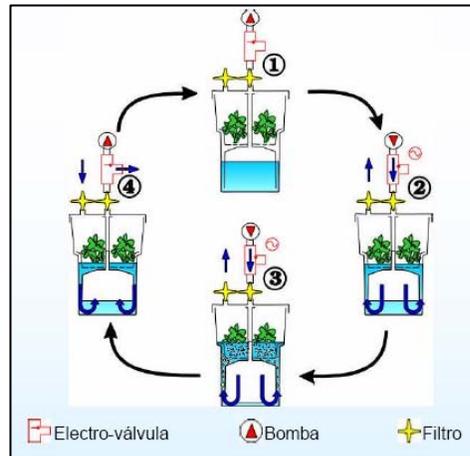


Imagen 2. Funcionamiento sistema RITA® (Tomado página Web CIRAD).

Este sistema, ya sea de uno o dos recipientes, ha sido acogido por la comunidad científica debido a las bondades que brinda a los tejidos en su desempeño fisiológico. Contrariamente al cultivo en frascos con medio sólido o líquido, los tejidos no están sometidos a los dos tipos de estrés; hídrico y gaseoso. En primer término, y dado que los tejidos están separados, éstos no están en contacto permanente con el medio, aliviando así el estrés hídrico. Por otro lado, los gases acumulados (Etileno, CO₂, alcoholes etc.) en la cabeza de aire disponible en los frascos, es renovada cada vez que se cumple un ciclo de inmersión, aliviando así el estrés del microambiente. La frecuencia y el tiempo de inmersión dependen de la especie que se esté trabajando (Salazar, 2006). Por ejemplo, el tomate de árbol tiene una frecuencia de 12 horas y un tiempo de inmersión de 10 minutos, pero, el banano responde mejor a una frecuencia de inmersión de 3 minutos cada 6 horas.

La eficiencia del sistema de inmersión temporal ha sido comprobada en diferentes laboratorios del mundo con los trabajos desarrollados en embriogénesis somática, cultivo de raíces para la producción de metabolitos secundarios, y en la micropropagación de cultivos como banano (Pinto *et al*, 2000), piña (Atehortua y Naranjo, 2003), ñame (Cabrera *et al*, 2003), café

caucho, caña de azúcar (Escobar *et al*, 2000), entre otros. Actualmente, este sistema se considera como el más importante para el escalamiento y automatización de la micropropagación, ya que aumenta la tasa de multiplicación, disminuye los costos de producción y reduce los riesgos de contaminación, originados por las diferentes transferencias de los explantes en el sistema convencional. Por tal motivo se ha considerado que el sistema de inmersión temporal presenta las siguientes ventajas frente al método convencional.

- Contacto directo renovado con el medio durante cada inmersión, lo que significa un aporte más eficiente de elementos nutritivos (mejor nutrición mineral).
- Renovación completa de la atmósfera dentro del recipiente a intervalos regulares, lo que evita la acumulación prolongada de gases nocivos como el etileno.
- Agitación por flujo de aire durante la inmersión, lo que causa la dispersión de los tejidos vegetales.
- Mayor optimización biológica por los altos coeficientes de multiplicación.
- Reducción de los costos por vitroplanta.
- Reducción del número de frascos y estantes en las cámaras de cultivo y por tanto mayor producción por m² de cámara.
- Eliminación de la fase de enraizamiento *in vitro*.
- Mejor comportamiento de las vitroplantas *ex vitro* por mayor metabolismo autotrófico durante la fase *in vitro*.
- Reducción de problemas de asfixia o hiperhidratación de los tejidos.
- Reducción de la mano de obra. (Salazar, 2006)

Este laboratorio dispone de las condiciones necesarias para desarrollar los sistemas de inmersión temporal (RITA[®]), en los cuales se han micropropagado con excelentes resultados especies tales como ñame

(Salazar, 2006) y tomate de árbol (Vélez, 2007). Se hicieron varios ensayos tanto para tomate de árbol como para ñame.

En el caso del tomate de árbol, por ejemplo, se utilizaron 9 vasos RITA® con una capacidad de 1L, a los cuales se les adicionó medio de cultivo líquido específico para la multiplicación del Tomate de árbol, el cual consistió en sales y vitaminas básicas de MS, suplementado con 30g/L de sacarosa, 0.5 mg/L de Piridoxina, 0.5mg/L de Ácido Nicotínico, 4mg/L de Glicina, 0.02mg/L de IAA, 0.1mg/L de BAP, 0,05mg/L de IBA, pH 5.7-5.8. Los medios se esterilizaron en una autoclave a 121°C, 15 kg/cm² por espacio de 20 minutos. Para recibir los explantes (entrenudos) en el recipiente superior, se utilizó un soporte inerte consistente en un círculo de malla de polisombra (Saran).

La frecuencia y tiempo de inmersión para cada experimento se controló a través de un temporizador programado cada 12 horas, durante 10 minutos por un periodo de 30 días.

Los tratamientos realizados fueron los siguientes:

	VOLUMES DE MEDIO	DENSIDAD DE EXPLANTES
1	200 mL	5
2	200 mL	10
3	200 mL	15
4	150 mL	5
5	150 mL	10
6	150 mL	15
7	100 mL	5
8	100 mL	10
9	100 mL	15

Tabla1. Diferentes tratamientos usados para la propagación de Tomate de árbol utilizando sistemas de inmersión temporal

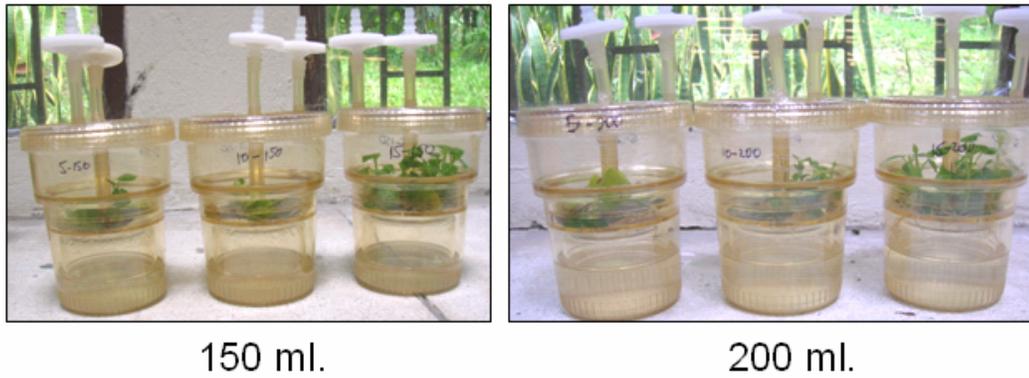


Imagen 3. Ensayos RITA® en diferentes volúmenes de medio (de izquierda a derecha 5, 10 y 15 explantes)

RESULTADOS

Coefficiente de multiplicación

Al analizar los valores obtenidos por medio de gráficos se puede observar una tendencia de incremento del coeficiente de multiplicación a medida que aumenta el volumen.

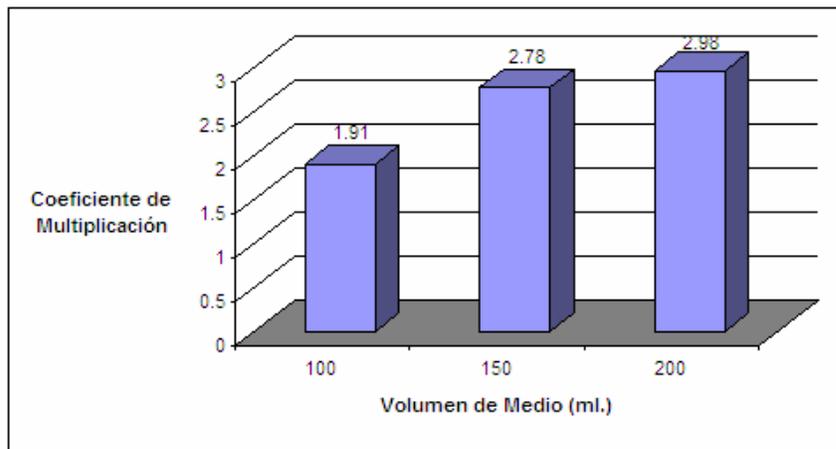


Grafico1. Efecto del volumen del medio sobre el coeficiente de multiplicación.

En cuanto al número de explantes, el mayor coeficiente de multiplicación se encontró cuando se sembraron 15 explantes.

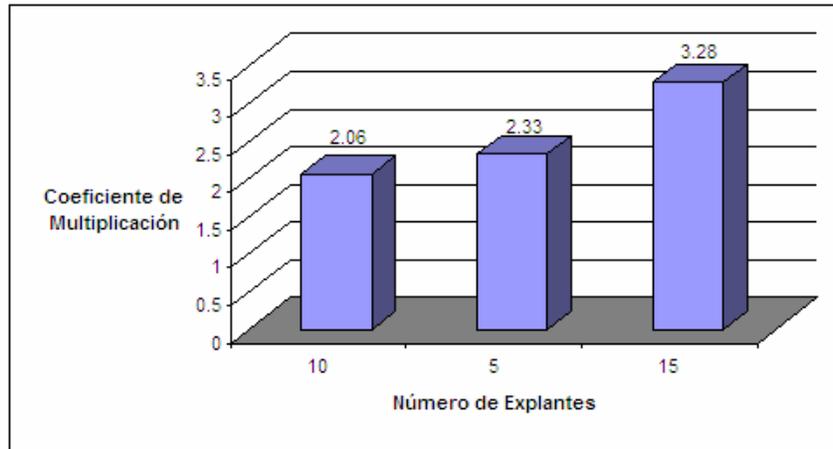


Grafico2. Efecto del número de explantes sobre el coeficiente de multiplicación.

Longitud de los explantes

A medida que se incremento el volumen del medio la longitud de los explantes también fue mayor.

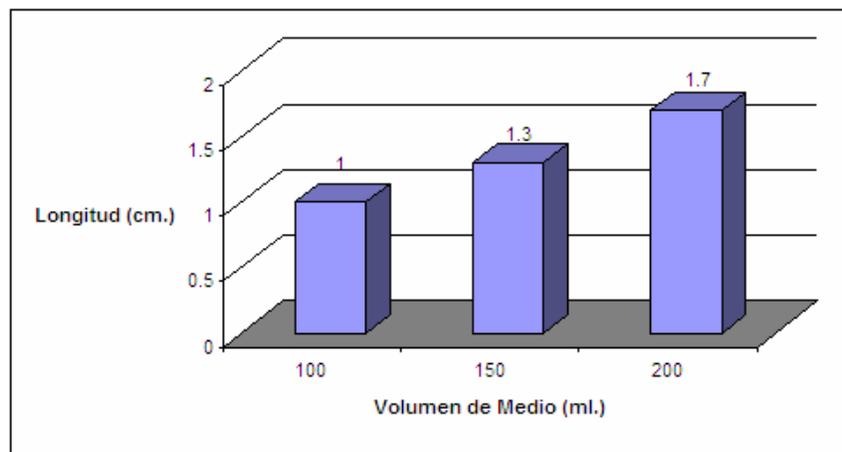


Grafico 5. Longitud promedio de los explantes en los diferentes volúmenes de medio.

El anterior experimento se realizó como parte del entrenamiento de la pasante dentro del estudio de la regenerabilidad y multiplicación *in vitro* de tres variedades (común, mora y amarillo) de tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* (Cav.)). Trabajo de grado llevado a cabo por la Ingeniera Forestal Margarita Viviana Vélez Herrera para optar el título de magíster en Biotecnología

SUSPENSIONES CELULARES

Otra de las técnicas que ofrece el cultivo de tejidos vegetales *in vitro* son las **suspensiones celulares**. Estas constituyen un modelo muy eficiente en los programas de selección y mejoramiento genético, pues, al tener una gran cantidad de células aisladas, la probabilidad de encontrar un mutante es mucho mayor; así mismo, a nivel celular resulta más fácil y seguro medir el efecto de la condición limitante, por lo que la eficiencia del trabajo experimental aumenta notablemente (Castroni et al, 1995).

Esta técnica también se aplica en la producción de metabolitos secundarios, los cuales son sustancias producidas por las células vegetales y son compuestos nativos de las plantas no asociados al metabolismo energético primario. Estos subproductos pueden ser importantes para la industria y benéficos en salud humana, especialmente los metabolitos presentes en las plantas medicinales (Capataz, 2005). Otras aplicaciones de esta técnica en investigaciones con vegetales son: estudios sobre el ciclo celular, estudios fisiológicos y bioquímicos y embriogénesis somática (Szábados et al, 1991).

Las suspensiones celulares se inician generalmente mediante la incubación de trozos de callos friables en medios líquidos en constante agitación. **Los callos** son de una formación desorganizada (dediferenciado) de un grupo de células, resultado de una alta actividad mitótica de células diferenciadas en respuesta a un estímulo Ej.: heridas, alta producción de auxinas en señal de cicatrización (Ocando y Schuler, 2008). Estos estímulos cambian el metabolismo celular pasando de inactivo a activo, así, el proceso de diferenciación y especialización de las células en una planta es invertido y el explante comienza un proceso de re-diferenciación, indicando que las células están respondiendo a nuevos estímulos que afectan su especialización (Restrepo y Uribe, 1989). La mayoría de los tejidos requieren de uno o más

factores de crecimiento en el medio de cultivo para estimular el desarrollo del callo. Los explantes pueden ser subdivididos de acuerdo a los factores de crecimiento requeridos, de la siguiente manera: los que requieren una sola auxina, solo citoquininas, auxina más citoquinina y los que necesitan extractos naturales complejos (Dodds y Roberts, 1982). En aras de lograr suspensiones celulares, se indujo la producción de callos de ñame (pico de botella y espino), gardenias y neem. Se sembraron tejidos foliares en un medio de cultivo compuesto de las sales y vitaminas de MS suplementados con diferentes concentraciones de BAP y 2,4D.

Para el caso específico de la producción de callos en ñame (pico de botella) se utilizó el medio de cultivo MS completo 4.4g/l mas 3% azúcar, 0.1 mg/l tiamina, 20 mg/l L-cisteina, 0.5 g/l carbón activado, 1.7 g/l phytigel, pH 5.8 con 5 repeticiones por cada tratamiento (65 frascos con 15 ml), y 4 explantes por frasco.

Las concentraciones de cada hormona fueron:

	BAP(g/L)	2,4D(g/L)			
1.	0.5	0.5	7.	0.5	0.5
2.	0.5	1	8.	0.5	1
3.	0.5	2	9.	0.5	2
4.	1	0.5	10.	1	0.5
5.	1	1	11.	1	1
6.	1	2	12.	1	2
			13.	Sin hormonas	

Tabla2. Diferentes tratamientos usados para la inducción de callos en Dioscorea alata Var. Pico de botella

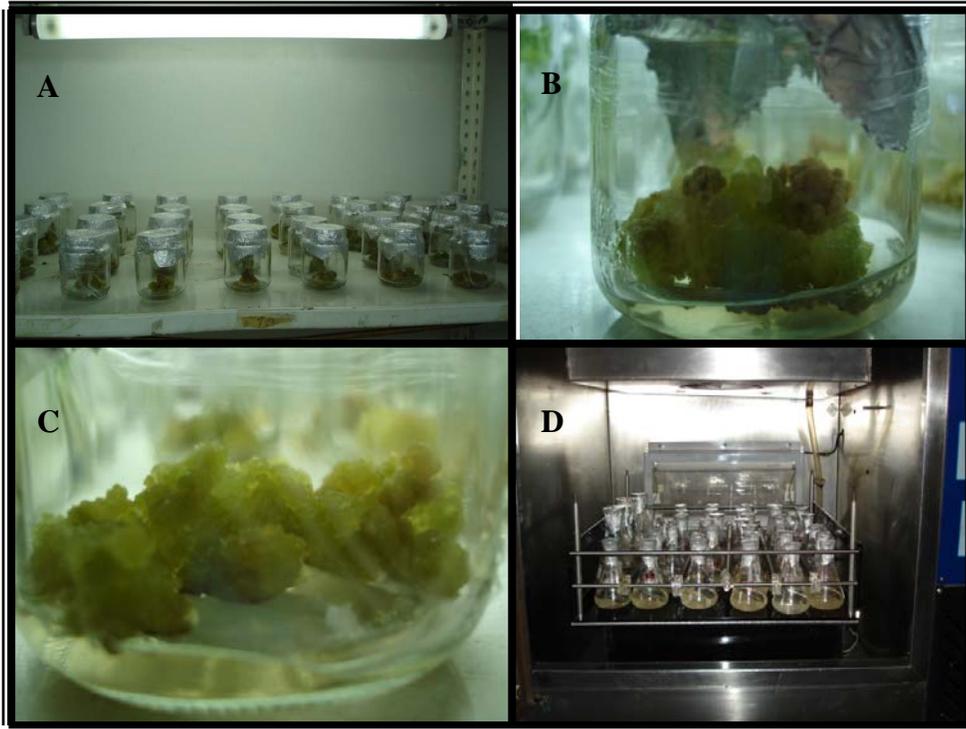


Imagen5. Diferentes tratamientos usados para la inducción de callos en *Dioscorea alata* Var. Pico de botella y Var. Espino

Para el caso del neem, las suspensiones celulares fueron logradas a partir de callos friables, de 8 semanas de edad, previamente establecidos en el laboratorio. Luego de disgregar el callo se depositó en erlenmeyers de 80 ml que contenían 20 ml de medio líquido específico para neem (medio de cultivo MS completo 4.4g/l mas 3% azúcar, glicina 0.002 g/L, ácido nicotínico 0.0005 g/L, piridoxina-HCl 0.0005 g/L y tiamina-HCl 0.0001 g/L ajustado a un pH de 5,8, suplementado con IBA 0.004 g/L y BAP 0.001 g/L. Las suspensiones fueron incubadas en condiciones de oscuridad, 25°C y 120 rpm en un agitador orbital.

Para lograr unas suspensiones más finas y homogéneas se realizaron subcultivos utilizando un tamiz en una malla de acero inoxidable N° 16 (1.19 mm). Con esto se previno la formación de grandes agregados celulares. El filtrado celular obtenido fue dejado en sedimentación para retirar todo el medio de cultivo viejo y las células remanentes (sedimentadas) fueron suspendidas en medio fresco de igual volumen al retirado (sobrenadante).

Se obtuvieron suspensiones homogéneas mediante la transferencia de 5 mL de suspensión celular tamizada a erlenmeyers de 80 mL pre-esterilizados con 20 mL de medio fresco cada tres semanas.



Imágen6. A, B y C callos de neem (*Azadiractha indica*), y D suspensiones de neem

Las suspensiones se examinaron al microscopio en cada subcultivo con el fin de monitorear que la morfología celular no fuera amorfa, sino isodiametrica, característica de las suspensiones celulares de neem.

SELECCIÓN *IN VITRO*

Es un procedimiento rápido y eficiente para aislar individuos con genotipos específicos generados por las técnicas *in vitro* en la presencia de un agente selectivo, que puede ser de origen biótico o abiótico de acuerdo con los fines que se persigan. En este procedimiento, la presión de selección puede ser aplicada a un número extremadamente alto de células (Patiño, 2006). Contrario a las pruebas convencionales de campo, en donde la selección se hace sobre un número pequeño de plantas, que para el caso de la búsqueda de líneas resistentes a enfermedades, es consumidor de tiempo, costoso y depende de las fluctuaciones naturales en la abundancia del inóculo, y, además de los factores que influyen la dispersión del patógeno, la infección, el desarrollo y expresión de la enfermedad. Comparativamente, la selección *in vitro* requiere menos esfuerzo y menos recursos que la selección bajo condiciones de campo (Borras et al, 2001).

Para cumplir el objetivo trazado relacionado con el aislamiento y la purificación de hongos para la extracción de filtrados crudos aplicados en la selección celular, se desarrolló el establecimiento de un protocolo para la selección *in vitro* de dos variedades de ñame (*dioscorea spp*) por su tolerancia al filtrado crudo del hongo *Colletotrichum Gloeosporioides*, que a continuación se describe

SELECCIÓN *IN VITRO* DE DOS VARIEDADES DE ÑAME (DIOSCOREA SPP) POR SU TOLERANCIA AL FILTRADO CRUDO DEL HONGO

Colletotrichum gloeosporioides

Presentado por: Samara Irina Contreras¹, y Rodrigo Alberto Hoyos Sanchez²

¹ Estudiante de Biología de la Universidad de Sucre.

² Docente Departamento de Ciencias Agronómicas Facultad de Ciencias Agrarias
Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.

Grupo de Biotecnología Vegetal. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue establecer un protocolo de selección *in vitro* para plantas de ñame por su resistencia a las fitotoxinas presentes en el filtrado crudo producido por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides*. Se evaluaron dos variedades de ñame criollo, Coco y Pico de Botella, por su resistencia a la antracnosis mediante el empleo de filtrados crudos del hongo *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causante de la enfermedad. Los filtrados del hongo fueron obtenidos mediante el crecimiento de éste en medio líquido y bajo condiciones de fermentación estática. Las fermentaciones del hongo se realizaron a intervalos de una semana durante cuatro semanas y de cada semana se evaluaron cinco tratamientos correspondientes a cinco diluciones del filtrado crudo: 6, 12, 25, 50 y 75 % (v/v). Como explantes se usaron nudos de las dos variedades de ñame, las cuales se evaluaron con los filtrados de dos cepas del hongo. En cada dilución se sembró un nudo como explante y cuatro explantes por unidad experimental. Se evaluó como variable respuesta la muerte o sobrevivencia del explante y en los sobrevivientes, la generación de brotes. Los resultados corroboraron lo reportado bajo condiciones de campo en relación a la respuesta de las dos variedades de ñame a la enfermedad, encontrándose una susceptibilidad mayor en la variedad “Coco” que en la “Pico de Botella”.

El efecto del filtrado crudo sobre los explantes de ñame fue mayor en la medida que se aumento la concentración del filtrado en el medio, en la dilución del 75% se obtuvo un menor número de individuos. El tiempo de fermentación del hongo fue importante en la selección del material, ya que en la segunda y cuarta semana el porcentaje de generación de brotes disminuyó. Se observaron diferencias morfológicas marcadas en las plántulas regeneradas de las dos variedades, lo cual podría ser un indicativo de la presencia de variantes somaclonales. Estos materiales se encuentran en proceso de multiplicación para hacer las pruebas en invernadero y campo.

Palabras claves: *D. alata*, filtrado crudo, selección *In Vitro*, antracnosis, *Colletotrichum gloeosporioides*, variación somaclonal, resistencia.

INTRODUCCION

En Colombia, el ñame se usa para alimentación de la población, principalmente, de la Costa Atlántica; es cultivado por pequeños y medianos agricultores y constituye la principal fuente de ingresos y de empleo rural en estas zonas. Además, su exportación a los mercados de Estados Unidos y Europa le genera al país más de US\$2.5 millones anuales. El ñame criollo (*Discorea alata*), que es la especie más popularmente sembrada en las zonas productoras del caribe colombiano, esta reportado como la más susceptible de las especies de ñame a la enfermedad de la antracnosis (Onyeka, et al 2006).

El ñame es un cultivo de bajo nivel tecnológico, sembrado generalmente en asocio, que genera alta mano de obra. La enfermedad foliar conocida como antracnosis, producida por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides*, apareció como epidemia en 1990, reduciendo en más del 70% el área sembrada y la oferta de este producto. La comercialización de ñame es regional para

consumo en fresco, aunque una parte se exporta a Estados Unidos, España y Alemania para alimento de la población latina y uso farmacológico. No hay industrias transformadoras de ñame en Colombia y las investigaciones orientadas a su valoración como materia prima agroindustrial han sido escasas (Pérez, 1990).

Una alternativa para el mejoramiento genético de éste cultivo la ofrecen las nuevas herramientas biotecnológicas como los sistemas *in vitro* (Kadota and Niimi, 2004), que comprenden desde la inducción de variabilidad genética hasta las transformaciones de la planta. Esto posibilitaría desarrollar un programa de mejoramiento genético en ñame con miras a ofrecer a los agricultores nuevos materiales con potencial tolerancia o resistencia, que posteriormente deben ser seleccionadas, multiplicadas y evaluadas. (Perea, 2000; Onwyka, 2006).

La variabilidad genética en los clones (Variación somaclonal), puede ser generada *in vitro* de diferentes maneras (Palombi, et al, 2007; Kubis, et al. 2003; Amzad, et al. 2003). Este tipo de selección es un procedimiento que podría resultar rápido y eficiente para aislar individuos con genotipos específicos generados en la presencia de un agente selectivo. En este procedimiento, la presión de selección puede ser aplicada a un extremadamente alto número de células, evitando la selección de plantas individuales en pruebas de campo convencionales. El agente de selección puede ser de origen biótico o abiótico de acuerdo con los fines que se persigan: metales pesados, sales, herbicidas, patotoxinas, virus, etc. (Patiño, 2006)

Teniendo en cuenta que los filtrados crudos de microorganismos poseen fitotoxinas (Lu, et al, 2000), que pueden ser utilizadas como agentes de selección. Que el hongo *C. gloeosporioides* cultivado en medio líquido,

genera metabolitos secundarios, enzimas y hormonas, que han sido usados como agentes de presión de selección presentes en la resistencia *in vitro* (Patiño, Hoyos y Afandor, 2007). Y que además la selección de cultivos embriogénicos de ñame con tolerancia mejorada contra fitotoxinas puede ser utilizado para generar plantas de ñame resistentes a la antracnosis (Abang 2003) se quiso hacer un estudio preliminar estableciendo un protocolo de selección *in vitro* para plantas de ñame por su resistencia o tolerancia a las fitotoxinas presentes en el filtrado crudo producido por el hongo. Este trabajo constituye un paso en la identificación de las posibilidades técnicas y económicas de aprovechamiento y valoración del ñame, dada la importancia de la producción regional en que están comprometidas las comunidades campesinas. Los objetivos que se trazaron para este trabajo fueron evaluar tanto el efecto del tiempo de cultivo en medio líquido como la concentración del filtrado crudo de dos cepas del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* sobre tejidos nodales de dos variedades de ñame.

MATERIALES Y METODOS

Material Vegetal

Se usaron tubérculos de las variedades “coco” y “pico de botella” provenientes de zonas productoras de ñame del departamento de Sucre. Las plántulas *in Vitro*, fuente de los explantes para el presente trabajo, fueron obtenidas mediante cultivo de meristemos y los explantes utilizados correspondieron a segmentos nodales. Las vitroplantas se multiplicaron en un medio de cultivo reportado por Salazar y Hoyos (2007), el cual consistía de 4.4 g/L de MS, 3% azúcar, 0.1 mg/l tiamina, 20 mg/l L-cisteína, 2 mg/l de BAP, 0.5 mg/l de ANA1.7g/L de phytigel, 0.5 g/l de carbón activado y pH 5.8

Patógeno

El hongo fue sembrado en el medio de cultivo “Agar Marthur’s” durante 7 días a una temperatura de 25 ± 2 °C con un fotoperíodo de 12 horas. Transcurrido este tiempo, se extrajeron cuatro discos de crecimiento micelial de aproximadamente 5 mm de diámetro y fueron depositados en erlenmeyers de 1000 ml que contenían 500 ml medio líquido.

Obtención del filtrado crudo del hongo (FC)

El FC del hongo se obtuvo mediante filtraciones sucesivas independiente en cada semana de cultivo. La primera filtración se realizó a través de papel filtro Whatman N° #1, con el que se removió el micelio y las partículas grandes, este procedimiento se realizó tres o cuatro veces, luego el filtrado resultante se pasó por membranas milipore de 0.2 μm con el fin de esterilizarlo por filtración, como se ve en figura. 1

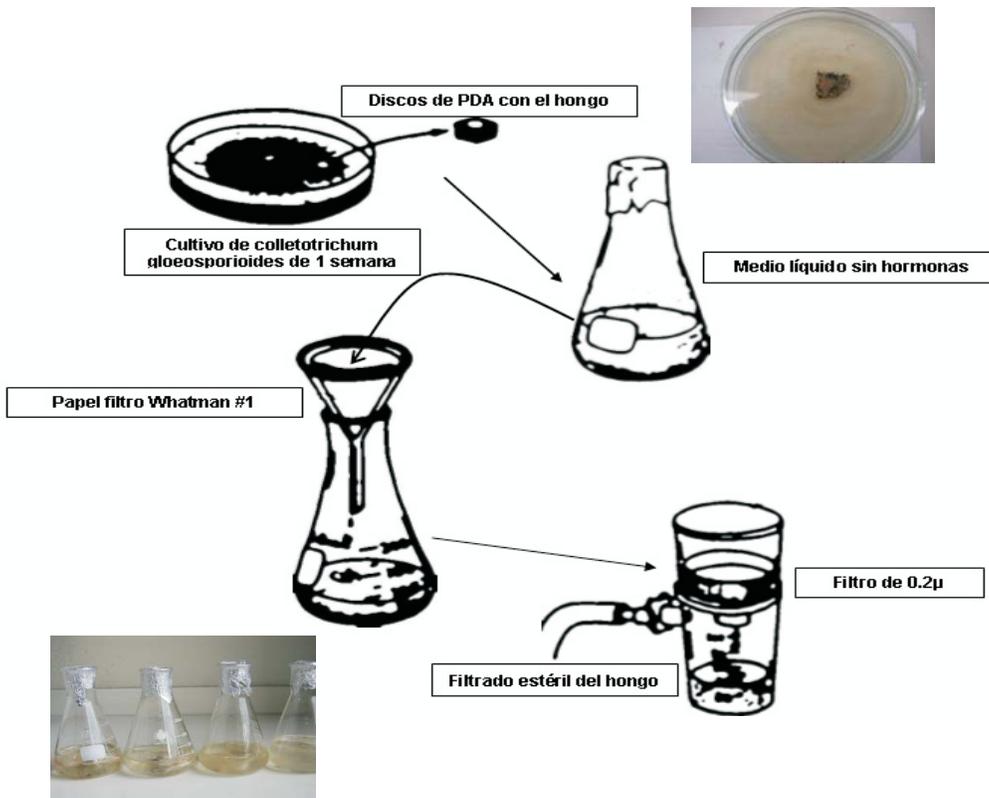


Figura 1. Obtención del filtrado crudo de *Colletotrichum gloeosporioides* en medio de cultivo líquido.

Medios de cultivo para la selección *in vitro* de plántulas de ñame

El medio de cultivo sobre el cual se sembraron los explantes fue el mismo medio utilizado para la multiplicación del ñame (Salazar y Hoyos, 2007). Los niveles de concentración del agente de selección (filtrados fitotóxicos) adicionados al medio de cultivo fueron 75%, 50%, 25%, 12% y 6% (v/v) y el testigo, al cual no se le adicionó filtrado. El filtrado crudo se adicionó al medio de cultivo cuando todavía se encontraba en estado líquido a una temperatura entre 25 y 30 °C. Por cada concentración de filtrado utilizada se sembraron 4 explantes en 25 ml de medio de cultivo cada uno, los cuales se mantuvieron a una temperatura de 25°C aproximadamente y fotoperíodo de 12 horas. La variable respuesta evaluada fue la sobrevivencia de los explantes.

RESULTADOS

Viabilidad de dos variedades de ñame: “coco” y “pico de botella” a la acción del filtrado crudo del hongo *C. Gloesporioides*.

En la figura 2 se observa que las variedades de ñame “coco” y “pico de botella” presentaron una respuesta diferencial a la acción del FC de las dos cepas evaluadas. La variedad “coco” presentó un porcentaje de sobrevivencia de 3.75% y 11.5 % a la acción de las cepas cg339 cg216 respectivamente. Por otro lado, la variedad “pico de botella” presentó un porcentaje de sobrevivencia de 22.5 % para la cepa cg339 y de 30% para la cepa cg216.

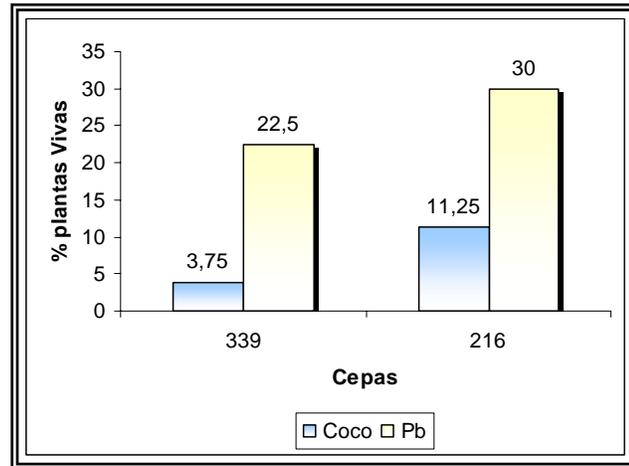


Figura 2. Respuesta varietal a la acción del filtrado crudo de las cepas cg216 y cg339 del hongo *C. gloeosporioides*

El efecto de las diluciones del filtrado crudo de las cepas 216 y 339 en la variedad “coco” fue diferente. Siendo las diluciones de 75% y 50% altamente tóxicas ya que en estas diluciones todos los explantes murieron (Tabla 1). Por otro lado, solamente, para la dilución del 25% cepa del hongo causó un gran efecto en la respuesta de la variedad “coco” a la acción de las fitotoxinas del filtrado ya que ningún explante sobrevivió para ambas cepas. , de la cepa cg 216 se obtuvo una respuesta positiva y en el caso de las diluciones más bajas (12% y 6%) ambas cepas produjeron resultados. Con relación al tiempo, se determinó que la sobrevivencia de las dos variedades empezó a disminuir considerablemente después de la segunda semana Tabla 2.

Diluciones del Filtrado crudo (%)	Plantas vivas (%)			
	Variedad Coco		Variedad Pico de botella	
	Cg339	Cg216	Cg339	Cg216
6	12,5	31,25	31,25	37,5
12	6,25	18,75	25	43,75
25	0	6,25	37,5	37,5
50	0	0	12,5	18,75
75	0	0	6,25	12,5

Tabla 1. Porcentaje de sobre vivencia de la variedad de ñame "coco" a las diluciones del filtrado crudo de dos cepas de *Colletotrichum gloeosporioides*. penz

Semanas de fermentación	Plantas vivas (%)			
	Variedad Coco		Variedad Pico de botella	
	Cg339	Cg216	Cg339	Cg216
1	10	25	55	70
2	0	5	20	15
3	5	10	5	15
4	0	5	10	20

Tabla 2. Efecto de la fitotoxicidad de las cepas cg216 y cg339 sobre dos clones de ñame (coco y pico de botella) en las semanas 1, 2, 3 y 4 de fermentación del hongo en medio de cultivo líquido.

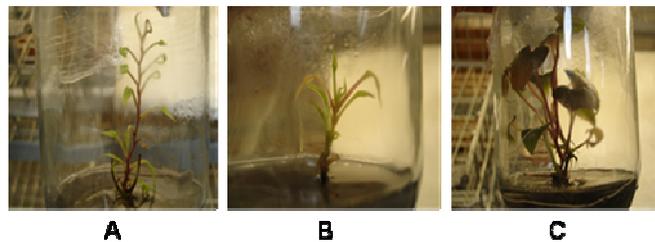
Entre las plántulas que sobrevivieron a la acción del filtrado crudo de las cepas cg339 y cg216 se pudo observar los fenotipos con mayor grado de diferencia para las dos variedades evaluadas, por ejemplo en la variedad “coco” con el FC de la cepa cg339 figura 2 se muestran plántulas con (A) plántulas alargadas sin ramificaciones, hojas pequeñas, de color verde pálido, un pecíolo alargado y un tallo de color rojo, en una dilución 6% (v/v) de la primera semana de fermentación del hongo. (B) reducción del crecimiento de las plántulas con hojas delgadas y alargadas, en una dilución de 6% (v/v) de la tercera semana de fermentación del hongo; (C) un fenotipo normal, en una dilución de 12 % (v/v) de la primera semana de fermentación del hongo, las hojas y el tipo de crecimiento tienen la forma típica de las plántulas de ñame. Por otro lado, las plántulas obtenidas en el medio de cultivo con el FC de la cepa cg216 se pudo observar: (A) plántulas alargadas sin ramificaciones, hojas pequeñas, de color verde, un pecíolo alargado, y el tallo de color amarillento, en una dilución 12% (v/v) de la primera semana de fermentación del hongo; (B) plántulas con un mínimo crecimiento, los nudos escasamente brotaron con una tasa de crecimiento lenta en una dilución 12% (v/v) de la semana cuarta de fermentación; (C) plántulas con crecimiento reducido, este tipo de plántulas aunque presentaron hojas normales su crecimiento estuvo marcadamente reducido en una dilución 6% (v/v) de la semana tres de fermentación del hongo.

La variedad “pico de botella” con el FC de la cepa cg339 figura 3. mostró plántulas con (a) plántulas de color verde con varios tallos sin ramificaciones y hojas pequeñas en una dilución 12% (v/v) de la segunda semana de fermentación; (b) plántulas con hojas rojas, de crecimiento normal y producción de raíces adventicias en una dilución 12% (v/v) de la primera semana de fermentación; (c) plántulas de tamaño reducido, con escasa producción de hojas y raíces en una dilución de 25% (v/v) de la primera semana de fermentación; (d) similar a las plántulas de (a) excepto por el

color rojizo de los tallos y pecíolos en una dilución de 25% (v/v) de la semana cuarta de fermentación; esta variedad cultivada con el FC de la cepa cg216 presento: (e) plántulas con una alta proliferación de brotes, hojas similares a (a) y (d) en una dilución de 12% (v/v) de la primera semana de fermentación; y (f) plántulas con capacidad de producir callos en la base del tallo. Dentro de este grupo de plántulas la capacidad de enraizamiento y formación de callos en la base del explante también fue diferente dependiendo de la procedencia del FC, las plántulas cultivadas con el FC de la cepa 339 presentaron un sistema radical menos profuso, en cambio las que crecieron con el FC de la cepa cg216 tuvieron una mayor formación de raíces y fueron estas y en esas condiciones que formaron callo.

FENOTIPOS DE ÑAME IN VITRO.

Variedad Coco / cepa cg339



Variedad Coco / cepa cg216

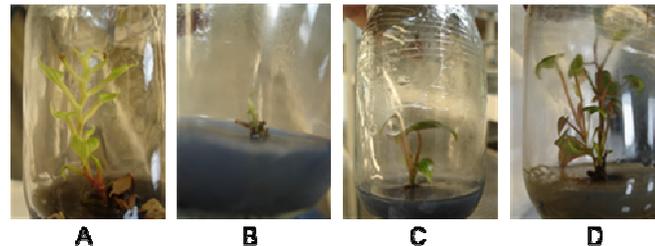
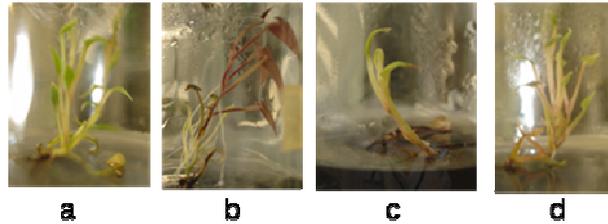


Figura 3. Variación morfológica de plántulas sobrevivientes de "coco" al filtrado crudo de las cepas de *C. gloeosporioides*.

Variedad pico de botella / cepa cg339



Variedad pico de botella / cepa cg216

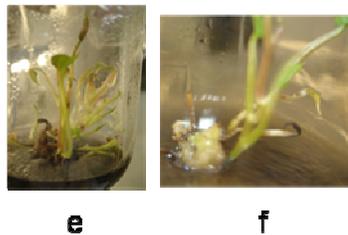


Figura 4. Variación morfológica de plántulas sobrevivientes de “pico de botella” al filtrado crudo de las cepas de *C. gloeosporioides*

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Amzad, Md. Hossain, Kunihiko Konisho, Mineo Minami, & Kazuhiro Nemoto. Somaclonal variation of regenerated plants in chili pepper (*Capsicum annum* L.). *Euphytica* 130, 2003; p.233–239.
2. Barjau, M., D. Druet, L.C. Comeau.. Purification and partial characterization of phytotoxic glycopeptides secreted by *Colletotrichum gloeosporioides*. *App. Microbiol. Biotechnol.* 43, 1995; p.217-221
3. Carlos Patiño Torres, Rodrigo Alberto Hoyos Sánchez y Lucia Afanador K.. Selección y regeneración *in vitro* de somaclones de tomate de árbol (*Solanum betacea* cav. Sendt) utilizando filtrados de cultivo de *Colletotrichum acutatum* con actividad pectinasa. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*. Volumen: 60 Número 2, 2007; p. 3923-3937

4. Cerón, Laura E. Rincón, Blanca L. Higuera M., Jimena Sánchez N., Silvia Bustamante, Gustavo Buitrago. Crecimiento y desarrollo de *Colletotrichum gloeosporioides f. alatae* durante su cultivo en medios líquidos.. Acta Biológica Colombiana, Vol. 11 No. 1, 2006, p.99 – 109
5. Kadota, Masanori and Y. Niimi. Improvement of micropropagation of Japanese yam using liquid and gelled medium culture. Scientia Horticulturae 102, 2004, p.461–466
6. Kubis, Sybille E., Alexandra M.M.F. Castilho, Alexander V. Vershinin and John Seymour (Pat) Heslop-Harrison.. Retroelements, transposons and methylation status in the genome of oil palm (*Elaeis guineensis*) and the relationship to somaclonal variation. Plant Molecular Biology 52, 2003. p.69–79.
7. Lu, Hong, Wen Xin Zou, Jun Cai Meng, Jun Hu, Ren Xiang Tan. 2000. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*. Plant Science 151, 2000. p. 67–73
8. Onyeka, T. J., D. Pétro, G. Ano, S. Etienne and S. Rubens. Resistance in water yam (*Dioscorea alata*) cultivars in the French West Indies to anthracnose disease based on tissue culture-derived whole-plant assay. Plant Pathology. 55, 2006(a). p.671–678
9. Onyeka, T. J., D. Petro, S. Etienne, G. Jacqua and G. Ano. Optimizing Controlled Environment Assessment of Levels of Resistance to Yam Anthracnose Disease Using Tissue Culture-derived Whole Plants. Plant Pathology. 55, 2006 (b).

10. Palombi, Maria Antonieta, - Beatrice Lombardo and Emilia Caboni. *In vitro* regeneration of wild pear (*Pyrus pyraster* Burgsd) clones tolerant to Fe-chlorosis and somaclonal variation analysis by RAPD markers. *Plant Cell Rep.* 26, 2003. p.489–496.
11. Perea, D.M. y H.G. Buitrago.. Aplicación de la biotecnología agrícola al cultivo de ñame. En: Guzmán, M. y G. Buitrago (eds.). Ñame: producción de semillas por biotecnología. Universidad Nacional de Colombia Unibiblos, Bogotá, Colombia. 2000. p.17-19
12. Pérez, P. David. Determinación de parámetros para el secado de ñame. Tesis de grado Ingeniería Agrícola. Facultad de Ingeniería, Universidad de Sucre, Sincelejo. 1990. 78 p.
13. Salazar, D., Robinson y Rodrigo A. Hoyos Sánchez. Multiplicación y tuberización *in vitro* de ñame (*Dioscorea alata* L.) en sistema de inmersión temporal *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín.Vol.60, No.3920 2, 2007 p.3907-3921.*
14. <http://www.turipana.org.co/name.htm>

Por último, además de las actividades prácticas descritas, la asistencia al curso en el área de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* dictado para el postgrado en biotecnología de esta Universidad contribuyó con la profundización en la teoría científica, asimismo la lectura y presentación de artículos científicos relacionados con Cultivo de Tejidos Vegetales de igual forma ayudaron al aumento de mis conocimientos teóricos acerca de esta disciplina.

RESUMEN DE LAS ACTIVIDADES DESARROLLADAS DURANTE LA PASANTÍA

1. Preparación de medios

- Medio para iniciación y multiplicación de ñame (*Dioscorea alata*)
- Medio para multiplicación de banano (*musa sp*)
- Medio para multiplicar callos de neem (*Azadiractha indica*)
- Medio líquido para tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*)
- Medio líquido para suspensiones de neem (*Azadiractha indica*)
- Medio PDA
- Medio agar Mathur's
- Medio líquido de ñame para el crecimiento del hongo *Colletotrichum gloeosporioides*
- Medio para la inducción de callo en ñame (*Dioscorea alata*)
- Medio para la inducción de callo en jazmín (*Jasminum officinale*)

2. Establecimiento de material vegetal

- Establecimiento de cultivos de ñame (*Dioscorea alata*) de las variedades pico de botella, diamante 22 y oso. También de banano (*musa sp*)

3. Micropropagación de material vegetal

- Micropropagación de banano (*musa sp*)
- Micropropagación de ñame (*Dioscorea alata*) de las variedades pico de botella y coco.
- Micropropagación de tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*)
- Micropropagación de yuca (*Manihot esculenta*)
- Micropropagación de lulo (*Solanum quitoense*)
- Micropropagación de jazmín (*Jasminum officinale*)

4. Inducción de callos

- En jazmín (*Jasminum officinale*)
- En ñame. (*Dioscorea alata*)

5. Iniciación de suspensiones celulares

- En neem (*Azadiractha indica*)

6. Multiplicación *in vitro* de hongos fitopatógenos

- Multiplicación de las cepas 225, 355, 222, 216 y 339 de *colletotrichum gloeosporioides*.

7. Obtención de filtrados crudos para la selección celular

- Obtención de filtrados crudos de los hongos *colletotrichum* de mora y ñame (*gloeosporioides* cepas 216 y 339).

8. Selección *in vitro* por su resistencia a *C. gloeosporioides*

- Establecimiento de un protocolo de selección *in vitro* para plantas de ñame (*Dioscorea alata*) por su resistencia a las fitotoxinas presentes en el filtrado crudo producido por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides*.

9. Montaje del sistema de inmersión temporal

- En ñame (*Dioscorea alata*)
- Tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*)

10. Aclimatación de plántulas

- Aclimatación de plántulas de tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* (Cav.))
- Aclimatación de plántulas de banano (*musa sp*)

11. Asistencia al curso en el área de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* dictado para el postgrado en biotecnología.

12. Práctica pedagógica en la cual se asistió al centro de investigación para la caña de azúcar (CENICAÑA), Centro de investigación para el café (CENICAFÉ), al open house ofrecido por el CIAT, a CORPOICA (Palmira y Bogotá), Universidad Javeriana, Universidad Nacional Sede Bogotá.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Atehortua L y Naranjo E. Bioconversión de embriones somáticos de la palma de chontaduro (*Bachis gasipaes* H.B.K.) utilizando los sistemas de inmersión temporal "RITA". Reesumen III seminario internacional y IX nacional de especies promisorias. (Oct de 2003); p. 29-31
2. Bhowmik, P.K. Y Matsuz, T., Novel micropropagation System: A Review. *Pakistan journal of biological sciences* 4 (2), 2001. p.117-120.
3. BILANG, R., et.al, *Agrucultural biotechnology*. Taylor & Francis, New York 1998
4. Borrás, O.; Santos, A. R.; Matos, A. P.; Cabral, R. S. And Arzola, M. A First attempt o use a *Fusarium subglutinans* culture filtrate for the selection of pineapple cultivars resistant to fusarirose disease. *Plant Breeding*, 120, 2001. p.435-438.
5. Cabrera M, Torres Y, Santos A, Basail M, Rayas A, Medero V, Robaina A, López J, García M, Ventura J, Espinosa E, Gutiérrez V, Otero E, Berta M y Álvarez M. Establecimiento y multiplicación *in vitro* del clon de ñame blanco de Guinea (*Dioscorea rotundata* Poir). Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales, INIVIT. 2003.
6. Capataz, J. Efecto de elicitores Abióticos Sobre la Producción de Metabolitos Secundarios en Suspensiones Celulares de *Azadirachta Indica* y su Efecto Sobre *Spodoptera* sp. Trabajo de Grado (Magíster en Biotecnología). Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. Medellín 2005. 67p.

7. Castroni, S. Fuchs, M. Y González, V. Evaluación de la Reacción de Genotipos de Caña de Azúcar a Diferentes Concentraciones de NaCl Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Departamento de Biotecnología Venezuela, 1995.
8. Compton, M. E., Saunders, J. A., Veilleux, R. E. Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises CRC press United States of America, 1996. p. 201-274.
9. Díaz, J.J. Producción De Plantas De Banano (*Musa AAA*) Clon "Giant Cavendish en Biorreactores de Inmersión Temporal. Trabajo de Grado (Magíster en Biotecnología). Universidad Católica de Oriente. Rionegro 2006. 70p.
10. Dodds, J. Y Roberts, L.; Experiments in plant tissue culture. Cambridge University press. Cambridge. 1982.
11. Escobar R, Florez C, Tabares E, Lentini Z y Roca W. Implementación del sistema RITA® en algunos cultivos del CIAT. Annual Report. 2000. p.185-187.
12. Etienne H. Y Berthouly M. Temporary immersion systems in plant micropropagation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 69, 2002. p.215-231.
13. George E. F., et al. Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition. Springer. Netherlands 2008. 501p.
14. González, F. A. Y Hernández E. J. Inducción de callos y organogénesis en *Dioscórrea alata* Var. Pico de botella. Trabajo de

grado, Universidad de Sucre. Facultad de Educación y Ciencias. Departamento de Biología. Sincelejo – Colombia. 2002. 74p.

15. Gray D. J., Trigiano R. N., Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises CRC press. United States of America 1996. 374p.
16. Hall, R. Plant cell culture protocols, methods in molecular biology vol. 111. Humana press New Jersey 1999. p.1-18
17. Harisha, S. Biotechnology Procedures And Experiments Handbook Infinity Science Press Llc. Hingham, Massachusetts 2007. 694p.
18. Lavalett, L. Caracterización Morfológica e Identificación Molecular de Aislados de *Colletotrichum Spp* Causantes de la Antracnosis en Ñame *Dioscorea Spp.* en el Departamento de Sucre. Trabajo de grado, Universidad de Sucre. Facultad de Educación y Ciencias. Departamento de Biología. Sincelejo – Colombia. 2002. 60p.
19. Montoya, N. Y Castro, D. Tuberización *in vitro* de papa (*Solanum tuberosum* L) Variedad Diacol Capiro en Biorreactores de inmersión temporal y evaluación de su comportamiento en campo. Rionegro Trabajo de Grado (Magíster en Biotecnología). Universidad Católica de Oriente. 2005. 66p.
20. Mroginski, L. et al; Establecimiento de cultivo de tejidos vegetales. Parte II cap 2 En: Biotecnología y mejoramiento vegetal. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria 2004.

21. Murphy, D. J. Plant Breeding and Biotechnology. Cambridge University Press New York 2007.
22. Nair, A.J., Introduction To Biotechnology And Genetic Engineering Infinity Science Press Llc. Hingham, Massachusetts 2007.
23. Ocando, O. Y Schuler, I. Bio-Aventura una exploración en el mundo de la biotecnología agrícola Agrobio, 2008.
24. Pérez Molphe Balch E.M, Ramírez Malagón R, Nuñez Palenius H.G y Ochoa Alejo N. Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes. Apoyado por el Fondo para la Modernización de la Educación Superior, FOMES. 1999.
25. Pinto E, De Souza M, Calheiros L, Lessa J, Sarmiento E. MicropropagaÇáo de clones de banana cv. Terra em biorreactor de imersáo temporaria. Rev. Bras. Frutic. 23(3). 2001 p.482-487.
26. Restrepo, O Y Uribe, G.; Inducción de callos en explantes de hoja de dos materials de Musa sp. Tesis Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. Facultad de ciencias agropecuarias. 1989.
27. Roca, W. Y Mroginski, L; Cultivo de tejidos en la agricultura; fundamentos y aplicaciones. CIAT. Cali Colombia. 1991.
28. Salazar R. Multiplicación y tuberización *in vitro* de ñame (Dioscorea alata L.) en sistema de inmersión temporal. Tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. 2006.

29. Smith J. E. Biotechnology in the agricultural and forestry industries cap 10. En: Biotechnology Fourth Edition Cambridge University Press. New York, United States of America. 2004. p. 181-203.
30. Szabados, L., Roca, W. Y Mroginski, L. Suspensiones celulares: Descripción, manipulación y aplicaciones En: Cultivo de tejidos en la agricultura; fundamentos y aplicaciones. CIAT. Cali Colombia. 1991.
31. Vélez, M. Estudio de la regenerabilidad y multiplicación *in vitro* de tres variedades (común, mora y amarillo) de tomate de árbol (*cyphomandra betacea (cav.)*). 2007.
32. Villalobos, V. y Thorpe, T. Micropropagación: Conceptos, Metodologías y Resultados En: Cultivo de tejidos en la agricultura; fundamentos y aplicaciones. CIAT. Cali Colombia. 1991.

CÁPITULO 2: REVISIÓN DE TEMA

ALGUNAS TÉCNICAS APLICADAS AL CULTIVO *IN VITRO* DE TEJIDOS VEGETALES

Resumen

Las técnicas de cultivo de tejidos se utilizan en la actualidad como instrumentos poderosos para el estudio de diversos tipos de problemas básicos, no sólo en la fisiología vegetal, biología celular y la genética, sino también en la agricultura, silvicultura, horticultura, y en la industria. Una importante contribución hecha por esta técnica es la revelación de la capacidad única que tienen las células vegetales conocida como totipotencia celular, lo que significa que todas las células en un organismo vegetal puede dar lugar a una planta completa.

Palabras claves: organogénesis, embriogénesis, meristemos, cultivo de tejidos, protoplastos

Introducción

La biotecnología se define como toda aplicación tecnológica que utiliza sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos (CDB 1992), y dentro de ella existen varias herramientas que son ampliamente usadas en la agricultura para conducir problemas asociados con la productividad, el almacenamiento y el procesamiento de la cosecha (FAO 2006).

Una de esas herramientas es el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales (CITV) que forma parte de la biotecnología clásica y se define como el conjunto de tecnologías empleadas en la propagación y mejoramiento de una especie. Estas tecnologías se fundamentan en los procesos naturales de propagación vía vegetativa y sexual y en la capacidad que tiene la célula vegetal para regenerar una planta completa, a partir de un explante (parte separada de un vegetal: protoplasto, célula, tejido, órgano), esa potencialidad se define como totipotencia (Roca y Mroginski, 1991).

Las técnicas utilizadas en el CITV no solo permiten la propagación rápida o producción en masa de clones idénticos de especies de plantas, también son usadas para la eliminación de virus y otros patógenos, la creación de bancos de germoplasma en vez de semillas convencionales, la producción de plantas haploides utilizando cultivo de anteras y ovarios, el rescate de embriones, entre otros (Smith, 2004)

El CITV está basado en la premisa de que las plantas pueden ser separadas en sus componentes (órganos, tejidos o células), que luego pueden ser manipuladas *in vitro* y, a menudo, se vuelven a cultivar convirtiéndose en plantas completas. Esta idea de manipulación de las plantas superiores con ayuda de microorganismos abre muchas posibilidades interesantes para su estudio; además, se constituye en pautas y estímulos para la investigación contribuyendo ostensiblemente al desarrollo del sector agrícola (Caponetti et al, 1996)

CULTIVO DE MERISTEMOS

Consiste en el corte del ápice meristemático de una planta madre seleccionada para luego ser cultivada *in Vitro*. La extracción del meristemo es generalmente un corte pequeño (menos de 1 mm) y es removido por

disección estéril bajo el microscopio. Este corte comprende el domo meristemático y un limitado número de primordios foliares jóvenes, excluyendo cualquier tejido diferenciado provascular o vascular. (Grout, 1990)

Los meristemas son grupos de células organogénicas, que se establecen durante la embriogénesis de la planta. Existen dos meristemas apicales, uno que se encuentra en los brotes y el otro en extremo de la raíz, produciendo las partes aéreas y subterráneas de la planta, respectivamente. Para cumplir su función un meristemo produce células hijas que se diferencian en distintos tipos de células, dando origen a diferentes tipos de tejidos que forman los órganos de la planta. Sin embargo, un meristemo debe autorregenerarse a lo largo de la vida de la planta para permitir procesos organogénicos. Esta doble función requiere un constante flujo de células a través del meristemo y este flujo es mantenido por un sistema autorregulatorio que asegura una constante población de células y previene la diferenciación prematura de las células del meristemo. (Hay y Tsiantis, 2005)

Por otro lado, las razones para que los meristemas tengan pocos o ningún virus no están esclarecidas completamente pero podría deberse a: 1) sistema vascular poco diferenciado: los virus son rápidamente transportados a lo largo de toda la planta por el floema. Los meristemas no tiene tejido vascular formado, por lo tanto, el avance es solo a través del movimiento célula a célula. Por esta razón se supone que las células meristemáticas no están completamente invadidas por virus cuando están en activo crecimiento. 2) la elevada actividad metabólica: presumiblemente es más difícil para un virus invadir células con elevada actividad metabólica, donde tiene lugar una activa mitosis y 3) las elevadas concentraciones de auxinas: se ha observado que altas concentraciones de 2,4-D en el medio de cultivo inhiben la multiplicación de los virus. Por lo tanto se puede suponer que las auxinas

endógenas de los meristemos pueden producir un efecto similar. (Conci, 2004)

El uso de meristemos para el cultivo *in vitro* proporciona estabilidad genética y es fácilmente aplicado a muchas especies de plantas. En consecuencia, esta técnica ha jugado un papel importante en el desarrollo de la industria a nivel mundial produciendo más de 250 millones de plantas anualmente. Además de la propagación el cultivo de meristemos se utiliza para la obtención de plantas libres de patógenos y preservación de germoplasma también libre de patógeno. (kane, 1996)

ORGANOGENESIS

El proceso de formación de órganos de novo es llamado organogénesis, que puede ocurrir sobre un órgano o sobre una pieza de tejido. Los tejidos capaces de formar órganos son llamados organogénicos, siendo posible la formación de brotes de novo (caulogénesis) y raíces adventicias (rizogénesis). La organogénesis puede ocurrir de dos formas, directa, en la cual se da la formación de meristemos a partir de células diferenciadas sin la proliferación de tejido no diferenciado (callo); e indirecta, en la cual los meristemos se forman a partir de células de callo o cultivos en suspensión, que son células no especializadas, desorganizadas y desdiferenciadas (George, 1993) citado por González y Hernández 2002

En determinadas especies, los brotes adventicios que surgen directamente de los tejidos del explante (y no de callo previamente formado) pueden proporcionar un método fiable para la micropropagación. Sin embargo, la inducción de la regeneración de brotes de manera directa depende de la naturaleza del órgano del cual es tomado el explante y en gran medida del genotipo de la plantas. Como respuesta, las plantas forman brotes

adventicios *in vitro* sobre piezas de tejidos derivados de diversos órganos (hojas, tallos, pétalos de flores o raíces); en algunas especies, sólo se da en un rango limitado de tejidos y en muchos géneros de plantas la morfogénesis directa rara vez se observa, o es desconocida. (George, 2008)

La organogénesis *in vitro* ha sido llevada a cabo en más de 1000 especies de plantas a través de la selección empírica del explante, la composición del medio y del control ambiente físico. Aunque se está avanzando, los eventos determinantes aún no se conocen totalmente. En todos los sistemas examinados, el proceso de la organogénesis se inicia con cambios en una o en un pequeño grupo de células del parénquima, que a su vez se dividen para producir una masa globular de células. Estas células pueden dar lugar a brotes ya sea como primordio foliar o como primordio radicular. (Bhowmik y Matsuz, 2001)

EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

La embriogénesis somática, puede ocurrir de una manera directa o indirecta sobre cultivos de células, tejido u órganos. La forma directa involucra la formación de un embrión asexual sobre el explante proveniente de una o de un grupo células sin la previa inducción de callos. Tal como ocurre en los cítricos donde células preexistentes de tejido nucelar dan origen a embriones nucleares (tanto *in vivo* como *in vitro*). La forma indirecta de embriogénesis necesita primero, del establecimiento del explante en cultivo, luego, de la proliferación de callos e iniciación de pro-embryones (usualmente en medio que contiene altas concentraciones de auxinas) y después, la transferencia del callo a medio nutritivo exento de reguladores de crecimiento para así inducir la formación de embriones bipolares a partir de células pro-embryonarias. Al final, cuando las condiciones son ideales estos embriones germinan dando origen a plántulas. (Tisserat, 1987)

La embriogénesis somática ha sido reportada en más de 130 especies, incluyendo cereales, leguminosas, pastos y coníferas. Tejidos de zanahoria han demostrado ser muy útiles en el estudio de la embriogénesis somática, pero hasta la fecha la mayoría de los estudios fisiológicos y bioquímicos solo se han enfocado en el desarrollo del embrión en lugar del proceso completo. Sin embargo el reciente desarrollo de un método para seleccionar células capaces de formar clusters y luego formar embriones somáticos relativamente sincronizados permitiendo observar el proceso completo de una forma más profunda (Bhowmik y Matsuiz, 2001)

CULTIVO DE PROTOPLASTOS

La capacidad para fusionar las células de plantas de especies que pueden ser incompatibles por medio de cruces sexuales y la capacidad de las células de las plantas para asumir e incorporar códigos genéticos foráneos amplía las posibilidades de modificaciones para las plantas a través del cultivo de tejidos. La mayor parte de estas manipulaciones se llevan a cabo con la utilización de Protoplastos, que son solo las células que han sido despojadas de sus paredes celulares mediante tratamiento enzimático (Harisha, 2007). Estas células se incuban en una mezcla enzimática compuesta de celulasa, hemicelulasa, pectinasa durante un período determinado de tiempo. La mezcla actúa en la pared celular y es completamente digerida, de manera que la membrana celular subyacente queda expuesta (Nair, 2007). Una sola hoja en estas condiciones de tratamiento puede producir decenas de millones de células individuales, cada uno de ellos teóricamente capaz de producir eventualmente una planta entera. (Harisha, 2007)

Desde el decenio de 1970, la fusión de protoplastos se ha utilizado para crear nuevos tipos de plantas a partir de combinaciones de especies no relacionadas, y la técnica también ha sido muy útil en varias áreas de

investigación básica. En al menos uno de los casos, las células humanas cultivadas fueron fusionados con protoplastos de tabaco, lo que demuestra el uso potencial de la hibridación somática para transferir información genética entre prácticamente cualquier especie de organismos eucariotas. La hibridación somática se introdujo en programas de mejora genética de cultivos en los comienzos del decenio de 1980 y hasta ahora ha sido utilizada para crear nuevas variedades comerciales de patata. La técnica se ha intentado con muchos otros cultivos, pero el principal obstáculo técnico en la actualidad es la inestabilidad del genoma nueva combinación creada por la fusión de los cromosomas de dos especies diferentes. (Murphy, 2007)

No obstante, a través de la recuperación de variantes inducidas, híbridos parasexuales e ingeniería genética, el cultivo de protoplastos ha sido usado para desarrollar plantas con mejores características agronómicas y con una mayor resistencia a enfermedades. Por ejemplo variantes (somaclones) con características mejoradas han sido obtenidas por aislamiento de protoplastos, también híbridos parasexuales o somáticos se pueden lograr realizando fusión de protoplastos de diferentes especies no relacionadas. (Compton et al, 1996)

CULTIVO DE ANTERAS

El cultivo de anteras inmaduras y granos de polen se realiza para inducir el desarrollo de formas multicelulares en los granos de polen, particularmente en los embriones, con la mitad del número de cromosomas de la especie. Cuando esos embriones haploides son tratados con agentes duplicadores de cromosoma (por ejemplo, colchicina) se restablece el número normal de cromosomas (y por lo tanto, su fertilidad). Además, es un método muy sencillo para el desarrollo de genotipos homocigotos o líneas puras. La

formación de líneas puras es una tendencia natural para autofertilizar especies. (Nair, 2007).

El número de especies de plantas a partir de la cual el cultivo de anteras ha dado lugar a plantas haploides es relativamente poco. Comprende unas 70 especies en 29 géneros hasta 1975 y 121 especies o híbridos en 20 familias de 1981-1982. (George, 2008)

Las limitaciones técnicas que afectan a muchas especies, como la renuencia a la regeneración de plantas y los bajos rendimientos para las plantas haploides, han ocasionado el lento desarrollo del mejoramiento genético mediante el cultivo de anteras. En consecuencia, las condiciones que llevan a la haploidía en las plantas de importancia cultivadas, necesitan desarrollarse o mejorarse. (Roca et al., 1991)

TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE PLANTAS

La ingeniería genética o manipulación genética, podría definirse, muy ampliamente, como la técnica con que se forman artificialmente combinaciones nuevas de material hereditario (ADN o ARN) mediante la inserción de moléculas de ácido nucleico producidas fuera de la célula, es decir, dentro de virus, plásmidos bacterianos u otro vector de ácidos nucleicos estos vectores incorporan las nuevas moléculas de ácidos nucleicos dentro de un organismo hospedante, en el cual éstas no se hallan presentes en condiciones naturales pero pueden ser replicadas.(Calderón et.al, 1991)

La pared celular impide la entrada del ADN en la célula, constituyendo un obstáculo que todos los métodos de transformación genética tienen que superar de algún modo. Estos métodos pueden dividirse en: transformación

mediada por *Agrobacterium*, vector biológico que participa del proceso de transferencia y métodos de transformación genética directa, también llamados físicos (como la microinyección y el bombardeo de partículas de oro con un acelerador de partículas), mediante los cuales, por distintos mecanismos, se introduce el ADN en la célula (Díaz, et.al, 2004)

La técnica de transferencia de genes a las plantas ha cambiado a través de la historia, ahora se puede utilizar cualquier carácter, a partir de cualquier organismo, en cualquier especie. Y se puede decidir en qué órgano se expresa el carácter novedoso, con que fuerza, y que respuesta debe dar a la señal externa o endógena. La transferencia de genes También ofrece la posibilidad de inactivar los genes endógenos. Sin embargo, los genes de importancia agronómica a menudo no son fáciles de identificar y aislar. La expresión de los genes depende más de la integración al azar en el genoma huésped que de la expresión adecuada de señales. (Sautter, et.al, 1998)

La modificación genética de plantas depende principalmente de dos factores, que son la capacidad de transferir e integrar el ADN en el genoma de una célula huésped y la capacidad de regenerar adultos fértiles de las plantas transformadas. (Bilang, 1998)

CONCLUSIONES

Existen muchos reportes de estudios realizados a una gran variedad de especies vegetales, lo que demuestra que la aplicación de las diferentes técnicas de cultivos de tejidos *in vitro* ha sido de gran ayuda para el conocimiento fisiológico de la planta.

El conocimiento que arroja el estudio de las plantas a través de la aplicación de las técnicas de cultivo *in vitro* trae como beneficio, en el caso de los cultivos, un mejor entendimiento de éstas, lo que puede generar una mayor productividad del cultivo y traer como consecuencia un aumento en la rentabilidad del mismo.

La integración de la ingeniería genética con las técnicas de cultivo de tejido *in vitro* muestra un gran avance en la obtención de plantas con características deseadas, lo que sin duda, permitirá paliar la crisis alimentaria, que según pronósticos científicos se avecina.

REFERENCIAS

1. 28a. Conferencia Regional de la FAO para el Cercano Oriente. Sana'a, República del Yemen 12 al 16 de marzo de 2006 Potencial de la biotecnología en apoyo del desarrollo rural: ventajas e inconvenientes
2. Bhowmik, P.K. y Matsuz, T., Novel micropropagation System: A Review. Pakistan journal of biological sciences 4 (2): 117-120, 2001
3. Bilang, R., et.al, Genetic Engineering of Crop Plants. En: agricultural biotechnology. Taylor & Francis, New York 1998
4. Calderón, A., Roca, W.M., Jaynes, J.; Ingeniería genética y cultivo de tejidos. En: Cultivo de tejidos en la agricultura; fundamentos y aplicaciones. CIAT. Cali Colombia. 1991.P.271-293
5. Caponetti J. D., Gray D. J., Trigiano R. N., History of plant tissue culture En: Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises CRC press. United States of America 1996 p 4-8
6. CBD, 1992. "Convenio sobre la diversidad biológica". Disponible en www.biodiv.org/d.oc/legal/cbd-es.pdf
7. Compton, M. E., Saunders, J. A., Veilleux, R. E. Use of protoplasts for plant improvement. En: En: Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises CRC press United States of America 1996 p 201-274
8. Conci, V. C.; Obtención de plantas libres de virus. Parte VIII cap 5 En: Biotecnología y mejoramiento vegetal. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria 2004

9. Díaz, M.L.; Transformación genética. Parte III cap 3 En: Biotecnología y mejoramiento vegetal. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria 2004
10. George E. F., et al. Micropropagation: Uses and Methods Cap 2 En: Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition. Springer. Netherlands 2008 p. 29–64.
11. González, F. A. y Hernández E. J. Inducción de callos y organogénesis en *Dioscorea alata* Var. Pico de botella. Trabajo de grado, Universidad de Sucre. Facultad de Educación y Ciencias. Departamento de Biología. Sincelejo – Colombia. 2002. 74p.
12. Grout, W.W.; Meristem - tip culture cap 9. En: Methods in molecular biology vo. 6, plant cell and tissue culture. Humana press New Jersey United States of America 1990. p. 81-91
13. Harisha, S. Biotechnology Procedures And Experiments Handbook Infinity Science Press Llc. Hingham, Massachusetts 2007
14. Hay, A., Tsiantis, M., From genes to plants via meristems. The company of biologists, Jun 2005 vol132, no 12, p. 2679-2684
15. Kane, M. E. Propagation from preexisting meristems. En: Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises CRC press United States of America 1996 p 61-71
16. Murphy, D. J. Modern high-tech breeding, En: Plant Breeding and Biotechnology Cap 3 Cambridge University Press New York 2007

17. Nair, A.J., Introduction To Biotechnology And Genetic Engineering Infinity Science Press Llc. Hingham, Massachusetts 2007
18. Roca, W. Y Mroginski, L; Establecimiento de los cultivos vegetales *in vitro* En: Cultivo de tejidos en la agricultura; fundamentos y aplicaciones. CIAT. Cali Colombia. 1991.p.19-40
19. Roca, W., Nuñez, V.M, Morman K.; Cultivo de anteras y mejoramiento de plantas En: Cultivo de tejidos en la agricultura; fundamentos y aplicaciones. CIAT. Cali Colombia. 1991.P.271-293
20. Smith J. E. Biotechnology in the agricultural and forestry industries cap 10. En: Biotechnology Fourth Edition Cambridge University Press. New York, United States of America. 2004. p. 181-203
21. Tisserat, B., Embriogénesis, Organogenesis and plant regeneration. En: Plant Cell Culture a practical approach. Press limited. Oxford, England 1987. p 79-106