UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIRIQUÍ
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA

EL CULTIVO DE TEJIDOS *IN VITRO*, APLICADO A LA CONSERVACIÓN DE ORQUÍDEAS NATIVAS DE CENTRO AMÉRICA Y PANAMÁ.

PRÁCTICA PROFESIONAL REALIZADA EN LA EMPRESA BIOTECH DE PANAMÁ, PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA CON ESPECIALIZACIÓN EN BIOLOGÍA AMBIENTAL.

POR:
OLMEDO YORNEY FRAGO P.

DAVID, CHIRIQUÍ, PANAMÁ
1999 - 2000

10 ABR 2000

INDICE GENERAL

Indice de figuras. viii

Dedicatoria. ix

Agradecimiento. x

Resumen. xi

Introducción. 1

Capitulo I.

Programa inicial previo a la introducción en cultivo de tejidos. 4

1. La producción y dominio de los cultivos como arte y ciencia. 4

1.1 La producción de los cultivos como arte. 4

1.2 La producción de los cultivos como ciencia. 4

2. Crecimiento de la población y abastecimiento de alimentos. 5

2.1 Teoría de Malthus. 6

2.2 Alternativas para incrementar la producción de los alimentos. 6

3. Fenómenos relacionados con el agua en las plantas. 8

3.1 Conceptos generales. 8

3.1.1 Difusión. 10

3.1.2 Ósmosis. 11

3.1.3 Potencial del agua. 13

3.1.4 Absorción y movimiento del agua. 13

3.1.5 Funcionamiento de los estomas. 16

3.1.6 Conceptos generales de la transpiración 16

3.1.7 El uso del agua en las plantas. 18

3.1.8 Efectos de la falta de agua en las plantas. 20

4. Fotosíntesis. 21

4.1 Conceptos generales. 21

4.1.1 La luz, los pigmentos y los cloroplastos. 21

4.1.2 Tipos de fotosíntesis. 25

4.1.2.1 Plantas con fotosíntesis tipo C-3. 25

UNACAR
obs. RJJT 4161
8811 e.1

4.1.2.2 Plantas con fotosíntesis tipo C-4. 27
4.1.2.3 Mecanismo ácido de las crasuláceas (CAM) o (MAC). 30
4.1.3 Ciclo del Carbono. 30
4.1.4 Factores que influyen en la fotosíntesis. 32
5. Respiración. 33
5.1 Conceptos generales. 33
5.1.1 La Glicólisis. 33
5.1.2 Ciclo de Krebs. 34
5.1.3 Transporte de electrones 36
5.1.4 Factores que influyen en la respiración. 38
6. El nitrógeno en las plantas. 38
6.1 El ciclo del Nitrógeno. 39
7. Nutrición mineral. 41
7.1 Absorción y translocación de los nutrientes minerales. 42
7.2 Elementos esenciales. 44
7.2.1 Macronutrimentos y su función. 45
7.2.2 Micronutrimentos y su función. 49
8. Fitohormonas. 51
8.1 Auxinas. 52
8.2 Citocininas. 55
8.3 Giberelinas. 57
8.4 Retardadores del crecimiento. 59
9. Control de floración 62
9.1 Conceptos generales. 62
9.1.1 Factores ambientales que inducen en la floración. 62

Capitulo II.

Fundamentos teóricos para la realización de la práctica profesional orientada al cultivo de tejidos ***in vitro*** en la empresa Biotech de Panamá, como requisito para optar por el grado de licenciatura en Biología. 64

1. Micropropagación. 64

1.1 Ventajas. 64

2. Historia del cultivo de tejidos. 65

3. Bases botánicas para el cultivo de tejidos. 69

4. Medios para cultivos de tejidos. 73

4.1 Generalidades. 74

4.2 Componentes. 76

5. Reguladores del crecimiento y aditivos orgánicos utilizados en medios de cultivos 77

5.1 Auxinas y su función. 78

5.1.1 Efectos sobre los cultivos de tejidos *in vitro*. 79

5.2 Citocininas y su función. 80

5.2.1 Efectos de los tejidos cultivados *in vitro*. 81

5.3 Giberelinas y su función. 82

5.4 Compuestos aditivos orgánicos y sus posibles efectos . 82

6. Tipos de explantes mas frecuentes. 83

6.1 Raíces. 83

6.1.1 Aplicaciones del cultivo de raíz. 83

6.1.2 Cultivo de raíces aisladas. 84

6.2 Anteras y polen. 84

6.2.1 Bases morfológicas. 85

6.2.2 Condiciones que afectan el cultivo de anteras. 86

6.3 Hojas. 86

6.4 Meristemas. 87

6.4.1 Cultivo *in vitro* de meristemas apicales. 89

6.5 Embriones y óvulos. 90
6.5.1 Técnicas de extracción de embriones. 90
6.6 Factores que afectan el cultivo de embriones. 90
6.6.1 El medio de cultivo. 91
6.6.2 Osmolaridad. 91
6.6.3 Reguladores del crecimiento. 92
7. Respuestas de los explantes *in vitro*. 92
7.1 Callos y su utilización. 92
7.2 Organogénesis. 94
7.2.1 Factores que afectan la organogénesis. 95
8. Adaptación de las plantas obtenidas en el laboratorio a las condiciones exteriores. 95

Capítulo III.

Fundamento práctico para la realización de la práctica profesional orientada al cultivo de tejidos ***in vitro***, realizada en la empresa Biotech de Panamá, para optar por el grado de licenciatura en Biología. 98
1. Biotech de Panamá. 98
1.1 Reseña histórica de la empresa. 98
2. El laboratorio. 100
2.1 Facilidades. 100
2.1.1 Requerimientos básicos. 101
2.1.2 Localización. 101
2.1.3 Diseño práctico del laboratorio. 102
2.1.4 Equipo indispensable y básico. 103
3. Estructura arquitectónica de un laboratorio de cultivo de tejidos. 105
3.1 Sala de recepción y vestíbulo. 107
3.2 Sala de preparación de medios de cultivos. 107
3.3 Sala de crecimiento e incubación. 109

3.4 Sala de siembra, transferencia y disección. 109
3.5 Bodega de materiales. 110
3.6 Invernaderos de estudio y evaluación del material. 110
3.7 Sala de registros, oficina y biblioteca. 111
4. Técnicas de esterilización, manipulación y controles generales asépticos. 111
4.1 Limpieza general y rutinaria del laboratorio. 111
4.2 Higiene personal. 113
4.3 Medidas de seguridad y asepsia . 114
4.4 Recibimiento del material vegetativo del campo y vivero. 115
4.5 Esterilización del material a introducirse. 116
4.6 Monitoreo periódico de contaminados. 117
5. Preparación de medios. 118
6. Medios utilizados. 119
7. Explante utilizado. 120
7.1 Técnica utilizada para extraer el explante. 121
7.2 Desarrollo del explante *in vitro*. 122
7.3 Adaptaciones de las plantas *in vitro* a las condiciones exteriores. 123
Conclusiones. 124
Recomendaciones. 125
Bibliografía. 127
Anexos 130

INDICE DE FIGURAS

Fig.1 Thomás Robert Malthus. 7
Fig. 2 Distribución del agua en el Mundo. 9
Fig. 3 Difusión. 9
Fig. 4 Ósmosis 12
Fig. 5 Transpiración. 15
Fig. 6 Esquema de la estructura de una hoja. 17
Fig. 7 Esquema de cómo las células de protección regulan el tamaño del estomas. 17
Fig. 8 Espectros de absorción de las clorofilas a y b, Así como espectro de acción de la fotosíntesis. 24
Fig. 9 Reacciones fotodependientes de la fotosíntesis, también llamadas Ciclo de Calvin. 26
Fig. 10 Mecanismo C4 de fijación del CO2. 28
Fig. 11 Diferencias entre las plantas C3 y C4 . 29
Fig. 12 Diagrama simplificado del Ciclo del Carbono. 31
Fig. 13 Ciclo del ácido cítrico . 35
Fig. 14 Quimiósmosis . 37
Fig. 15 El Ciclo del Nitrógeno. 40

ANEXOS

Fig. 16 Destilador de agua 131
Fig. 17 Sala de preparación de medios 132
Fig. 18 Gabinetes 133
Fig. 19 Neveras 133
Fig. 20 Balanza analítica, agitador magnético con calentamiento y pH metro 134
Fig. 21 Sala de crecimiento 135

Fig. 22 Cámara de flujo laminar 136
Fig. 23 Instrumentos y materiales necesarios en la cámara 137
Fig. 24 Vivero de aclimatación 138
Fig. 25 Invernadero 138
Fig. 26 Oficina de Biotech de Panamá 139
Fig. 27 Medidas de asepsia 140
Fig. 28 Cápsulas de orquídeas 141
Fig. 29 Material contaminado 142
Fig. 30 Identificación de contaminados 142
Fig. 31 Registros de contaminados 143
Fig. 32 Esterilización 143
Fig. 33 Manipulación de cápsulas 144
Fig. 34 Manipulación de plántulas 145
Fig. 35 Inventario de material vegetativo en existencia en el laboratorio 146

Dedicatoria

A mi abnegada madre, Epifania Pinto P., con todo cariño, quien se esforzó de manera muy especial en darme su apoyo para la obtención de mi Licenciatura en Biología.

A mi hermana Anayansi Frago P., familiares y amigos que siempre estuvieron presentes y dispuestos para brindarme su apoyo y ayuda incondicional.

Y a todas aquellas personas a quienes sea de utilidad esta información y con ello poner en práctica las palabras de Sófocles: "La obra humana más bella es la de ser útil al prójimo".

Agradecimiento

A Dios por todas las cosas buenas que me ha dado, por permitirme alcanzar una de mis metas.

A mi mamá por todo el apoyo, amor, y comprensión que me ha dado.

A el Ing. Elvis E. Ortega, Sra. Marlina B. Alvarez y Joel Rodríguez de la empresa Biotech de Panamá por haberme brindado sus conocimientos, apoyo y asesoría sobre cultivo de tejidos.

A mis familiares, amigos, compañeros y profesores asesores (Orlando Cáceres, Pedro Caballero y Clotilde Arrocha) que contribuyeron a la realización de este trabajo.

Resumen

El cultivo de tejidos además de ser la principal técnica de la Biotecnología, por su aplicación en la agricultura, es una herramienta versátil para el estudio de los problemas básicos y aplicados de la biología de las plantas; constituyen un puente entre las manipulaciones genéticas en los laboratorios hasta la obtención del producto final evaluado en el campo.

Su importancia para la conservación radica en que esta es una alternativa de propagación masiva de muchas plantas que pueden estar en peligro de extinción.

Este trabajo de graduación que es el resultado de nuestra práctica profesional, contempla tres capítulos. El primer capítulo esta compuesto por ocho temas principales: producción y dominio de los cultivos, crecimiento poblacional y el abastecimiento de alimentos, fenómenos del agua relacionados con las plantas, fotosíntesis, respiración, el nitrógeno, nutrición mineral, fitohormonas y control de floración.

En el segundo capítulo se exponen conceptos básicos sobre las técnicas de cultivo *in Vitro* de tejidos, sus bases botánicas, los medios de cultivos, los reguladores de crecimiento, tipos de explantes más frecuentes, principales respuestas de los explantes *in vitro* y la adaptación de las plantas obtenidas en el laboratorio a condiciones del ambiente exterior. Capítulo que sustenta las bases teóricas necesarias para la práctica que está contenida en el tercer capítulo.

El tercer capítulo está compuesto por las actividades realizadas en el laboratorio BioTech de Panamá. Dicho capítulo se divide de la siguiente manera: Reseña histórica del laboratorio, técnicas de esterilización y controles asépticos preparación de medios de cultivo y explantes utilizados.

El propósito de esta practica ha sido producir un documento que por su contenido teórico - práctico sirva como manual auxiliar de referencia para los técnicos, estudiantes universitarios, profesores y otros profesionales que investiguen en el campo de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales.

Nuestro plan de trabajo fue organizado por el Ing. Elvis E. Ortega, revisado por MSc. Orlando Cáceres y quedo establecido de la siguiente manera:

Actividad	**Tiempo en semanas**
- Revisión bibliográfica sobre fisiología vegetal y cultivo de tejidos	Tres semanas.
- Sala de lavado. Lavado de material contaminado. Esterilización de contaminados	Una semana.
- Sala de preparación de medios Preparación de medios Esterilización de explantes Esterilización de medios y envases varios	Cinco semanas y media.
- Sala de siembra y transferencia. Sembrado de protocormo. Transplantado de plántulas. Clonación de plántulas. Sembrado de cápsulas.	Cuatro semanas
- Sala de crecimiento. Reconocimiento de contaminados. Registro de contaminado Inventario de material vegetativo en existencia	Cinco semanas

Durante el tiempo que duró la práctica profesional (480 horas), nuestro objetivo primordial fue realizar un trabajo teórico práctico en la empresa Biotech de Panamá, a fin de aprender haciendo las técnicas de cultivo de tejidos *in vitro*, para la micropropagación de orquídeas.

Introducción

La tierra tiene aproximadamente unos 4,600 millones de años; se formó a partir de gas y polvo. Esta gigantesca bola se condensa formando sólidos y líquidos. Mientras transcurrían los períodos, fueron ocurriendo diversos cambios que originaron la formación de moléculas orgánicas, dando como resultado las primeras formas de vida; que según estudios realizados estas fueron acuáticas (Taylor, 1985; Solomon, *et al.*, 1996).

Las plantas, surgieron en el período Silúrico de la era Mesozoica tal como se asegura en la siguiente cita: **" Dos formas de vida de gran importancia biológica aparecieron en el período Silúrico; plantas terrestres y animales que respiraban aire. Las primeras plantas conocidas parecían helechos, poseían tejidos vasculares (conductos) y se reproducían por esporas. La aparición de las plantas permitió que surgieran los animales terrestres al obtener de las mismas alimento y refugio"**
(Solomon, *et al.*, 1996).

Probablemente, estas plantas tuvieron que adaptarse mediante la evolución de estructuras especializadas tales como:

* Raíces fuertes que pudieran crecer ante una superficie nueva y dura, como lo son las rocas.
* La formación de tallos que soportaran el peso corporal ante la mayor presión atmosférica fuera del agua y que además, sirvieran como puente de comunicación entre las raíces y las hojas.

El refugio y los alimentos proporcionados por las plantas, conjuntamente con la cacería permitieron al hombre antiguo evolucionar hasta ser lo que somos hoy en día (Solomon, *et al.*, 1996).

Las plantas se pueden reproducir sexual o asexualmente. Aquellas que se reproducen sexualmente necesitan de la unión de los gametos masculinos (polen) y femeninos (óvulos) con lo cual se produce la fecundación. A partir de esta unión se forman los frutos con semillas que una vez maduras se dispersan, germinan y dan lugar a nuevas plantas.

Las plantas que se reproducen asexualmente, lo hacen por medio de la regeneración de nuevos individuos a partir de tallos, hojas, raíces u otros órganos vegetativos, formando brotes y yemas que crecen hasta convertirse en nuevas plantas. Sin embargo, no todas las plantas en estado natural tienen la misma facilidad de reproducirse.

Las orquídeas se reproducen sexualmente, pero necesitan formar una simbiosis con ciertos hongos para germinar pues las semillas de estas plantas presentan un endospermo o tejido nutritivo incompleto que sirva de alimento al embrión. Producen cápsulas con miles o millones de semillas para aumentar las probabilidades de reproducción de sus especies (Larson, 1988).

Por lo difícil que les resulta reproducirse en el medio natural, la belleza de sus flores y con propósitos comerciales, la conservación ecológica de las especies de orquídeas en peligro de extinción, han sido escogidas para ser micropropagadas por medio de las técnicas de cultivos de tejidos. Este proceso consiste en regenerar plantas a partir de la extracción de una parte u órgano de la misma llamado explante; el mismo se cultiva en medios nutritivos, que contienen las sustancias químicas necesarias para su desarrollo *in vitro*. Se consideran explantes a los protoplastos, las células, los tejidos, los órganos, el polen, las anteras, etc. (Larson, 1988; Roca & Mroginski, 1991).

Objetivos:

1- Realizar un trabajo teórico en el área de fisiología vegetal y teórico práctico en el área de cultivo *in vitro*, en la empresa Biotech de Panamá, para la propagación y conservación de orquídeas en vías de extinción.

2- Aplicar y desarrollar la importancia de la propagación *in vitro* como medida de conservación en el campo de la Biología Ambiental.

Capítulo I.

PROGRAMA INICIAL PREVIO A LA INTRODUCCIÓN EN CULTIVO DE TEJIDOS.

1. La producción y dominio de los cultivos como arte y ciencia

1.1 La producción de los cultivos como arte.

En el período Neolítico se da inicio a la Agricultura; el hombre empieza a cultivar los campos y se hace sedentario, construye viviendas en lugares fértiles, a veces dentro de ríos y lagos (palafitos) (Melo, *et al.*, 1990).

El arte de la producción de cultivos es antiguo y la forma de hacerlo no ha cambiado mucho, ya que en la actualidad se siguen casi los mismos pasos elementales; estos, en forma reducida, son:

1. Recolección y almacenamiento adecuadas de semilla de las plantas cultivadas.
2. Destrucción de vegetación indeseable que crecen en las parcelas (malezas).
3. Remoción del suelo hasta formar una cama de siembra.
4. Siembra de cultivos bajo condiciones climáticas apropiadas, según experiencia pasadas.
5. Protección de los cultivos contra enemigos naturales.
6. Recolección, procesamiento y almacenamiento de los productos (Rosas, 1988)

1.2 La producción de los cultivos como ciencia.

En América, desde hace siglos, los indios precolombinos cultivaban las plantas empíricamente con fines medicinales y de subsistencia. Se cultivaba el maíz, el zapallo y los frijoles, para la alimentación; además de la coca y el tabaco con fines medicinales

En la actualidad, la Agronomía (*agro*: tierra; *nomos*: manejo) es la ciencia que se encarga del estudio de los cultivos de las plantas (Rosas, 1988). Sin embargo, la Agronomía como ciencia no puede actuar por sí sola; en sus estudios se integran conocimientos y disciplinas que involucran los campos de la Biología, la Química, la Física, las Matemáticas, la Entomología, la Ecología, la Botánica, entre otros.

En este sentido, la Agronomía necesita de la clasificación de las plantas en géneros y especies con el objetivo de determinar un trabajo más organizado, esto se lo permite la Botánica. La Fisiología Vegetal le brinda herramientas suficientes para comprender los procesos fisiológicos de la planta en general. La Entomología posibilita el estudio y clasificación de insectos o plagas que atacan a los cultivos. Por otro lado los conocimientos que se agrupan bajo la Química Orgánica e Inorgánica proveen a la agronomía de los principios teóricos adecuados para la elaboración de fertilizantes, los estudios de suelos para la nutrición vegetal; por último necesita de la Física y las Matemáticas para elaborar cálculos de rendimiento de los cultivos y procedimientos relacionados y de la Ecología para entender las relaciones existentes entre los factores bióticos y abióticos en las áreas de los cultivos.

2. Crecimiento de la población y abastecimiento de alimentos.

La población mundial desde sus orígenes ha aumentado considerablemente hasta la actualidad. Este incremento poblacional tiene un límite, debido a que el ambiente solamente puede sostener una cantidad finita de personas (capacidad de carga) (Solomon; *et al.*, 1996).

El aumento exponencial de individuos exige una mayor demanda de alimentos y se genera competencia (Rosas, 1988).

2.1 Teoría de Malthus.

La producción de suficiente alimento para una población que continúa creciendo en un mundo con limitaciones de tierra cultivable y producción, es un problema que fue enunciado por Thomas R. Malthus en 1798 (Fig. 1). El argumentaba que el hombre solamente puede incrementar su subsistencia en progresión aritmética, mientras que el crecimiento de la población es en progresión geométrica. Enunció además, que como inevitables consecuencias del crecimiento de la población se producen hambrunas, enfermedades y guerras. Un tercio y medio de la población mundial sufre actualmente períodos de hambre. La alimentación de la masa en países subdesarrollados es inadecuada; principalmente por la falta de proteínas. El 80 % de las calorías consumidas son derivados de cereales, raíces de alto contenido en almidón y azúcares (Rosas, 1988; Solomon, *et al.*, 1996).

2.2 Alternativas para incrementar la producción de alimentos.

La Agronomía, en conjunto con otras ciencias, estudian las alternativas para dar soluciones al problema de la carencia de alimentos ante una población mundial que continúa creciendo. Tal es el caso de la aplicación de la técnica de cultivo *in vitro* de tejidos y la micropropagación masiva de plantas.

En tal sentido, la Empresa BIO-TECH de Panamá, inició sus labores de cultivo *in vitro* con la propagación masiva de bananos, con el objetivo de obtener mayores rendimientos en el cultivo de este rubro.

En forma general existen dos alternativas para incrementar la producción de alimentos:

1) Aumentar el área de tierra para la agricultura
2) Incrementar los rendimientos por unidad de área (productividad).



Figura 1. Thomás Robert Malthus, economista Inglés (1766-1834), autor del ensayo del principio de la población, en el que, dado el aumento constante de la población, aconseja la limitación de los matrimonios y nacimientos para evitar un empobrecimiento progresivo de las clases sociales pobres, producido por la escasez de los medios de subsistencia (Tomado del Diccionario Larousse).

Los agricultores tradicionales preparaban nuevas tierras para incrementar su producción, pero en la actualidad eso no es posible, ya que dicha expansión significa destruir los pocos ecosistemas que existen y en algunos países no hay espacio para ampliar las áreas cultivables.

La ingeniería genética manipula la constitución de los genes de las plantas para inducir el desarrollo de características deseadas tales como, mayor resistencia a las plagas; producción de frutos de mayor tamaño y hasta sabor; mediante métodos como ADN recombinante (Stanfield, 1995).

El incremento de los rendimientos mundiales de granos en las últimas décadas, se ha logrado, mediante el uso de variedades de híbridos más productivos, con mayor uso de fertilizantes y de pesticidas.

Altos rendimientos envuelven el uso de tecnología y mayor capital. Incrementos de los rendimientos pueden ser obtenidos mediante las mejoras de los cultivos, mayor uso de los fertilizantes, irrigación, drenaje, pesticidas, implementos agrícolas más eficientes, cultivos múltiples, períodos de descanso de los terrenos o barbecho, prácticas culturales mejoradas o alguna combinación de estos (Rosas, 1988).

3. Fenómenos relacionados con el agua en las plantas.

3.1 Conceptos generales.

El agua es el elemento de mayor abundancia en el planeta, cubre aproximadamente un 71 % de su superficie. El 97 % del volumen total de agua existente se encuentra en los océanos, un 3 % es agua dulce; del cual, un 79 % está en los glaciares y casquetes polares, 20 % es agua subterránea y solo el 1 % es agua dulce superficial (Fig. 2) (Miller, 1994).

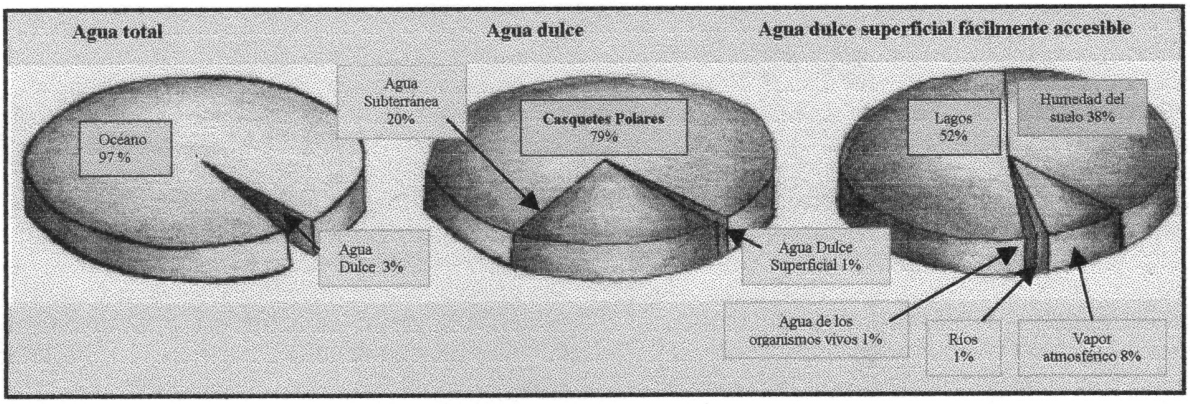


Figura 2. Distribución de aguas en el Mundo.

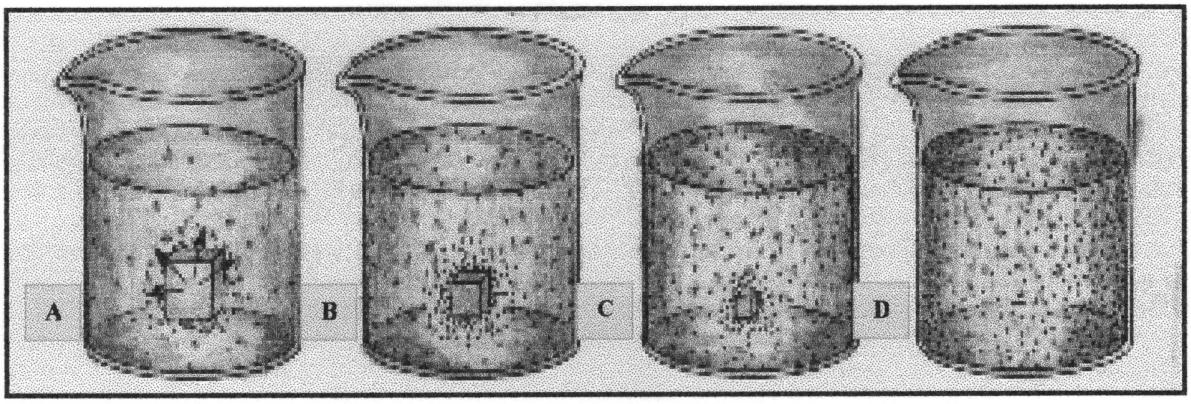


Figura 3. DIFUSION. Cuando se coloca un pequeño cubo de azúcar en un matraz con agua, sus moléculas se disuelven, como se muestra en (A). Las moléculas de azúcar comienzan a difundirse en el agua del recipiente, como se ilustra en (B) y (C). Las flechas de (A), indican el movimiento neto de las moléculas de azúcar que se desplazan al azar en todas las direcciones. Tarde o temprano, la difusión causa disminución uniforme de las moléculas de azúcar en toda el agua del matraz, como se ilustra en (D).

Este elemento es el componente de mayor porcentaje en los seres vivos, participa y es solvente universal en todas las reacciones de los organismos vivos; además, en las transformaciones morfológicas, biológicas, y climáticas entre otros, su efecto es significativo en general para el planeta (Montes, 1989; Rosas, 1988).

La presión del agua es responsable de la turgencia de las células vegetales, participando en su expansión. En las transformaciones fisiológicas, interviene en la respiración, en la hidrólisis, en la síntesis de polisacáridos, péptidos y actúa como regulador de la temperatura en los organismos vivos.

Las plantas han desarrollado mecanismos para la toma de agua entre ellos esta la difusión y la ósmosis.

3.1.1 Difusión.

Es la dispersión de sustancias por el movimiento independiente moléculas que tienden a igualar sus concentraciones a través de un sistema (Rosas, 1988).

La energía cinética relacionada con el movimiento del agua origina la difusión, o sea el movimiento neto de partículas (átomos, iones, moléculas) de una región de mayor a menor concentración, de manera tal que las partículas tienden a una distribución uniforme. Puede afirmarse que la difusión implica el movimiento neto a favor de su gradiente de concentración (un cambio en la concentración de la sustancia de un punto a otro). Esto no implica que sea imposible el movimiento de las partículas en dirección opuesta o contra la gradiente de concentración. Sin embargo, al inicio es lógico que se desplacen al azar las partículas de la región con mayor concentración a la región de concentración baja y no a la inversa (Fig. 3) (Solomon, *et al.*, 1996).

La velocidad de la difusión depende del movimiento de las moléculas, lo que a su vez, está condicionado por su tamaño y su forma, carga eléctrica y por la temperatura. Al aumentar esta última, las moléculas se mueven con mayor rapidez y aumenta la velocidad de la difusión. Las moléculas de cualquier sustancia en una mezcla se difunden en forma independiente unas de otras, hasta que se alcanza un estado de equilibrio en el cual, éstas se distribuyen de manera uniforme (Solomon, *et al.*, 1996; Devlin, 1980).

3.1.2 Ósmosis.

La semipermeabilidad de las membranas biológicas permite un tipo especial de difusión llamado ósmosis. Este proceso es el movimiento del agua (o de cualquier solución) a través de una membrana semipermeable que no permite el paso de otro soluto. El movimiento de las moléculas puede ser en ambas direcciones, pero, al igual que todos los tipos de difusión, el movimiento neto es de una región de mayor a menor concentración de las moléculas.

Por otro lado, la presión osmótica de una solución se define como la tendencia del agua a moverse hacia dicha solución por ósmosis. Una solución baja en solutos, tiene mayor concentración de agua y además, presión osmótica baja (Devlin, 1980).

En la fisiología de las plantas la ósmosis es sumamente importante, mediante este proceso la planta obtiene agua y todos los nutrientes necesarios del suelo para su desarrollo y sobrevivencia (Fig. 4) (Solomon, *et al.*, 1996).

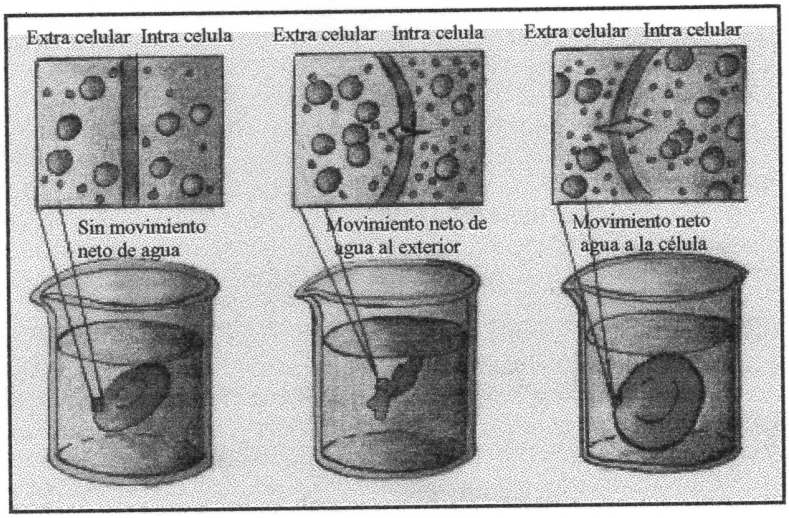


Figura 4. Osmosis. (A) Célula colocada en una solución isotónica. La concentración de solutos (y por lo tanto las moléculas de agua) en una solución es igual que en la célula, de modo que el agua puede entrar y salir de la célula, si bien el movimiento lento es nulo. (B) Célula inmersa en una solución hipertónica. Esta última contiene concentración de solutos mayor (y por lo tanto, menor concentración de agua) que la célula lo que produce la salida neta del agua (flechas), que se deshidrata, se encoge y quizás muere. (C) Célula colocada en una solución hipertónica. Esta tiene menor concentración de solutos (mayor concentración de agua) que la célula, por lo que el contenido de esta última posee presión osmótica mayor que la de la célula. Hay movimiento neto de las moléculas del agua hacia la célula (flecha), lo que hace que esta última aumente de tamaño, e incluso puede llegar a estallar (Tomado de Villee, 1996).

3.1.3 Potencial del agua.

El concepto de potencial del agua o potencial hídrico, se define como la energía libre del agua o la capacidad de la misma para realizar trabajo. Es importante en las plantas como una medida de la capacidad de las células para absorber agua por ósmosis.

El potencial hídrico del agua pura se fija en "0" bar por convención, este no puede medirse directamente. Sin embargo, sí es posible medir las diferencias en la energía libre de las moléculas del agua. Esto significa que los solutos disueltos en la misma, reducen el potencial hídrico con un valor negativo.

El agua se desplaza desde una región de mayor potencial hídrico (menor cantidad de solutos) a otra de menor potencial hídrico (mayor cantidad de solutos) (Devlin, 1980).

El potencial hídrico de las células radicales también es bajo debido a la presencia de azúcares y otros solutos disueltos en ellas. Sin embargo, las raíces contienen mayor cantidad de materiales disueltos en su interior que el agua del suelo, a menos que el suelo sea muy seco (un suelo seco tiene más solutos concentrados). Esto significa que en condiciones normales el potencial hídrico de la raíz es menor (contiene más solutos) que el potencial hídrico del suelo. Así el agua se desplaza desde el suelo hacia el interior de la raíz.

3.1.4 Absorción y movimiento del agua.

El agua penetra en las raíces por ósmosis, como respuesta a un gradiente de energía libre. La presencia de sales en la solución del suelo crea una limitación en la habilidad de la planta para absorber agua (Montes, 1989).

La acumulación del agua en los tejidos de la raíz producto del proceso de ósmosis y la diferencia del potencial del agua en la atmósfera (cantidad de vapor) permiten que ocurra el proceso de evapotranspiración el cual, genera una presión que a su vez, fuerza el agua a subir por el xilema hasta las hojas de las plantas (Fig. 5) (Solomon, *et al.*, 1996).

Este movimiento del agua a través del xilema, permite que la misma se difunda a todas las células para suplir las necesidades básicas de agua como lo son: crecimiento, termorregulación, solvente, la fotosíntesis apertura y cierre de los estomas entre otros (Salisbury, *et al.*, 1994).

La teoría más aceptada del movimiento del agua hacia la parte superior de la planta, es la teoría de cohesión-adhesión-tensión (CAT). Se produce una tensión en las partes superiores de la planta, que tira el agua hacia arriba. La tensión producida en la parte superior de la planta es causada por la atracción evaporativa de la transpiración, que a su vez, es accionada por energía solar cuando ocurre el proceso de evapotranspiración o pérdida de agua en forma de vapor.

Esta tracción ascendente del agua es posible sólo mientras exista una columna ininterrumpida de agua en el xilema. El agua tiende a formar tal columna debido a la cohesividad de sus moléculas, es decir, fuerte atracción entre sí, producido por la formación de los enlaces de hidrógeno (Rosas, 1988; Montes, 1989; Solomon, *et al.*, 1996).

El movimiento del agua en el xilema debido al mecanismo de tensión- cohesión puede explicarse en términos de potencial hídrico. La atmósfera tiene un potencial hídrico extremadamente negativo. Existen gradientes de potenciales hídricos desde el menos negativo (en el suelo), pasando por la planta, hasta el más negativo (en la atmósfera). Esto literalmente tira del agua hacia arriba por la planta (Avers, 1991).

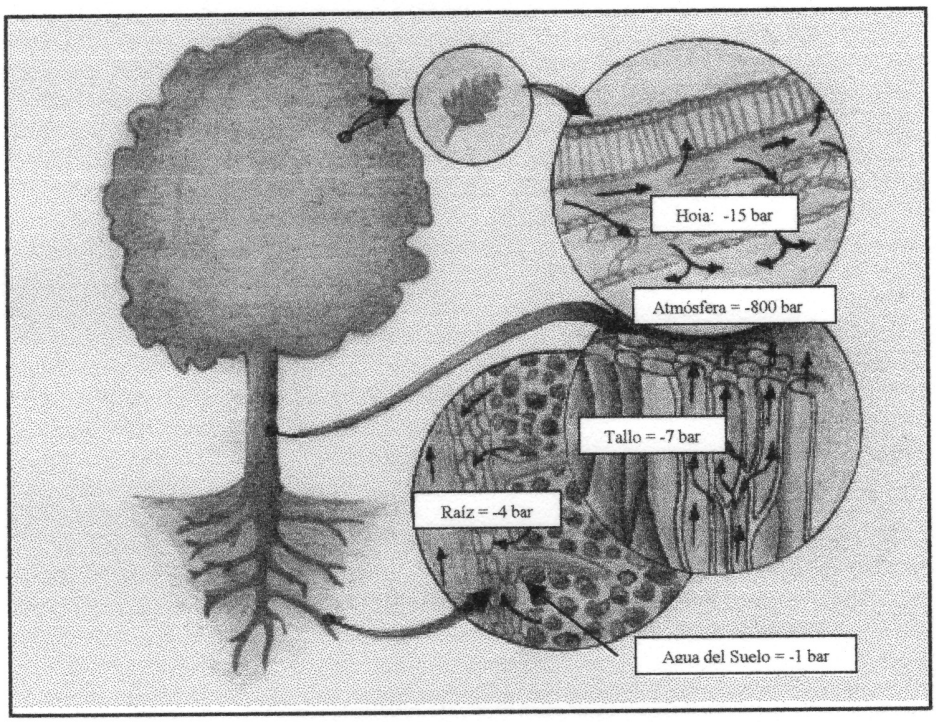


Figura 5. Transpiración. La tracción evaporativa de la transpiración es accionada por el gradiente de potenciales hídricos desde el suelo, pasando por la planta y hasta la atmósfera. El agua se desplaza desde los potenciales hídricos menos negativos hacia los más negativos.

3.1.5 Funcionamiento de los estomas.

Los estomas son poros diminutos localizados en la epidermis de las hojas, y se componen de dos células redondeadas, llamadas células guardas o células oclusivas. Varios gases pasan por los estomas por difusión, tales como el dióxido de carbono, el oxígeno y el vapor de agua.

Se cierran durante la noche para conservar agua en la planta ya que no se requiere enfriamiento de las hojas. Sin embargo, las plantas que viven en desiertos (CAM), cierran sus estomas durante el día para evitar la pérdida de agua y se abren durante la noche para captar el CO2 necesario para la fotosíntesis (Fig. 6 y 7) (Solomon, *et al.*, 1996).

Los estomas tienen la función de actuar como indicadores del estado hídrico de las plantas. Si estos se encuentran abiertos, esto es un indicativo de que el balance hídrico de las hojas es favorable; por el contrario, si se encuentran cerrados, cuando normalmente deberían estar abiertos, es una evidencia de que la planta esta sufriendo un déficit de agua (Sivori, *et al.*, 1980).

Los estomas además de ser intermediarios para la captación de CO2, tienen la función de actuar como mecanismo termorregulador de la planta al intervenir en el proceso de evapotranspiración (Rojas, 1980).

3.1.6 Conceptos generales de la transpiración.

La pérdida de vapor de agua en las plantas terrestres se llama transpiración. Es importante para el movimiento ascendente del agua por el xilema hasta las hojas, aporta termorregulación a las mismas.

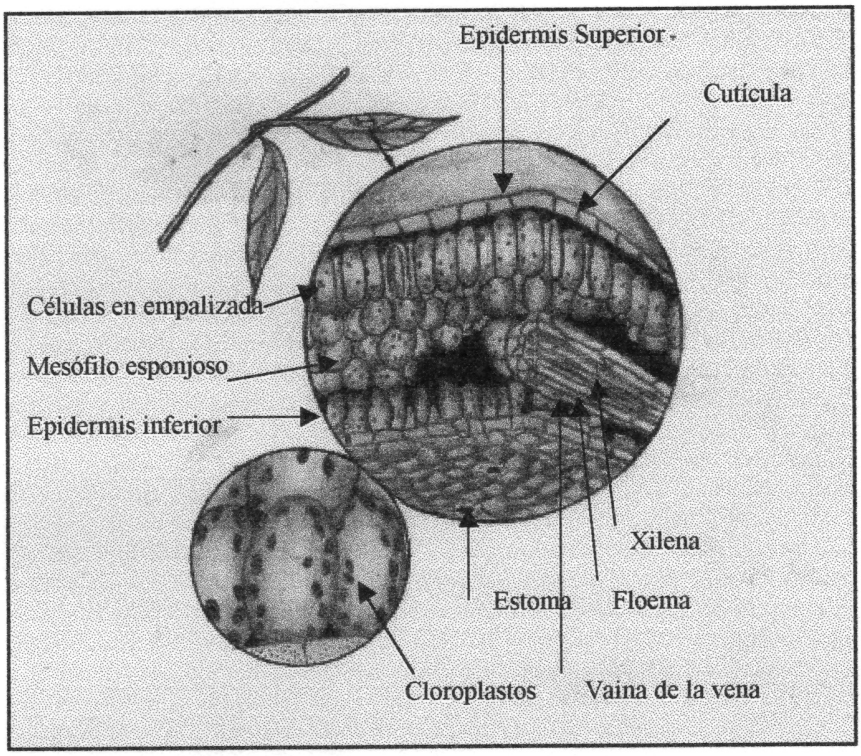


Figura 6. Esquema de la estructura de una hoja. A la derecha se observa parte de una pequeña vena.

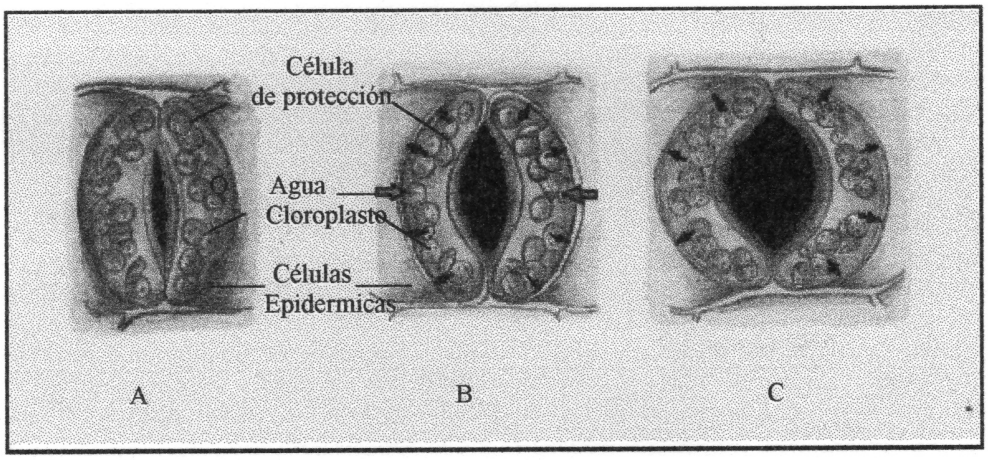


Figura 7. Esquema de cómo las células de protección regulan el tamaño del estoma. A, Estoma parcialmente cerrado. B, Cuando se producen substancias osmóticamente activas como glucosa, entra agua a las células, aumenta su presión de turgencia y cambian de forma, de suerte que aumenta el tamaño del estoma. C, Estoma abierto.

La transpiración tiene sus beneficios, primero, tiene un efecto enfriador en la planta. Porque cuando el agua pasa del estado líquido al gaseoso, absorbe una gran cantidad de calor.

Así, el efecto enfriador de la transpiración suele impedir que las hojas se sobrecalienten, en particular las que están expuestas a la luz solar directa (Devlin, 1980).

Varios factores ambientales influyen en la rapidez de la transpiración; a mayor temperatura hay más transpiración de las superficies vegetales. La luz solar incrementa la tasa de transpiración, al activar la apertura de los estomas. El viento también incrementa la transpiración al llevarse el aire húmedo de la superficie foliar y substituirlo por aire seco. Por el contrario, una elevada humedad relativa reduce la transpiración, pues el aire se encuentra saturado de vapor de agua.

La transpiración puede ser dañina para una planta en ciertas condiciones. En los días de verano, los vegetales pueden perder por transpiración más agua de la que puede ser repuesta por la planta. Como resultado, sus células pierden turgencia, y la planta se marchita (Miller, 1967).

3.1.7 El uso del agua en las plantas.

El agua juega un papel importante en las actividades fisiológicas de la planta, esto se debe a las propiedades de la misma.

La forma normal de una planta se mantiene gracias a la presión del agua en sus protoplastos que mantienen la turgencia de las células. Además, las plantas crecen a medida que absorben el agua, al expandir sus células. Algunos pétalos y hojas, como las de *Mimosa pudica*, (dormidera) se mueven o pliegan cuando el agua entra o sale de células especiales que hay en la base de sus hojas (Rosas, 1988; Salisbury, *et al.*, 1994).

El agua posee algunas propiedades que le confieren capacidad para ser utilizadas por la planta, de manera que puede participar en diferentes procesos fisiológicos:

El calor específico del agua, que se debe al arreglo de sus moléculas lo cual contribuye a que la planta mantenga estabilidad en su temperatura.

Existe una atracción entre moléculas conocida con el nombre de adhesión, esto es debido a que forman puentes de hidrógeno entre ellas.

La atracción entre moléculas iguales se denomina cohesión, esto permite que el agua tenga una resistencia tensil (capacidad de resistir estiramiento). Estas propiedades del agua le permiten entrar a la planta y subir hasta las partes superiores de la misma formando una columna de agua en el xilema, que es literalmente tirada desde la copa del árbol, por la resistencia tensil del agua.

Otra función del agua es evitar el paso de burbujas de aire por los diminutos poros y depresiones de las paredes celulares. Esto se logra por la elevada tensión superficial del agua que no es más que la atracción de las moléculas superficiales de un líquido a su interior evitando así espacios para moléculas gaseosas (Salysbury, *et al.*, 1994).

El agua ejerce un importante papel como solvente, ya que permite que ocurran los procesos de ósmosis en la célula, también, en el movimiento de materiales disueltos por difusión y flujo masivo. Con esto se logra el paso de minerales disueltos hacia el interior de la planta.

Los componentes del protoplasma, como proteínas y ácidos nucleicos deben sus estructuras moleculares y por consiguiente, sus actividades biológicas a las propiedades del

agua. El agua en la planta es necesaria para que en el protoplasma se realicen actividades químicas específicas al medio acuoso en donde se encuentran a excepción de las moléculas que se encuentran dentro de los oleosomas o las porciones lipídicas (Salisbury, *et al.*, 1994).

El agua es necesaria para que ocurran los procesos fotosintéticos, pues, actúa como sustrato de las reacciones bioquímicas y como fuente de hidrógeno (H), o iones, para la formación de azúcares. La planta reduce la tasa fotosintética al reducir los niveles de agua (Rosas, 1988; Saldivar, 1994).

También el agua es utiliza para que los estomas se abran o se cierren, esto se debe a que las células oclusivas deben absorber agua para que los estomas se abran (Saldivar, 1994).

3.1.8 Efectos de la falta de agua en las plantas.

La disminución en los niveles requeridos de agua por las plantas provoca marchitez. Esta ocasiona a su vez, una reducción en el proceso fotosintético. Afecta, por lo general, a los tejidos viejos, produciendo una reducción en el contenido de proteínas, que puede deberse a una disminución de la síntesis del ARN.

La falta de agua en las plantas origina el cierre de los estomas, alterando la turgencia de la epidermis. Después, ocurre una disminución del proceso fotosintético, alterando la respiración celular y finalmente el marchitamiento y muerte de las hojas. Si el déficit es severo la planta iniciará un proceso irreversible y morirá (Montes, 1989).

4. Fotosíntesis.

4.1 Conceptos generales.

La fotosíntesis puede definirse, como el proceso por el cual las plantas tomadas energía lumínica y la transforman en presencia el agua y dióxido de carbono en compuestos orgánicos energéticos, con la liberación de oxígeno (Fernández, *et al.*, 1986; Rosas, 1988).

Las reacciones que constituyen estos procesos se llevan a cabo en los plastidios que contienen clorofila, llamados cloroplastos, estos poseen las unidades estructurales y bioquímicas de la fotosíntesis con la intervención de ciertas enzimas (Rosas, 1988).

En el interior de los cloroplastos se encuentran los tilacoides o lamelas, donde ocurren las reacciones para capturar la luz. En el estroma que es el material que rodea las membranas fotosintéticas, ocurre una serie de reacciones en donde la energía se transfiere a moléculas orgánicas (Rosas, 1988; Avers, 1991).

4.1.1 La luz, los pigmentos y los cloroplastos.

La comprensión de las reacciones ocurridas en la fotosíntesis se facilita al considerar los cloroplastos y el papel que juegan estos, al igual que la luz y los pigmentos en la fotosíntesis.

Los cloroplastos son los organelos fotosintéticos que contienen clorofila y en ellos se lleva a cabo la fotosíntesis de las plantas. Los cloroplastos, están limitados por membranas internas y externas que rodean un líquido contenido en la zona llamada estroma. El estroma contiene las enzimas necesarias para el proceso fotosintético.

A su vez, la membrana interna de los cloroplastos rodea a un tercer sistema de membranas, que forma un conjunto de sacos aplanados llamados tilacoides y agrupados a maneras de pilas, estructuras llamadas granas. Las reacciones para captar la luz tienen lugar en los tilacoides, donde se encuentran las clorofilas y otros pigmentos.

Las reacciones en las cuales la energía lumínica es transformada a compuestos orgánicos se realiza en el estroma (Rosas, 1988; Avers, 1991; Solomon, *et al.*, 1996).

Por otro lado, los pigmentos sensibles a la luz se encuentran en el interior de los cloroplastos, la clorofila que es una molécula formada por átomos de carbono y nitrógeno dispuestos en un anillo complejo. Se conocen dos tipos de clorofilas, la clorofila **a** y la clorofila **b**. Además, las plantas pueden presentar otros pigmentos como son los carotenos, las xantofilas, ficocianinas y ficoeritrinas entre otros (Avers, 1991; Solomon, *et al.*, 1996).

Considerando a la luz, esta se comporta como onda, o como partículas; de ondas que viajan a diferentes longitudes; cada longitud de onda tiene un grado de absorción diferente, en las clorofilas la longitud de onda de máxima absorción es de 440 nanómetros (nm.) (Villee, 1968).

Por otro lado, existe un pigmento llamado fitocromo, puede encontrarse en dos formas, una con un máximo de absorción de luz a los 660 nm. y otra con un máximo de 730 nm. Esta molécula de cromoproteína capaz de absorber luz desde los 200 hasta los 800 nm, participa en diferentes procesos fisiológicos como la germinación, alargamiento de los entrenudos, crecimiento de las hojas, formación de primordios foliares, diferenciación de estomas, síntesis de antocianinas, alargamiento de los peciolos, síntesis de clorofila, forma de la hoja, floración, y distribución de los productos de la fotosíntesis (Sivori, *et al.*, 1980).El proceso fotosintético se lleva a cabo en dos fases, la fase lumínica y la fase oscura.

1- Fase lumínica.

La fase lumínica ocurre en los tilacoides, durante la misma, la luz es captada por los pigmentos fotosintéticos para sintetizar ATP (trifosfato de adenosina) y NADPH (fosfato dinucleótido de nicotinamida-adenina). Aquí, el agua es fotolizada liberando oxígeno molecular, que es un producto secundario.

En esta fase pueden ocurrir fosforilación cíclica y no cíclica; en el caso de la fosforilación cíclica, el fotosistema II (que es una molécula con pigmentos fotosintéticos como las clorofilas **a, b** y xantofilas, capaces de absorber la luz a una longitud de onda determinada) es activado por la energía lumínica, cediendo dos electrones a un aceptor primario, y de aquí a otros aceptores de electrones, generando con esto moléculas de ATP.

Luego, los electrones llegan al fotosistema I (molécula con pigmentos fotosintéticos como la clorofila **a, b** y carotenoides, capaces de absorber la luz a una longitud de onda determinada) y con la ayuda de la luz se continúa la cadena de transferencia de electrones, generando consigo ATP (Fig. 8). En la fosforilación no cíclica, actúa solamente el fotosistema I, en donde los electrones producidos por la luz pasan de un aceptor a otro, en la membrana de los tilacoides, creando una diferencia de potencial redox, para transportar (bombear) protones a través de la membrana tilacoidal generando ATP.

2- Fase oscura.

La fase oscura se lleva a cabo en el estroma de los cloroplastos. En esta fase se utiliza el ATP y el NADPH producidos en la fase lumínica para fijar el dióxido de carbono y formar moléculas orgánicas (carbohidratos). Estas reacciones no necesitan la presencia de la luz como fuente de energía, por ello, se dice que ocurre en la fase oscura (puede ser dependiente o no de la luz).

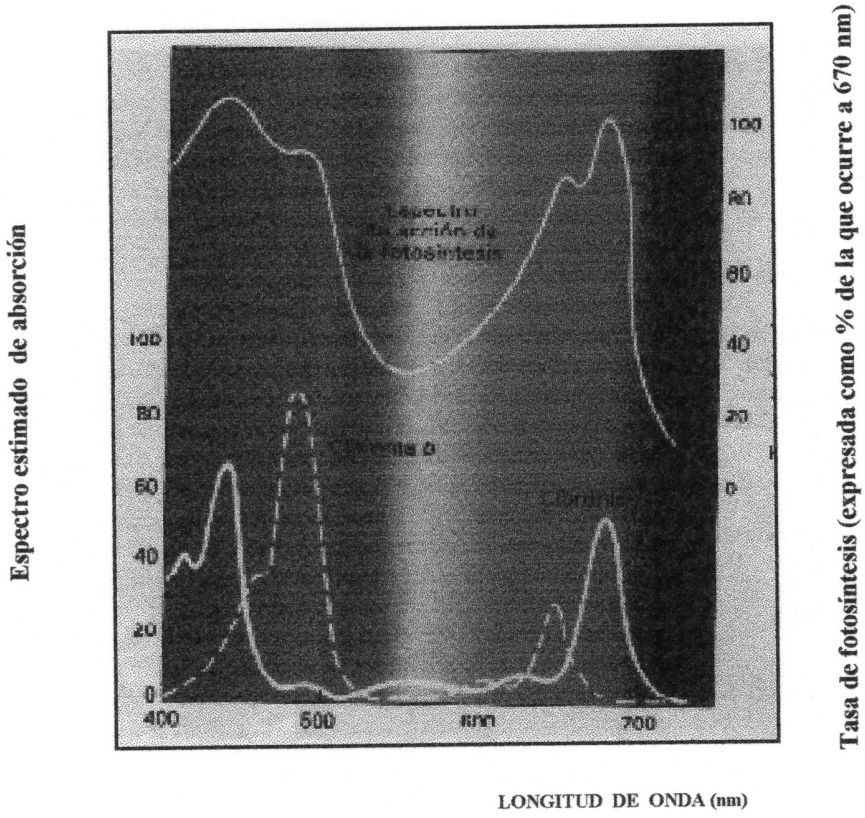


Figura 8. Espectros de absorción de las clorofilas *a* y *b,* así como espectro de acción de la fotosíntesis. La curva blanca continua del extremo inferior ilustra el espectro de absorción de la clorofila *a*, y la curva blanca de guiones, el de la clorofila *b*. La clorofila absorbe principalmente luz de las porciones azul y roja del espectro electromagnético. La curva blanca del extremo superior (espectro de acción de la fotosíntesis) ilustra la eficacia de diversas longitudes de onda como fuente de energía de la fotosíntesis. Nótese que el espectro de acción es más amplio por la presencia de pigmentos accesorios que pueden utilizar luz de diferentes longitudes de onda (Tomado de Villee, 1996).

Las reacciones de esta fase pueden variar dependiendo del hábitat en que se desarrolla la planta y la especie vegetal a la que nos referimos, así de acuerdo al mecanismo fotosintético las plantas pueden clasificarse en plantas con ciclo fotosintético C3, C4, y CAM (Avers, 1991; Rosas, 1988; Fernández, 1986).

4.1.2 Tipos de fotosíntesis

4.1.2.1 Plantas con fotosíntesis tipo C3.

En las plantas C3 el primer producto de la fijación del dióxido de carbono, es un compuesto de tres carbonos, el PGA (ácido 3-fosfoglicérico o fosfoglicerato). En este proceso llamado Ciclo de Calvin, se produce parte de una molécula de carbohidrato en cada ciclo, se necesitan seis repeticiones del ciclo, para formar una molécula de glucosa (Fig. 9) (Avers, 1991).

Este ciclo tiene su inicio con una molécula de azúcar de cinco carbonos llamada ribulosa 1,5 bifosfato (o rubisco), catalizada por la enzima ribulosa 1,5 difosfato carboxilasa, esta capta el dióxido de carbono luego, se divide en dos de tres carbonos, el fosfoglicerato (PGA); en este momento es cuando entonces entra el ATP y el NADPH de las reacciones luminosas, para formar el gliceraldehído-3 fosfato (PGAL). Después de seis repeticiones del ciclo, se forman carbohidratos. Ciertas moléculas de PGAL se unen a la molécula de fosfato de ribulosa (RP) el cual se fosforila con ATP para producir RUBP, el azúcar de cinco carbonos que inició el proceso (Villee, 1968; Avers, 1991; Solomon, *et al.*, 1996)

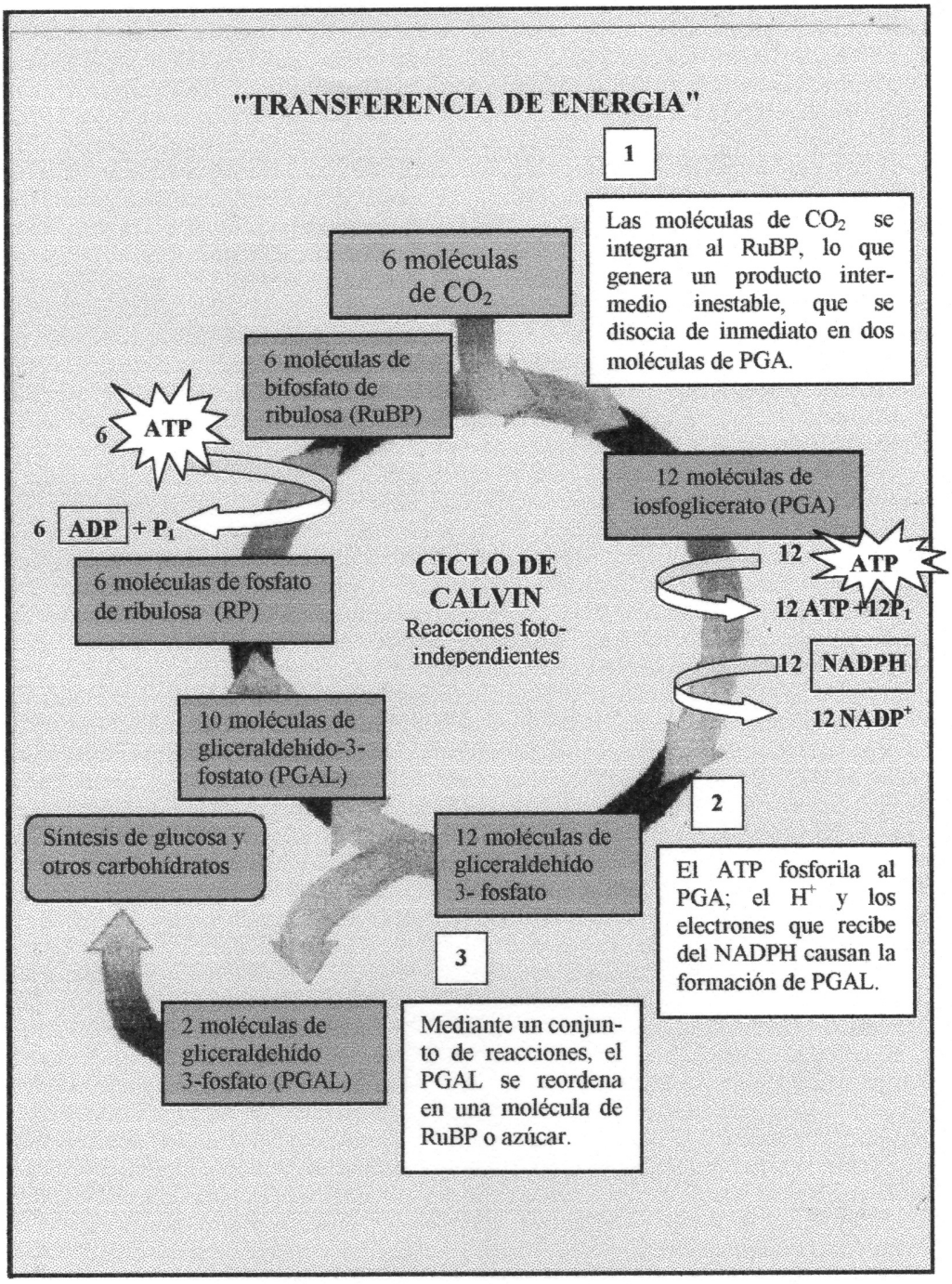


Figura 9. Reacciones fotoindependientes de la fotosíntesis, también llamadas ciclo de Calvin. En el diagrama se ilustra seis repeticiones del ciclo, en las cuales seis moléculas de CO_2 se conviertes en una de un azúcar de seis carbonos, como la glucosa. La energía (y la capacidad reductora) del ciclo de Calvin proviene de los productos de las reacciones fotodependientes (o sea de ATP y NADPH).

4.1.2.2 Plantas con fotosíntesis tipo C -4

Las plantas C4 son llamadas así porque fijan el dióxido de carbono en un compuesto de cuatro carbonos, el oxalacetato; otro nombre de este mecanismo es el de Hatch-Slack en honor a sus descubridores. Este proceso ocurre en las células del mesófilo y comienza con la fijación del dióxido de carbono por el fosfoenolpiruvato (PEP), para producir Oxalacetato con la ayuda de la enzima fosfoenol piruvato carboxilasa (PEP carboxilasa) (Fig. 10).

El oxalacetato se convierte en otra molécula, el malato, para entrar a las células de la vaina, al transformarse a piruvato, liberando dióxido de carbono y NADPH. El dióxido de carbono entra al Ciclo de Calvin, al unirse al RuBP (ribulosa 1-5 bifosfato) y el piruvato regresa a las células del mesófilo, en donde con el uso de ATP forma el fosfoenol piruvato inicial (Avers, 1991; Solomon, *et al.*, 1996).

Diferencias entre las plantas C3 y C4.

Los dos tipos de plantas presentan diferencias estructurales en las hojas, y subsisten en ambientes bajo condiciones climáticas diferentes, que acondicionan a las mismas. Las plantas C3 presentan hojas con epidermis en la parte externa, luego en la parte interna de las hojas están las células del mesófilo, muy próximas unas de las otras (parénquima en empalizada), y rodean las células de la vaina, que a su vez rodean la vena de la hoja.

Por otro lado, las plantas C4 presentan células diferentes después de la epidermis, células del mesófilo están muy separadas y no rodean las células de la vaina; en su lugar hay un segundo tipo de células, las del mesófilo esponjoso y luego están las células de la vaina que rodean la vena. Además, las C3 son de clima templado y las C4 son de clima tropicales (Fig. 11) (Rosas, 1988; Sivori, *et al.*, 1980; Solomon, *et al.*, 1996).

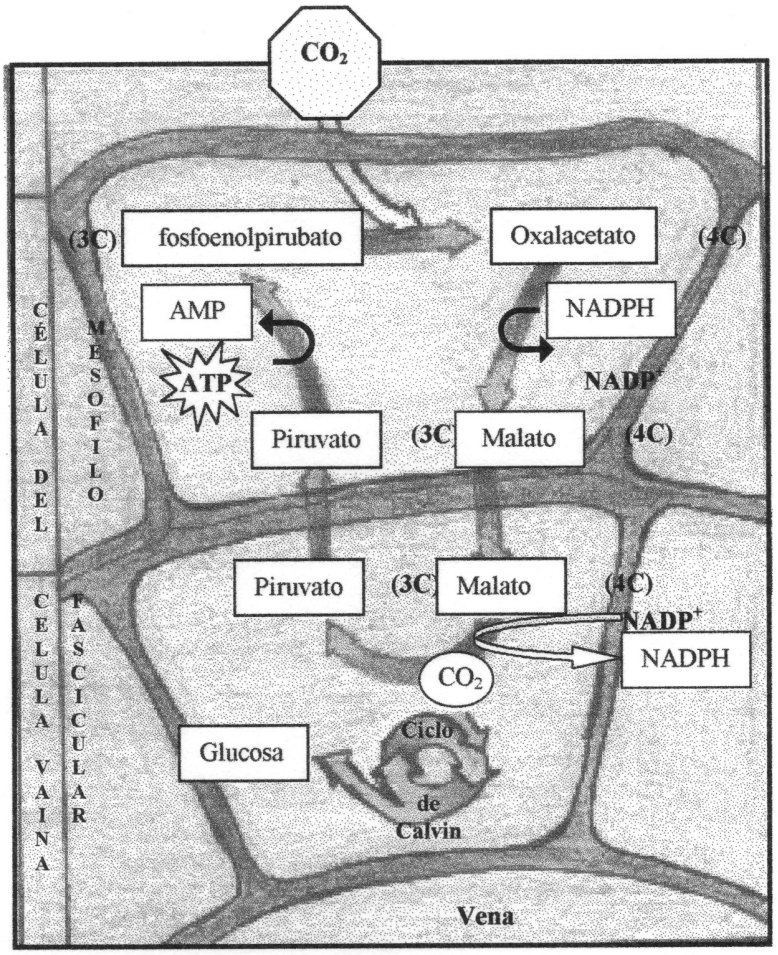
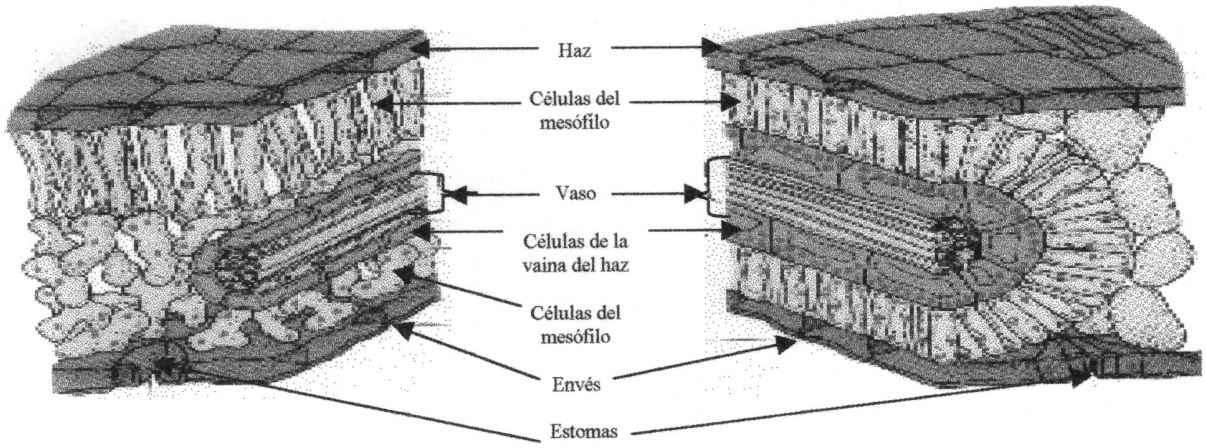
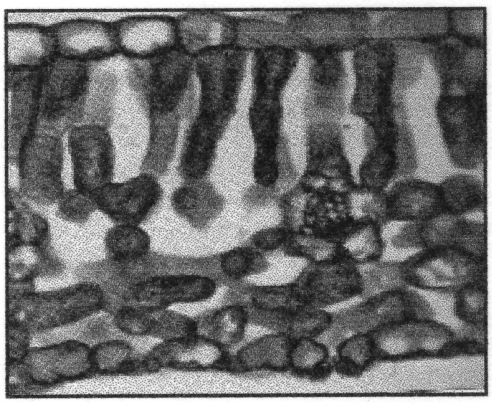


Figura 10. Mecanismo C_4 de fijación del CO_2. El dióxido de carbono se combina con el fosfoenolpiruvato (PEP) en las células mesófilas, con la formación de un compuesto de cuatro carbonos que se convierte en malato. Este pasa a las células de la vaina fascicular , donde se descarboxila. El CO_2 liberado de esta manera en las células de la vaina fascicular sirve en la síntesis de azúcares mediante el ciclo de Calvin. El sistema C_4 consume algo de energía, que en última instancia está disponible sólo gracias a la fotosíntesis, de manera que este sistema es importante para la planta sólo cuando la intensidad luminosa es considerable. En estas condiciones, puede fijar más carbono que con el sistema C_3 solo.

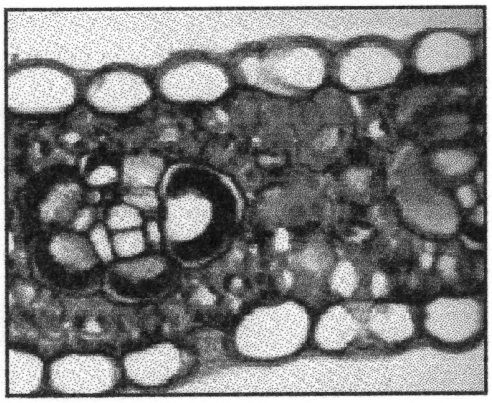


(a) Disposición de las células en la hoja de una planta C_3.

(b) Disposición de las células en la hoja de una planta C_4.



(c)



(d)

Figura 11. Diferencias entre las plantas C_3 y C_4. Las laminas a y b muestran las diferencias estructurales entre las plantas C_3 y C_4. Las Láminas c y d son cortes transversales de las plantas C_3 (c) y C_4 (d). (Tomado de Villee, 1996).

4.1.2.3 Metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM) o (MAC).

Esta variante la realizan aquellas plantas que viven en condiciones Xéricas, es decir, de sequía extrema. Estas plantas al igual que las anteriores también tienen estructuras fisiológicas, de adaptación a los lugares en donde viven, sus estomas se abren sólo de noche para captar CO2 y se cierran durante el día, para reducir al máximo la pérdida de agua, por transpiración.

Esta adaptación permite que el dióxido de carbono se fije durante la noche y no de día, dando lugar a la formación de un metabolismo fotosintético diferente llamado, metabolismo ácido de las Crasuláceas o simplemente MAC (Avers, 1991; Solomon, *et al.*, 1996).

Las plantas MAC realizan el mecanismo C3 y C4, pero en momentos y lugares diferentes de la planta. En la noche fijan el dióxido de carbono por el mecanismo C4 formando el malato, en las células del mesófilo y durante el día descarboxilan el dióxido de carbono, así la planta tiene el dióxido de carbono incorporado, necesario para realizar el mecanismo C3 durante el día (Sivori, 1980; Avers, 1991; Solomon, *et al.*, 1996).

4.1.3 Ciclo del Carbono.

El carbono esta presente y es necesario en la mayoría de las moléculas biológicas, de aquí la importancia de conocer los procesos del Ciclo del Carbono (Fig. 12).

En la atmósfera el carbono esta presente como dióxido de carbono (gaseoso, CO2); en el mar y rocas existe la forma de carbonatos y bicarbonatos. El dióxido de carbono es captado por las plantas y algunas bacterias, las plantas sirven de alimento a los animales, los cuales lo incorporan a su vez como moléculas de carbono; estos animales respiran el oxígeno que es producido por el proceso fotosintético de las plantas, liberando CO2 (dióxido de

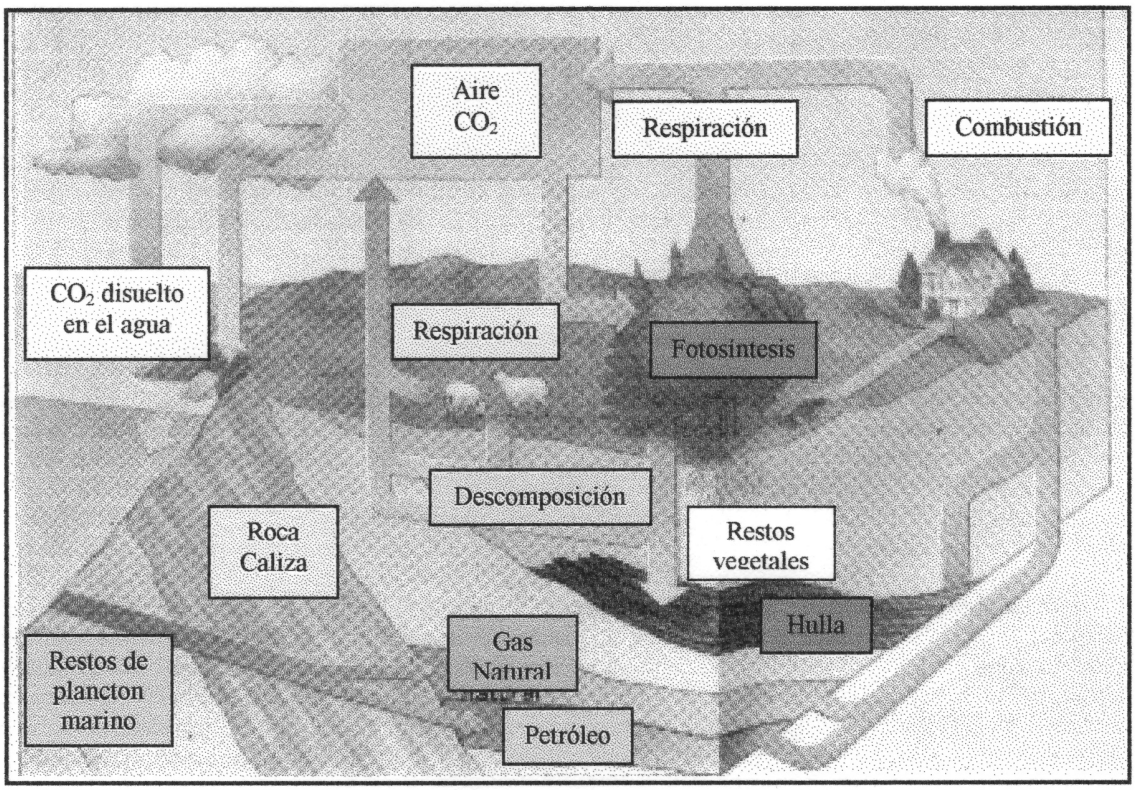


Figura 12. Diagrama simplificado del ciclo de carbono. El carbono (en la dióxido de carbono, CO_2) ingresa en los seres vivos desde el ambiente abiótico cuando plantas y otros productores fotosintetizan (flechas violetas). El carbono regresa a la atmósfera cuando a los seres vivos respiran (flechas verdes), cuando la materia orgánica muerta es desintegrada (flechas doradas) o cuando se quema madera o combustibles fósiles (flecha gris). También ocurre movimiento de carbono en el ambiente abiótico (flechas azules). Nótese asimismo que los restos de organismos formaron depósitos de combustibles fósiles (petróleo, gas natural y hulla), lo que extrajo carbono del ciclo temporalmente. Cuando los combustibles fósiles son quemados, el carbono vuelve a liberarse en la atmósfera.

carbono) al ambiente en forma gaseosa, una vez que estos animales mueren, se descomponen liberando el mismo compuesto, con la ayuda de los microorganismos descomponedores.

Las plantas también sirven de alimento al hombre liberando así el dióxido de carbono al aire; el petróleo cuando es quemado, libera dióxido de carbono. Sin embargo, el CO2 se precipita al mar cuando llueve y regresa a la atmósfera cuando se evapora. El dióxido de Carbono pasa de un estado a otro, todo en un comportamiento cíclico (Solomon, *et al.*, 1996).

4.1.4 Factores que influyen en la fotosíntesis.

La fotosíntesis varía dependiendo de las plantas a las cuales nos referimos y del lugar natural en donde viven. Sin embargo, la intensidad de la fotosíntesis puede variar de acuerdo a factores limitantes tales como, dióxido de carbono, agua y la temperatura entre otros.

El dióxido de carbono necesario para la fotosíntesis. Se encuentra la atmósfera entre un 0.03 % y 0.04 % aproximadamente. Su ausencia provocaría la muerte de las plantas, así como su aumento por encima de los niveles normales, aumentaría la fotosíntesis. Sin embargo, esto no puede ocurrir en condiciones naturales, puesto que en el Ciclo del Carbono se mantiene el equilibrio (Rojas, 1980).

La luz es la única fuente de energía para la fotosíntesis, así como la planta requiere una cantidad de energía lumínica para la fotosíntesis, al variar la intensidad de luz, variará la intensidad de fotosíntesis.

La fotosíntesis se realiza a temperaturas óptimas dependiendo de donde vivan las plantas. En las regiones templadas se realiza la fotosíntesis desde los 5 °C; en los trópicos

tiene un límite entre los 10 y 35 °C. Vemos pues, que la temperatura también juega un papel importante en la intensidad de la fotosíntesis (Miller, 1980).

El agua es otro factor limitante en el proceso de fotosíntesis, si privamos la planta de agua, disminuirá la fotosíntesis y cuando se dan sequías, la planta se puede deshidratar hasta morir.

El oxígeno parece ser necesario para la fotosíntesis, según investigaciones realizadas por Burk y Warburg en 1951, se demostró que en cierta etapa de la fotosíntesis la planta consume algo del oxígeno que ha sido liberado.

Entre otros factores que influyen en la fotosíntesis están, la deficiencia de minerales, potasio, hierro y fósforo, necesarios para la síntesis de clorofila ya que forman parte de su estructura.

5. Respiración.

La respiración es el proceso por el cual las moléculas orgánicas, (carbohidratos, lípidos, grasas y proteínas), son transformados a ATP, el cual es utilizado por las células en los procesos fisiológicos esenciales (Rosas, 1988).

5.1 Conceptos generales.

Las moléculas de glucosa son degradadas en tres etapas diferentes: La glucólisis, el Ciclo de krebs y la cadena de transporte de electrones.

5.1.1 La glicólisis

Esta etapa ocurre en el citosol y se lleva a cabo de la siguiente manera: (Rosas, 1988).

1- Las moléculas de glucosa son degradadas en moléculas más simples y con menor contenido energético, como lo es el ácido pirúvico.

2- Ocurre la fosforilación, proceso en el cual se obtiene dos moléculas de ATP a partir de ADP y de fosfatos inorgánicos (Pi).

3- Los protones producidos por la oxidación de la glucosa son aceptados por una molécula, la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) la que se convierte en NADH (o sea la misma molécula pero en forma reducida al aceptar un protón).

5.1.2 Ciclo de Krebs.

El Ciclo de Krebs también es conocido como Ciclo del Ácido Cítrico (Fig. 13), se lleva a cabo, al igual que la cadena de transporte de electrones, en un organelo especializado de la célula llamado Mitocondria. En ella el ácido pirúvico se oxida a Acetil CoA. Las moléculas de ácido pirúvico son oxidadas formándose grupos de acetilos los cuales se unen con coenzima A para producir Acetil CoA que es requerida para el Ciclo de Krebs (Rosas, 1988; Avers, 1991; Solomon, *et al.*, 1996).

Reacciones del ciclo.

La Acetil CoA se convierte en acetato y esta a su vez, desdobla en citrato, luego éste (el citrato) se transforma en oxalacetato, con la liberación de dióxido de carbono, ATP y los compuestos reducidos de alta energía como los son el NADH y FADH2.

La molécula de Acetil CoA se fragmenta y el grupo acetilo se une al oxalacetato, formándose el citrato, la parte restante (CoA), queda libre para combinarse con otra molécula.

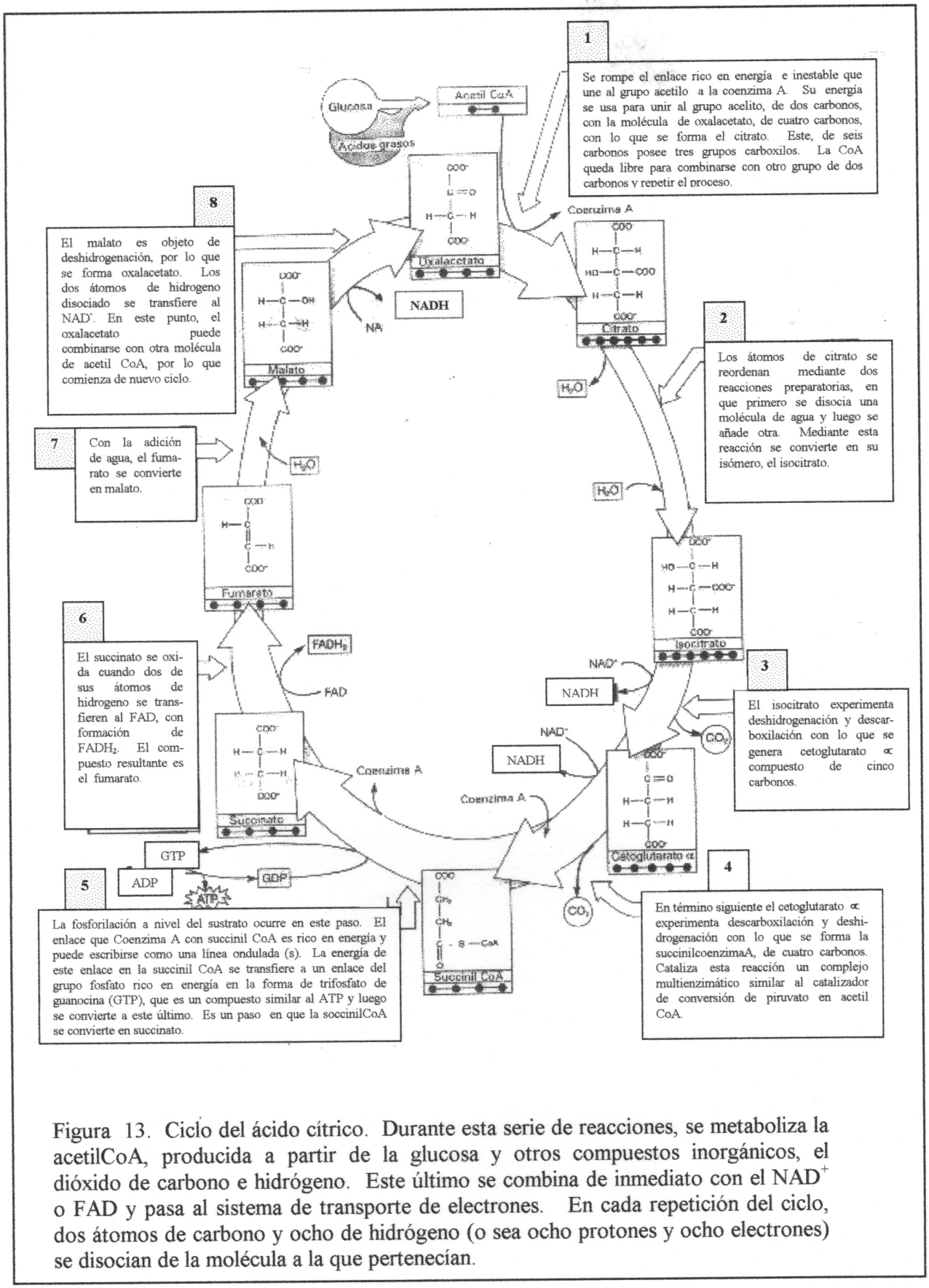


Figura 13. Ciclo del ácido cítrico. Durante esta serie de reacciones, se metaboliza la acetilCoA, producida a partir de la glucosa y otros compuestos inorgánicos, el dióxido de carbono e hidrógeno. Este último se combina de inmediato con el NAD^+ o FAD y pasa al sistema de transporte de electrones. En cada repetición del ciclo, dos átomos de carbono y ocho de hidrógeno (o sea ocho protones y ocho electrones) se disocian de la molécula a la que pertenecían.

El citrato se convierte en isocitrato, el cual se deshidrogena por acción del NAD+ y se carboxila con el CO2, formando el alfa cetaglutarato, este se deshidrogena por otra molécula de NAD+, descarboxilándose a Co2 y se une a la CoA para formar el succinil CoA.

La molécula de succinil CoA, se fracciona liberando energía en forma de ATP convirtiéndose a succinato. Este compuesto se oxida a fumarato con la donación de dos hidrógenos al FAD.

Posteriormente, el fumarato se convierte a malato con la adición de agua y por último, el malato es deshidrogenado a NAD para formar el oxalacetato completando el ciclo nuevamente (Avers, 1991; Solomon, *et al.*, 1996).

5.1.3 Transporte de electrones.

En el Ciclo de Krebs con la molécula de glucosa utilizada se formó ATP y ADP. Los electrones liberados en el Ciclo de Krebs son transferidos de un aceptor a otro en la cadena de transporte de electrones dando como resultado la formación de más moléculas de ATP y ADP; este proceso es conocido como Fosforilación oxidativa (Fig. 14).

Los electrones que se encuentran en forma de NADH y FADH2 son transferidos a complejos enzimáticos situados en la membrana interna de las mitocondrias.

El NADH transfiere sus electrones al complejo NAD dehidrogenasa y este último lo conduce hasta la coenzima **Q.** El FADH2 transfiere sus electrones al complejo succinato dehidrogenasa que lo lleva a la conezima **Q**. Luego la coenzima **Q** reducida, cede sus electrones al complejo de citrocromos **b** y **c**, de aquí, los electrones salen al espacio intermembranal hasta el citocromo **c,** que es oxidado por el complejo de citocromo oxidasa y finalmente el oxígeno capta el par electrónico de la citocromo oxidasa, transformándose en

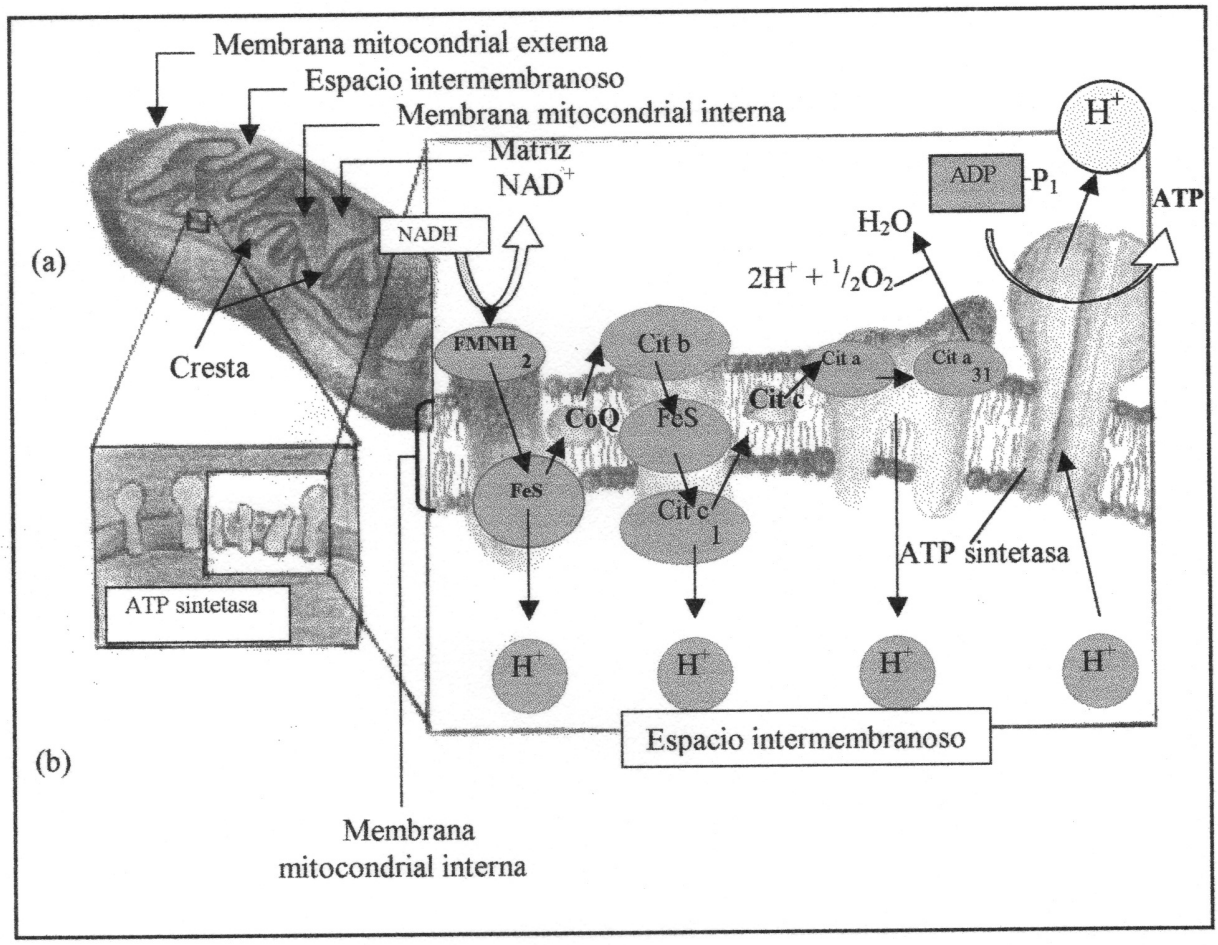


Figura 14. Quimiosmosis. (a y b) Conforme al modelo quimiosmótico, una cadena de transporte de electrones en la membrana mitocondrial interna es una bomba de protones. (c) Los aceptores de electrones de la membrana se localizan en tres complejos principales. El mononucleótido de flavina, que oxida al NADH, se localiza en el primer complejo. El complejo del citocromo b-c_1 consiste en dos citocromos y algunos otros aceptores de electrones. El tercer complejo incluye los citocromos a y a_3. La coenzima Q y el citocromo c, son portadores móviles que transfieren electrones entre los complejos. En tres sitios de la cadena la energía liberada durante el transporte de electrones se utiliza para el de protones (H^+) de la matriz mitocondrial al espacio intermembranoso donde se acumula una alta concentración de protones. Se impide que estos difundan de nuevo hacia la matriz, a través de la membrana interna, excepto en conductos especiales de la ATP sintetasa en la propia membrana. El flujo de electrones por la sintetasa genera ATP a costa de la energía libre proveniente de los protones que pasa de la región de su concentración alta, a la de su concentración baja.

agua (H2O). Los electrones son transferidos desde una molécula con potencial electromotriz bajo a uno más alto (Rosas, 1988; Avers, 1991; Solomon, *et al.*, 1996).

5.1.4 Factores que influyen en la respiración.

Entre algunos de los factores que inciden en la respiración figuran la temperatura, aumento del volumen del protoplasma de las células, contenido de oxígeno de la atmósfera.

La temperatura incide en la intensidad de la respiración de las plantas ya que aumenta con la temperatura; la intensidad se duplica o triplica por cada 10 °C de incremento en la temperatura.

Protoplasma de la célula.

La intensidad de la respiración se multiplica con el aumento del protoplasma, las células meristemáticas tienen una intensidad de respiración relativamente alta, esto se debe a la gran cantidad de protoplastos presentes en dichas células.

Contenido de oxígeno de la atmósfera.

Se ha observado un ligero aumento en la respiración de las plantas expuestas a mayor concentración de oxígeno que el atmosférico (Steward, *et al.*, citado por Miller, 1967).

6. El Nitrógeno en las plantas.

El nitrógeno es importante para todos los seres vivos, forma parte de moléculas como proteínas y ácidos nucleicos. Este elemento es esencial para el desarrollo normal de la planta, y se le clasifica como un macronutriente. Se encuentra en grandes cantidades en forma de

gas en la atmósfera (80 % y 70 %) . Sin embargo, su estabilidad hace difícil que se combine con otros elementos, por lo que los seres vivos no lo pueden tomar en forma gaseosa de la atmósfera, es por ello que debe ser transformado con la ayuda de microorganismos a una forma asimilable para las plantas. Todo este proceso ocurre en forma cíclica y se conoce como el Ciclo del Nitrógeno (Sivori, 1980; Rosas, 1988).

6.1 Ciclo del Nitrógeno.

Este ciclo se compone de varios procesos consecutivos, fijación del nitrógeno atmosférico nitrificación, amonificación, asimilación y desnitrificación. Muchos de estos pasos lo realizan bacterias las cuales juegan un importante papel en dicho ciclo (Fig. 15) (Miller, 1969; Solomon, *et al.*, 1996).

1- Fijación del nitrógeno.

Este proceso implica la transformación del nitrógeno gaseoso en amoniaco (NH3) o nitrato (NO3-), es decir, el nitrógeno se fija a una forma disponible para los seres vivos (Solomon, *et al.*, 1996).

Los microorganismos que realizan este proceso son bacterias pertenecientes a los géneros Clostridium y Azotobacteres; ambas oxidan la materia orgánica del suelo y utilizan parte de la energía para "fijar" el nitrógeno atmosférico (Winogradski, citado por Miller, 1969).

Estas bacterias, emplean la enzima nitrogenasa para poder realizar este proceso; las mismas pueden producir nódulos en las raíces de las plantas como el Rhizobium.

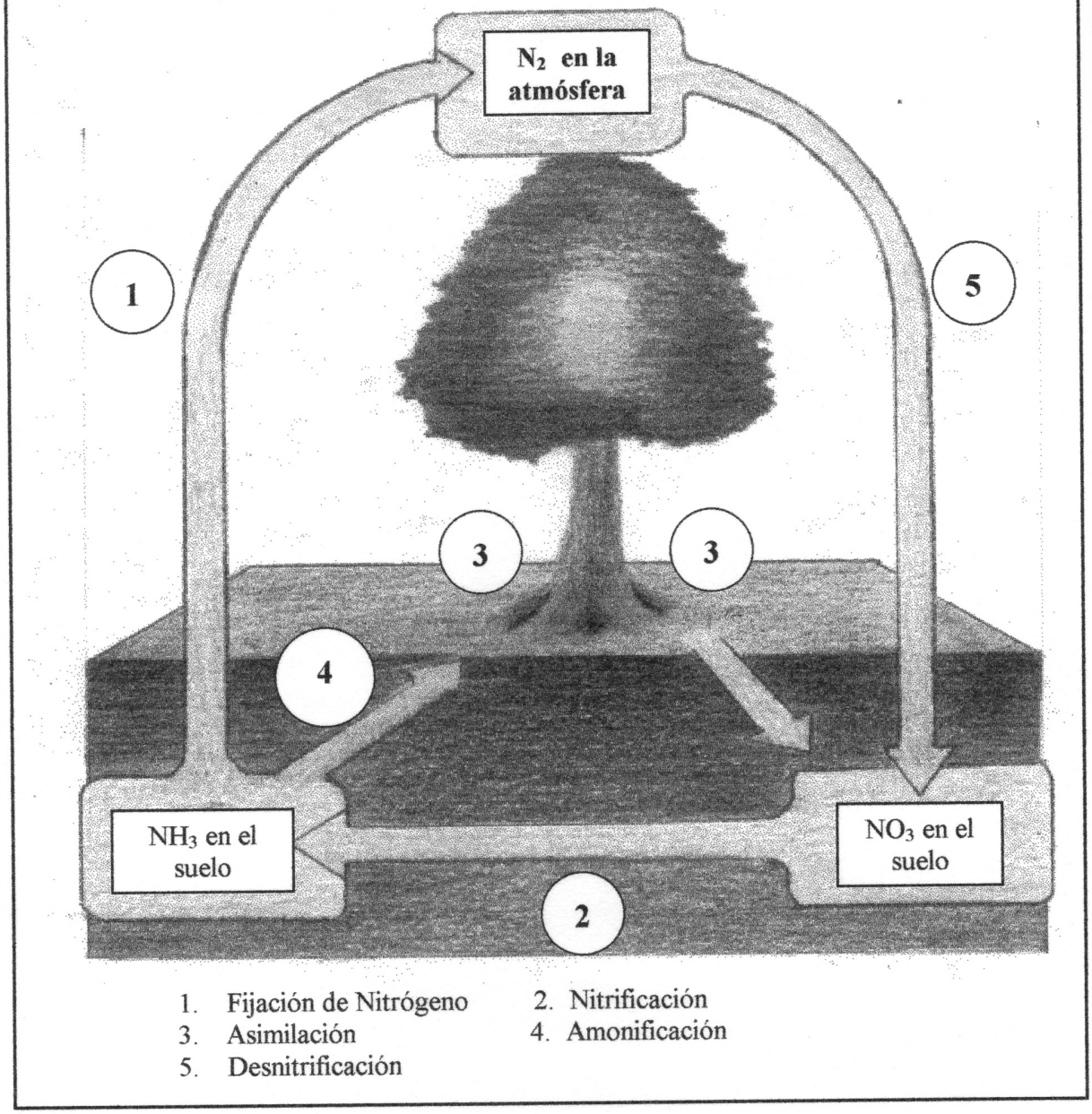


Figura 15. El ciclo del nitrógeno tiene cinco pasos en los que participan seres vivos. Bacterias fijadoras de nitrógeno convierten el nitrógeno atmosférico en amoniaco. Este es convertido en nitratos por bacterias nitrificantes del suelo. El nitrato es la principal forma de nitrógeno absorbida por las plantas, las cuales lo asimilan para producir proteínas y ácidos nucleicos; los animales comen proteínas vegetales y producen proteínas animales como parte de la asimilación. Cuando plantas y animales mueren, sus compuestos nitrogenados son degradados por bacterias amonificantes, que liberan amoniaco. Parte del nitrógeno es devuelto a la atmósfera por bacterias desnitrificantes, que convierten nitrato en nitrógeno molecular.

En los hábitats acuáticos hay bacterias fijadoras del nitrógeno como lo son las cianobacterias; sin embargo, hay también, algas que pueden realizar este proceso; tal es el caso de las Algas verdeazules (Nostoc) (Villee, 1968; Solomon, *et al.*, 1996)

2- Amonificación.

Cuando las plantas y los animales mueren, liberan el nitrógeno en forma orgánica el cual es absorbido por las plantas, la mayor parte es absorbida en forma inorgánica.
Es aquí en donde intervienen los microorganismos que hacen disponible dicha molécula para la asimilación y desnitrificación.

3- Asimilación.

Las plantas absorben el nitrato (NO3) o el amoniaco (NH3) formado en la fijación y lo incorporan a sus tejidos, y así lo incorporan a la cadena alimenticia cuando son asimilados por otros animales

4- Desnitrificación.

Esta es la última etapa del ciclo, ya que estas bacterias liberan nitrógeno a la atmósfera contrario a la fijación.

7. Nutrición mineral.

Se entiende por nutrición mineral, todo lo relacionado con la absorción y asimilación de los diversos elementos inorgánicos que utilizan las plantas para su alimentación y supervivencia. (con excepción del carbono, oxígeno y el hidrógeno).

7.1 Absorción y translocación de los nutrientes minerales.

Las plantas tienen como mecanismo de absorción de los nutrientes minerales el proceso de difusión. La cantidad de sustancias que se difunden hacia el interior de la planta está relacionada con la gradiente de concentración. La difusión está regida por la ley de Fick J. - D **(dc/dx),** en donde **j** es el flujo, cantidad de sustancia que se difunde por segundo, perpendicularmente a un área de un centímetro cuadrado; **dc/ dx** es el gradiente de concentración entre dos puntos situados a una distancia **X ; D** es le coeficiente de difusión; propio de cada soluto y solvente.

Su signo negativo en la fórmula indica un movimiento del soluto con un gradiente negativo de concentración. Por otra parte, el proceso de difusión se debe a la energía cinética de las moléculas o energía térmica, siguiendo la formula **E = KT** en donde **K** es una constante y **T** es la temperatura absoluta (Sivori,1980).

Antes de que los nutrimentos sean absorbidos por las plantas, éstos deben entrar en contacto con las raicillas o pelos absorbentes. Existen tres mecanismos de contacto entre las raíces y los nutrimentos del suelo:

- Intercepción directa por la raíz.
- Difusión.
- Acción o flujo de masas.

a- Intercepción.

Al crecer la raíz entra en contacto con los diferentes nutrimentos y los absorbe por cualquiera de los mecanismos anteriores

b- Difusión.

Las raíces absorben los nutrimentos de la rizosfera (zona de influencia de la raíz), dando lugar a una menor concentración en estas áreas.

c- Acción de masas.

Es el movimiento de los iones nutritivos, diluidos en agua, hacia la raíz, cuando la planta transpira. Existen tres mecanismos diferentes para la absorción de nutrimentos por la raíz; la absorción pasiva vía del apoplasto la absorción pasiva vía del simplasto y absorción activa vía del simplasto.

1- La absorción pasiva vía del apoplasto.

La vía del apoplasto es el movimiento de iones fuera del interior de la célula, en los espacios intracelulares. Esta absorción se lleva a cabo por difusión e intercambio iónico entre los iones de la pared celular y los de la solución del suelo.

2- La absorción pasiva vía del simplasto.

La vía del simplasto es el movimiento de los iones dentro de la célula, una vez que están dentro del citoplasma. En esta absorción, hay un bombeo de iones de H, con uso de energía, desde el interior de la célula hacia el exterior, formando con esto, un potencial electroquímico dando lugar a que los cationes entren por difusión facilitada a través del plasmalema (membrana plasmática).

3- La absorción activa vía del simplasto.

Las moléculas de ATP o ligadas a esta y localizadas en el plasmalema, se combinan con los iones que se encuentran en el apoplasto, los transportan a través de la membrana plasmática y los liberan en el interior del citoplasma (Rodríguez, 1991).

Las plantas absorben los minerales del suelo por difusión y esto depende del gradiente de concentración de la energía cinética e inclusive del grado de permeabilidad de la membrana.

Una vez absorbidos los minerales, estos son transportados por el proceso de translocación, donde el agua y los minerales son transportados al xilema. El xilema es un tejido vascular que conduce el agua y los minerales disueltos a través de las plantas (Solomon, *et al.*, 1996).

El agua y los minerales forman una solución diluida que se desplaza dentro de las traqueídas y elementos del vaso, estos son células muertas y huecas. En el xilema los minerales ascienden, por mecanismos de presión-cohesión, distribuyéndose así por toda la planta.

7.2 Elementos esenciales.

En el mundo existen aproximadamente 104 elementos, considerando los naturales y los sintéticos, de los cuales, más del 60 % se han encontrado en las plantas, sin embargo, no todos ellos se consideran esenciales para el crecimiento de las plantas.

Según estudios realizados por muchos fisiólogos se ha demostrado que 16 elementos son esenciales para el crecimiento de las plantas; nueve de ellos se requieren en cantidades grandes y se les conoce como macronutrimentos y los siete restantes son necesarios en cantidades mínimas o trazas, llamados entonces micronutrimentos (Rosas, 1988; Solomon, *et al.*, 1996).

7.2.1 Macronutrimentos y su función.

Entre los macronutrimentos figuran el carbono(C), nitrógeno (N), fósforo(P), potasio(K), azufre(S), calcio(Ca) y magnesio(Mg); cada uno con funciones específicas en las plantas, considerando las condiciones naturales y artificiales. En condiciones artificiales como la hidroponía cultivo de plantas en medios líquidos, o el cultivos de tejidos.

El Nitrógeno.

Este elemento se hace disponible con la ayuda de microorganismos que lo transforman en iones como nitratos (NO3-) y amoniaco (NH4). Es esencial para las plantas, puesto que forma parte de compuestos orgánicos presentes en las plantas como son, aminoácidos, proteínas, coenzimas, ácidos nucleicos y la clorofila; aumenta el crecimiento y desarrollo de todos los tejidos vivos; mejora la calidad de las hortalizas y de los forrajes, además de participar en el metabolismo de los carbohidratos.

La deficiencia del nitrógeno provoca crecimiento reducido o atrofiado, poco follaje clorosis foliar con mayor frecuencia en las hojas inferiores (Sivori, *et al.*, 1980; Rodríguez, 1991).

El Fósforo.

Este elemento poco disponible para la planta, debido al proceso de fijación por el hierro y el aluminio en los suelos ácidos y por la formación de fosfato de calcio de poca solubilidad en los suelos alcalinos. Es obtenido en forma de ión fosfato monovalente y bivalente a través de las raíces y transportado por el xilema a las demás partes de la planta (Sivori, *et al.*, 1980; Rodríguez, 1991).

El fósforo tiene diferentes funciones en la planta, forma parte de los ácidos nucleicos, fosfolípidos y moléculas de alta energía (ATP); actúa en la división celular y síntesis de las grasas; participa en los procesos de la floración y la fructificación de las plantas; maduración de los frutos; desarrollo radical; fortaleza del tallo en los cereales y mejora la calidad general de los cultivos.

La deficiencia del fósforo provoca un crecimiento lento de las plantas y a diferencia del nitrógeno, su deficiencia se manifiesta en un color verde oscuro; reducción de la velocidad de crecimiento; desarrollo radical limitado; retraso en la madurez y poco desarrollo de los frutos y de las semillas (Miller, 1969; Sivori, *et al.*, 1980; Rodríguez, 1991).

El Potasio.

Este macronutriente se encuentra en las plantas en forma de iones y a diferencia del nitrógeno y del fósforo, el potasio tiene una función importante en el mantenimiento de la turgencia celular, promueve la entrada del agua por ósmosis en las células; tiene que ver con la apertura y cierre de los estomas; es un activador enzimático, responsable del metabolismo energético, síntesis de almidón, reducción de nitratos y degradación de los azúcares; participa en el metabolismo del agua en la planta; transporte de hidratos de carbono; es esencial en la fotosíntesis (desarrollo de la clorofila); es importante en la formación de grano en cereales;

reducción de nitrato; en la formación y desarrollo de raíces y tubérculos; actúa en la división normal de las células; proporciona resistencia del tallo al acame (caída) y a muchas enfermedades, contrarresta el efecto del exceso de nitrógeno; retarda la madurez temprana debido a la abundancia de fósforo; balancea las cargas negativas debido ácidos orgánicos en la célula y de aniones como sulfato, cloruros y nitratos absorbidos por la raíz (Millller, 1969; Rodríguez, 1991; Solomon, *et al.* , 1996).

Su deficiencia causa achaparramiento de las plantas las cuales adquieren un color pardo, y en ocasiones se secan; se produce marchitez y caída temprana de las hojas; crecimiento lento; tallos débiles y frutos y semillas resecos (Miller, 1969; Sivori, *et al*, 1980; Rodríguez, 1991; Solomon, *et al.*, 1996).

El Calcio.

Tiene funciones fisiológicas y estructurales, participa en la permeabilidad de las membranas; activación enzimática; forma parte de la lámina media de las paredes estructurales; mantiene la estructura de los cromosomas; es necesario para la división celular; contribuye a la estabilidad de las membranas; neutraliza los ácidos orgánicos de la planta y se cree que el calcio en la planta se combina con los ácidos orgánicos que serían tóxicos en sus formas libres (Miller, 1969; Rodríguez, 1991; Solomon, *et al.*, 1996).

La deficiencia de calcio en las plantas produce, poco crecimiento del tejido meristemático; deformación en los puntos de crecimiento y hojas jóvenes; quemaduras en las puntas de las hojas de la lechuga; corazón negro en el apio; mancha de la cavidad de la zanahoria; pudrición apical de la flor del tomate y melón (Rodríguez, 1991).

El Magnesio.

El magnesio tiene funciones como macronutrimento, además, forma parte integral de la molécula de la clorofila; mantenimiento de la estructura de los rizomas; actúa como activador enzimático en el Ciclo de Krebs; es esencial para la producción de aceite en las plantas; favorece la asimilación del dióxido de carbono y la producción de azúcares y almidón; estimula la absorción del nitrógeno y del fósforo (Miller, 1969; Rodríguez, 1991; Solomon, *et al.*, 1996).

La deficiencia del magnesio en la planta retarda la fase reproductiva; evento observado en las leguminosas, algunas veces los márgenes de las hojas permanecen verdes (Rodríguez, 1991; Solomon, *et al.*, 1996).

El Azufre.

Es indispensable para la formación de la clorofila; forma parte de algunos aminoácidos y vitaminas; forma eslabones de bisulfuro entre cadenas de polipéptidos; es constituyente de vitaminas (biotina y tiamina) y de la coenzima A; es constituyente de compuestos volátiles generalmente los disulfuros o polisulfuros (cebolla, ajo, mostaza, crucíferas); es constituyente de algunos aminoácidos (metionina, cisteina y cistinas) (Miller, 1969; Rodríguez, 1991).

La deficiencia del azufre provoca coloración verde pálido en las hojas; tallos rígidos, leñosos y delgados; poco crecimiento de los retoños; hojas angostas en las crucíferas y reducción de la nodulación en las leguminosas (Miller, 1969; Rodríguez, 1991).

El Carbono.

Se obtiene del dióxido de carbono atmosférico y se incorpora durante la fotosíntesis. Tiene función estructural pues forma parte de los carbohidratos, los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos.

El Hidrógeno.

Lo obtiene la planta probablemente a través de agua que absorbe. Tiene una función estructural también, por que forma parte de los carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos.

El Oxígeno.

Es obtenido por medio de la molécula del agua y en estado gaseoso de la atmósfera. También tiene función estructural pues forma parte de los carbohidratos, los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos.

7.2.2 Micronutrimentos y su función.

Los micronutrimentos son aquellos que se requieren en cantidades mínimas para el desarrollo de la planta. Por muchos años, no se les concedió la debida importancia, luego, tras diversas investigaciones se llegó a la concluir que su deficiencia originaba ciertos trastornos fisiológicos en la planta y que su exceso causaba toxicidad.

En este grupo se incluyen el hierro, el manganeso, el zinc, el boro, el molibdeno, el cloro entre otros.

El hierro.

Es necesario para la formación de clorofila; también actúa como catalizador en el transporte de oxígeno en las células durante el proceso de oxidación-reducción; forma parte de las enzimas como catalasa, peroxidasa y citocromos. Forma parte integral de la ferrodoxina y quizás de la nitrito reductasa (enzima que interviene en la reducción de los nitratos a iones de amonio). Su deficiencia provoca clorosis en la planta (Miller, 1969; Sivori, *et al.*, 1980)

El Cobre.

Este elemento tiene funciones en las reacciones enzimáticas aplicadas a la fotosíntesis, forma parte de las enzimas, Oxidasa del ácido ascórbico, la tirosinasa y plastocianina entre otras.

Su deficiencia provoca que las hojas jóvenes se tornen verdes oscuro, deformes y pueden presentar puntos necróticos.

El Manganeso.

Es un activador enzimático de enzimas relacionadas con la formación de los ácidos grasos, los ácidos ribonucleicos; actúa en el ciclo de Krebs y la fotólisis del agua. Su deficiencia provoca clorosis en hojas, además de lesiones necróticas.

El Boro.

Es necesario en la síntesis de las proteínas y la división celular, probablemente, actúa en el traslado de hidratos de carbono; y favorecen la germinación del polen .

Su deficiencia provoca la muerte de los meristemos apicales del tallo y de las raíces (Miller, 1969).

El Molibdeno.

Este elemento es parte de las enzimas que intervienen en el metabolismo nitrogenado, es un transportador de electrones. Su deficiencia provoca clorosis (Silvori, *et al.*, 1980; Solomon, *et al.*,1996)

El Zinc.

Este elemento es parte integral de las enzimas implicadas en la respiración, como la anhidrasa carbónica, deshidrogenasa alcohólica, láctica, glutámica entre otros.

Su deficiencia causa desórdenes fisiológicos en el metabolismo general de las plantas.

El Cloro.

Actúa en el balance iónico; las reacciones luminosas. Su deficiencia causa marchites de las hojas, clorosis y necrosis (Solomon, *et al.*, 1996).

8. Fitohormonas.

Las plantas utilizan químicos llamados fitohormonas para regular su desarrollo y crecimiento. Estas fitohormonas pueden regular, favorecer o inhibir algunos procesos fisiológicos, dependiendo de su concentración. Las fitohormonas se pueden agrupar en cinco grupos diferentes a saber, auxinas, las giberelinas, las citocininas, el etileno y el ácido absícico.

8.1 Las auxinas.

Las auxinas estimulan el crecimiento de los tallos y de las raíces, poseen; la propiedad particular de estimular la extensión de las paredes celulares acompañadas de entrada de agua a las células y como consecuencia de ello inducen alargamiento celular (Sivori, 1980). Pueden ser naturales o sintéticas y participan en la multiplicación celular, en los fenómenos denominados de morfogénesis, de partenocarpia, caída natural de las hojas, de las flores y de los frutos (abscisión).

a- Estructura molecular y las actividades de las auxinas.

La estructura química de las auxinas están relacionadas directamente con los efectos fisiológicos de las plantas. Las auxinas presentan estructuralmente las siguientes características:

1- Una parte cíclica insaturada.

2- Una cadena lateral ácida.

3-Una cierta separación entre el grupo carboxilo (- COOH) y el anillo (con algunas excepciones).

4- Una disposición espacial particular entre el sistema típico y la cadena lateral ácida. La naturaleza del anillo (indol, fenil, antraceno, etc.) y la longitud de la cadena lateral, son todos ellos factores que influyen sobre la actividad auxínica.

1- Naturaleza de la parte cíclica de las auxinas.

El ácido indol acético, que es una de las auxinas de gran uso industrial, (AIA), presenta un anillo en el cual la actividad disminuye al aumentar el grado de oxigenación de los enlaces dobles de su estructura química, llegando al cese completo de la actividad cuando el anillo queda totalmente saturado (Devlin, 1980).

El ácido fenoxiacético es una auxina sintética que esta formada por un anillo fenólico central, al cual, se le unen un cloro en posición *orto* (segundo carbono) y otro en posición *para* (cuarto carbono) lo que le confiere a esta molécula una actividad auxínica máxima. Por ello, es una de las de mayor uso. El átomo de cloro sobre el anillo del fenilo de la molécula de ácido fenoxiacético, en las posiciones 2 y 6, llevó a la conclusión de que la posición del anillo fenilo junto al punto de unión de la cadena lateral está relacionada con la reacción de crecimiento (Devlin, 1980; Sivori, *et al.*, 1890.).

El anillo fenólico que poseen el ácido naftalenoacético (ANA) y el ácido indolbutírico (AIB), presentan una carga parcialmente positiva (+) y una carga negativa (-) a una distancia de 0.55 nm (nanómetros) entre ellas. Se cree que estas cargas están relacionadas con su actividad (Sivori, *et al.*, 1980).

La inhibición del crecimiento por exceso auxínico es producto de la formación de etileno estimulado por la auxina (Devlin, 1980; Sivori, *et al.*, 1990.).

2- La naturaleza de la cadena lateral ácida.

La posición y la longitud de la cadena lateral ácida desempeña un importante papel en la actividad auxínica. A medida que aumenta la longitud de la cadena lateral del ácido fenoxiacético, la actividad de los compuestos correspondientes va disminuyendo. La actividad disminuye mucho más cuando la cadena lateral posee un número impar de carbonos. Es decir, el ácido 2,4 diclorofenoxibutírico (4 carbonos) es más activo que el 2,4 diclorofenoxipropiónico (3 carbonos). Según parece, las cadenas laterales que poseen un número impar de carbonos resultan metabolizados en el tejido vivo hasta producir fenol inactivo, mientras que las cadenas de números par son actas para formar ácido fenoxiacético (Devlin, 1980).

b- Biosíntesis de las auxinas.

La producción de las auxinas es un proceso enzimático, a partir del triptófano y del indolacetonitrilo como precursores.

El ácido indolacético (AIA), puede formarse a partir de triptófano siguiendo dos caminos diferentes: El triptófano puede desaminarse por acción de una desaminasa y dar lugar a la formación de ácido indolpirúvico; mediante una descarboxilasa, este derivado indol se descarboxila y genera indolacetaldehído, el que luego, se oxida para producir AIA.

Por otro lado, el triptófano, puede, por descarboxilación formar triptamina, que por desaminación oxidativa produce indolacetaldehído (Devlin, 1980; Sivori, *et al.*, 1980).

c- Funciones y efectos de las auxinas

1- Alargamiento celular.

Las auxinas provocan un aumento de las paredes celulares longitudinales, seguido por un incremento de la plasticidad. Esto produce una disminución en el potencial hídrico de las células, provocando el ingreso del agua a las células y el consiguiente aumento del volumen célula (Sivori, *et al*, 1980).

2- Multiplicación celular.

Las auxinas estimulan la multiplicación celular en los tejidos parénquimaticos, induciendo así la cariocinesis, previa estimulación de la duplicación del ADN.

3- Rizogénesis.

La formación de raíces puede ser estimulada por la acción de las auxinas. Este fenómeno esta relacionado, en el caso de las estacas, con el número de yemas que estas posean y no tiene lugar en su ausencia. El efecto de las auxinas se lleva a cabo en dos etapas: La primera, estimulación del crecimiento de la raíz; la segunda, inhibición del efecto de las auxinas al aumentar su concentración, provocado por la formación de etileno.

4- Inducción e inhibición floral.

Las auxinas son capaces de inducir la floración cuando se les aplica al ápice vegetativo o sobre las hojas; esto permite regular la producción de frutos. En las plantas de días cortos, las auxinas pueden inhibir la floración al aplicar auxinas sobre hojas expuestas a días largos. Por otro lado, la aplicación de auxinas en plantas de días largos, expuestas a días cortos, induce la floración (Devlin, 1980).

8.2 Citocininas.

Las citocininas son reguladores de crecimiento naturales (fitohormonal) o sintéticos, que estimulan la citocinesis, que es una etapa de la división celular en la que el citoplasma se divide para formar dos células hijas. En cultivos de tejidos, las citocininas interactúan con las auxinas durante la organogénesis (formación de órganos). También retardan el envejecimiento de la planta (Sivori, *et al.*, 1980; Solomon, *et al.*, 1996).

a- Estructura molecular y actividad de las citocininas.

Las citocininas (o Citocininas) son derivados de adenina, sustituidos en el átomo de nitrógeno número seis. Su actividad biológica depende de la presencia de un anillo purínico

intacto, de alta especificidad (adenina) y la existencia de una cadena lateral no polar. Su actividad aumenta con el incremento del largo de dicha cadena hasta un máximo de cinco carbonos (Sivori, *et al.*, 1980).

b- Función y efectos de las Citocininas

Las citocininas tienen diferentes efectos ligados a la división celular (mitosis y citocinesis), en los procesos relacionados con las yemas.

1- Retardo del envejecimiento foliar.

La aplicación de las citocininas sobre las hojas adultas o separadas de la planta retarda el envejecimiento porque impide la clorosis de estos órganos. Por otro lado, cuando la planta está produciendo frutos, ocurre un envejecimiento foliar.

Esto se debe a que hay una acumulación de citocininas en la semilla de los frutos, originando un déficit en la nutrición por competencia con los niveles del follaje, acelerando la senescencia de la planta o de sus partes (Sivori, *et al.*, 1980; Devlin, 1980).

2- Agrandamiento celular.

Las citocininas estimulan el agrandamiento celular en los discos foliares de numerosas especies. El AIA de conjunto con la cinetina estimulan la síntesis de ADN en cultivo de médula del tabaco y son necesarias para la mitosis.

De las tres etapas de la división celular, el AIA interviene en las dos primeras (en la duplicación del ADN y en la mitosis) y la última (citocinesis) es exclusivamente regulada por la cinetina (Devlin, 1980; Sivori *et., al.,* 1980).

c- Modo de acción de las citocininas.

Actúan a través de la síntesis de los ácidos Nucleicos y de las proteínas. Tienen relación con ciertas ARNt, de las cuales forman parte o se les unen.

8.3 Giberelinas.

Las giberelinas son fitohormonas que participan en la división celular y elongación del tallo, inducen el fotoperiodismo y vernalización de algunas especies de días largos. Además producen la ruptura del estado de dominancia de las yemas y reemplaza en forma total o parcial la necesidad de luz para la germinación de ciertas semillas (Solomon, *et al.*, 1996).

a- Bioquímica de las giberelinas.

Los centros de mayor producción de las giberelinas son los órganos jóvenes de las plantas. Entre ellos están las semillas inmaduras, los frutos, las yemas, los nódulos, los tejidos de cicatrización y las raíces.

b- Estructura molecular y actividad de las giberelinas.

Las giberelinas son derivados de los diterpenoides, los cuales contienen un grupo carboxilo. Muchas de ellas poseen un anillo lactónico A. Las mismas se dividen en tres grupos según su sustitución en el carbono 7 y 8. El primer grupo incluye a las giberelinas que, además de poseer el anillo lactónico, tienen un grupo CH2 en el carbono 8; el segundo, a las que además muestran sustitución por un -OH en el carbono 7 y el tercero a las giberelinas que poseen grupos -CH3 y -OH en el carbono 8 y ausencia de sustitución en el carbono 7 (Sivori, *et al.*, 1980).

c- Función y Efectos de las giberelinas

1- Enanismo genético.

Las giberelinas promueven el alargamiento celular y hacen desaparecer el enanismo genético de ciertas plantas.

El alargamiento caulinar es inducido a través de la acción estimulante de las giberelinas sobre la multiplicación celular en el meristemo subapical. Contribuye también al alargamiento celular de las nuevas células (Devori, 1980; Sivori, *et al*, 1980).

2- Espigamiento y floración.

Las giberelinas controlan la floración de las plantas en roseta, constituyen una parte del complejo normal de la floración, afectan el crecimiento de los tallos florales, no actúan en la diferenciación de los primordios florales. Es decir, la inflorescencia es el resultado indirecto del tratamiento con giberelinas y no pueden considerarse como fitohormonas para la floración (Devlin, 1980, Silvori, *et al.*, 1980) .

3- Partenocarpia.

Las giberelinas son muy buenas para producir frutos partenocárpicos, como ha sido comprobado en los manzanos. Además, existe una correlación entre el contenido de giberelinas endógenas y la relación de crecimiento del fruto.

4- Crecimiento de los estolones y tuberización.

El crecimiento de los estolones en las plantas tuberosas (papa), es controlado por la acción de las giberelinas endógenas. En condiciones de plantas de días largos, el contenido es alto durante casi todo el ciclo y la tuberización se retarda o no se produce crecimiento radical. Las giberelinas inhiben o frenan el enraizamiento, neutralizando, en algunos casos, la activación rizógenea del AIA.

8.4 Retardadores del crecimiento.

Son sustancias que inhiben o retardan el crecimiento vegetativo de las plantas. Estos pueden ser de naturaleza y composición química diferente a las sustancias que normalmente constituyen a la regulación y periodicidad del crecimiento, contrarrestando total o parcialmente, la acción de las auxinas, giberelinas, y citocinas (Sivori, *et al.*, 1980).

a- Propiedades de los retardadores del crecimiento:

1- Aumento gradual de los niveles de depresión o inhibición total del crecimiento.
2- Inhibición del crecimiento en diferentes tejidos y órganos aislados.
3- Carencia de una acción anti-fitohormónica específica e inducción de los fenómenos de antagonismo.
4- Capacidad de acumularse en las yemas y semillas durante la dormancia y senescencia.
5- Incapacidad para inducir fenómenos de morfogénesis por sí mismo con relación a la acción de las auxinas y citocininas.

b- Retardadores de crecimiento de uso frecuente:

1- Ácido abscísico (ABA).

Se sintetiza en el follaje de las plantas, tiene un papel preparatorio de ciertos fenómenos de dormancia que posteriormente ocurren en las yemas de los ejes caulinares y los órganos de reservas.

Inhibe la germinación de las semillas de numerosas rosáceas y gramíneas. En general, existe una estrecha relación entre el contenido de ABA endógeno y la inhibición de la germinación.

El ABA es un inhibidor de la floración que está relacionado por su presencia en las hojas de las plantas de días largos, crecidas bajo condiciones inhibidoras de días cortos, para la floración. Sin embargo, promueve la floración de algunas plantas de días cortos, bajo condiciones no inducidas de días largos. El ABA acelera la senescencia de los discos foliares y hojas separadas de la planta. También regula el mecanismo estomático e inhibe la formación de nódulos en las raicillas de la arveja.

2- La xantoxinina.

Este inhibidor natural se encuentra en las plantas de poroto y de trigo. Inhibiendo el crecimiento del hipocótilo de la lechuga y la germinación de la semilla de berro.

3- Morfactinas.

Son reguladores sintéticos, no tóxicos, que inhiben el crecimiento, modifican su expresión morfológica a través de la inducción de efectos formativos; alteran el crecimiento

caulinar, la dominancia apical, la germinación y la expresión del geotropismo y fototropismo. Las morfactinas son derivadas del ácido fluoreno 9 carboxílico. Por la acción que ejercen sobre el crecimiento caulinar, las morfactinas pueden inhibir la formación anticipada de tallos floríferos

c- Función y Efectos de los retardadores del crecimiento.

1- Crecimiento caulinar.

Los retardantes de crecimiento frenan el alargamiento caulinar en numerosas especies sin afectar el crecimiento foliar y floral. Esto se debe a la inhibición de la división celular en el meristema subapical de los ejes caulinares y de los estolones.

2- Cuajado y crecimiento de los frutos.

El Cicocel (CCC) se utiliza para aumentar el éxito de la fructificación como ocurre con la vid cuando se lo aplica en dosis relativamente bajas.

3- Diferenciación de yemas florales.

El CCC y el B9 promueven la diferenciación de yemas florales, aumentan los niveles de fructificación en los manzanos, los cerezos y los limoneros.

4- Estimulación de la tuberización.

El CCC estimula la tuberización de fragmentos de brotes de tubérculos de papa cultivados *in vitro*. También acelera la formación de tubérculos.

5- Inducción de la resistencia a los factores ambientales adversos.

La aplicación de CCC en plantas como el tomate, los porotos y el repollo, aumentan la resistencia a los efectos de las heladas y a las condiciones de salinidad. Esta resistencia de las plantas a la acción de la helada se relaciona con un aumento de vitamina C (Sivori, *et al.*, 1980).

9. Control de floración.

9.1 Conceptos generales.

La floración es una fase reproductiva que puede estar controlada por factores ambientales, dándose inicio a la formación de meristemas florales, el desarrollo morfológico de la flor y la anthesis. Sin embargo, no todas las plantas son sensibles a los efectos ambientales para florecer. Los efectos del ambiente sirven para sincronizar el tiempo de floración (Montes, 1988).

El objetivo principal de controlar la floración de una planta es lograr la adaptación de las especies a cambios estacionales del clima, obtener el máximo de producción en el caso de las especies frutales o emplear el máximo de energía en el crecimiento vegetativo, si son árboles maderables.

La precocidad se refiere al tiempo fenológico de la planta, trascurrido hasta que aparece la primera flor, es el momento de la diferenciación de la yema y de la aparición de la flor primaria en el nudo más bajo. Por otro lado, el retardo es el retraso en la floración de una planta.

9.1.1 Factores ambientales que inducen la floración.

Entre los factores ambientales que inducen la floración tenemos la temperatura; algunas plantas, durante estudios experimentales, son sometidas a temperaturas controladas, induciendo así, el retardo de la precocidad floral. En 1957, ensayos en donde fueron expuestas plántulas de tomate a varios periodos fríos (10-16 °C), mostraron precocidad en la expansión de la primera flor, por el contrario, se logró un efecto inverso al someterlas a altas

temperaturas (27 °C). La luz es otro factor que altera la floración, como fue demostrado por Garner y Allard en 1920 con el descubrimiento del fotoperíodo en las plantas. Sin embargo, la intensidad de la luz es el principal factor responsable del retardo o la aparición de la flor (Montes, 1988).

Capítulo II.

FUNDAMENTOS TEÓRICOS PARA LA REALIZACIÓN DE PRÁCTICA PROFESIONAL ORIENTADA AL CULTIVO DE TEJIDOS *IN VITRO* EN LA EMPRESA BIO-TECH DE PANAMÁ, COMO REQUISITO PARA OPTAR POR EL GRADO DE LICENCIATURA EN BIOLOGÍA.

1. MICROPROPAGACIÓN.

La micropropagación consiste en producir plantas a partir de porciones muy pequeñas de ellas, de tejidos o de células cultivadas asépticamente en tubos de ensayos u otros recipientes en que se pueden controlar estrictamente las condiciones de ambiente y nutrición (Hartmann & Kester, 1989).

La micropropagación es una técnica de propagación masiva de plántulas *in vitro* que se ha venido modernizando desde 1860, y en la actualidad se basa en los principios de totipotencialidad celular propuesta por Haberlandt en 1902 y la hipótesis del balance hormonal sugerida por Skoog et al., en 1957. Esta técnica permite estudiar eventos de diferenciación celular, obtención de las plantas libres de virus y otros patógenos, conservación de germoplasma y mejoramiento genético (Roca & Mroginski, 1991).

1.1 Ventajas.

La micropropagación permite una metodología ventajosa en comparación con los sistemas convencionales de propagación; las ventajas obtenidas pueden ser:

* Aumento en la cantidad de plantas derivadas de genotipos deseables.
* Disminución del tiempo de multiplicación.
* Capacidad de producir plantas en forma masiva, en espacio pequeño y tiempo económicamente costeable.

* Obtención de planta libres de patógenos.
* Posibilidad de evitar la extinción de plantas de difícil propagación.

2. Historia del cultivo de tejidos.

Los primeros trabajos realizados en cultivos de tejidos vegetales fueron iniciados por Sacks en 1860 y Knops en 1861; sin embargo, los trabajos de mayor importancia en esta técnica fueron realizados por Haberlandt en 1898, quien cultivó células de *Erithonium ornithogalum* y *Tradescantia* sp. pero, pese a que logró mantenerlas vivas por largo tiempo no logró la división celular de los tejidos.

La primera planta de maíz híbrido comercial se obtiene en 1921. Posteriormente, Robbins y W. Kotto en 1922, lograron que ápices de raíces crecieran al cultivarlas en medios nutritivos. En 1934, J.P. White al cultivar raíces de tomate continuamente *in vitro* proporcionándoles extractos de levadura descubre la importancia de la vitamina B y de las auxinas en el cultivo de dichos tejidos. Por otro lado en 1939, P. White, R.J. Gautheret y P. Nobécourt cultivaron *in vitro* callos de tabaco y zanahoria de manera indefinida en un medio sintético.

La contribución de los cultivos de tejidos a la obtención de las plantas sanas mediante el estudio de enfermedades vegetales, constituye una segunda etapa en el desarrollo de esta técnica. Van Oberbek, Cocklin y Blakslee, en 1941 y Caplin con Stwart en 1948 observaron el crecimiento de células tumorales al usar el agua de coco (Hurtado & Merino, 1997).

Continuando con el afán por obtener plantas sanas, en 1952 Morel y Martín (Citados por Hurtado & Merino, 1997); lograron obtener plantas libres de virus.

En 1957 F. Skoog y C.O. Miller (Citados por Roca & Mroginski, 1987); hacen de conocimiento público el descubrimiento de las auxinas y citocininas, y en el control hormonal de la regeneración de tallos y raíces logradas en callos de tabaco; en 1948 en la Universidad de Wisconsin, con lo que se establecen las bases para manipular la iniciación de órganos y proporcionó el principio en que se basa toda la micropropagación.

En 1958 el investigador Muir utilizó la técnica Nodriza y crecimiento en microcámaras logrando aislar y describir características de los clones celulares aislados.

Uno de los mayores avances en la micropropagación de las plantas fue el logrado por Murashige y Skoog en 1962, quienes elaboraron un medio nutritivo que en la actualidad se utiliza aunque, con ciertas modificaciones y que en aquella época fue utilizado para obtener un crecimiento rápido de tejido de tabaco (Hurtado & Merino, 1997).

Otros eventos importantes comprendieron el descubrimiento de la formación de plantas haploide a partir de granos de polen en desarrollo por Bourgin, J. P. y J. P. Nitsch 1967; Guha, S. y C. Maheshwari 1964; Nitsch J. P. y C. Nitsch 1969 (Citados por Hartman & Kester 1989).

Kameya y Ninat en 1970 (Citados por Hurtado & Merino, 1997) cultivaron polen de angiosperma. Las especies utilizadas pertenecían al género *Brassica sp.* y el medio líquido utilizado contenía del 10 al 15% de sacarosa y 10% de agua de coco; con este método se logró obtener la formación de pequeñas colonias celulares, pero no se obtuvieron plántulas. En ese mismo año, 1970, se aísla la primera enzima de restricción que corta el ADN en puntos específicos (Roca & Mroginski, 1987; Hurtado & Merino, 1997).

El aislamiento de protoplastos vegetales se inició con trabajos de Cocking E. C. 1960 y Eriksson , T. & K. Jonasson 1969 (citados por Hartman & Kester 1989).

En 1971 Takebe, Labeid y Melcher lograron aislar protoplastos del mesófilo de hojas de tabaco y demostraron que a partir de los protoplastos es posible inducir la formación de callosidades y posteriormente regenerar plántulas (Hurtado & Merino, 1997).

En 1975 se establece la primera empresa de Biotecnología dedicada a la agricultura (Roca, Mroginski, 1987).

En 1977 Narayanaswami (citado por Hurtado & Merino, 1997) analizó dos investigaciones del cultivo de tejidos y llegó a concluir que:

A- La superficie del cultivo del inóculo es importante en la determinación del potencial de regeneración.

B- La edad fisiológica del inóculo es un factor importante y ejerce influencia en la formación de órganos.

En el año 1978 se logró obtener híbridos interespecíficos; por ejemplo: El caso del Melchers, Sacristan y Holder obtuvieron híbridos somáticos de plantas por medio de la fusión de protoplastos de tomate.

En cuanto al control de patógenos durante la micropropagación sobresalen los trabajos publicados sobre el control de organismos patógenos externos de Knauss J. F. en 1976 y también en los patógenos internos de Knauss J. F. & J. W. Miller, en 1978 (Citados por Hartmann & Kester 1989).

Entre los años de 1979 a 1983, se da inicio a los estudios en morfogénesis, embriogénesis, citogénesis y al uso de técnicas para la selección y mejoramiento de plantas. En el año de 1979, Knou y Knauss (citado por Hurtado & Merino, 1997), realizaron observaciones sobre el principal problema en el cultivo de tejidos vegetales, la contaminación bacteriana en la etapa de multiplicación y /o enraizamiento. Ellos aseguraron que el problema radica en la desinfección previa de las plantas y medios de cultivo, quedando cultivados en un ambiente frío y seco y libre de contaminación (Hurtado & Merino, 1997).

En el año de 1982 se logró la aplicación del cultivo de tejidos vegetales a la propagación de especies de interés forestal. Este logro fue obtenido por Lakshmi, Vaidyanathan (Hurtado & Merino, 1997).

En 1987 se construyen las primeras moléculas de ADN recombinante y se establece la primera empresa dedicada a la Ingeniería Genética.

En 1992, E. Ortega, obtiene exitosamente híbridos interespecíficos de frijol entre las especies *Phaseolus vulgaris L.* y *Phaseolus acutifolius* A. Gray mediante el rescate y cultivo *in vitro* de embriones, con el fin de obtener resistencia a la sequía y a la virosis, causada por el virus del mosaico dorado, a la bacteriosis, causada por *Xanthomonas campestris* pv. Phaseoli, a *Empoasca kramery* (insecto chupador y transmisor de enfermedades) y finalmente, altos rendimientos en las cosechas.

Desde los inicios de la utilización de las técnicas de cultivos de tejidos vegetales se han logrado grandes avances como son, la obtención de plantas libres de patógeno y enfermedades, cultivo de diversos órganos y tejidos, tales como meristemas, callos, óvulos, ovarios, anteras y protoplastos para luego aplicar esta técnica en la propagación masiva de especies difíciles de reproducir en condiciones naturales o en forma masiva (Hurtado & Merino, 1997).

3. Bases botánicas para el cultivo de tejidos.

Principios en Botánica sistemática.

A. Los sistemas de clasificación

Las plantas para su mejor estudio y conocimiento se pueden clasificar utilizando sistemas artificiales, naturales o filogenéticos.

Sistemas artificiales

Los antiguos sistemas predarwinianos de clasificación eran, en buena parte , artificiales; es decir, se fundaban en unos cuantos caracteres morfológicos. Se considera una clasificación artificial cuando las plantas se clasifican arbitrariamente, basándose en el color de la flor, época de floración, hábitat, forma o disposición de las hojas y consistencia herbácea o leñosa.

Ejemplo de este sistema de clasificación:

Teofrasto clasificó las plantas basándose en el hábito de crecimiento, agrupó las especies en árboles, arbustos y enredaderas. Además, estudió la germinación de las semillas, el crecimiento de las plántulas; demostró que la raíz es la primera estructura que aparece en todas las semillas al germinar; clasificó las hojas y estudió su disposición en el tallo (Fuller & Ritchie, 1979).

Por otra parte, Linneo agrupó las plantas en 24 clases basándose en el número de estambres florales (Jones, 1987).

Sistema natural

Este sistema intenta clasificar a los organismos basándose en sus relaciones evolutivas y constituye la meta de la taxonomía; se caracteriza por su alto valor predictivo y por la utilización de varias características tratando de reflejar lo que existe en la naturaleza. A medida que se conoce más acerca de las relaciones entre las plantas, los sistemas artificiales son reemplazados por los sistemas naturales.

Algunos ejemplos de estos sistemas son:

A inicios del siglo XVIII, Pierre Magnol y John Ray (Jones, 1987), clasificaron las plantas según los cotiledones y los dicotiledones.

Por otro lado, Jussie clasificó las plantas en acotiledóneas que incluían algas, hongos y helechos; monocotiledóneas y dicotiledóneas.

Edlicher (Woodlant, 1997), agrupó las plantas en talofitas y cormofitas; que incluye a los líquenes, algas y hongos, como talofitas y dentro de las cormofitas a los musgos, helechos y plantas con semillas.

Sistema filogenético

Tiene su inicio con la publicación de Darwin *El origen de las especies*, en 1859. La teoría de la evolución sustituyó gradualmente el concepto de creación de las especies. Se descubrió que las especies no son fijas e inmutables, sino que se han producido por evolución de especies preexistentes en épocas geológicas. Hoy se considera como que en general, las semejanzas en la estructura son priçuebas de parentesco evolutivo. Así han surgido los modernos sistemas filogenéticos de clasificación, basándose en el parentesco por descendencia (Wilson & Loomis, 1968).

El sistema filogenético supone que la tendencia primaria de la evolución en los vegetales ha sido de organismos de estructura relativamente sencilla a los de mayor complejidad. Sin embargo, se ha advertido que, aunque la tendencia general de la evolución es progresiva, en muchos grupos y para muchos caracteres puede retroceder hacia la *reducción* o mayor sencillez. La divergencia resultante de la evolución permite agrupar los organismos en especies, géneros, familias, órdenes, clases y divisiones, ordenándolos según la manifestación de caracteres primitivos o avanzados. Esta situación aumenta la dificultad de los estudios filogenéticos, porque plantea el problema de si una estructura o condición dada es simple porque es relativamente primitiva o si es simple por reducción (Wilson & Loomis, 1968).

Otra dificultad en la interpretación de las relaciones evolutivas es la *evolución convergente*. Este término se aplica al desarrollo de estructuras similares en organismos no emparentados o emparentados lejanamente. Tales formas, aunque no descienden de la misma cepa presentan semejanzas que se confunden con pruebas de parentesco.

Por tanto, se sugiere que este sistema persigue los siguientes objetivos:

1. Determinar el origen de las plantas
2. Su modo de evolución.
3. Establecer las relaciones existentes entre las plantas actuales y las que han existido en años pasados.
4. Establecer las características que se consideran primitivas y las cuales son derivadas de las mismas.

Un ejemplo de la aplicación de este sistema, fue el planteado por el alemán Eichler (Jones, 1987) quién dividió las plantas en criptógamas y fanerógamas. Dentro de las criptógamas se encuentran las *Talophytas*, *Briophytas* (musgos), *Pteridophytas* (helechos) y dentro de las fanerógamas agrupó a las gimnospermas y angiospermas.

Otro ejemplo de este tipo de sistema es el realizado por Adolfo Engler (Woodlan, 1997), clasificó las plantas en: *Embriophytas* que a su vez se dividen en asiphonogamas que incluye a los helechos; y las siphonogamas que son aquellas en las que el gameto masculino se desplaza por el tubo polínico.

B. Reglas de Nomenclaturas

La nomenclatura sistemática asigna un nombre científico a cada planta, basándose en reglas establecidas y que aparecen en el código internacional de nomenclatura de Botánica. Este sistema de nomenclatura utiliza el latín, ya que esa era la lengua culta y hablada por los científicos de Europa cuando surgieron los primeros sistemas de clasificación. Además es una lengua muerta, por lo qe no sufre variaciones (Woodlant, 1997).

C. Introducción al cultivo de tejidos

Antes de iniciar un estudio de cultivo de tejidos se hace necesario estudiar la planta seleccionada, observar sus características tanto morfológicas como fisiológicas, con esto, se obtiene información del posible comportamiento del tejido de la planta *in vitro*. Por ejemplo: Bio-Tech de Panamá es una institución que trabaja con diferentes plantas de la familia Orquideáceae y originalmente se trabajaba con Musáceaes, en cualquiera de los casos dicha empresa debió realizar un estudio botánico de las plantas, previo a la introducción y multiplicación por cultivo de tejidos.

La empresa BIO-TECH de Panamá utiliza como fuente principal para micropropagación, las semillas de las orquídeas, sin embargo, se pueden utilizar explantes de hojas, de anteras, embriones y en caso de tratarse de otras plantas como las rosas o claveles, es posible utilizar los brotes terminales, básales, laterales, etc. De

muchas orquídeas no se utilizan los meristemas como explantes de cultivo, ya que esto implica cortar los órganos y en caso de ser una especie valiosa se arriesga la vida de la planta madre, resultando menos riesgoso para las especies, que se trabaje con sus semillas.

4. Medios para el cultivo de tejidos.

Un medio de cultivo es una mezcla balanceada de compuestos inorgánicos y orgánicos; de la cual se nutre y desarrolla el explante sembrado. Estos pueden variar dependiendo de los requerimientos nutricionales de los explantes, así como de las características que se deseen obtener de cada una de ellas, ya sea formación de raíces, multiplicación de los explantes o el crecimiento de estos hasta formar plantas completas. Estos poseen elementos minerales que se requieren en dos niveles, y se denominan macro nutrimentos y micro nutrimentos según la cantidad requerida. La mayor parte de los tejidos vegetales pueden crecer en un medio que contengan cualquiera de varias mezclas exitosas de sales minerales diseñadas para mantener el crecimiento de tejidos y órganos.

Algunos tejidos pueden crecer en medios simples, sin embargo, muchos otros no presentan crecimiento en soluciones salinas relativamente simples, de modo que necesitan de aditivos como vitaminas, extractos de levadura, malta y agua de coco, en los cuales hay sustancias promotoras de crecimiento indefinido del cultivo de plantas (Rocas & Mroginski, 1991).

4.1 Generalidades.

El desarrollo adecuado de los explantes empleados en el cultivo de tejidos está determinando en gran medida por las características del medio del cultivo empleado. Es

de suma importancia tomar en cuenta los nutrimentos, pureza y calidad fisica de los ingredientes del medio.

Los explantes utilizados en el cultivos de tejidos requieren sales, hormonas, vitaminas, azúcares y aminoácidos en diferentes cantidades. Las plantas que necesitan de nitrógeno lo pueden obtener en los medios de cultivo en forma de nitrato de amonio (NH4 NO3). Las dos fitohormonas más importantes son las auxinas y las citokininas que controlan el desarrollo de las raíces del tallo y el callo; en ocasiones se usan giberelinas para inducir el alargamiento de los tallos. Las auxinas sintéticas más activas son el 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético), IBA (ácido indolbutírico) ANA (ácido naftalenacético); las citokininas más efectivas son la zeatina, el 2ip (N6 isopenthil-adenina), BAP (bencilaminopurina) y la kinetina (6-furfurilaminopurina). Así, si se desea inducir la formación de raíces en un explante, se le adiciona al medio de cultivo 2,4-D, AIA (ácido indoleacético) o ANA, sin embargo, si se quiere inducir la formación de brotes se le adiciona al medio zeatina, 2ip, BAP o kinetina.

En cuanto a la pureza de los medios de cultivo, es necesario que todas las sustancias químicas empleadas en la elaboración de los mismos sean de alta pureza.

El agua utilizada en la preparación de medios debe ser bidestilada y en casos en donde se realizan trabajos de investigaciones, es necesario usar a veces agua tridestilada. El agar utilizado debe tener un porcentaje de pureza mayor del 95% generalmente, no debe ser menor a la especificación de la Difco Bacto agar (Hurtado & Merino, 1997).

La calidad de la gelificación del medio de cultivo depende del agente gelificante del pH y las altas temperaturas. Se puede emplear agar como agente gelificante, sin embargo, la poliacrilamida y el silicagel dan mejor gelificación a los medios de cultivo.

Si se quiere obtener un medio que no sea ni muy endurecido, ni poco gelificado se debe regular el pH en un ámbito entre cinco y seis.

La cantidad de medio nutritivo en un recipiente debe estar determinada por la cantidad de plantas que se desea sembrar en el medio, de las posibilidades de supervivencia y la relación que existe entre el tamaño del explante y la cantidad de nutrientes.

A los frascos de cuatro onzas a menudo se les adiciona de 20 a 25 ml de medio, para sembrar 10 plantas; si los explantes son pequeños se ven afectados por cantidades excesivas de medio, de igual manera si las mismas son grandes se restringe su desarrollo por un inadecuado suministro de medio.

El calentamiento excesivo de los medios al esterilizarlos en el autoclave disminuye su calidad, porque se pueden inactivar los reguladores de crecimiento, degradar los azúcares y aminoácidos lo que da lugar a la caramelización de los azúcares y evaporación de compuestos como reguladores de crecimiento y vitaminas.

Múltiples medios tienen diferentes aplicaciones; así, el medio Murashige y Skoog puede ser empleado para la inducción de callos en diversas especies al adicionarle 0.1 mg/L de cinetina y 0.3 mg/L de 2,4 D; también se puede inducir el enraizamiento de los explantes al adicionarle 1 mg/L de cinetina y 0.3 mg/L a AIA y si se desea inducir la multiplicación se utiliza una concentración alta de citocinica y baja de auxina. Estas relaciones citocinina/auxina varían según las especies en estudio y suelen variar dramáticamente de una a otra.

4.2. Componentes.

Los medios de cultivo están constituidos por sales inorgánicas, compuestos orgánicos, complejos naturales y materiales inertes de soporte.

Las sales inorgánicas proporcionan los macronutrimentos (N, P, K, Ca, Mg y S) y los micronutrimentos (Fe, Zn, B, Mn, Cu, Mo y Co). La mezcla de estas sales en diferentes concentraciones determinan las características de los medios de cultivos, ejemplo: El medio Murashige y Skoog esta compuesto por sales de nitrato de amonio, ácido bórico, cloruro de calcio, cloruro de cobalto, sulfato cúprico, sulfato ferroso, sulfato de magnesio, sulfato de manganeso, cloruro de potasio y fosfato de potasio.

Este medio de cultivo contiene grandes cantidades de macronutrimentos y nitrógeno en forma de NH4 NO3 y KNO3 (Hurtado & Merino, 1997).

Los compuestos orgánicos en los medios de cultivos se encuentran representados por los carbohidratos, reguladores de crecimiento y las vitaminas.

Algunos de los carbohidratos más usados en los medios de cultivos son la sacarosa y el mioinositol. La sacarosa se utiliza en cultivos de monocotiledóneas; sin embargo, también se utilizan la fructosa y el almidón en otras especies. Todos son fuente de carbono para la planta e influyen sobre la organogénesis disminución de la concentración de azúcares en el medio, tienden a favorecer el restablecimiento de las capacidades organogénicas de los cultivos (IICA, 1987; Hurtado & Merino,1997).

Entre los reguladores del crecimiento en los medios de cultivo se utilizan las auxinas y citocininas. Las auxinas más usadas son el ácido 3-indolacético (AIA), ácido 4-amino, 3, 5, 6- tricloropicolínico. El AIA es conocido como auxina natural y AIB, ANA y 2,4D se les llama auxinas sintéticas (Roca & Mroginski, 1991).

En la preparación de medios de cultivos, las citocininas más usadas son: El N6 benzilamino purina (BAP), N6 dimetilalilaminopurina, N6 furfurilaminopurina (cinetina o kinetina) y N6 (4-hidroxi, 3-metil, 2 butenil) adenina (zeatina) (Hurtado & Merino, 1997).

Las plantas son autótrofas; sin embargo, en las primeras etapas de su vida cuando no pueden realizar fotosíntesis necesitan vitaminas entre las cuales, la tiamina es considerada como esencial en los cultivos de las células. La piridoxina, el ácido nicotínico, el ácido ascórbico, el ácido glutámico, el ácido pantoténico, biotina, riboflavina y la colina son requeridos por ciertos tejidos vegetales por lo que de ordinario se añaden a los medios de cultivo (Roca & Mroginski, 1991).

Otros componentes de los medios de cultivos lo constituyen los aminoácidos y las amidas; los aminoácidos más utilizados en el cultivo de antera son la L-glutamina y la L-serina, siendo este último utilizado en cultivo de anteras (IICA, 1987; Hartmann & Kester 1989).

Otras sustancias utilizadas son el agua de coco (por su alto contenido de malta), el jugo de tomate y extracto de levadura (Hurtado & Merino, 1997)

5. Reguladores del crecimiento y aditivos orgánicos utilizados en medios de cultivo.

Los reguladores del crecimiento vegetal (RCV) son conocidos también como fitohormonas, su utilidad se aplica a muchos campos de la biología y la agronomía como el desarrollo de frutos, desfoliación, propagación vegetativa y controles de tamaño de las plantas. Una hormona vegetal es un compuesto orgánico que se sintetiza en alguna

parte de una planta y que se transloca a otra parte, en donde concentraciones muy bajas causan una respuesta fisiológica, que puede ser promotora o inhibidora (Salisbury & Ross, 1994).

Los reguladores del crecimiento se definen como compuestos orgánicos no sintetizados por las plantas, que en bajas cantidades estimulan, inhiben o modifican en algún modo cualquier proceso fisiológico en las plantas (Salisbury & Ross, 1994; Hurtado & Merino,1997).

Según Hurtado & Merino (1997), los tres grupos básicos de reguladores de crecimiento son:

a. Promotores del crecimiento: Auxinas, citocininas y giberelinas.
b. Inhibidores del crecimiento: Ácido abscísico.
c. Etileno.

5.1. AUXINAS Y SU FUNCIÓN.

Las auxinas son un grupo de compuestos caracterizados por su capacidad de inducir el crecimiento. El término de auxinas deriva del griego "Auxein" que significa incrementar, fue utilizado por Wenten 1926, quien descubrió que en el ápice del caleóptilo de avena se producía esta sustancia; sin embargo, en la actualidad se sabe que las mismas están distribuidas en otras plantas e inclusive se pueden obtener en forma artificial y producen resultados iguales.

Las concentraciones más elevadas de las auxinas se encuentran de modo natural en los ápices en crecimiento; sin embargo, también se encuentran distribuidos por toda la planta, provenientes de los meristemas apicales que son los principales puntos de síntesis.

La circulación de las auxinas en la plantas es lenta, polar, basipetalo y tiene lugar en dos modos distintos: Uno, que depende de la energía metabólica y otro, que se realiza a favor de la difusión simple siendo este último el que se lleva a cabo en forma anaeróbica Dewin, 1980, citado por Hurtado & Merino (1997). El IAA se transloca principalmente a través de las células parenquimatosas que contactan los haces vasculares. Las auxinas se biosintetizan a partir del triptófano en tres vías de síntesis:

1. Vía del ácido indol-pirúvico: Es la principal vía de síntesis.

2. Vía triptamina.

3. Vía del indol-acetaldoxina.

Los efectos de las auxinas en los procesos fisiológicos son muchos; éstas actúan sobre el alargamiento y la división celular, la formación de brotes, raíces y tejidos callosos, la respiración, abscisión, partenocarpia, dominancia apical y embriogénesis, entre otros (Bidwell, 1979, citado por Hurtado & Merino, 1997).

En los tallos y hojas estimulan el crecimiento, sin embargo, en las raíces su efecto es inhibidor a excepción de concentraciones muy bajas. Por lo que se establece como característica que las auxinas a concentraciones bajas estimulan el metabolismo y desarrollo y las concentraciones altas lo deprimen (IICA, 1987).

5.1.1. Efectos sobre los cultivos *in vitro.*

A. Inducción de callo: Las auxinas, en concentraciones de moderadas a elevadas, es la hormona primaria que se usa para producir callo. Las auxinas como el 2,4D empleadas en la formación de callos, se utiliza en concentraciones diferentes Así,

en las monocotiledóneas en concentraciones que van de 2-10 mg/L y en las dicotiledóneas en concentraciones de 1-3 mg/L.

B. Síntesis de clorofila: Las auxinas tienden a inhibir la síntesis de clorofila.

C. Morfogénesis: La formación de tallos y raíces dependen de la interacción auxina/citoquinina.

La formación de embriones está determinada por la adición de altos niveles de auxinas, sin embargo, una vez formados, sólo se desarrollan en bajos niveles de auxinas si se cultivan órganos como meristemas y ápices, las auxinas son indispensables para promover el crecimiento inicial. Si se desea multiplicar tallos, se utilizan bajas concentraciones de auxinas con altos niveles de citoquininas.

5.2. CITOCININAS Y SU FUNCIÓN.

Las citocininas son aquellas sustancias químicas en su mayoría derivadas de la adenina que pueden estimular la división celular o citocinesis, (Hurtados & Merino, 1997).

La biosíntesis de las citocininas tienen lugar en los tejidos meristemáticos de las raíces, de los frutos y órganos jóvenes.

Las citocininas están presentes en diferentes formas, como bases libres, ribonucleósis, ribonucleóticos o como constituyentes de ciertos ARN de transferencias.

Existen dos mecanismos de biosíntesis, uno es la isopentenilación de la adenina monofosfato (AMP) y por degradación de moléculas de ARN de transferencia.

Las citoquininas utilizadas en cultivos de tejidos son la kinetina (6-furfurilaminopurina) y BAP (6 Benciladenina) (Hurtado & Merino, 1997).

Los explantes cultivados *in vitro* necesitan de las citoquininas, ya que no sintetizan suficiente por sí solas, a excepción de las raíces que pueden crecer sin un aporte exógeno de citocinina. Una fuente de citocinina muy utilizada en cultivos de tejidos es el agua de coco.

5.2.1 Efecto sobre los tejidos cultivados *in vitro*.

A. Estimulan la división celular, y activan este proceso directamente.

B. Involucrar en la síntesis de proteína, reducen la actividad de las proteinazas.

C. Retardan la senescencia.

D. El desarrollo de callos requiere de la presencia de citocininas, estas favorecen la formación de callos, y se inhibe la formación, desarrollo y crecimiento de las raíces (IICA, 1987).

En el cultivo de tejidos se utilizan mezclas de hormonas para un mejor rendimiento del explante, ejemplo; altas concentraciones de auxinas con bajas concentraciones de citoquininas inducen la formación de raíces en estacas, sin embargo, bajas concentraciones de auxinas, con altas concentraciones de citoquininas inducen la proliferación de brotes axilares.

5.3. GIBERELINAS Y SU FUNCIÓN.

Las giberelinas son un grupo de reguladores del crecimiento formadas por diterpenos, los cuales están compuestos por cuatro unidades de isopreno, formando tres anillos. Las giberelinas estimulan la iniciación radicular, estimulan el crecimiento de plantas de tipo enano, estimulan la germinación de semillas e inducen la partenocarpia en frutos (Hurtado & Merino, 1997).

En el cultivos *in vitro* sus efectos son múltiples:

A. Inhibe la formación de tallos y raíces.

B. Inhibe la formación de embriones somáticos.

C. Estimula el crecimiento y desarrollo en órganos preformados como son los meristemas.

D. En cultivos de ápices estimula el crecimiento y es indispensable para permitir la elongación de los tallos formados.

5.4 COMPUESTOS ADITIVOS ÓRGANICOS Y SUS POSIBLES EFECTOS.

Otros compuestos utilizados son el inositol o mionositol que pasa a formar parte de organelos como los cloroplastos y es utilizado en la multiplicación de embriones (Arditti & Ernest,1992 citados por Roca & Mroginski, 1991).

La adenina o el sulfato de adenina estimulan la formación de tallos *in vitro*. Las bases nitrogenadas promueven el crecimiento en cultivos de callos.

Por otra parte, el jugo de naranja aumenta el crecimiento de algunos callos, se cree que esto se debe a la presencia del ácido cítrico. Este ácido junto con el ascórbico se emplean en los medios de cultivo para evitar la oxidación de ciertos inóculos.

6. Tipos de explantes más frecuentes.

Uno de los explantes más utilizados en la propagación *in vitro* son los órganos; en algunos casos, como la propagación de orquídeas se utilizan semillas; luego de estas se germinan, protocormos y finalmente plantas.

Si se desean clonar se toman las hojas y tallos y se usan como explantes para dar lugar a la formación de nuevas plantas que son genéticamente idénticas; a continuación se detallan algunos tipos de explantes:

6.1. Raíces.

Una de las primeras y prolíferas aplicaciones de cultivo de tejido lo fue el cultivo de raíces; estos fueron subcultivados en diversas ocasiones manteniéndose con éxito. Entre los pioneros en utilizar este explante se destacaron: Katte y Robbins quienes en 1992 reportaron el crecimiento limitado de los ápices de raíces de plántulas de trigo (Stemard & Kriboriam, 1977 citados por Hurtado & Merino, 1997).

6.1.1 Aplicaciones del cultivo de raíz.

Los estudios realizados con el cultivo de raíces han aportado conocimientos acerca del metabolismo de los carbohidratos, el papel de los iones minerales, vitaminas y

hormonas en el crecimiento vegetal, así como la diferenciación y el desarrollo de raíces. Mediante el cultivo *in vitro* de las raíces se ha logrado comprobar que estas requieren de vitaminas como la tiamina para un crecimiento prolongado, se sugiere que en condiciones naturales las raíces requieren de las partes aéreas para un adecuado abastecimiento de vitaminas.

Otros experimentos han sugerido que las raíces en condiciones naturales necesitan de la parte aérea para producir cambium vascular (conjunto de células que forman el tejido vascular secundario). En cultivos *in vitro* es necesario añadir al medio sacarosa y AIA para suplir las deficiencias por falta de la parte aérea e inducir la formación del cambium vascular.

El cultivo de raíces permitió realizar estudios en los procesos de nodulación, originado por el *Rhizobium sp* .Otra aplicación del cultivo *in vitro* de raíces lo ha sido el descubrimiento del ciclo de vida de los fitonemátodos (Hurtado & Merino, 1997).

6.1.2 Cultivo de raíces aisladas.

Se pueden lograr cultivos de raíces laterales o primarias, a partir de plántulas germinadas en condiciones asépticas o de plántulas en cultivos hidropónicos.

En ocasiones después de realizar varios subcultivos las raíces pierden su capacidad de crecer aunque se les cambie a un medio fresco. Tal como ocurre cuando se multiplica excesivamente un tejido, este pierde la capacidad de división celular y luego de diferenciarse en un tejido (forman masas).

6.2. Anteras y polen.

Uno de los primeros estudios realizados con polen fue llevado a cabo por La Rue en 1948, de este modo se demostró que el polen se podía desarrollar si se cultivaba en un

medio nutritivo adecuado. Posteriormente en 1953, Teluke observó que los granos de polen de las gimnospermas *Gingo biloba* podían cambiar su desarrollo para formar callos si se les cultivaba en un medio apropiado (Hurtado & Merino, 1997).

6.2.1 Bases morfológicas:

Las anteras y polen se cultivan en un medio en donde se dividen para formar embriones o callos. Estos se transfieren a medios de multiplicación y se forman plántulas. El objetivo de realizar estos cultivos es producir plantas haploides. Este tipo de plantas pueden ser empleadas en programas de mejoramiento para seleccionar características deseadas o para la producción de híbridos entre especies incompatibles entre sí. Roca, Mroginski, 1991; Dodds & Roberts, 1978 y Keller Stringham 1978 citados por Hurtado & Merino (1997).

La utilización de esta técnica (cultivo de polen y anteras) es importante en estudios sobre mutagénesis como albinismo, ya que los haploides permanecen genéticamente estables.

Microesporogénesis abarca toda la secuencia del desarrollo, desde la célula madre hasta la maduración de granos de polen. Esta secuencia se divide en tres fases:

Primera fase: Se forman esporas tetraédricas.

Segunda fase: Se forman microesporas individuales.

Tercera fase: Se inicia la división celular para dar lugar a la formación del gametofito.

6.2.2 Condiciones que afectan el cultivo de anteras:

a. La edad del polen para su cultivo es un factor muy importante para el éxito de la producción de embrioides Dadds, Roberts, 1982 citados por Hurtado & Merino (1997).

b. Las condiciones fisiológicas de las plantas madres juegan un papel importante en el desarrollo de los explantes, ya que las anteras deben tomarse de las flores producidas durante el inicio de la floración de la planta Sunderland, 1973 citado por Hurtado & Merino (1997).

c. Fisiología de las plantas donantes.

La intensidad luminosa es importante en la producción de embrioides, se obtiene alta producción a partir de plantas donantes que crecieron bajo alta intensidad luminosa.

El fotoperíodo, la temperatura y la nutrición mineral de las plantas son otros factores que inciden en el desarrollo de los explantes.

d. El medio de cultivo utilizado.

El medio de cultivo a emplearse puede ser el de Halperin. La composición hormonal y el potencial osmótico del medio deben ser ajustados para prevenir la lisis del polen según Sunderlan, 1973 (citado por Hurtado & Merino, 1997).

6.3 Hojas.

Los primeros cultivos *in vitro* exitosos se obtuvieron a partir de órganos, en vez de ser a partir de células o tejidos. En 1904 Harninning obtuvo plántulas de embriones obtenidos de frutos inmaduros (Hurtado & Merino, 1997).

En la actualidad los cultivos de órganos son casi inexistentes a excepción de los cultivos de ápices, utilizados para lograr una rápida propagación clonal, y de los meristemas para la obtención de plantas libres de patógenos.

El cultivo de órganos es útil para determinar hasta donde llega el desarrollo normal del órgano en condiciones *in vitro*. Un ejemplo puede ser el cultivo de las secciones de hojas (Steeves & Sunix, 1972; Hurtado & Merino, 1997).

Las hojas pueden crecer desde el primordio hasta la madurez en cultivos *in vitro*, pero tienen la característica de que disminuyen su tamaño y muestran una reducción en la complejidad morfológica. Sin embargo, el cultivo de hojas se ha usado en la propagación masiva utilizando secciones de hojas con la finalidad de obtener embriones somáticos, ejemplo aplicado al cafeto y las violetas (Hurtado & Merino, 1997).

6.4. Meristemas.

Se considera a los meristemas como el grupo de células que mantienen su actividad embrionaria durante toda la vida de la planta y tienen la capacidad de dividirse sin restricción o especializarse en un tejido u órgano. Los meristemas se pueden encontrar en la raíz y el tallo (principales y laterales). El meristemo apical de tallo da lugar a diversos tipos de células, tejidos y órganos.

Según Schmidt 1924, citado por Hurtado & Merino (1997), al describir el crecimiento apical es necesario emplear el concepto de la teoría cuerpo - túnica. Esta teoría sugiere que existen dos zonas de tejidos en el meristemo apical: la primera llamada túnica, que consta de una o más capas de células periféricas, y el cuerpo, masa celular rodeada por la túnica.

Posteriormente, en 1938 se clasificaron cinco zonas en el meristemo, basándose en el tamaño de las células, grado de vacuolación, volumen nuclear, división celular y espesor de la pared celular. Estos son:

1. Grupo inicial madre central.
2. Zona celular madre central.
3. Zona de transición.
4. Zona de tejido periférico.
5. Costilla u orilla del meristemo.

Luego Popham en 1951 citado por Hurtado & Merino (1997), basándose en diferencias histológicas, propuso siete zonas de organización apical.

1. Tipo helecho (una sola célula apical).

2. Tipo de transición (4 a 5 células apicales).

3. Tipo *Lycopodium* (con tres zonas : Meristema central, superficial y periférico).

4. Tipo *Ginko* (con células madre central, zona semejante al cambium y meristemo central y periférico).

5. Tipo *Abies* - *Cryptomeria* (con cuatro zonas).

6. Tipo *Opuntia* (con manto, células madres, centrales y periféricos).

7. Tipo angiosperma (con manto, iniciales subapicales y meristemos central y periférico).

De todas las clasificaciones de la organización del meristemo apical la más aceptada es la de Wardlaw en 1965 (Hurtado, Merino, 1997); que divide la región apical en cinco regiones:

a. Región distal (meristemática).

b. Región Subdistal (primordios de hoja).

c. Región inorgánica (tejidos internos).

d. Región Subapical (elongación de axis y diferenciación del tejido vascular).

e. Región de maduración (estabilización morfogenética).

6.4.1 Cultivo *in vitro* de meristemas apicales..

Los meristemos están asociados a un gran número de tejidos especializados y a partir de estos, se diferencian muchos tejidos y órganos, su estudio y desarrollo *in vitro*, nos permite entender los mecanismos que controlan la diferenciación de las plántulas (IICA, 1997.

Las células meristemáticas son diploides, por consiguiente son genéticamente iguales a la planta madre del que se extrajo el explante y las plántulas que se produzcan a partir de estos, presentan las mismas característica.

6.5. Embriones y óvulos.

Hanning en 1940 fue el primer científico que logró extraer embriones a partir de óvulos y demostrar que éstos se podían cultivar (Roca & Mroginski, 1991).

Los embriones, por su carácter juvenil, son potencialmente meristemáticos, es decir, tienen la capacidad de multiplicar sus células; esto explica su uso como explantes para la iniciación de callos, permitiendo así, obtener un elevado número de plantas. En ocasiones, las células del callo obtenido a partir de embriones, forman nuevos embriones a estos se les denomina embrioides. Sin embargo, los embriones también pueden dar lugar a la formación de plántulas, de hecho, se obtiene una rápida producción de las mismas (IICA, 1987).

6.5.1 Técnicas de extracción de embriones.

Una manera de obtener embriones es extraerlos de las semillas, óvulos o frutos en forma aséptica, con la ayuda de un microscópio o estereoscópio.

Las semillas de las plantas arbóreas pasan por un período de latencia antes de la germinación; si se cultivan *in vitro* se interrumpe la latencia y es posible producir plántulas en 2 ó 3 semanas. El cultivo *in vitro* de los embriones ayuda a la germinación de las especies arbóreas, con semillas que deben pasar por un período largo de latencia (Roca & Mroginski, 1991).

6.6 Factores que afectan el cultivo de embriones.

Antes de iniciar labores en un cultivo de embriones o de óvulos, deben considerarse factores que afecten el desarrollo, la germinación y la multiplicación de los

explantes. Entre los más importantes se destacan:

6.6.1 El medio de cultivo.

El medio más indicado en la propagación *in vitro* es el medio Murashige y Skoog (1962). Sin embargo, algunas veces es necesario modificar las concentraciones de sacarosa en los medios a 120 g/litro; concentraciones altas de sacarosa promueven la germinación precoz de los explantes y dan como resultado plantas deformes. Sin embargo, en algunos casos, es necesario adicionar aminoácidos, vitaminas y agua de coco, para el cultivo de embriones extraídos de óvulos jóvenes. Inclusive, dependiendo de las especies y su grado de exigencias, es posible cultivar embriones en medios sin hormonas, vitaminas o agua de coco, como fue demostrado en estudios realizados por E. Ortega en 1991, donde logró rescatar embriones de *Phaseolus vulgaris x Phaseolus acutifolius A. Gray*, utilizando el medio Murashige y Skoog al 50%, sin la adición de hormonas (Ortega, 1992).

6.6.2 Osmolaridad.

La osmolaridad existente en los medios de cultivo para embriones, parece ser un factor determinante en el grado respuesta y crecimiento de los mismos. Los endospermos líquidos como el agua de coco favorecen el cultivo de embriones; sin embargo, poseen una osmolaridad alta; aumentando las concentraciones de sacarosa y sustituyendo con este compuesto algunos elementos metabólicamente inertes como son el manitol o glicerol se contrarresta en cierto grado este inconveniente. El 2 % de sacarosa provee las condiciones energéticas óptimas para el crecimiento. Por otro lado, el óptimo de osmolaridad puede variar dependiendo del desarrollo del embrión al momento de ser aislado Rietsema *et al.* citado por Roca & Mroginski (1991).

6.6.3 Reguladores del crecimiento.

Sus efectos no son muy claros. Sin embargo, se ha sugerido que el desarrollo embrionario está relacionado con la osmolaridad (concentración de solutos) alta en el medio.

7. Respuestas de los explantes *in vitro.*

Haberlandt en 1902, citado por Roca & Mroginski (1991), propuso que todas las células vegetales, tenían totipotencialidad o capacidad de formar plantas completas.

Esta teoría no fue demostrada, hasta 1958, cuando Reinert, Steward *et al.*, informaron acerca de la producción de embriones somáticos, demostrándose la totipotencialidad de las células vegetales (Krikorian *et al.*, 1969; Bosks- Huseman *et al.*, 1970; Reinert *et al.*, 1971citados por Roca & Mroginski, 1991).

Si bien es cierto que las células vegetales tienen totipotencialidad, las respuestas de los explantes cultivados *in vitro* no son iguales, éstas se ven condicionadas y afectadas por las concentraciones de hormonas, sacarosa, también por los ámbitos de luz y temperaturas.

7.1. Callos y su utilización.

La propagación *in vitro* a partir de callos por medio de la organogénesis o de la embriogénesis somática, es considerada como una alternativa en los métodos de propagación; sin embargo, el cultivo de callos presenta poca estabilidad genética.

Se buscan otras alternativas, como regenerar plantas a partir de células selectas y la utilización de nuevos métodos genéticos celulares aplicables al mejoramiento de las plantas.

Los embriones somáticos son células que se forman a partir de tejidos vegetales que no son el producto de la fusión de gametos (callos) y que tienen la capacidad de formar plántulas (Roca & Mroginski, 1991).

Los callos embriogenéticos somáticos son utilizados para estudiar la diferenciación de las células somáticas y la formación de plántulas. Antiguamente se creía que era necesario la presencia de auxinas en los cultivos *in vitro*, como el 2,4-D para estimular la embriogénesis somática en un callo y que se debía remover la auxina, para que ocurriera la maduración y germinación de los embriones. Sin embargo, en la actualidad se sabe que dentro de un explante ciertas células están preacondicionadas para los eventos morfogénicos que llevan a la embriogénesis (Hurtado & Merino, 1997).

La respuesta de los callos como explantes dependen del genotipo de la planta madre, se han observado diferencias en las respuestas, dependiendo de la especie de la planta y del tipo inicial de explante. También es importante considerar el estado de desarrollo de la planta madre, los explantes extraídos de plantas jóvenes tienen mayor capacidad meristemática que explantes extraídos de plantas maduras. (Roca, Mroginski, 1991).

Las concentraciones altas de sacarosa estimulan la formación de los callos embriogénicos; reducen la formación de embriones secundarios y la formación de policotiledones. Sin embargo, el ácido abscísico (ABA) es un inhibidor de crecimiento que permite obtener los mismos resultados (Ammirato *et al.*, 1972, citado por Roca & Mroginski, 1991).

Los cultivos semi-sólidos son utilizados para obtener el crecimiento de callos y estimulan la embriogénesis somática, pero también se pueden utilizar medios líquidos. En este último, es preferible agitar suavemente el medio para así obtener anornalidades en el desarrollo de los callos.

7.2. Organogénesis.

Contrario a la embriogénesis, la organogénesis comprende la formación de plántulas a partir de yemas o meristemas radicales sin pasar por la formación de callos (Hurtado & Merino, 1997).

En condiciones *in vitro*, la organogénesis de los explantes depende de las hormonas y de los inhibidores o retardadores del crecimiento, en el medio de cultivo. En 1957 Skoog *et al.*, demostraron la importancia de la proporción de auxina-citocinina *in vitro*, en la respuesta morfogenética. Concentraciones altas de auxinas y bajas de citocininas favorecen la formación de yemas análogo a lo que ocurre con el sulfato de adenina, que promueve el desarrollo de yemas. Sin embargo, los explantes responden de manera diferente a iguales condiciones de cultivo y tales diferencias se deben al estado fisiológico de la fuente del explante. Los factores endógenos (hormonas u otros) que inducen la organogénesis *in vitro*, varían cuantitativamente de acuerdo a las condiciones ambientales, el genotipo, el tipo de célula y otros aspectos (Roca & Mroginski, 1991).

Para que los callos formen órganos definidos, se deben producir cambios que conduzcan a la organización celular.

La respuesta de los explantes varía de acuerdo a los requerimientos de los reguladores de crecimiento y al tamaño de los explantes. Los explantes de tamaño grande tienen menor confiabilidad en cuanto a la esterilización, pero presentan una capacidad regenerativa alta, contrario a lo que ocurre con los explantes pequeños.

A la edad fisiológica del explante, si se utilizan explantes cercanos al ápice caulinar (parte joven de la planta), se puede producir mayor cantidad de plántulas que a partir de la porción baja del tallo.

7.2.1 Factores que afectan la organogénesis

La luz: El fotoperíodo juega un papel importante en la organogénesis; se requiere de 12 a 16 horas y una intensidad lumínica de 1000 a 3000 lux, para inducir la organogénesis (Hasegawa, *et al.*, 1973 citados por Roca & Mroginski, 1991).

La temperatura, Los cultivos pueden permanecer a temperaturas entre 18 y 28 OC, para la organogénesis; sin embargo, Thorpe, 1980, citado por Roca & Mroginski (1991) señala que, Sautheret en 1969; encontró que la temperatura variaba de 20 a 15 OC, durante el día y la noche, situación bajo la cual, se obtenía buena respuesta de los explantes en la formación de raíces.

Consistencia del medio: Se cree que las concentraciones altas de agar crean un ambiente más estresante para las plantas, lo que reduce la formación de órganos (Hurtado & Merino, 1997).

El pH del medio no debe ser ni muy alto ni muy bajo, se recomienda de 5.5 a 6.0 (Mangora *et al.*, 1967; citado por Roca & Mroginski, 1991).

8. Adaptación de las plantas obtenidas en el laboratorio a las condiciones exteriores.

La propagación *in vitro* de las plantas puede ser exitosa en el laboratorio, pero la etapa culminante y que determina el éxito total del trabajo realizado con los explantes es el transplante de las plántulas que se encuentran en el medio estéril y con todos los

requerimientos nutricionales necesarios al suelo o al nuevo sustrato, el cual no es estéril y que difiere considerablemente del medio en que se encontraba originalmente. Por todo esto las plántulas provenientes del laboratorio deben pasar por tres fases, estas son:

1. Fase de aclimatación.

Durante esta fase deberán ser controladas por una a dos semanas la intensidad lumínica y la temperatura de acuerdo al medio en que crecerán. En caso de que el frasco que contenga las plántulas tenga papel parafilm este deberá retirarse cinco días antes del transplante, para eliminar la alta humedad relativa en el medio (Hurtado & Merino, 1997).

2. Fase de invernadero.

Después de que las plántulas pasan por la fase de aclimatación son separadas para ser transportadas y transplantadas al nuevo substrato que debe reunir una serie de características:

a. Las plantas a transplantar deben tener de dos a tres nudos o una altura de aproximadamente cinco centímetros y un sistema radicular desarrollado.

b. Se deben sacar las plántulas del envase en que se encontraban y se lavan con agua desionizada, para que no quede agar adherido a las raíces.

c. Se recomienda que el sustrato al cual se va a transplantar las plántulas, sea de tierra neutra como la agrolita (material de origen volcánico), 70% de corteza de pino, 25% de musgo y 5% de cenizas.

d. Una vez sembradas se riegan y en algunos de los casos se cubren con una bolsa de polietileno durante 15 días (cámaras húmedas).

e. Se recomienda la fumigación periódica del invernadero, para prevenir el ataque de insectos y enfermedades.

3. Fase de campo.

Las plantas provenientes del invernadero son transportadas al campo. Si la planta fue sembrada en un pote, se recomienda colocarla en un lugar con poca luz. Si se va a sembrar en el suelo se recomienda hacerlo en un día nublado.

El establecimiento de las plantas a las condiciones de campo dura de uno a dos meses (Hurtado & Merino, 1997).

Capítulo III.

FUNDAMENTO PRÁCTICO PARA LA REALIZACIÓN DE LA PRÁCTICA PROFESIONAL, ORIENTADA AL CULTIVO DE TEJIDOS *IN VITRO* REALIZADA EN LA EMPRESA BIOTECH DE PANAMÁ, PARA OPTAR POR EL GRADO DE LICENCIATURA EN BIOLOGÍA.

1. Biotech de Panamá.

1.1 Reseña histórica de la empresa.

Biotech de Panamá es una empresa que fue fundada en 1994 por la familia Flores. El propósito inicial de la empresa fue utilizar la micropropagación masiva de banano, para productores nacionales y para autoconsumo de la Empresa Bananera San Bosco, localizada en la provincia de Bocas del Toro, República de Panamá.

Después de realizadas las investigaciones necesarias, se consideró la micropropagación de las especies nativas de orquídeas de la geografía panameña y Centroamericana. Para iniciar el proyecto se compró una colección privada de 1500 especies de orquídeas nacionales, a las cuales se anexó la colección de plantas exclusivas del extranjero de la Sra. Evelina Wachter (Máxima colaboradora de Biotech de Panamá). Se invirtió en la construcción de viveros apropiados y duraderos.

Posteriormente, Biotech de Panamá estableció convenios con coleccionistas locales, para la obtención de cápsulas de especies nuevas y se les pidió que realizaran cruces de orquídeas para la obtención de nuevos híbridos.

Esta nueva iniciativa ha dado excelentes resultados y de ella se benefician tanto la empresa que invierte en los costos de germinación de las cápsulas, como los donadores que reciben a cambio un número de plantas germinadas en estado de finalización y

además se les asesora en los procedimientos básicos de aclimatación de las mismas. Para dicho convenio se establece un contrato escrito y debidamente firmado por ambas partes en acuerdo mutuo.

La creación de la empresa Biotech de Panamá y posteriormente utilización de las orquídeas se justifica en los siguientes puntos:

1. Las especies de orquídeas seleccionadas para la micropropagación clonal en Biotech de Panamá son representativas de la flora de los bosques de el país. Esta flora está siendo devastada en forma progresiva e irreversible, diezmando la posibilidad de que las orquídeas subsistan en su ambiente natural. Es de extrema necesidad que estas plantas sean reproducidas en forma masiva, para garantizar que no desaparezcan de nuestros bosques.

2. La distribución de las plántulas a coleccionistas y aficionados evita que los mismos se adentren en los bosques en busca de plantas adultas. Esto traerá significativas consecuencias en pro de la conservación de nuestros bosques.

3. La distribución al exterior mediante la exportación, permite dar a conocer la diversidad en cuanto a orquídeas se refiere generando así interés por nuestros paradisíacos lugares y variabilidad natural.

Objetivos principales de Biotech de Panamá:

1- Perpetuar las especies de orquídeas en extinción.
2- Obtener plantas híbridas y exclusivas.
3- Obtener clones con características comerciales deseables.
4- Retomar de especies a los bosques.
5- Conservar un banco de germoplasma (Orquídeas).
6- Multiplicación masiva de orquídeas para la exportación y mercado local.

Uno de los objetivos de la empresa, lo es el establecimiento de convenios y acuerdos con Instituciones de Estudios Superiores (Universidades), para que se realicen prácticas profesionales y trabajos de tesis, utilizando las instalaciones del laboratorio. Con esta actividad, los estudiantes de las diferentes Universidades del país tienen la oportunidad de aprender, practicar y relacionarse con las técnicas de cultivo de tejidos, a cambio, realizan gratuitamente en el laboratorio actividades de producción y asistencia.

Biotech de Panamá obtiene así la distinción de ser una de las empresas privadas del país que colabora con la educación y formación de futuros egresados de las Instituciones Superiores de Enseñanza de Panamá, impartiendo técnicas pioneras de Biotecnología para la conservación y el desarrollo sostenible de nuestra Biodiversidad.

2. El laboratorio.

2.1- Facilidades.

El laboratorio de cultivo de tejidos debe cumplir con diferentes requisitos, teniendo como objetivo primordial alcanzar los propósitos establecidos, como lo son: Bajos costos, diseño práctico y eficiente, y equipos indispensables detallados en los siguientes puntos.

2.1.1 Requerimientos básicos.

Entre las necesidades básicas de un laboratorio de cultivo de tejidos vegetales tenemos:

1. Debe estar ubicado en un área preferiblemente con baja humedad, lejos de fuentes de contaminación inmediata como carreteras, basureros y fábricas entre otras.

2. Debe seguir un diseño que reduzca los niveles de contaminación de los explantes y plantas subcultivadas, reduciendo al mínimo la exposición de los cultivos a personas ajenas que puedan ser portadoras de esporas o bacterias que contaminen.

3. Debe tener varias salas, de manera tal que el trabajo se distribuya en cada una de ellas; por ejemplo: Sala de recepción, sala de preparación de medios de cultivo, sala de crecimiento y sala de incubación.

4. Debe tener viveros experimentales para evaluar, observar las características y el comportamiento de las plantas multiplicadas en el laboratorio.

5. Debe seguir reglas de asepsia para la limpieza general, higiene personal, manipulación y preparación de medios de cultivos utilizados.

6. Debe contar con equipos básicos para alcanzar los propósitos establecidos.

2.1.2 Localización.

El laboratorio de cultivo de tejidos vegetales debe estar localizado en un área aislada para evitar posibles fuentes de contaminación, tales como: Carreteras muy transitadas, el flujo constante de los autos lo que produce una atmósfera cargada de dióxido de carbono que se acumula en las paredes de los edificios en forma de un polvo de color negro y tóxico; además, las llantas de los autos a altas velocidades levantan partículas de polvo, las cuales pueden transportar esporas y bacterias.

El laboratorio de cultivo de tejidos debe estar alejado de almacenes, depósitos de basura y restaurantes y de lugares en donde se almacenan mercancías; estos sitios son frecuentados por hormigas, ratones y cucarachas que transportan en sus patas o en sus

secreciones microorganismos que contaminan. En los depósitos de basura y restaurantes se crían organismos como la mosca común (*Musca doméstica*), la cucaracha (*Periplaneta americana*), algunos chinches, escarabajos, arácnidos y hormigas entre otros.

El laboratorio debe ubicarse en un área seca y de baja humedad, ya que estas condiciones disminuyen el desarrollo de esporas bacterianas.

2.1.3 Diseño práctico del laboratorio.

Todos los laboratorios de cultivos de tejidos existentes, al momento de ser diseñados tomaron en cuenta muchos factores como son necesidades, alternativas y costos.

Las necesidades de los laboratorios de cultivo de tejidos se desglozan y clasifican en prioritarias y no prioritarias para aminorar costos, sin que se deje de alcanzar el éxito en los resultados. Entre las necesidades prioritarias del laboratorio estan: La oficina, la sala de preparación de medios, sala de crecimiento y la sala de incubación.

El equipo de laboratorio también se debe clasificar dentro de las categorías de indispensable y opcional, por ejemplo: Para esterilizar los medios de cultivos, se puede usar una olla de presión en reemplazo de un autoclave automático costoso y con iguales resultados.

Se necesitan cámaras de flujo laminar para inocular los explantes, se puede escoger entre comprar una cámara de flujo laminar prefabricada en el exterior o diseñar una propia, con la que se obtengan los mismos resultados.

2.1.4 Equipo indispensable y básico.

1. Autoclave u ollas de presión.
2. Balanza analítica (indispensable).
3. Balanza granataria (opcional).
4. Refrigerador (indispensable).
5. Lavadora de cristalería (opcional).
6. Destilador de agua (indispensable) (Anexo, Fig. 16).
7. Agitador magnético con calentamiento (indispensable).
8. Macro y micro espátulas (indispensables).
9. Frascos ámbar para guardar soluciones madres (opcionales).
10. Buretas (opcionales de acuerdo a los propósitos).
11. Soporte universal (opcional).
12. Anillos (opcional).
13. Pinzas de Mohr (opcional).
14. Pinzas largas para disección (indispensable).
15. Termómetros (indispensables)
16. Guantes de asbesto (indispensables).
17. Tapa para tubos de ensayo (opcionales).
18. Tapones para frascos (indispensables).
19. Gradillas para tubos de ensayo (pueden fabricarse en forma artesanal).
20. Matraces Erlenmeyer (indispensable).
21. Matraces de balón (indispensable).
22. Matraces aforados (indispensables).
23. Desecadores (opcionales).
24. Pipetas (opcionales, pueden usarse jeringas graduadas).
25. Aspersores de alcohol y desinfectantes (indispensables).
26. Pipetas graduadas (opcionales, se pueden usar jeringas graduadas).
27. Pipetas volumétricas (opcionales).

28. Goteros (indispensables).
29. Pro- pipetas (opcionales).
30. Probetas de varios volúmenes graduadas (indispensables).
31. Vasos de precipitados (indispensables).
32. Cámaras de flujo laminar de aire (indispensables).
33. Microscopio, estereoscopio (indispensables si se trabajacon meristemas muy pequeños, tal es el caso de saneamiento de virus y enfermedades).
34. Lupa con lámpara (opcional).
35. Estuche de disección (opcional).
36. Bisturíes y navajas (indispensables).
37. Mecheros Bunsen, Touch o matic (pueden usarse de alcohol).
38. Bomba de vacío (opcionales).
39. Caja de petries (opcionales).
40. Cánulas para cajas petries (opcionales).
41. Cánulas para pipetas (opcional).
42. Tubería de Plástico (indispensable si se trabaja con mecheros que usan gas).
43. Papel filtro (opcional).
44. Papel parafilm (opcional).
45. Gasas (opcionales).
46. Algodón (indispensable).
47. Toallas de papel (indispensable).
48. Detergente para cristalería (indispensable).
49. Desinfectantes varios (indispensables).
50. Reloj de alarma para control del tiempo (indispensable).
51. Termostatos (indispensables).
52. Balastros (indispensables).
53. Tubos de ensayo 25 x 150 y 25 x 200 (opcionales).
54. Microscopio de inmersión (opcional, a menos que se realicen estudios citológicos).
55. Cubreobjetos (opcionales a menos que se realicen estudios citológicos).

56. Porta objetos (opcionales a menos que se realicen estudios citológicos).

Reactivos en general como:

1. Nitrato de amonio ($NH_4 NO_3$).
2. Nitrato de potasio (KNO_3).
3. Cloruro de calcio (CaC_{l2}. 2 H $_2O$).
4. Sulfato de magnesio (Mg SO_4. 7 H_2O).
5. Fosfato de potasio dibásico ($KH_2 PO_4$).
6. Fosfato de sodio (NaH_2PO_4. H_2O).
7. Ácido bórico (H_3BO_3).
8. Ácido etilén- diamino-tetraacético de di sodio (Na_2 EDTA).
9. Sulfato ferroso ($FeSO_4$.7 H_2O).
10. Sulfato de magnesio ($MgSO_4$. H_2O).
11. Sulfato de cobre ($CuSO_4$. H_2O).
12. Molibdato de sodio (Na_2MoO_4. 5 H_2O).
13. Buff3er pH 7.
14. Buffer pH 10.
15. Sacarosa y agar.

3. Estructura arquitectónica de un laboratorio de cultivo de tejidos.

La estructura arquitectónica de un laboratorio de cultivos de tejidos, debe considerar las condiciones de asepsia, sus propósitos y objetivos, el trabajo debe realizarse en diferentes áreas y la ubicación de las secciones varía de un laboratorio a otro; sin embargo, el objetivo principal es disminuir los niveles de contaminación. A continuación se muestra un modelo propuesto.

A. Oficina.	***B. Sala de recepción y vestíbulo***
1.Archivador.	1. Sillones.
2. Escritorio.	2. Mesa.
3. Aire acondicionado.	3. Ventanas de vidrio.
C. Baño	***D. Comedor.***
	1. Sillones.
	2.Mesa
	3.Lavado
	4.Ventanas de vidrio
E. Sala de lavado.	***F. Sala de esterilización.***
1. Lavado.	1. Autoclave.
2. Mesa.	2.Mesa.
G. Sala de preparación.	***H. Sala de cultivos- transferencia.***
1. Gabinetes.	1. Cámaras de flujo laminar.
2. Mesa.	2. Ventanas de vidrio.
3. Nevera.	***I. Sala de observación y exámenes al microscopio y estereoscopio.***

	2. Mesa.
	3. Ventanas de Vidrio.
J. Sala de crecimiento	***K. Sala de crecimiento.***
1. Estantería.	1. Estantería
2. Aire acondicionado.	2. Aire acondicionado.
3. Ventanas de vidrio.	3. Ventanas selladas de vidrio.
L. Almacén de medios.	
1. Estanterías.	
2. Ventanas de vidrio.	

3.1 Sala de Recepción y Vestíbulo.

Esta sala se diseña para recibir las visitas al laboratorio, la misma, debe ser equipada para ofrecer un ambiente cómodo mientras se espera.

3.2 Sala de Preparación de Medios de Cultivos.

Esta área se utiliza para la preparación de los medios de cultivos, debe ser espaciosa, con paredes color blanco con pintura anti-hongos, así se detectan de inmediato la aparición de contaminantes. Las superficies de las mesas y muebles de trabajo deben ser lisas para facilitar la limpieza y desinfección periódica. Esta sala debe estar amueblada con estanterías y repisas sin puertas o con puertas que permitan la ventilación apropiada de los químicos y reactivos de uso inmediato en la preparación de los diferentes medios que se utilicen (Anexo, Fig. 17).

El equipo imprescindible debe ser:

1. Mesa de trabajo para preparación de medios, en ella se mezclan las soluciones, se colocan los frascos para verter los medios y se realizan la mayoría de las labores esenciales para la actividad en general del cultivo de tejidos, la misma se ubica en el centro y debe permitir la libre circulación del personal a su alrededor, debe ser alta, de este modo, no es necesario permanecer por mucho tiempo inclinado al realizar los trabajos, evitando así el cansancio y malestar de espalda del personal.

2. Gabinetes y estanterías para químicos, reactivos, cristalería y equipos varios (Anexo, Fig. 18).

3. El equipo de refrigeración necesario para guardar a bajas temperaturas las soluciones madres de los nutrimentos, reguladores de crecimiento y otros compuestos químicos (Anexo, Fig. 19).

4. Balanza analítica, granataria, Ph-metros, agitadores magnéticos con calentamiento, relojes de tiempo, etc. (Anexo, Fig. 20).

5. Los lavamanos y fregadores, deben disponer de agua caliente y fría; además deben ser anchos y profundos, de esta manera la cristalería y equipo accesorio se puede lavar fácilmente sin que ocurran salpicaduras y accidentes por limitación de espacio de las mismas. No se recomiendan lavamanos y fregadores de metal, estos se corroen y se deterioran rápidamente con el contacto permanente de los químicos y reactivos que se vierten al desagüe.

6. Destiladora de agua o un aparato desionizador, hornos microondas o de esterilización por calor, etc.

3.3 Sala de crecimiento e incubación.

Es el área del laboratorio donde se desarrollan los explantes cultivados hasta la formación de las plantas, por lo que debe estar equipada con instalaciones eléctricas, aires acondicionados, controles de temperatura, espacios para cultivos en agitación y estanterías con las siguientes características:

Anaqueles con varios niveles, se acostumbra cinco niveles. Cada nivel debe presentar lámparas fluorescentes de tipo "day light". Estas pueden ser de luz fría o gro lux para 1000 y 3000 lux. La cantidad de lámparas por nivel debe variar de acuerdo a las necesidades de luz de las plantas (Anexo, Fig. 21) (Hurtado & Merino, 1997).

3.4 Sala de siembra, transferencia y disección.

Esta sala debe cumplir con medidas estrictas de asepsia, puesto que la misma esta destinada a la inoculación y transferencia de los explantes a los medios de cultivos.

Debido a los altos requerimientos asépticos en algunos laboratorios esta sala se divide en compartimientos. Cada uno debe contar con los siguientes materiales (Anexo, Fig. 22 y 23).

1. Cámaras de flujo laminar de aire.

2. Aires acondicionados con filtro.

3. Máscaras y gorras sanitarias.

4. Instrumentos de disección.

5. Mecheros Bunsen.

6. Papel toalla.

7. Alcohol al 70 y 96%, en botellas de aspersión de manos y botellas con picos.

8. Lámparas de luz ultravioleta.

3.5 Bodega de materiales.

El objetivo de esta área del laboratorio es almacenar los reactivos en general. Debe tener humedad baja, al mismo tiempo no ser caliente. Se recomienda la instalación de extractores de humedad o deshumificadores. Debe ser preferiblemente un lugar oscuro equipado con detectores de humo y extinguidores. A esta área sólo deben ingresar una a dos personas con máscaras y hojas de controles de reactivos en existencia.

3.6 Invernaderos de estudios y evaluación de material.

El invernadero es un sitio al cual se trasladan las plantas para su observación y evaluación. Se realizan además labores de aclimatación de las plantas (Anexo, Fig. 24).

De acuerdo a las facilidades económicas, estas áreas pueden contar con los siguientes equipos opcionales:

1. Mallas que no permitan la entrada de insectos.

2. Pisos de concretos o de piedra picada.

3. Filtros de aire.

4. Sistemas de irrigación automática o mangueras manuales (Anexo, Fig. 25).

3.7 Sala de registros, oficina y biblioteca.

En algunos casos estas salas se encuentran ubicadas en un solo recinto y su finalidad es contener registros de las existencias en el laboratorio, historiales en general, así como libros, revistas, folletos y catálogos de información relacionada (Anexo, Fig. 26).

4. Técnicas de esterilización, manipulación y controles generales asépticos.

La contaminación de los medios de cultivos y los explantes, se traducen en pérdidas de dinero, esfuerzo y tiempo; reducción en el crecimiento y hasta la muerte de los explantes, causados generalmente por hongos y bacterias, que pueden destruir los medios de cultivo, competir con el explante por el medio o inclusive modificarlo (Hurtado & Merino, 1997).

4.1 Limpieza general y rutinaria del laboratorio.

Una de las actividades determinantes y con mayores consecuencias para obtener el éxito buscado en el laboratorio de cultivo de tejidos es un programa rígido y estricto de limpieza general. Cada miembro del personal debe ser conciente de la importancia de mantenerse a la defensiva contra posibles fuentes de contaminantes que surjan en las instalaciones, mediante una observación minuciosa de paredes, pisos, superficies de

trabajo, estanterías, etc. Además, debe seguir sin descuido cada paso establecido para mantener íntegra la asepsia general del laboratorio.

El piso de estas salas no puede barrerse en seco, de hacerlo se levantarían conjuntamente con el polvo acumulado, esporas de hongos y bacterias, por lo que es necesario humedecer primero el piso con un desinfectante, luego, se realiza el trapeado y finalmente con una escoba desinfectada y humedecida previamente, se barren las partículas grandes que se han fijado durante el trapeado. Se utiliza una escoba para las salas de transferencias y otra para las salas de preparación de medios, lo mismo que los trapeadores. Estos instrumentos no deben utilizarse fuera del laboratorio. Entre los desinfectantes utilizados tenemos, clorox (hipoclorito de sodio) diluido en concentraciones diferentes. Esto depende de los grados de contaminación observados en los monitores periódicos, también se utilizan amonios cuaternarios y otros.

Se recomienda la rotación periódica de los desinfectantes para prevenir la aparición de resistencia a los mismos, por parte de hongos y bacterias.

En cada puerta de laboratorio es necesario colocar esponjas gruesas, impregnadas con hipoclorito de sodio, para disminuir el número de microorganismos presentes en los zapatos.

Es necesario fumigar las salas de cultivo y transferencia, con insecticidas, bactericidas y fungicidas que no sean tóxicos al personal.

Las luces ultravioleta de las cámaras de flujo laminar se dejan encendidas durante las noches para eliminar o atenuar los microorganismos y al momento de utilizarlas flamear todas las pinzas (Anexo, Fig. 27).

4.2 Higiene del personal.

Cada persona es un agente transportador de microorganismos contaminantes, las medidas de higiene deben ser rigurosas e inflexibles. Algunos de los pasos para mantener la higiene del personal son:

1. Lavarse las manos y antebrazos con un jabón bactericida líquido, antes de iniciar labores en el laboratorio.

2. Afeitarse y cortarse las uñas y el cabello periódicamente, con esto se disminuye los sitios de alojación de los microorganismos en el cuerpo humano.

3. Colocarse la bata del laboratorio, previamente esterilizada.

4. El personal debe desprenderse de relojes y anillos cuando esta laborando.

5. Empaparse las manos y antebrazos con alcohol etílico al 70% o 96%, a intervalos regulares mientras se trabaja en las cámaras de flujo laminar, o al manipular cualquier muestra de los cultivos y cuando se realizan los monitoreos y observaciones periódicas de rutina.

6. Bañarse inmediatamente después de fumigar en el laboratorio con bactericidas, fungicidas o insecticidas. Esta medida de seguridad es importante para el fumigador, pues se eliminan los residuos químicos que pueden haberse adherido a la piel.

4.3 Medidas de seguridad y de asepsia.

El laboratorio de cultivo de tejidos es muy similar a cualquier otro laboratorio; sin embargo, se diferencia en las condiciones de esterilidad y desinfección necesarias para manipular los explantes y los medios de cultivos. Esta característica conlleva a la utilización de muchas técnicas de asepsia presentadas a continuación:

1. Esterilizar la cristalería y equipo de disección, ya sea por el método de calor seco o húmedo. El calor seco utiliza hornos a temperatura de 160 °C o más; el calor húmedo utiliza autoclaves a temperaturas de 121 °C x 20 minutos.

2. Se requiere de un área estéril, que es proporcionada por las cámaras de flujo laminar, que retienen partículas de 0,3 nm. Estas se deben ubicar en un cuarto aislado de las corrientes de aire que pueden transportar las esporas.

3. Encender las cámaras 30 minutos antes de utilizarlas para eliminar cualquier partícula de polvo que exista.

4. Dejar paso libre al flujo de aire entre la pantalla y el área de trabajo.

5. No tocar las superficies que mantienen contacto con los tejidos.

6. Evitar pasar las manos por encima del material que se trabaja.

7. Flamear la boca de los frascos que contienen los medios de cultivo antes y después de sembrar los explantes.

8. Sumergir las pinzas en alcohol periódicamente mientras se están utilizando y alejar el alcohol de la llama.

Otras medidas de seguridad y asepsia las constituyen la desinfección de la cámara de flujo laminar de tipo artesanal asperjando alcohol al 96% en las rendijas y vidrios, alcohol al 70% en el resto de la cámara y sumergir los filtros que se coloquen en los extractores de la cámara en alcohol al 96 % cada 15 días (Cámaras artesanales).

Todo material que esta relacionado con la preparación de medios de cultivo debe ser estéril. Las tapas y frascos destinados a contener los medios de cultivo deben estar esterilizados previamente. Las tapas se sumergen en una tina con jabón bactericida , luego en un tanque de 5 galones con 8 onzas de hipoclorito de sodio, se envuelven con papel de aluminio en grupos de 25 tapas y se autoclava a 15 libras de presión por 20 minutos y a una temperatura de 121°C. Los frascos después de sumergirse en hipoclorito de sodio al 2 % se autoclavan a 15 libras de presión durante 15 minutos, antes de verter en ellos los medios.

Los medios de cultivos atraen insectos como las hormigas las cuales pueden ser portadoras de bacterias y hongos, por ende se toma medidas de seguridad como colocar en la base de los anaqueles que almacenan los medios, un recipiente que contenga una solución líquida con un fungicida incorporado para evitar que los insectos trepen hasta los medios.

4.4 Recibimiento del material vegetativo del campo y vivero.

Al recibo de material vegetativo procedente del campo, se sigue un protocolo para registro de datos, estos pueden ser por ejemplo:

-Lugar de procedencia del material:

-Fecha (día, mes y año).

-Nombre del material vegetativo: Si es una especie, se anota el nombre científico, si es un híbrido se anota el nombre de los padres o el nombre comercial Ejemplo: *Dendrobium sp, Madan Vaiper.*

-Parte vegetativa extraída: Se anota el nombre del tejido u órgano extraído de la planta, ejemplo: Si es una cápsula, meristema, apical, radical, yemas axiliares, hojas, embriones o primordios.

-Cantidad: Se anota el número de explantes recibidos (cápsulas, estacas, etc.).

-Condición: Se anota el estado en que se recibió el material vegetativo.

-Código: El laboratorio que recibe el material vegetativo le asigna un código para identificar las especies dentro del laboratorio.

-Nombre del colector y código o número de colecta del mismo.

4.5 Esterilización del material a introducirse.

Una vez que el laboratorio reciba el material vegetativo, este lo debe esterilizar para eliminar contaminantes adheridos a sus superficies, tales como, grasas y aceites, esporas de hongos, bacterias, tierra húmeda, etc. En caso de recibir una cápsula (Anexo, Fig. 28) se le cortan los restos florales; se sumerge la cápsula en un recipiente con jabón bactericida, durante 5 a 8 minutos agitándolo en forma circular. Se sumerge en dos ocasiones en hipoclorito de sodio grado comercial de 5.25%, sin diluir por un tiempo de 5 a 8 minutos agitando en forma circular.

Tiempo de exposición de las cápsulas en NaClO varía de acuerdo a el grosor de la cápsula, ejemplo: *Cattleya sp., Laelia sp., Lycastes sp.*, presentan cápsulas de texturas

gruesas, por lo que se sumergen en NaClO por un periodo de 15 a 20 minutos; sin embargo, especies como *Comparetia sp.*, *Pescatoria sp.*, y *Bletia sp.*, que presentan cápsulas con texturas delgadas, se sumergen por 5 a 10 minutos.

El recipiente se cubre con papel aluminio y se limpia con alcohol al 95 %; una vez en la cámara de flujo laminar, se extrae con pinzas esterilizadas, se flamea y se abre; si se trata de meristemas se extrae con las pinzas esterilizadas y se procede a disectar.

Si se trata de anteras, se sumergen en etanol al 70 % por diez minutos o NaClO al 0.8 % por cinco minutos. Sin embargo, al trabajar con médulas, se sumergen en etanol al 70 % por 20 segundos o NaClO (Roca & Mroginski, 1991).

4.6 Monitoreo periódico de contaminados.

Es difícil lograr cultivos completamente estériles en el estricto sentido de la palabra, aún con todas las medidas de asepsia (Anexo, Fig. 29). Una vez detectados los cultivos contaminados o muertos en la sala de crecimiento (Anexo, Fig. 30) se deben anotar en una lista los siguientes datos:

1. Código de la planta: Se anota el nombre de la planta de la cual se extrajo el explante que se cultivó. Si se trata de un clon (grupo de plantas genéticamente idénticas que han sido reproducidas en forma asexual), se anota el nombre del híbrido del cual se extrajo y el número del clon.

2. Fecha: Se debe registrar la fecha en la que fue sembrado o subcultivado el explante. Si son varios frascos de la misma especie o híbrido con diferentes fechas se anota la fecha de cada frasco.

3. Medio de crecimiento: Se anota el nombre del medio en que se encontraba el explante.

4. Tipo de envase: Se anota el volumen y tipo de envase, ejemplo: Gerber de 4 onzas, phytacon grande o pequeño o botellas.

5. Cantidad: Se registra el número de frascos que se contaminaron y se anota por especie o híbrido (Anexo, Fig. 31).

Todas estas anotaciones se registran con el objetivo de llevar un control de existencia de las especies en el laboratorio y así priorizar las especies que se van a subcultivar de acuerdo a los niveles de sobrevivencia y comportamiento.

5. Preparación de medios.

El desarrollo de los explantes *in vitro*, depende de las características del sustrato nutritivo en que crecen. La elaboración de los medios de cultivo conllevan una serie de pasos como lo son la preparación de soluciones madres, ajustes del pH, dilución del agar y distribución del medio, y por último la esterilización del medio.

Las soluciones madres permiten la elaboración en concentraciones adecuadas diluidas de las soluciones salinas. Las mismas deben mantenerse en refrigeración o a temperatura ambiente, sino se conoce su estabilidad; las soluciones de hierro deben guardarse en frascos ámbar para evitar su degradación por la luz.

Se ajusta el pH, de los medios con soluciones de NaOH y HCl, este factor es importante porque el pH del medio determina una buena o mala gelificación.

Luego de disuelto el gelificante, con la ayuda de agitadores, se procede a distribuir los medios de cultivo en los envases de la siguiente manera:

1. Se limpia la mesa con alcohol al 70 %.

2. Se colocan sobre la mesa, los envases boca abajo.

3. Se flamea la boca de los envases.

4. Se procederá a verter los medios en los frascos.

5. Inmediatamente se tapan con tapas esterilizadas.

La esterilización de los medios se realiza colocándolos en el autoclave ó olla de presión (Anexo, Fig. 32) a partir de las 15 libras de presión durante 20 minutos a 121 °C; es importante medir el tiempo y la presión, porque si se excede en el tiempo de esterilización, el medio se carameliza, es decir los carbohidratos se degradan.

Luego se guardan los envases con los medios de cultivo en los anaqueles para que se enfríen y gelifiquen.

6. Medios utilizados.

Los medios de cultivo *in vitro* varían enormemente en sus dosis de elementos químicos como son macronutrimentos, fuentes energéticas, azúcares, aminoácidos, hormonas, complejos aditivos, agentes gelificantes, rangos de pH, etc., de acuerdo al tipo de explante, la especie y propósito deseado.

En Biotech de Panamá se utilizan como medios principales:

- El medio B1, el cual es un medio utilizado para la germinación de semillas. Este es un medio Murashige y Skoog modificado que no contiene reguladores de crecimiento.

- El medio MLT, es un medio Murashige y Skoog modificado con reguladores de crecimiento.

- El medio AR1, es un medio utilizado para el crecimiento y finalización de las plántulas, con reguladores de crecimiento pero sin agua de coco.

7. Explantes utilizados.

Los explantes pueden ser extraídos de células que se mantienen en constante división, alargamiento y multiplicación conocidos como meristemas en el cultivo de tejidos *in vitro* y estas pueden ser meristemas apicales basales y axilares .

Otros tipos de explantes se extraen de segmentos de tallos raíces y hojas. Estas células por su alto grado de especialización deben ser inducidas a la formación de callos, que son grupos de células que crecen en forma irregular y se multiplican formando masas amorfas.

Existen otros explantes que pueden ser utilizados en el cultivo de tejidos *in vitro*; sin embargo, en Biotech de Panamá se utiliza la germinación *in vitro* de las semillas que se encuentran en las cápsulas de las orquídeas. Esta práctica no perjudica a los donadores de las cápsulas ya que ellos se quedan con la planta madre y a cambio de la cápsula reciben plántulas; también esto trae consecuencias significativas en pro de la conservación de nuestros bosques por que no es necesario extraer plantas adultas del bosque para sacarles otros explantes. La desventaja de usar este explante consiste en que

las plántulas obtenidas no siempre son iguales a las madres, por tanto no es recomendable en la reproducción de plántulas híbridas.

7.1 Técnicas utilizadas para extraer el explante.

Las cápsulas son tomadas de las plantas cuando maduran.

- Se anota el nombre o código de la planta en una libreta.

-Se dobla el tallo de la cápsula.

- Se le marca a la cápsula, un número que corresponda a la anterior anotación, con la ayuda de un objeto punzante, como una aguja de disección.

- Luego son transportadas al laboratorio en donde se somete al proceso aséptico.

- Se sumergen en envases con jabón bactericidas (CITRUS), agitando durante 10, 15, 20 ó 30 minutos dependiendo de la consistencia de la cápsula, ejemplo las cápsulas de *Dendrobium sp.*, y *Brassabola sp.*, son bastantes resistentes por tanto se pueden esterilizar por mas tiempo. También hay que tomar en cuenta el estado de la cápsula, si esta picada por insectos, o se esta abriendo naturalmente.

- Se sumergen en envases con hipoclorito de sodio (Clorox Comercial), agitando durante 10, 15, 20 ó 30 minutos dependiendo de las condiciones anteriormente descritas.

- Se recicla el clorox en otro envase cuidando de no tocar las cápsulas con la mano.

- Se tapan los envases y se llevan inmediatamente a la cámara de flujo laminar.

7.2 Desarrollo del explante *in vitro*.

Una vez en la cámara de flujo laminar, las cápsulas son sacadas de los envases una por una y con la ayuda de un bisturí y pinzas estériles se le hace un corte longitudinal (Anexo, Fig. 33).

- Se coloca la mitad de la cápsula en un plato petri.

- En la otra mitad se le realiza un raspado, para aflojar las semillas de la cápsula.

- Se dispersan las semillas en el medio de cultivo, que puede ser B1.

- Se espera a que las semillas germinen, formando un grupo de células verdes llamadas protocormo.

- Luego se separa y se colocan en medios que pueden ser AR1.

- Después de un tiempo (meses dependiendo de la especie), se separan las plantas y se colocan en nuevos medios de cultivo. Si se desea multiplicar las plantas, o se desea clonar una de ellas se colocan en medios MLT (Anexo, Fig. 34).

- Finalmente se espera a que las plantas tengan un tamaño promedio entre 3.5 a 5.0 cm de alto.

- Se considera entonces que estas plántulas están listas para ser vendidas localmente o ser exportadas al exterior.

Es importante recalcar que el período de incubación bajo condiciones de luz y temperatura controladas va de acuerdo a las condiciones ambientales de donde se extrajo

la planta. Por último la empresa necesita realizar inventarios periódicos del material vegetativo en existencia (Anexo, Fig. 35).

7.3 Adaptaciones de las plantas *in vitro* a las condiciones exteriores.

Después que las plántulas tienen raíces y tamaño apropiados están listas para ser trasladadas del laboratorio y dar inicio a la etapa de adaptación al ambiente exterior o de invernadero.

- Las plántulas se sacan de los medios, lavando sus raíces, cuidando de que no quede residuo del medio de cultivo.

- Luego se colocan envases apropiados para su crecimiento, que contienen materia orgánica (Peat moss) y perlas.

- Se le coloca la etiqueta que lo identifica, estas se pueden hacer de tiras de aluminio, obtenidas de latas de cerveza y se marcan con un clavo.

- Se fumigan, fertilizan y riegan periódicamente.

- Finalmente si se desea se transplantan a estopa de coco, troncos, raíces de Negra jorra, etc.

Conclusiones

Una de las mejores maneras de aprender y poner en práctica los conocimientos teóricos aprendidos en la Universidad, se obtiene a través de la Práctica Profesional en un ambiente de producción real y al mismo tiempo aprender técnicas que le complementaran para su mejor desempeño en el futuro.

La ventaja de tener conocimientos previos en un área determinada es que nos permite un dominio y mayor seguridad en está; por ello, se hizo necesario la realización de un capítulo sobre el comportamiento fisiológico de las plantas. Con esto se afianzó en este tema y fue posible un mejor entendimiento de los conceptos sobre micropropagación y cultivo de tejidos.

Las plantas desarrollan mecanismos para su crecimiento ya sea en condiciones naturales o *in vitro*. Sin embargo, en la naturaleza estos mecanismos están regulados por las condiciones climáticas en general. Mientras en cultivo *in vitro* tales mecanismos están completamente determinados por las condiciones a las cuales son sometidas, independientemente de las condiciones climáticas del exterior.

La técnica de cultivo *in vitro* es una alternativa viable para la propagación masiva de plantas que puedan estar en peligro de extinción, o que por sus sub productos (alimentos, medicinas, entre otros), amerita el someterlas al cultivo *in vitro*.

Para iniciar una empresa en cultivo de tejidos, es necesario realizar estudios previos sobre la estructura arquitectónica del laboratorio, sus condiciones asépticas, las características de las plantas con que se desea trabajar y un estudio sobre costos-beneficios.

Recomendaciones

Considero como un aporte a la empresa Biotech de Panamá la elaboración y confección del documento que constituye el informe final de mi práctica profesional, del cual se podrían beneficiar otros estudiantes que deseen ingresar a la empresa a realizar otras prácticas profesionales, pues les da una idea, de lo que ellos podrían realizar en la empresa., por tanto, el mismo podrá ser usado como referencia de algunas labores a ejecutar. Además el documento consta con información sobre las bases fisiológicas vegetales y el cultivo de tejidos.

Debido a que las plantas sometidas a cultivos *in vitro* necesitan ser transplantadas, multiplicadas y clonadas, para poder ser propagadas o vendidas en forma masiva; necesitan de un cuidado continuo, este cuidado demanda gran cantidad de tiempo. Tiempo con que no se cuenta si la cantidad de personas que laboran en dicha empresa es poca. Por lo tanto es recomendable tener personal permanente en actividades como subcultivos de plantas y preparación de medios; en forma rotativa, de manera tal que si falta uno o dos empleados, su actividad puede ser realizada por cualquiera de los trabajadores restantes. Así, no se interrumpirá ninguna actividad de la empresa por desconocimiento del proceso o por falta de personas para repartirse el trabajo.

Para que una empresa de cultivo de tejidos obtenga grandes ventas a nivel local o internacional, o sea del conocimiento público de que pueden contar con el método de cultivo *in vitro* para propagar sus plantas, es necesario invertir en publicidad ya sea a través de internet, o cualquier otro medio audiovisual o escrito.

El rol entre Empresa y Universidad debe ser contínuo, mediante la realización de actividades en conjunto, como investigaciones científicas o desarrollando congresos, foros, cursos y asesorías. Estas actividades les permitirían a las Empresas recibir

estudiantes para realizar prácticas profesionales, que serían de beneficio recíproco, porque los estudiantes podrían ayudarles en las labores a la empresa y a la vez obtendrían su título.

Bibliografía.

Avers, C. 1991. Biología celular. 2 ed. México D.F. México. Editorial Iberoamericana 748 pp.

Chang, R. 1992. Química. 4 ed. México D.F. México. Mc Graw-Hill. 1065 pp.

Devlin, R. 1980. Fisiología vegetal. 3 ed. España, Barcelona. Ediciones Omega. 493 pp.

Fernades, G. & M. Johnston. 1986. Fisiología vegetal experimental. Costa Rica. Servicio Editorial IICA . 411 pp.

Hartmann, H. & D. Kester. 1989. Propagación de Plantas. Principios y prácticas. CECSA. México. 592 pp.

Hurtado, D. & M. Merino. 1997. Cultivo de Tejidos Vegetales. 4ta. edición. México D.F, Editorial Trillas. 162 pp.

IICA.. 1987 II Curso de Cultivo de Tejidos. Catie, Turrialba; Costa, Rica. pp. 11-58.

Jones, S. 1987. Sistemática Vegetal. México, D.F. México. Editorial Mc Graw-Hill.

Larson, R. 1988. Introducción a la floricultura. México, D.F. México. Editorial AGT S.A. 146 pp.

Melo, J. A. & S. Martínez. 1990. Historia antigua y Edad media. Colombia. Manfer. 138 pp.

Miller, T. 1994. Ecología del medio ambiente. México, D.F. México. Editorial Iberoamnerica. 867 pp.

Miller, E. 1967. Fisiología vegetal. 1 ed. México D.F. México. Editorial Ispanoamericana. 362 pp.

Montes, A. 1989. Apuntes del curso de posgrado. Horticultura. Escuela agrícola. Panamericana. El Zamorano. Honduras. 9 pp.

Ortega, E. E. 1992. Obtención de híbridos interespecíficos entre frijol común (*Phaseolus vulgaris L.*) y el frijol tepari (*P. acutifolius* A. Gray) mediante el rescate y cultivo *in vitro* de embriones. Tesis Ing. Agr. Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano, Honduras. 61 pp.

Paton, S; I. Castro & P. Whelan. 1994. Introducción a la Bioestadística de Campo. Ecuador. pp. 1-3

Roca, W. & L. Mroginski. 1991 Cultivo de Tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones. Colombia, Cali . Editorial CIAT. 969 p.

Rodríguez, M. 1991. Resumen de curso de posgrado. Fertilizantes. Escuela Agrícola Panamericana. El Zamorano. Honduras. 29 pp.

Rojas, M. 1980. Fisiología Vegetal Aplicada. México, D.F. México. Mc Graw-Hill. 364 pp.

Rosas, J. 1988. Resumen de Curso de Posgrado. Principios y practicas para la producción de cultivos. Escuela Agrícola Panamericana. El Zamorano. Honduras. 43 pp.

Saldivar, R. 1994. Fisiología Vegetal. México, D.F. México. Editorial Trillas. 237 pp.

Salisbury, B. & C. Ross. 1994. Fisiología Vegetal. , México, D.F. México. Editorial Iberoamericana 759 pp.

Sivori, E.; E. Montaldi. & O. Caso. 1980. Fisiología Vegetal. , Buenos Aires, Argentina. Editorial Hemisferio Sur 681 pp.

Solomon, E.; L. Berg.; D. Martin. & C. Villeé. 1996. Biología de Villeé. 3 ed. México. Interamericana - Mc Graw-Hill. 1193 pp.

Stanfield, W. 1995. Genética. 3 ed. México, D.F. México. Mc Graw-Hill. 574 pp.

Taylor, R. 1987. 50 Hechos Sobre Nuestro Planeta. 2 ed. México, D.F. México. Compañía Editorial Continental. 39.pp.

Villeé, C. 1969. Biología. 5 ed. México, D. F. México. Interamericana. 688: (43 - 118) pp.

Wilson, C. & W. Loomis, 1968. Botánica. 1 ed. México. Impreso por el Centro Regional de ayuda técnica (AID) 682 pp.

Woodlant, D. 1997. Contemporany Plants Sistematics. II Edición. Michigan, USA. Andreuw the university prents. pp. 12-31

ANEXOS



Fig. 16. Destilador de agua

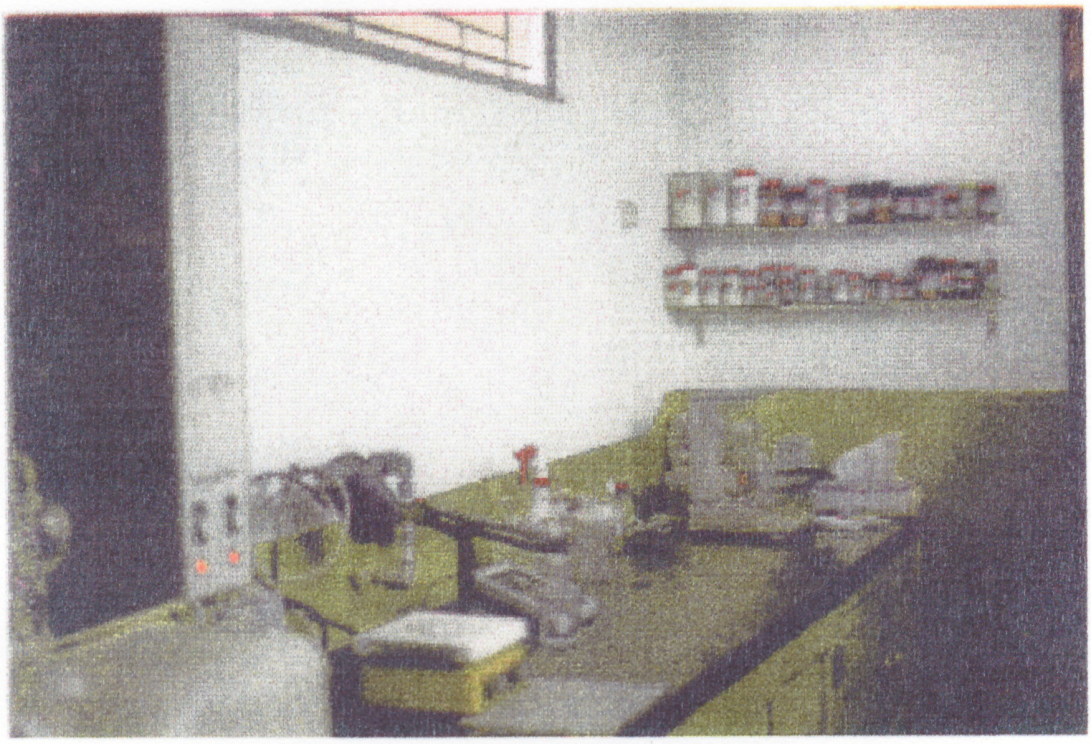


Fig. 17. Sala de preparación de medios



Fig. 18. Gabinetes

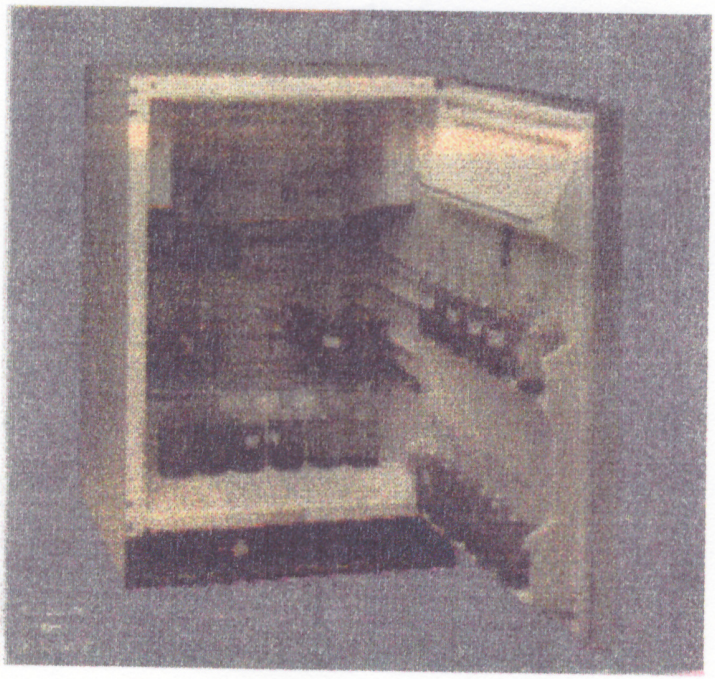
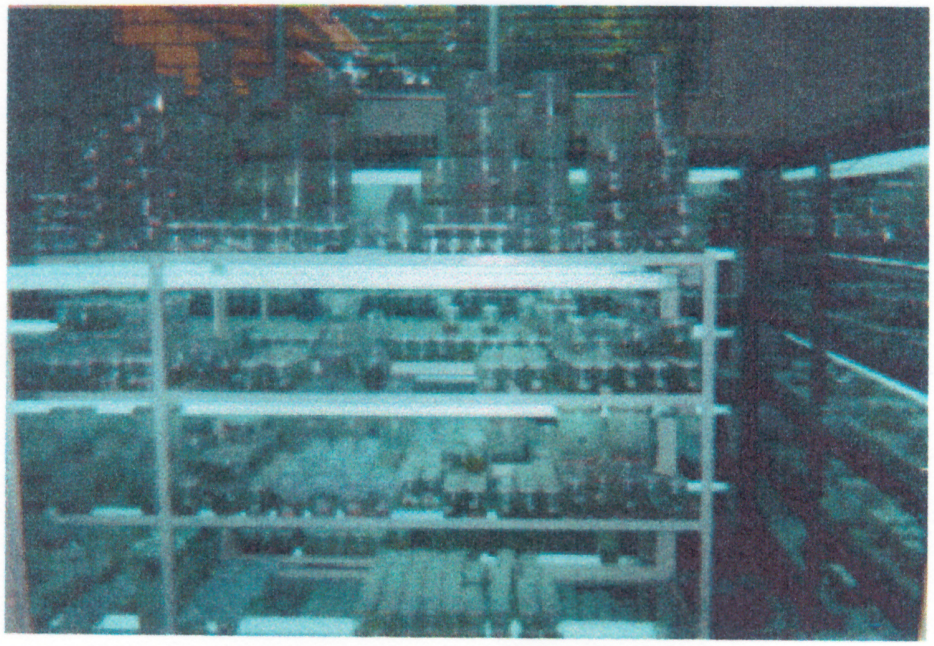


Fig. 19. Nevera



Fig. 20. Balanza analítica, Agitador magnético, pHmetro



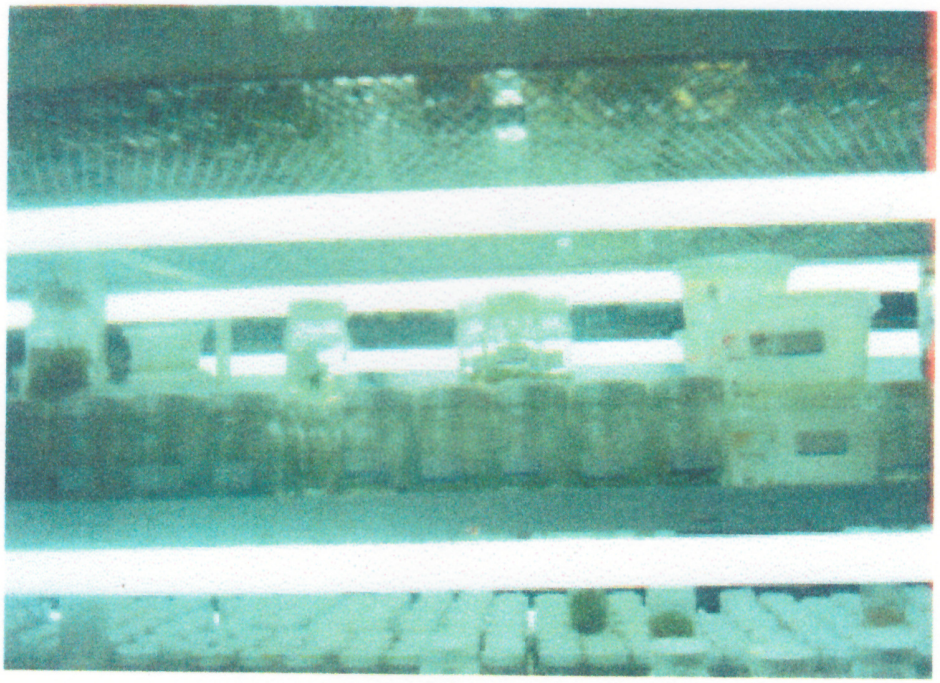


Fig. 21a y21b. Sala de crecimiento

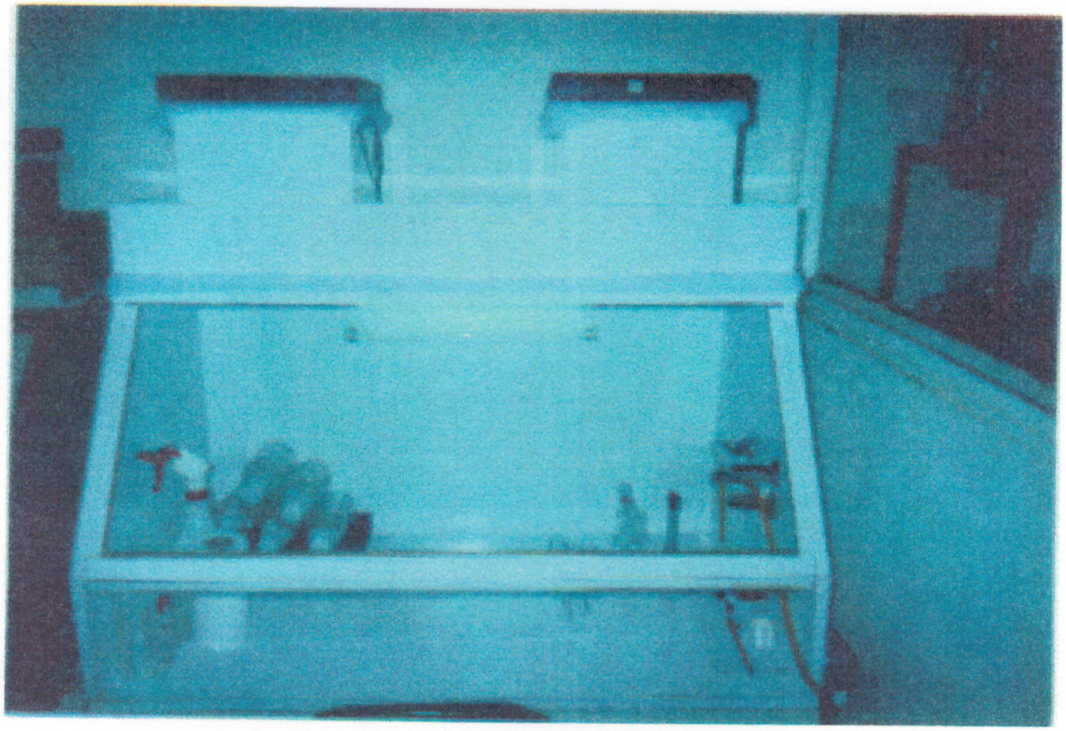


Fig. 22 Cámara de flujo

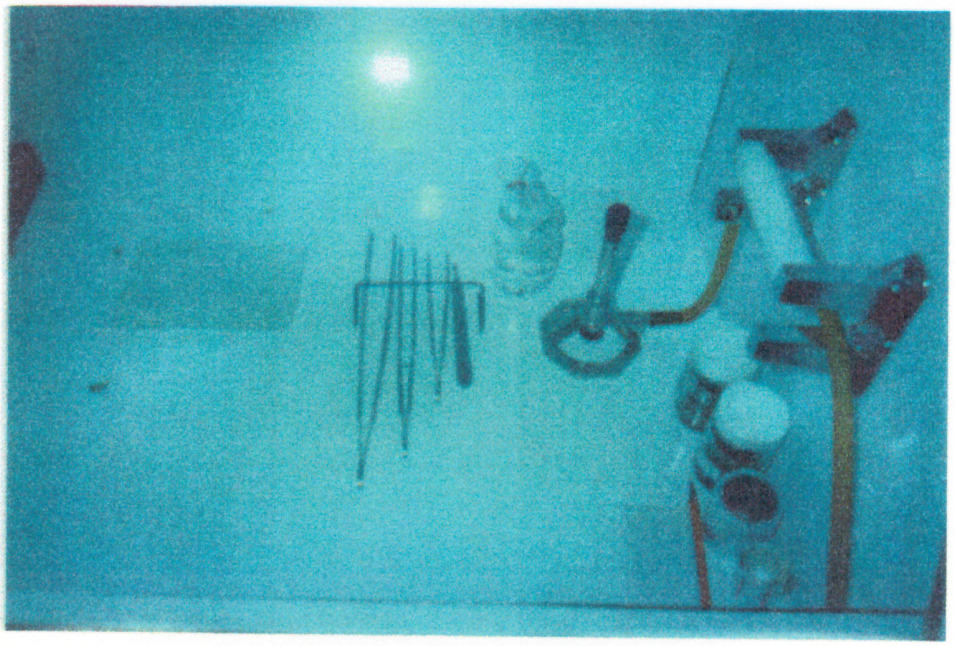




Fig. 23 a y 23b. Instrumentos y materiales necesarios en la cámara



Fig. 24. Vivero de aclimatación



Fig. 25. Invernadero

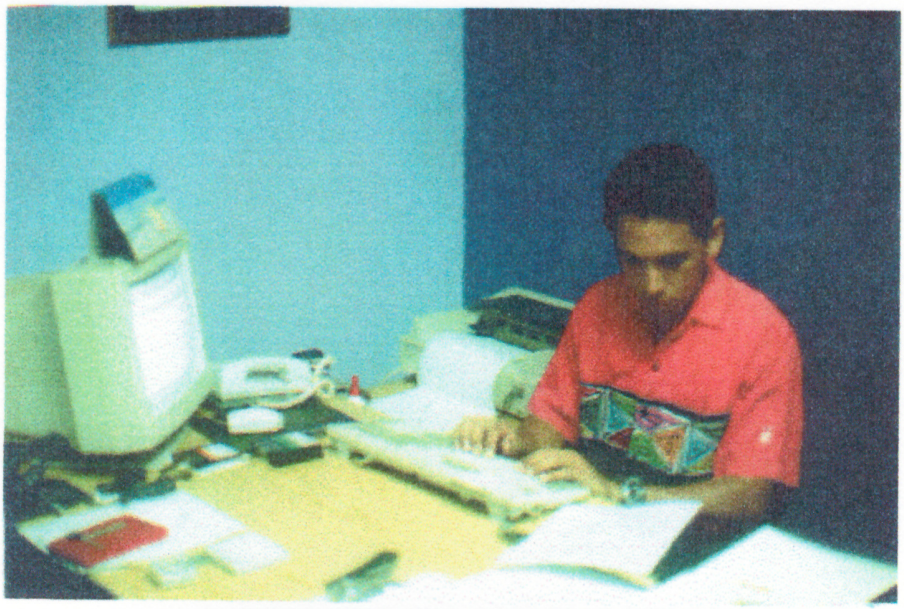




Fig. 26a y 26b. Oficina de BioTech de Panamá

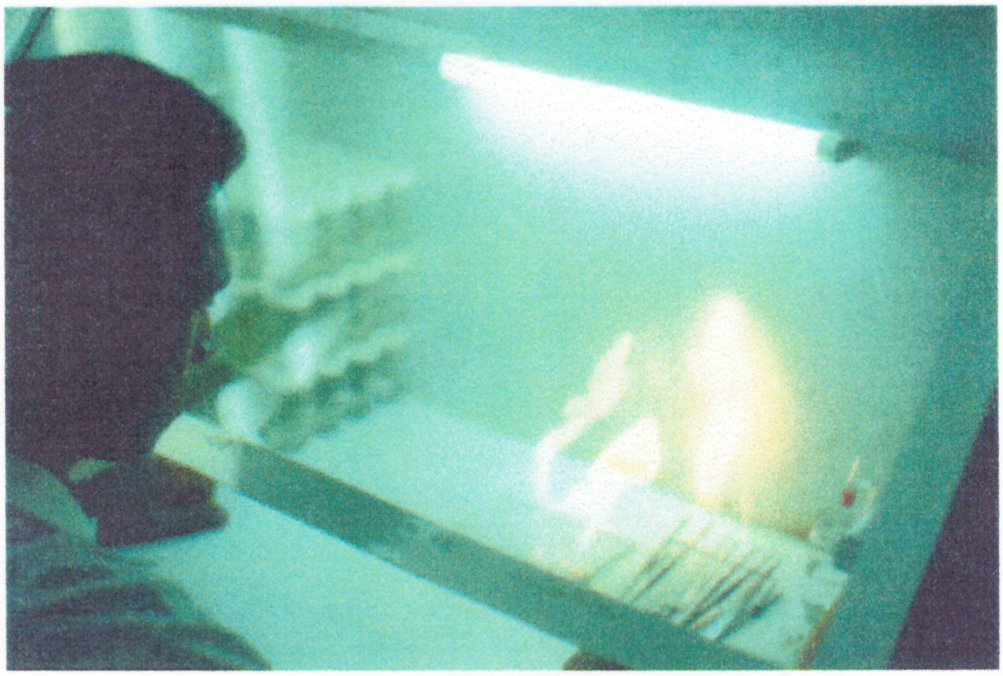


Fig. 27. Medidas de asepsia



Fig. 28. Cápsulas de orquídeas



Fig. 29. Material contaminado



Fig. 30. Identificación de contaminados

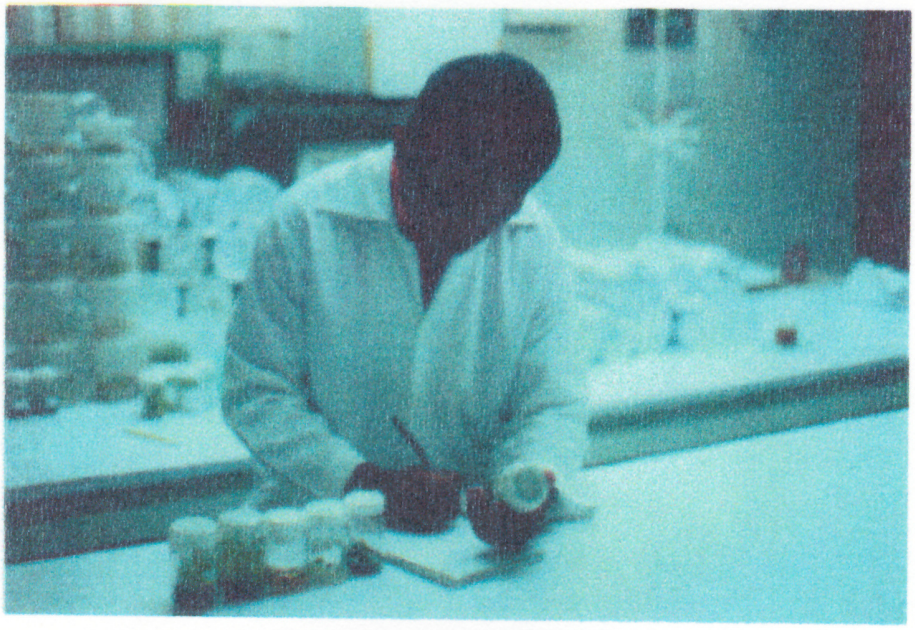
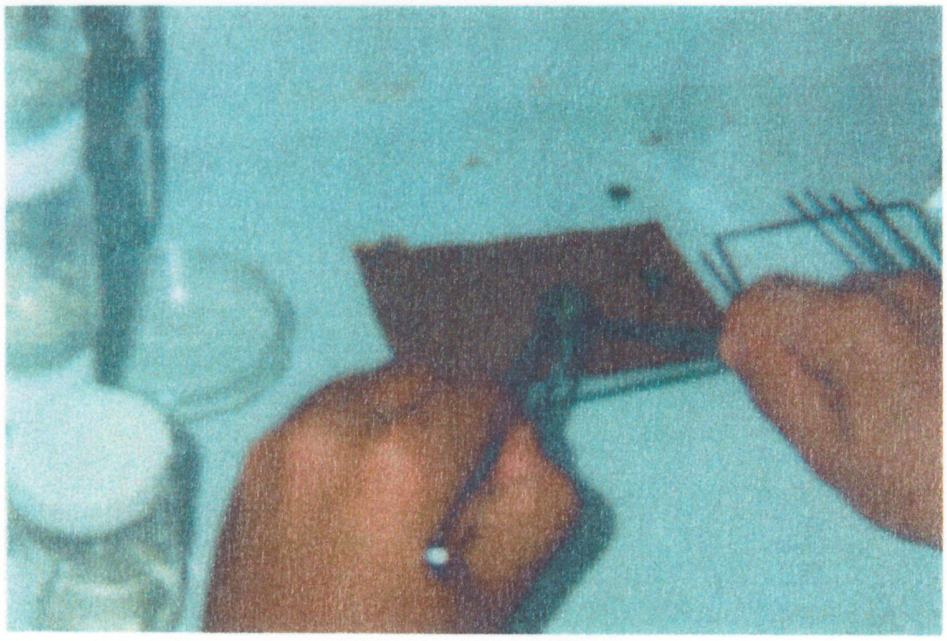


Fig. 31. Registro de contaminados



Fig. 32. Esterilización



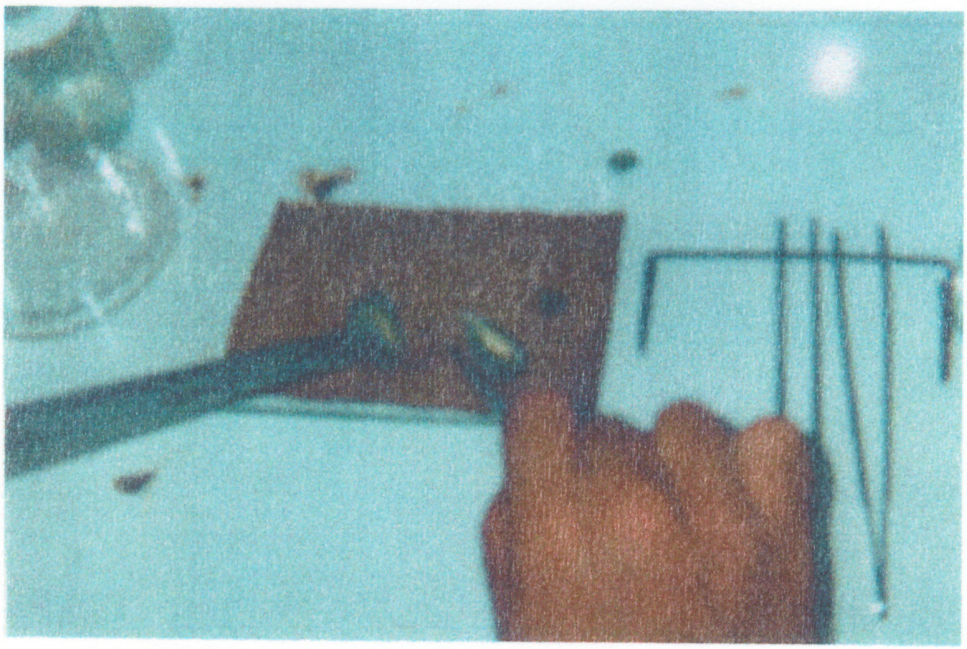
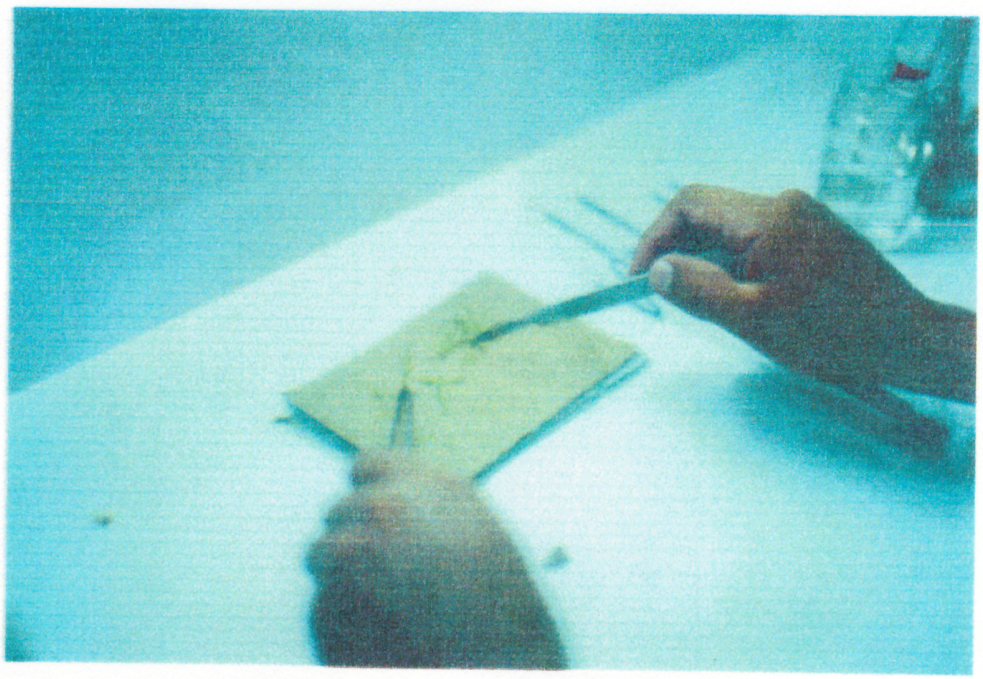


Fig. 33 a y 33b. Manipulación de las cápsulas



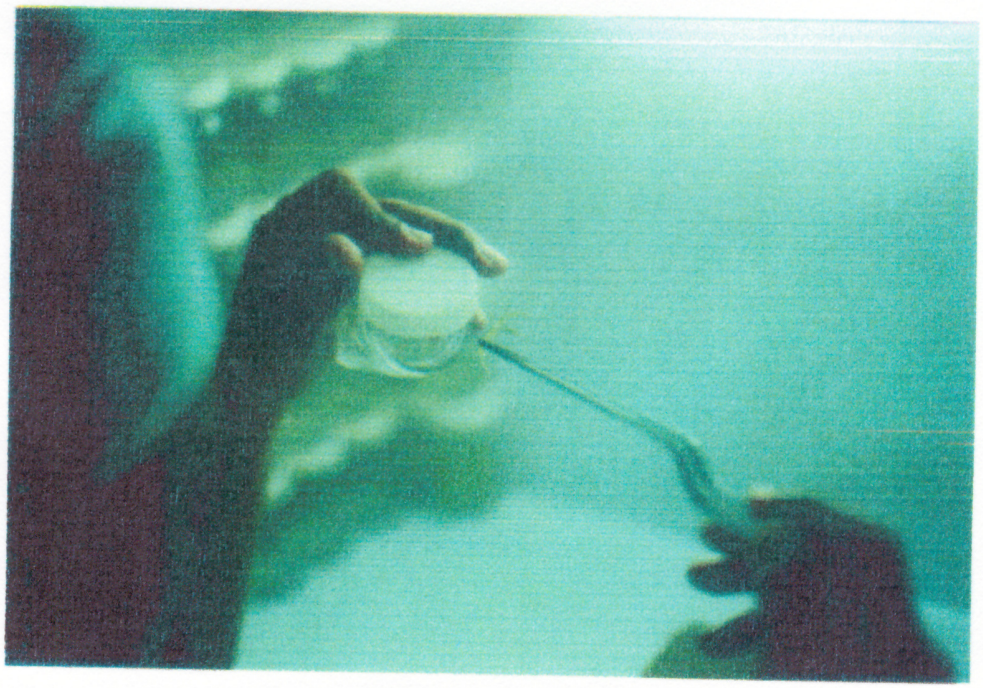


Fig. 34 a y 34b. Manipulación de las plántulas

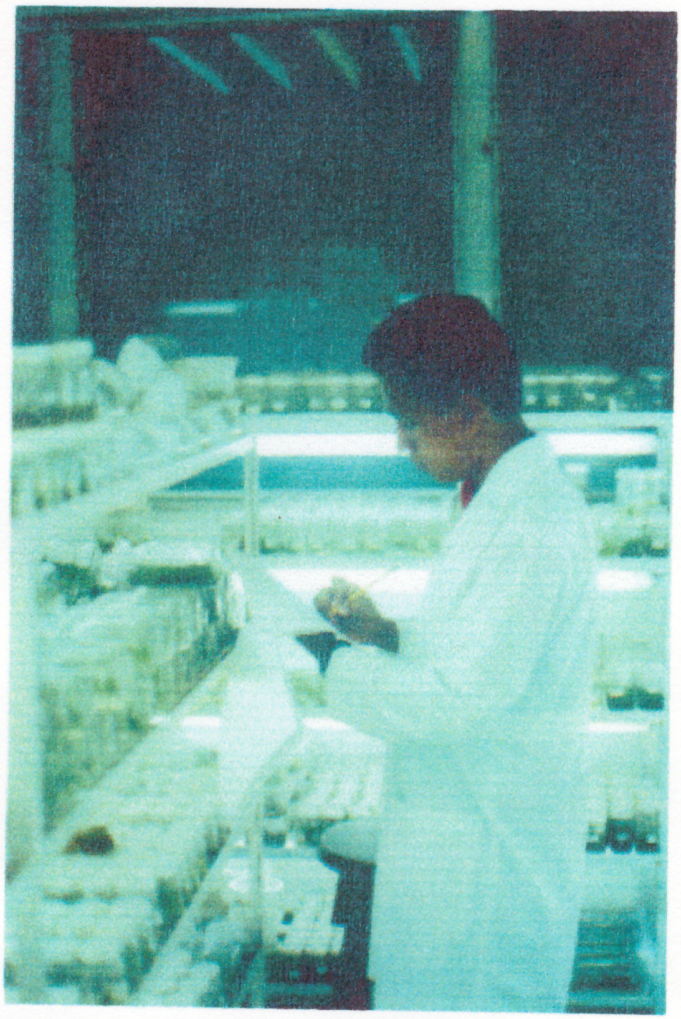


Fig. 35. Inventario de material vegetativo en existencia en el laboratorio

Esta práctica fue preparada bajo la dirección del consejo principal del comité de profesores por parte de la Universidad Autónoma de Chiriquí y personal capacitado por parte de la empresa Biotech de Panamá, quienes asesoraron a él candidato en la elaboración de su práctica. La misma ha sido aprobada por las autoridades de la Facultad de Ciencias Naturales y Exactas de la UNACHI.

Fue presentada como requisito previo a la obtención del título de Licenciado en Biología.

Marzo 2000

UNACHI

Orlando Cáceres
MSC

Pedro Caballero
MSC

Clotilde Arrocha
MSC

Biotech de Panamá

Elvis Ortega
Ing.