

DESARROLLO DE SOFTWARE EDUCATIVO MULTIMEDIA PARA EL APRENDIZAJE EN EL
ESTUDIO DE CULTIVOS DE TEJIDOS VEGETALES



David Ricardo Grandas Cárdenas
Néstor Eduardo Suat Rojas

UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
INGENIERÍA DE SISTEMAS
VILLAVICENCIO
2016

MANUAL DEL USUARIO

David Ricardo Grandas Cárdenas
Néstor Eduardo Suat Rojas

UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
INGENIERÍA DE SISTEMAS
VILLAVICENCIO
2016

CONTENIDO

Pág.

1. DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA
2. INICIO DE SOFTWARE EDUCATIVO
3. MODULOS
 - 3.1 MODULO 1
 - 3.2 MODULO 2
 - 3.2.1 ELABORACIÓN DE STOCKS
 - 3.2.2 MACRONUTRIENTES
 - 3.2.3 MICRONUTRIENTES
 - 3.2.4 VITAMINAS
 - 3.2.5 FUENTE DE CARBONO
 - 3.2.6 FITOHORMONAS
 - 3.2.7 SUSTANCIAS ORGÁNICAS
 - 3.2.8 PRACTICA
 - 3.3 MODULO 3
 - 3.3.1 PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO
 - 3.3.2 MEDIO DE CULTIVO
 - 3.3.3 COMPONENTES MEDIO DE CULTIVO
 - 3.3.4 EJERCICIO PRACTICO
 - 3.4 MODULO 4
 - 3.4.1 Micro propagación In Vitro
 - 3.4.2 Planta donadora
 - 3.4.3 limpieza y desinfectantes
 - 3.4.4 Preparación de cámara de flujo laminar
 - 3.4.5 Meristemos
 - 3.4.6 Extracción, siembra e incubación

3.4.7 Micro Estacas

3.4.8 Crecimiento de Micro Estacas.

3.4.9 Propagación Masiva por Micro Estacas

3.5 MODULO 5

3.5.1 Introducción

3.5.2 Establecimiento ex vitro

3.5.3 Propagación por Mini Estacas

3.5.4 Protocolo para la producción de micro estacas

3.6 MODULO 6

3.6.1 Cultivo in vitro de meristemas y ápices

3.6.2 Meristemas

3.6.3 Ápices

3.6.4 Aplicaciones del cultivo in vitro de meristemas y ápices.

3.6.5 Establecimiento ex vitro

3.7 MODULO 7

3.7.1 Rescate y cultivo de embriones cigóticos

3.7.2 Eventos importantes

3.7.3 Factores que afectan el cultivo in vitro

3.7.4 Reguladores del crecimiento.

LISTA DE FIGURAS

| | Pág. |
|--|-----------|
| Figura 1. Página Principal | 08 |
| Figura 2. Barra Menú | 09 |
| Figura 3. Banner | 09 |
| Figura 4. Contenido | 09 |
| Figura 5. Inicio De Recorrido | 10 |
| Figura 6. Información De Inicio | 10 |
| Figura 7. Salón De Biología Molecular | 11 |
| Figura 8. Elemento De Biología Molecular | 11 |
| Figura 9. Lavado, Destilación Y Esterilización | 12 |
| Figura 10. Cuarto De Preparación De Medios | 12 |
| Figura 11. Invernadero | 12 |
| Figura 12. Preparación De Stocks | 13 |
| Figura 13. Concepto De Stocks | 13 |
| Figura 14. Macronutrientes | 14 |
| Figura 15. Micronutrientes | 14 |
| Figura 16. Vitaminas | 15 |
| Figura 17. Fuente De Carbono | 15 |
| Figura 18. Fitohormonas | 16 |
| Figura 19. Sustancias Orgánicas | 16 |
| Figura 20. Practica | 17 |
| Figura 21. Módulo 3 | 17 |
| Figura 22. Preparación De Medios De Cultivo | 18 |
| Figura 23. Medios De Cultivo | 18 |
| Figura 24. Componentes Medios De Cultivo | 19 |
| Figura 25. Ejercicio Practico | 19 |
| Figura 26. Índice Modulo 4 | 20 |
| Figura 27. Micro Propagación In Vitro | 20 |
| Figura 28. Planta Donadora | 21 |
| Figura 29. Limpieza Y Desinfectantes | 21 |
| Figura 30. Preparación De Cámara De Flujo Laminar | 22 |
| Figura 31. Meristemos | 22 |
| Figura 32. Extracción, Siembra E Incubación | 23 |
| Figura 33. Micro Estacas | 23 |
| Figura 34. Crecimiento De Micro Estacas | 24 |
| Figura 35. Propagación Masiva Por Micro Estacas | 24 |
| Figura 36. Módulo 5 | 25 |

| | |
|---|-----------|
| Figura 37. Introducción Ex Vitro | 25 |
| Figura 38. Establecimiento Ex Vitro | 26 |
| Figura 39. Propagación Por Mini Estacas | 26 |
| Figura 40. Protocolo Para La Producción De Micro Estacas | 27 |
| Figura 41. Módulo 6 | 27 |
| Figura 42. Cultivo In Vitro De Meristemas Y Ápices | 28 |
| Figura 43. Meristemas | 28 |
| Figura 44. Ápices | 29 |
| Figura 45. Aplicaciones Del Cultivo In Vitro De Meristemas Y Ápices. | 29 |
| Figura 46. Establecimiento Ex Vitro | 30 |
| Figura 47. Módulo 7 | 30 |
| Figura 48. Rescate Y Cultivo De Embriones Cigóticos | 31 |
| Figura 49. Eventos Importantes | 31 |
| Figura 50. Factores Que Afectan El Cultivo In Vitro | 32 |
| Figura 51. Reguladores Del Crecimiento. | 32 |

1. DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA

1.1 Presentación General.

Los programas Ingeniería Agronómica y Licenciatura en Producción Agropecuaria de la Universidad de los Llanos cuentan con cursos de Biotecnología o CTV como el programa de Ingeniería Agronómica y Lic. En Producción Agropecuaria, los cuales brindan a los educandos conocimientos científicos y destrezas que tienen creciente demanda a nivel local, regional y nacional en su perfil profesional de acuerdo con lo reportado por el Observatorio Colombiano de Ciencia y Tecnología. No obstante, el manejo de actividades en el laboratorio requiere pleno conocimiento en el área de cultivo de tejidos vegetales que involucra pleno conocimiento del mismo, de aparatos, instrumentos, reactivos, cuartos de incubación, de crecimiento y de procesos particulares para la preparación de stocks, medio de cultivo, manejo *in vitro* y *ex vitro* de plantas, cuestión en la que los estudiantes presentan dificultades para la ejecución de las actividades.

Por tal motivo, la integración de las TIC resulto ser un apoyo para el desarrollo del currículo de los cursos referidos. Sumado a estos materiales multimedia, la metacognición permite que el estudiante autorregular su aprendizaje, y aprenda a aprender, de tal manera que, en la orientación, a través de un software virtual e integrado con un modelo pedagógico, el estudiante va a ser el eje rector de su aprendizaje. Por eso se diseño y desarrollo del software educativo multimedia para el estudio de C.T.V con los componentes técnicos, pedagógicos y científicos va a permitir implementar a los usuarios, el material multimedia para su enseñanza y aprendizaje.

Página principal del Sitio Web Oficial de los procesos de aprendizaje para los programas de Ingeniería Agronómica y Lic. En Producción Agropecuaria de la universidad de los llanos.

Elementos que podemos observar en el sitio Web:

2. INICIO DE SOFTWARE EDUCATIVO

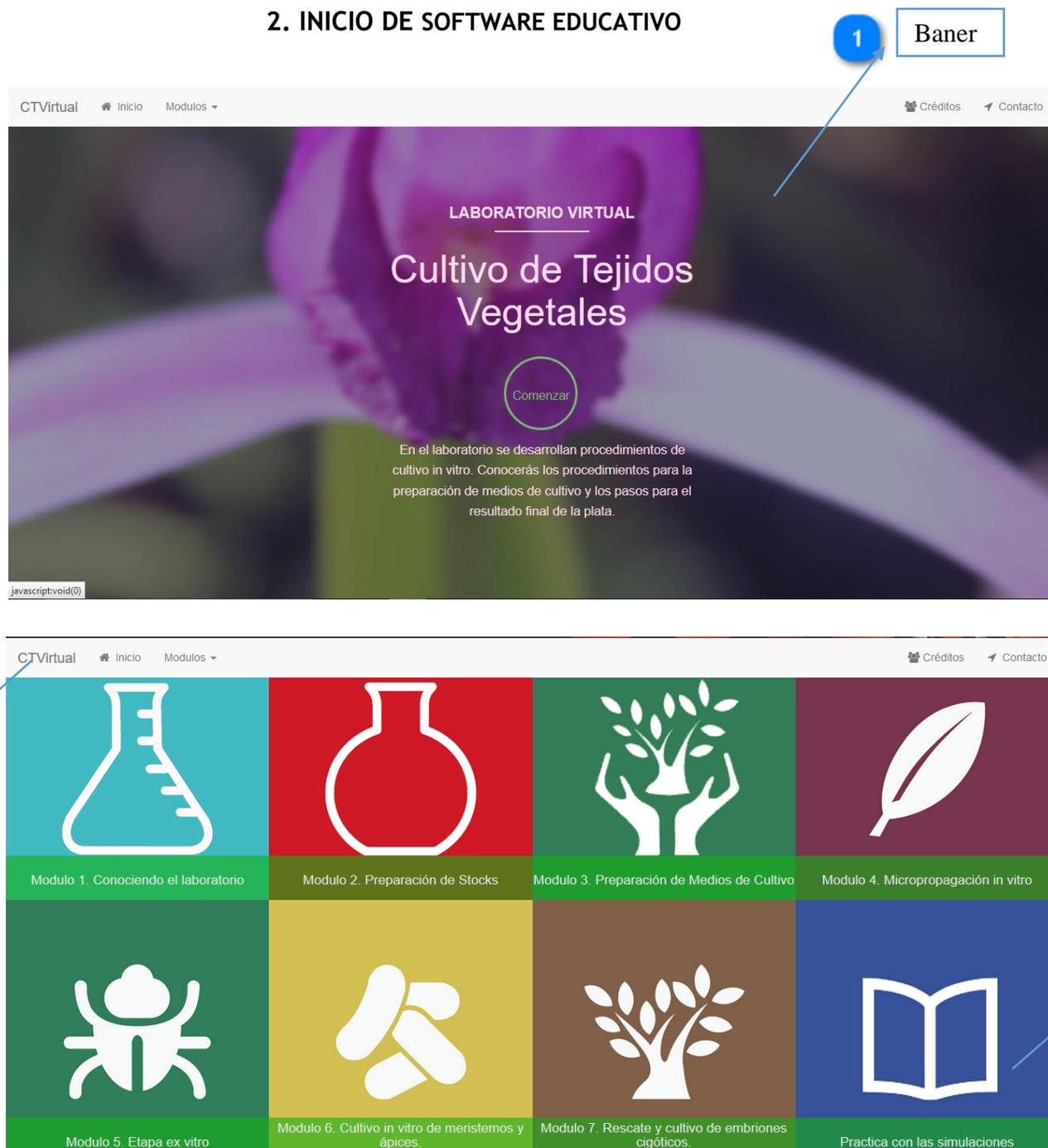


Figura 1 página principal

1 BARRA MENU

En esta sección se muestran los diferentes menús de opciones según los módulos solicitados.



Figura 2. Barra Menú

2 BANER



Figura 3. Baner

CONTENIDO



Figura 4. Contenido

Dependiendo de las opciones del menú, y de cada Módulo se mostrara un contenido diferente.

3. MODULOS

Con la existencia de los diferentes módulos, cada uno de estos mismos contienen una información correspondiente a la cual desea acceder. Este formato de selección consta de 8 campos en los cuales el usuario deberá elegir la opción según sea la necesidad de información.

3.1 Modulo 1

El modulo uno es una recopilación de la información encontrada en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales el cual tiene como utilidad darle al estudiante la oportunidad de observar y aprender lo relativo a las áreas de trabajo que va a encontrar en el transcurso de la aplicación de su conocimiento en el laboratorio.

Este módulo entrega un recorrido virtual de del laboratorio de cultivos vegetales de la universidad de los llanos e información de los elementos usados en el mismo.

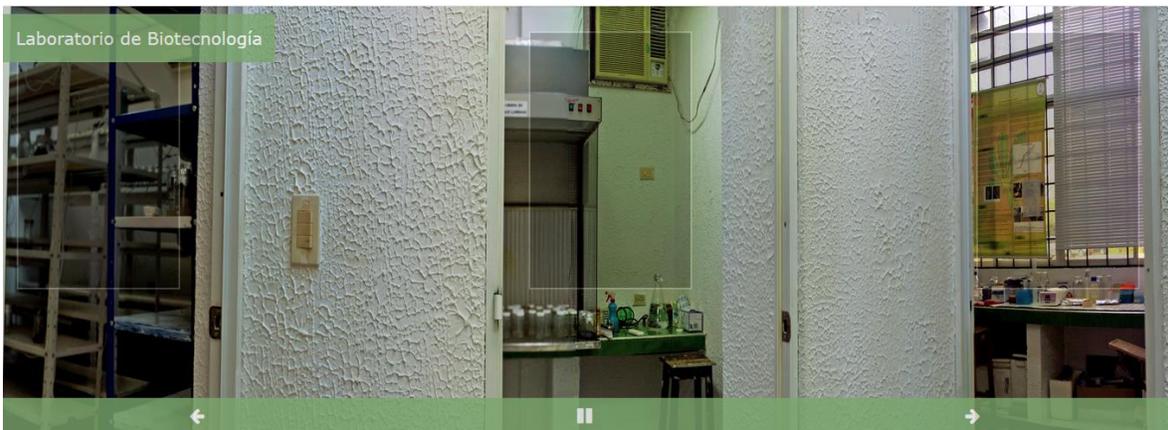


Figura 5. Inicio de recorrido



Figura 6. Información de inicio



Figura 7. Salón De Biología Molecular



Figura 8. Elemento De Biología Molecular



Figura 9. Lavado, destilación y esterilización



Figura 10. Cuarto De Preparación De Medios



Figura 11. Invernadero

3.2 Modulo 2

El modulo dos es una recopilación de la información necesaria para la elaboración de stocks la cual se le presenta al estudiante en una subdivisión de 7 presentaciones y un sub modulo de simulaciones lo que le da la oportunidad de observar y aprender lo relativo al área de la preparación de stocks.



Figura 12. Preparación De Stocks

3.2.1 Elaboración De Stocks

Es una descripción del concepto y materiales de los Stocks.

Introducción!

ELABORACIÓN DE STOCKS

Las tejidos vegetales in vitro necesitan unas concentraciones de macro y micronutrientes, vitaminas, fuente de carbono entre otros para su crecimiento y diferenciación. Generalmente estas fuentes son sintéticas por lo que son productos industriales, no obstante se puede suplementar con productos orgánicos como el agua de coco.

Medio MS ⓘ

Sotck(s) ⓘ



Figura 13. Concepto De Stocks

3.2.2 Macronutrientes

Es una descripción del concepto de Macronutrientes.

Elaboración

Macronutrientes

(Stock 1 y 2)

Los macronutrientes son los elementos que necesita la planta en mayor concentración. Estos se caracterizan en primarios (N, P y K) y secundarios (S, Ca y Mg); el C, H y O los obtiene del agua y del aire y fuente de carbono. Los nutrientes que necesita la planta, en mayor cantidad, son brindados por el stock 1 y 2 preparados a 50x y 333x respectivamente.

| Macronutrientes de stock 1 | | | |
|----------------------------|--------------------------------------|---------------|----------------|
| NÚMERO STOCK | COMPUESTO | CANTIDAD (gr) | AGUA DESTILADA |
| 1 | NO ₃ NH ₄ | 8,25 | 100 ml |
| | KNO ₃ | 9,5 | |
| | MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0,902 | |
| | KH ₂ PO ₄ | 0,85 | |



Figura 14. Macronutrientes

3.2.3 Micronutrientes

Es una descripción del concepto de Micronutrientes.

Elaboración

Los micronutrientes son elementos que la planta requiere en menor cantidad. Estos son el Boro (B), Manganeseo (Mn), Zinc (Zn), Cobre (Cu), Cobalto (Co), Molibdato (Mo), Cloro (Cl), Yodo (I) e Hierro (Fe).

Los micronutrientes que se aplican al medio de cultivo están divididos en 3 stocks. El stock 3, 4 y 5 y sus concentraciones se van aumentar a 1000X, 1000X y 200X, respectivamente. El stock 5 se aplica el NaEDTA en 10 ml de agua destilada. Luego en un Baker se aplica 15ml de agua destilada se pone al baño maría y se aplica el FeSO₄. Terminadas de preparar, las sustancias se mezclan y se llevan a un volumen de 25mL. Se debe cubrir con papel aluminio.

| Micronutrientes de stock 3 | | | |
|----------------------------|---------------------------------------|---------------|----------------|
| NÚMERO STOCK | COMPUESTO | CANTIDAD (gr) | AGUA DESTILADA |
| 3 | H ₃ BO ₃ | 0,031 | 1 ml |
| | MnSO ₄ ·H ₂ O | 0,0845 | |
| | CuSO ₄ ·5H ₂ O | 0,000125 | |
| | NaMoO ₄ ·2H ₂ O | 0,00125 | |
| | ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 0,043 | |
| | CoCl ₂ ·5H ₂ O | 0,000125 | |

| Micronutrientes de stock 4 | | | |
|----------------------------|-----------|---------------|----------------|
| NÚMERO STOCK | COMPUESTO | CANTIDAD (gr) | AGUA DESTILADA |
| 4 | KI | 0,004 | 1 ml |

| Micronutrientes de stock 5 | | | |
|----------------------------|-------------------|---------------|----------------|
| NÚMERO STOCK | COMPUESTO | CANTIDAD (gr) | AGUA DESTILADA |
| 5 | NaEDTA | 0,18625 | 25 ml |
| | FeSO ₄ | 0,13925 | |

Figura 15. Micronutrientes

3.2.4 Vitaminas

Es una descripción del concepto de Vitaminas.

Elaboración

Vitaminas

(Stock 6)

Generalmente, en el cultivo de tejidos se usa vitaminas del complejo B, principalmente necesita de la vitamina B1 o Tiamina. Designado aquí como stock 6. Éste se puede preparar a una concentración de 50X.

| Vitamina B1 de Stock 6 | | | |
|------------------------|-------------|---------------|----------------|
| NÚMERO STOCK | COMPUESTO | CANTIDAD (gr) | AGUA DESTILADA |
| 6 | Vitamina B1 | 0,0005 | 100 ml |



Figura 16. Vitaminas

3.2.5 Fuente de carbono

Es una descripción del concepto de Fuente de carbono.

Elaboración

Fuente de carbono

(Stock 7)

Las fuentes de carbono le brindan a los tejidos vegetales energía y regulación osmótica. El Mio-inositol es una de las más utilizadas. Generalmente se prepara el stock 7 a una concentración de 50X, aunque se recomienda hacer aplicación directa.

| Macronutrientes de stock 7 | | | |
|----------------------------|--------------|---------------|----------------|
| NÚMERO STOCK | COMPUESTO | CANTIDAD (gr) | AGUA DESTILADA |
| 7 | MIO-INOSITOL | 0,5 | 100 ml |



Figura 17. Fuente de carbono

3.2.6 Fitohormonas

Es una descripción del concepto de Fitohormonas.

Fitohormonas

(Stock 8, 9 y 10)

Las fitohormonas o reguladores de crecimiento son compuestos que permiten potenciar el crecimiento y diferenciación de los tejidos vegetales. Las plantas utilizan naturalmente, las auxinas, responsables del crecimiento de los tejidos, formación de callo, desarrollo de primordios foliares y enraizamiento; las citoquininas, favorecen la división celular; y Giberilinas, permiten el crecimiento, rompimiento de la latencia del embrión que involucran el transporte de nutrientes y yemas axilares y apicales para iniciar la floración.

Los organismos vegetales necesitan para su normal desarrollo fitohormonas, de tal manera que en el cultivo in vitro se aplican sintéticas para impulsar el desarrollo de los explantes. Las más utilizadas son el ANA (ácido naftalenacético), BAP (bencil amino purina) y AG3 (ácido giberélico) que corresponde al stock 8, 9 y 10, respectivamente.

| Ácido Naftalenacético de Stock 8. | | | | Bencil Amino Purina de stock 9. | | | |
|-----------------------------------|-----------|---------------|----------------|---------------------------------|-----------|---------------|----------------|
| NÚMERO STOCK | COMPUESTO | CANTIDAD (gr) | AGUA DESTILADA | NÚMERO STOCK | COMPUESTO | CANTIDAD (gr) | AGUA DESTILADA |
| 8 | ANA | 0,1 | 100 ml | 9 | BAP | 0,1 | 100 ml |

Figura 18. Fitohormonas

3.2.7 Sustancias Orgánicas

Es una descripción del concepto de Sustancias Orgánicas.

Elaboración

Sustancias Orgánicas

Las sustancias orgánicas son compuestos no sintéticos que se toma de otros vegetales para suplementar el medio de cultivo y disminuir el gasto de sales de MS. En cultivo in vitro se utilizan bastantes; no obstante el que presenta mejor resultado es el cotiledón líquido, que se usa del agua de coco. Permite reducir costos en la compra de reactivos y favorecer el desarrollo de la planta, pues contiene los micro y macro nutrientes, vitaminas entre otros componentes, también contiene reguladores de crecimiento.

Figura 19. Sustancias Orgánicas

3.2.8 Practica



Figura 20. Practica

3.3 Modulo 3

El modulo tres es una recopilación de la información encontrada en la Preparación de Medios de Cultivo usados en el cultivo de tejidos vegetales el cual tiene como utilidad darle al estudiante la oportunidad de observar y aprender lo relativo a las áreas de trabajo que va a encontrar en el transcurso de la aplicación de su conocimiento en la disciplina.



Figura 21. Módulo 3

3.3.1 Preparación De Medios De Cultivo

Introducción!

PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

Las plantas necesitan un soporte para su desarrollo radicular y sostenimiento: nutrientes, vitaminas, fuente de carbono y reguladores de crecimiento para un efectivo establecimiento *in vitro* y para su posterior adaptación *ex vitro*. El medio de cultivo debe cumplir requisitos estandarizados para que la producción de vitroplantas no presente ninguna complicación.

En este capítulo podrás encontrar lo necesario para continuar con el aprendizaje de **cultivo de tejidos vegetales**, recuerda tienes al final un ejercicio práctico para que interactúes y refuerces aún más en la preparación en un laboratorio.

Medios de Cultivo Componentes del medio de cultivo Simulación

Figura 22. Preparación De Medios De Cultivo

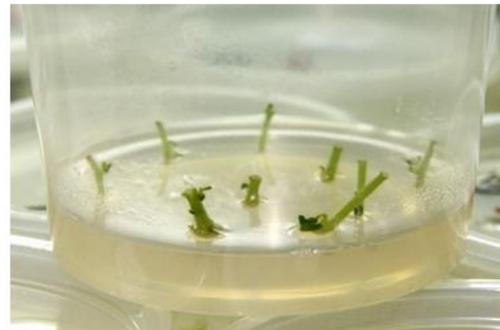
3.3.2 Medio de cultivo

En este sub modulo se da una explicación de lo que es un medio de cultivo y lo muestra.

PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

Medio de cultivo

El medio de cultivo da al explante cultivado *in vitro* los nutrientes, vitaminas, fuente de carbono y sostén para un desarrollo idóneo. Como ya se había mencionando en el capítulo anterior, el medio utilizado está estandarizado con base en las sales de Murashige y Skoog. Para el crecimiento de meristemos o microestacas, el medio de cultivo es suplementado con reguladores de crecimiento o productos orgánicos.



El uso de los componentes del medio, cuando se realiza el caldo nutritivo, al igual que las condiciones del cuarto de crecimiento, permite el desarrollo de las raíces, tallo, peciolo y hojas.

Figura 23. Medios De Cultivo

3.3.3 Componentes Medio de cultivo

En este sub modulo se muestra la composición del medio de cultivo requerido para los explantes.

Componentes del medio de cultivo

La composición del medio de cultivo está definida por los siguientes requerimientos de los explantes.

Agua.

El agua que se utiliza en el laboratorio es destilada. No se recomienda el uso de aguas "duras" por poseer altas concentraciones de Ca y Mg que pueden desregular el uso de sales de MS cuando se aplican.



Figura 24. Componentes Medios De Cultivo

3.3.4 Ejercicio practico

A hand-drawn diagram on a yellow background with horizontal lines, resembling a notebook page. On the left, the letters S, T, O, C, K are stacked vertically, with a circled '1' below them. In the center, there is a blue flask with a stopper and a red starburst shape containing the text '¡FELICIDADES!' and '¡HAZ MEZCLADO BIEN LOS COMPUESTOS!'. On the right, a table lists the components under the heading 'COMPUESTOS':

| COMPUESTOS | |
|------------|---|
| | Nitrato de Amonio (NO_3NH_4) 4.125 gr |
| | Nitrato de potasio (KNO_3) 475 gr |
| | Sulfato de magnesio hecxa hidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.902 gr |
| | Monofosfato de potasio (KH_2PO_4) 0.05 gr |
| | Agua Destilada 100 ml |

Handwritten chemical formulas like $\text{Ca}(\text{OH})_2 + \text{H}_3\text{PO}_4$ and $\text{C}_6\text{H}_5\text{COOH} + \text{O}_2$ are scattered around the diagram.

Figura 25. Ejercicio practico

3.4 Modulo 4

El modulo cuatro es una recopilación de las técnicas de micro propagación in vitro usadas en el cultivo de tejidos vegetales el cual tiene como utilidad darle al estudiante la oportunidad de observar y aprender estas mismas.



Figura 26. Índice Modulo 4

3.4.1 Micro propagación In Vitro

Es una descripción de la técnica de Micro propagación In Vitro.

MICROPROPAGACIÓN IN VITRO

(Planta donadora, Sustancias de limpieza y desinfectantes, Preparación de cámara de flujo laminar, Meristemos, Extracción, siembra e incubación, Corte de explantes después de protocolo de desinfección, Microestacas, Crecimiento de microestacas)

“ El cultivo de tejidos vegetales incluye diferente técnicas de micropropagación in vitro: siembra de meristemos, óvulos, anteras, embriones y tejidos radiculares, caulinares, peciolares, foliares y florales; no obstante, cuando las vitroplantas se han desarrollado, se puede llevar directamente a la etapa ex vitro o multiplicar el material obtenido. Por eso para propagación asexual se pueden utilizar los meristemos axilares y apicales, obteniendo de 3 a 5 microestacas.

En este capítulo podrás encontrar lo necesario para continuar con el aprendizaje de cultivo de tejidos vegetales.

Figura 27. Micro propagación In Vitro

3.4.2 Planta donadora

Es una descripción del proceso de Planta donadora.

Planta donadora

De la planta donadora o planta madre es donde se toma el explante.

El explante es el tejido vegetal que se corta para empezar el cultivo in vitro. Sin embargo, el material que se cultive, se debe garantizar libre de patógenos y el genotipo de interés (brasileira). Los meristemos apicales son los mejores tejidos ya que los haces vasculares (xilema y floema) no irrigan directamente el domo meristemático y, por ser los puntos de crecimiento que presentan los niveles más altos de totipotencia y células indiferenciadas.

Antes de hacer la toma de explantes apicales del tallo (se utiliza la variedad brasileira) debe estar un mínimo un mes en invernadero, bajo condiciones controladas, libre de agentes patógenos: el llamado estado de cuarentena.



Figura 28. Planta donadora

3.4.3 limpieza y desinfectantes

Es una descripción del proceso limpieza y desinfectantes de la Planta donadora.

Sustancias de limpieza y desinfectantes

Antes de ir a tomar el explante se debe alistar las sustancias para limpiar y desinfectar el tejido.

Dentro de las sustancias de limpieza esta el uso de jabón que se prepara al 1%. Esto indica que por cada litro se aplica un 1gr de jabón. El jabón se diluye en agua destilada-estéril (D-E). Para la limpieza se prepara la sustancia desinfectante (SD) 1 (Alcohol) y 2 (Hipoclorito) de acuerdo a lo establecido en la siguiente tabla.

| Sustancias desinfectantes (Manihot esculenta) | | |
|---|-------------------------|----------------------|
| # | Sustancia | Tiempo de exposición |
| 1 | Alcohol 70% | 20 segundos |
| 2 | Hipoclorito de Sodio 1% | 5 minutos |



Figura 29. Limpieza y Desinfectantes

3.4.4 Preparación de cámara de flujo laminar

Es una descripción del proceso a realizar para el uso de una cámara de flujo laminar.

Preparación de cámara de flujo laminar

En la cámara de flujo laminar se realizan las siguientes actividades:

- 1 Se prende la luz y el flujo
- 2 La luz ultravioleta durante 20 minutos y se deja en reposo 40 minutos
- 3 Limpieza de cámara con alcohol de adentro hacia fuera utilizando algodón
- 4 Se enciende un mechero
- 5 se limpia con alcohol los medios de cultivo, el estereoscopio
- 6 Ubica las cajas Petri, mango de bisturí, pinzas y papel kraf previamente esterilizados
- 7 La caja Petri se pone en el punto de vista del estereoscopio, el papel kraf debajo de un vaso de vidrio con alcohol al 96%, al mango se le pone la cuchilla y con las pinzas se pone en el interfaz del papel kraf
- 8 A un lado se pone las SD, las aguas D-E y el material vegetal para micropropagar; todo lo mencionado se ejecuta para la extracción de meristemos. Para microestacas no se incluye estereoscopio, ni SD ni agua D-E.

Figura 30. Preparación de cámara de flujo laminar

3.4.5 Meristemos

Meristemos

Los tejidos vegetales, que presentan mayor nivel de totipotencia son los meristemos.

Los meristemos generalmente se encuentran ubicados en el ápice del tallo, meristemo apical del tallo (MAT), o, la raíz, meristemo apical de la raíz (MAR). Existen, también, los meristemos axilares (MA) o intercalares (MI), que se encuentran en la posición nodal o entrenudos. Estos tejidos (MAT, MAR y MA) poseen mayor totipotencia, elevadas tasas de división celular (mitosis) por ser puntos de crecimiento e indiferenciación; que fácilmente en un medio de cultivo idóneo pueden generar una nueva planta.

Figura 31. Meristemos

3.4.6 Extracción, siembra e incubación

Es una descripción del proceso de Extracción, siembra e incubación.

Micropropagación in vitro

Extracción, siembra e incubación

De las plantas donadoras se corta los explantes apicales, en este caso los de la porción apical del tallo, donde se encuentra (MAT) y se deja sumergir directamente en 1% de NaOCl y después su lavado por 3 A-D-E.



Figura 32. Extracción, siembra e incubación

3.4.7 Micro Estacas

Es una descripción del tratamiento que se le dan a las Micro Estacas.

Micropropagación in vitro

Microestacas: regeneración de brotes.

Después de sembrar el tejido meristemático la planta dura dos meses para generar brote (tallo, peciolo y hojas).

El subcultivo se realiza a través de cortes diagonales uninodales a los brotes obtenidos, generando microestacas que se siembran en medio de cultivo MS-MB2 para el desarrollo de raíces, tallo y hojas. Se etiqueta los tarros con el genotipo (Brasilera), fecha y medio de cultivo.



Cerrar

Figura 33. Micro Estacas

3.4.8 Crecimiento de Micro Estacas.

Es una descripción del tratamiento que se ejecuta para el Crecimiento de Micro Estacas.

Micropropagación in vitro

Crecimiento de microestacas.



Los tarros se llevan a cuarto de crecimiento que presenta las siguientes características: temperatura de 30°C, Luminosidad de 3.000 lux y un fotoperíodo de 16 horas luz y 8 noches. Para mantener el ambiente estéril se deja alcohol e hipoclorito en diferentes puntos del cuarto para su volatilización.

Cerrar

Figura 34. Crecimiento de Micro Estacas

3.4.9 Propagación Masiva por Micro Estacas

Es una descripción del tratamiento que se ejecuta al finalizar el Crecimiento de Micro Estacas.

Micropropagación in vitro

Propagación masiva por microestacas.

Las apicales se siembra aparte pues su crecimiento es más rápido.

Después de que la vitroplanta haya desarrollado sus tejidos (brote de meristemo y regeneración de plántula microestaca) se procede a aplicar para la propagación masiva el subcultivo de cada vitroplanta obtenida para extraer entre 3 y 4 microestacas nodales y una apical.



Cerrar

Figura 35. Propagación Masiva por Micro Estacas

3.5 Modulo 5

El modulo cinco es una recopilación del procedimiento que se realiza en la etapa ex vitro usadas en en el cultivo de tejidos vegetales el cual tiene como utilidad darle al estudiante la oportunidad de observar y aprender estas mismos.

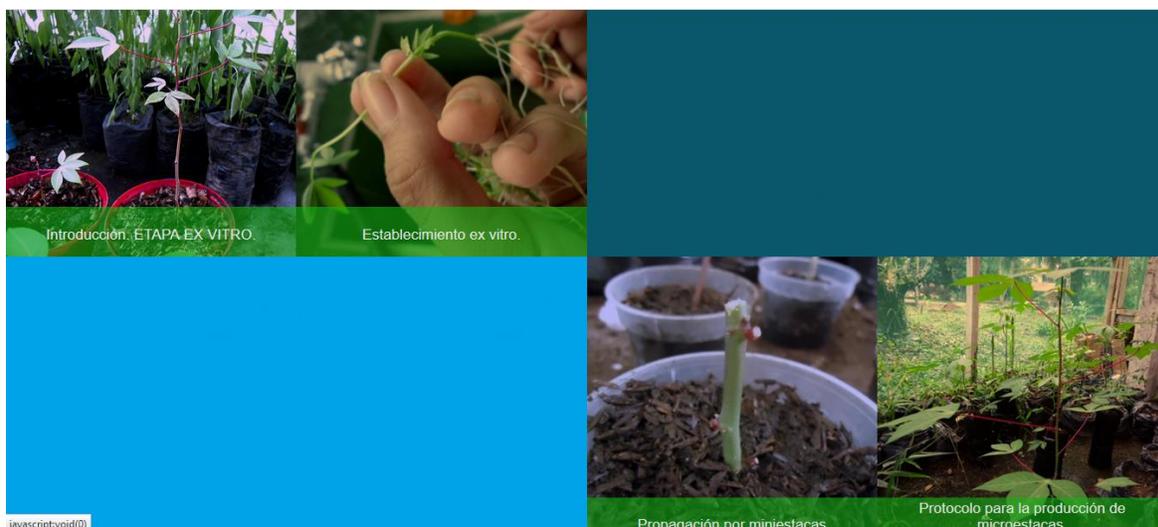


Figura 36. Módulo 5

3.5.1 Introducción

Este sub modulo es una breve explicación a los procesos ex vitro usados en el cultivo de tejidos vegetales el cual tiene como utilidad darle al estudiante la oportunidad de observar y aprender estas mismas.

Introducción!

ETAPA EX VITRO

(Establecimiento ex vitro, propagación por miniestacas y protocolo para la producción de microestacas)

“ Las vitroplantas poseen condiciones controladas y, con el tarro cerrado y sellado, su intercambio gaseoso es mínimo. La regulación estomática in vitro tiene niveles bajos, no obstante cuando la planta sale del frasco se enfrenta a una atmosfera que posee un nivel altísimo de CO2 que puede causar daño foliares y posible muerte de la planta. De tal manera que el cuello de botella de la producción de material a través del uso del cultivo de tejidos es la etapa ex vitro, aun se han reportado datos que alcanzan el 90% de perdidas.

La aclimatación ex vitro del material vegetal va permitir aplicar protocolos de miniestacas para potenciar la producción masiva de plantas y su paso a campo.

Cerrar

Figura 37. Introducción Ex vitro

3.5.2 Establecimiento ex vitro

Este sub modulo es una explicación del procedimiento que se realiza al pasar las plantas del medio de cultivo al suelo.

Etapa Ex Vitro

Establecimiento ex vitro

En esta etapa se saca la planta del frasco a un ambiente favorable para su buen desarrollo. Los siguientes pasos son los que se deben tener en cuenta para el establecimiento de las plantas a condiciones naturales:

Escoger la vitroplanta que ya tenga el tamaño ideal: cuando toca la tapa del frasco.



Cerrar

Figura 38. Establecimiento ex vitro

3.5.3 Propagación por Mini Estacas

Este sub modulo es una explicación del procedimiento que se realiza en la técnica de Propagación por Mini Estacas al pasar las plantas del medio de cultivo al suelo.

Etapa Ex Vitro

Propagación por miniestacas

El número de plantas obtenidas en cultivo de tejidos aumenta significativamente con el uso de la técnica de miniestacas.

» Para este propósito, después de la aclimatación de las vitroplantas se realizan cortes diagonales uninodales. Es aconsejable que la planta no presente total lignificación en el tallo, en busca que la brotación y enraizamiento sea más rápido.

Cerrar

Figura 39. Propagación por Mini Estacas

3.5.4 Protocolo para la producción de micro estacas

Este sub modulo es una explicación del protocolo que se realiza en la técnica de producción de micro estacas al pasar las plantas del medio de cultivo al suelo.

Etapa Ex Vitro

Selección de planta aclimatada: debe presentar tallo más herbáceo que leñoso, generación y desarrollo de tejidos vigorosos, y adecuada fertilización.

➤ *La planta no debe estar infectada o infestada por algún agente patógeno*



Los cortes uninodales o binodales diagonales se realizan con una cuchilla de bisturí desinfectada en NaOCl al 3%.

➤ *Se aplica, enseguida, el protocolo de desinfección por inmersión: Cal (3%) y fungicida (1%) por 2 minutos. Las miniestacas se siembran en el sustrato que puede ser el mismo utilizado en la etapa ex vitro.*

Cerrar

Figura 40. Protocolo para la producción de micro estacas

3.6 Modulo 6

El modulo seis es una recopilación de la información acerca de los meristemos y ápices usadas en el cultivo de tejidos vegetales el cual tiene como utilidad darle al estudiante la oportunidad de observar y aprender de estas mismas.



Figura 41. Módulo 6

3.6.1 Cultivo in vitro de meristemos y ápices

Este sub modulo es una descripción histórica de los conceptos de meristemos y ápices usados en los cultivos in vitro.

Introducción!

Cultivo in vitro de meristemos y ápices

(Méristemas, Ápices y Aplicaciones del cultivo in vitro de meristemos y Ápices)

“ El primer intento de cultivo in vitro de ápices en un medio artificial compuesto por sales inorgánicas y glucosa fue realizado por Robbins en 1922. Luego Ball (1946) reporto el primer protocolo de regeneración de plantas utilizando meristemos apicales, con lo cual obtuvo plántulas enraizadas aptas para trasplantar en el suelo. A este investigador se le reconoce como el padre de la micropropagación.

**Morel y Martin (1952) utilizaron por primera vez el cultivo de meristemos para obtener plantas de dalia y papa libres de virus. Stace-Smith y Mellor (1970) implementaron la técnica de la termoterapia con el cultivo de meristemos para optimizar la limpieza de tejido contaminado con virus.

Cerrar

Figura 42. Cultivo in vitro de meristemos y ápices

3.6.2 Meristemos

Este sub modulo recopila y explica el concepto de Meristemos

Cultivo in vitro de meristemos y ápices

Méristemas

Un meristemo es una estructura compuesta por células no diferenciadas y totipotentes en constante y rápida división celular. Se presenta con células pequeñas, de pared celular delgada, de forma poliédrica, en las cuales el núcleo ocupa la mayor parte del volumen celular y se caracteriza por la presencia de abundantes y pequeñas vacuolas.

Los meristemos son tejidos totipotentes que se multiplican en forma activa y neofoman tejidos diferenciados y células meristemáticas nuevas. Son responsables del crecimiento de las plantas y se reconocen dos tipos: **meristemos primarios**, responsables del crecimiento longitudinal de la planta y se encuentran localizados en los extremos del tallo, la raíz y las yemas; y **meristemos secundarios**, responsables del engrosamiento de los tallos y las raíces debido a divisiones celulares que ocurren en el cambium

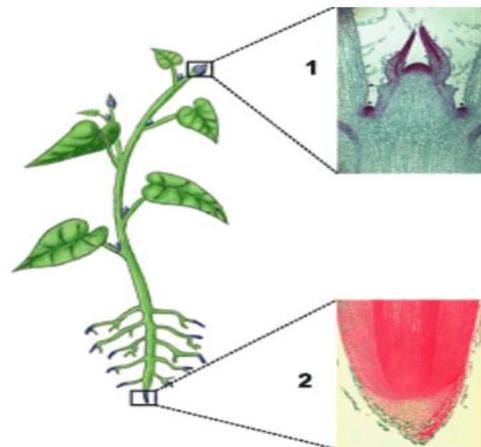


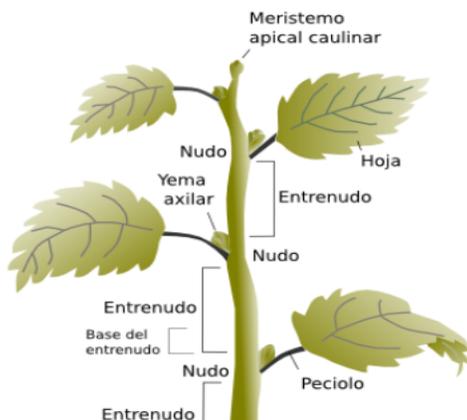
Figura 43. Meristemos

3.6.3 Ápices

Este sub modulo recopila y explica el concepto de Ápices

Cultivo in vitro de meristemos y ápices

Ápices



Los análisis histológicos permiten diferenciar un meristemo de un ápice. Según Roca (1980) un meristemo apical está conformado por el tejido joven más próximo al primordio (domo meristemático) foliar del tallo con tamaño menor que 0.1-0.3 mm, mientras que un ápice está formado por el meristemo apical acompañado de varios primordios. Ambas partes se encuentran localizadas tanto en las yemas apicales como en las laterales cuyas células se diferencian hasta formar los tejidos que conforman el cuerpo de la planta (soma). Estas estructuras presentan una alta organización; por tanto, mantienen la estabilidad genética.

El desarrollo de la yema apical ejerce un efecto de control sobre las yemas basales, lo cual evita su desarrollo. Este fenómeno se conoce como dominancia apical y se debe a la acción de AIA sintetizado en las yemas apicales que se distribuye en forma basipetala y

Cerrar

Figura 44. Ápices

3.6.4 Aplicaciones del cultivo in vitro de meristemos y ápices.

Este sub modulo recopila y explica las Aplicaciones del cultivo in vitro de meristemos y ápices.

Cultivo in vitro de meristemos y ápices

Aplicaciones del cultivo in vitro de meristemos y ápices.

Algunas de las aplicaciones de mayor uso del cultivo de meristemos y ápices incluyen : (1) la micropropagación; (2) la erradicación de patógenos, especialmente de origen viral; (3) la conservación de germoplasma in vitro; (4) el intercambio de germoplasma.

La micropropagación.

La propagación in vitro o micropropagación se realiza a través de



Cerrar

Figura 45. Aplicaciones del cultivo in vitro de meristemos y ápices.

3.6.5 Establecimiento ex vitro

Este sub modulo recopila y explica los procedimientos a realizar para trasplantar las plantas del cultivo in vitro al ex vitro.

Etapa Ex Vitro

Escoger la vitroplanta que ya tenga el tamaño ideal: cuando toca la tapa del frasco.

➤ *Ocurre, generalmente, después de entre un mes y dos de estar subcultivada y al presentar de 5 a 8 nudos.*



Se puede dejar los tarros semi-destapados hasta cuatro días, fuera del cuarto de crecimiento.

➤ *Con una leve radiación solar de 7am a 9 am y de 3pm a 5 pm.*

Cerrar

Figura 46. Establecimiento ex vitro

3.7 Modulo 7

El modulo siete es una recopilación de la información acerca del Rescate y cultivo de embriones cigóticos usadas en el cultivo de tejidos vegetales el cual tiene como utilidad darle al estudiante la oportunidad de observar y aprender estos mismos.



Figura 47. Módulo 7

3.7.1 Rescate y cultivo de embriones cigóticos

Este sub modulo recopila y explica lo necesario en el Rescate y cultivo de embriones cigóticos.

Introducción!

Rescate y cultivo de embriones cigóticos

“ La técnica de rescate y cultivo de embriones in vitro consiste en aislar y cultivar embriones cigóticos inmaduros con problemas de desarrollo, en un medio de cultivo artificial que contiene los requerimientos nutricionales que sustituyen a los del endospermo.

Los conceptos que se presentan en esta sección fueron tomados de Reed (2005), Litz (1993), Pierik (1990), Hu y Ferreira (1998), Peralta (1990), Picca y Cardone (2004), Sharma et al. (1996) y Collins y Grosser (1984), quienes han trabajado intensamente al respecto.

El desarrollo de un embrión cigótico en una planta presenta un estado temprano de carácter heterotrófico en el cual el embrión se desarrolla a expensas de los nutrientes del endospermo (ya que tiene una baja capacidad de síntesis) y un estado tardío de carácter autotrófico. Para la regeneración de plantas mediante el rescate y cultivo in vitro se pueden utilizar embriones tanto maduros como inmaduros.

Cerrar

Figura 48. Rescate y cultivo de embriones cigóticos

3.7.2 Eventos importantes

Este sub modulo recopila y explica los eventos importante sucedidos para el desarrollo de las técnicas aplicadas en los cultivos vegetales.

Eventos importantes en el desarrollo de esta técnica

Eventos importantes en el desarrollo de esta técnica.

El desarrollo de la técnica de rescate y cultivo de embriones se caracteriza por la ocurrencia de varios eventos importantes. En 1940 Hanning(citado por Litz,1993) realizo por primera vez un cultivo in vitro de embriones cigóticos maduros de plantas. Posteriormente, en 1924, Dietrich (citado por Pierik, 1990) realizo estudios para determinar si era posible regenerar plantas a partir de embriones sin que estos hubiesen completado su periodo de dormancia. Van Overbeek et al., (1941) demostraron que el agua de coco estimula el desarrollo de embriones de datura, lo que contribuyó al desarrollo de las investigaciones sobre cultivo in vitro de embriones para reducir el ciclo de mejoramiento genético en Iris. Estos eventos marcaron el inicio de la aplicación, asociándola a esquemas de cruces interespecíficos e intergenéticos.



Cerrar

Figura 49. Eventos importantes

3.7.3 Factores que afectan el cultivo in vitro

Este sub modulo recopila y explica los Factores que afectan el cultivo in vitro.

Rescate y cultivo de embriones cigóticos

Factores que afectan el cultivo in vitro de embriones cigóticos.

El cultivo de embriones inmaduros utiliza semillas sin madurar como fuente de explante. Con esta técnica se evita el aborto temprano del embrión logrando la regeneración de una planta viable, generalmente en cruces distantes. No obstante, la disección del embrión inmaduros resulta difícil por su escaso desarrollo, el riesgo de lesionarlo y la complejidad del medio de cultivo para continuar el crecimiento de embriones en estados inmaduros. Por otro lado, el cultivo de embriones maduros, provenientes de semillas igualmente maduras, presenta menos problemas durante la disección del embrión, y el medio para su cultivo es mucho mas simple ya que se solidifica con agar y solo contiene sales minerales y sacarosa como fuente de energía.



Figura 50. Factores que afectan el cultivo in vitro

3.7.4 Reguladores del crecimiento.

Rescate y cultivo de embriones cigóticos

Reguladores del crecimiento.



El desarrollo del embrión en la planta presenta dos fases: la **heterotrófica**, en la cual los embriones inmaduros, también denominados pro-embryones, dependen de los nutrientes presentes en el endospermo; y la **autotrófica**, cuando el embrión maduro es capaz de sintetizar, a partir de sales inorgánicas, las sustancias que necesita para su desarrollo.

Los requerimientos de reguladores de crecimiento han sido un tema ampliamente estudiado, especialmente para el cultivo de embriones heterotróficos. Sharma (1976) concluye que a bajas concentraciones de auxinas se promueve el crecimiento normal del embrión; el ácido giberélico (AG) produce alargamiento, mientras que las citoquininas lo inhiben. Collins y Grosser (1984) observaron que embriones inmaduros de híbridos interespecíficos de *Trifolium* cultivados inicialmente en un medio con alto contenido de sacarosa, un nivel moderado de auxina y una concentración baja de citoquinina detienen su crecimiento después de una o dos semanas. No obstante reanuda su desarrollo normal cuando es transferido a un medio con baja concentración de sacarosa y auxina y una concentración moderada de citoquinina.

Cerrar

Figura 51. Reguladores del crecimiento.

