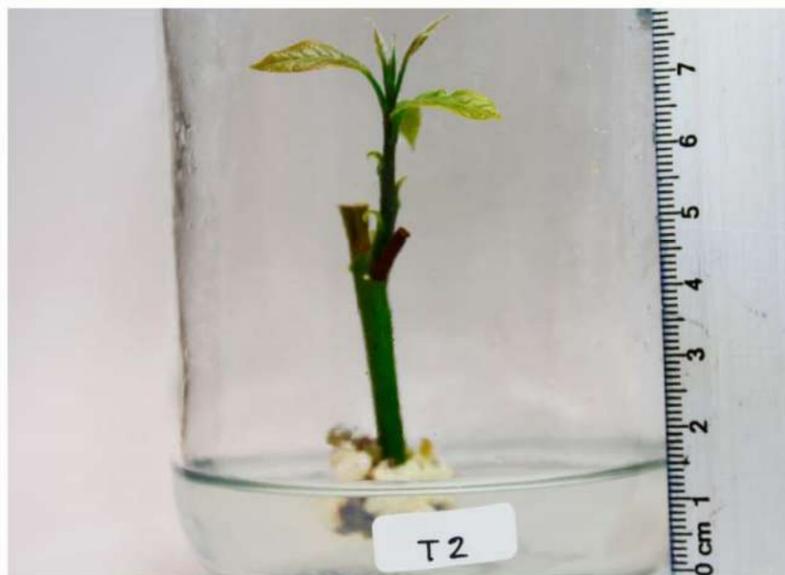


MANUAL DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO PARA LA **MICROPROPAGACIÓN** DE **PLANTAS**



Dr. José Manuel Rodríguez Domínguez
Dr. José Juvencio Castañeda Nava
INT. Fabricio Ociel del Toro de la Cruz
Dra. Antonia Gutiérrez Mora
Biól. Alexa Paola Plaza Ávila

MANUAL DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO PARA LA MICROPROPAGACIÓN DE PLANTAS

Primera Edición

2021

“Manual de Prácticas de Laboratorio para la Micropropagación de Plantas”

© Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Av. Normalistas # 800

Col. Colinas de la Normal

C.P. 44270

Guadalajara, Jalisco, México.

www.ciatej.mx

Año de Edición 2021

Primera Edición Impresa 2021

ISBN para la edición impresa: 978-607-8734-33-7

ISBN para la edición electrónica: 978-607-8734-34-4

Fotografías de Portada: Dr. José Juvencio Castañeda Nava

Diseño de Portada: IDGD Karen Elizabeth Pérez Beltrán

ACERCA DE LOS AUTORES:

Dr. José Manuel Rodríguez Domínguez¹

Dr. José Juvencio Castañeda Nava¹

Dra. Antonia Gutiérrez Mora¹

INT. Fabricio Ociel del Toro de la Cruz²

Biól. Alexa Paola Plaza Ávila³

¹Investigadores de la Unidad de Biotecnología Vegetal del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ, A.C.), Subsede Zapopan, Jalisco, México.

²Ingeniero en Nanotecnología egresado del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Occidente (ITESO, Universidad Jesuita de Guadalajara). Realizó Tesis de Licenciatura en CIATEJ-ITESO.

³Bióloga egresada de la Universidad Autónoma de Guadalajara (UAG); Actual estudiante de la Maestría en Innovación Biotecnológica, (CIATEJ, A.C.).

Obra Dedicada a:

Dr. Benjamín Rodríguez Garay, en reconocimiento a su trayectoria científica en el campo del cultivo *in vitro* de plantas.

Sr. Óscar del Toro y Sra. Patricia de la Cruz, padres de Fabricio Ociel por el apoyo otorgado a su hijo para estudiar y desarrollarse profesionalmente.

M.C. Martha Yolanda, Adriana Yolanda y Lidia Angélica por su apoyo y aporte de ideas para el enriquecimiento de esta obra.

ÍNDICE

	Página
Agradecimientos.....	2
Presentación del manual.....	3
Medidas de seguridad generales en el laboratorio.....	5
Reglamento de laboratorio.....	5
Clasificación de reactivos.....	7
Pictogramas de seguridad en laboratorios.....	10
Instalaciones, operación y equipo de laboratorio.....	12
Biofábricas para plantas <i>in vitro</i>	24
Prácticas de Laboratorio.....	31
PRÁCTICA 1. Preparación de soluciones stock para medio de cultivo MS y reguladores de crecimiento.....	32
PRÁCTICA 2. Efecto de diferentes longitudes de onda luminosas en la germinación de semillas de jitomate (<i>Solanum lycopersicum</i>) <i>in vitro</i>	40
PRÁCTICA 3. Desinfección de explantes de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>).....	50
PRÁCTICA 4. Callogénesis a partir de cacahuete (<i>Arachis hypogaea</i>).....	61
PRÁCTICA 5. Organogénesis en violeta africana (<i>Saintpaulia ionantha</i>).....	70
PRÁCTICA 6. Proliferación de yemas axilares en sauce (<i>Salix bonplandiana</i>).....	79
PRÁCTICA 7. Inducción de raíces <i>in vitro</i> en plántulas de jitomate (<i>Solanum lycopersicum</i>).....	89
PRÁCTICA 8. Producción de semillas sintéticas de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>).....	97
PRÁCTICA 9. Aclimatación de vitroplantas de sauce (<i>Salix bonplandiana</i>) a condiciones <i>ex vitro</i>	102
Bibliografía consultada.....	108
ANEXO 1: Abreviaturas.....	111
ANEXO 2: Conceptos básicos de concentración de soluciones y cálculos comúnmente Utilizados.....	112

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología de Jalisco (COECYTJAL), Proyecto No. 9146-2020 de la Convocatoria del Programa de Difusión y Divulgación de la Ciencia, Tecnología e Innovación (DyD) 2020, por el apoyo económico otorgado para la realización de esta obra.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-MEXICO), Proyecto: PlanTECC 315918 en el año 2021.

A Andrea Pérez Gutiérrez, por su ayuda para la realización de las figuras incluidas en el capítulo: Biofábricas para plantas *in vitro*.

A la Dra. María Cristina Guadalupe López Peralta y a la IBT. Mariana Orozco Mendoza por sus acertadas correcciones y útiles sugerencias durante la revisión del manuscrito.

PRESENTACIÓN DEL MANUAL

El presente Manual busca ser un apoyo para las sesiones prácticas de cualquier curso de Micropropagación de Plantas que se imparta en educaciones educativas o laboratorios de investigación, a fin de formar recursos humanos calificados en el campo del empleo de las técnicas del cultivo de células y tejidos vegetales *in vitro*, de igual manera, propone fomentar la creación de laboratorios de micropropagación, lo que generará fuentes de empleo; igualmente, capacitará a los docentes a fin de que transmitan estos conocimientos sobre este importante tema de la biotecnología vegetal a las futuras generaciones.

A diferencia de otros manuales de micropropagación, en este manual se incluyen prácticas con especies vegetales modelo, de fácil obtención y cuyo crecimiento *in vitro* es rápido, así como instrumental y reactivos relativamente fáciles de conseguir; además se busca englobar todos los pasos del cultivo *in vitro* de plantas, para lo cual se incluye una práctica donde se comparan diferentes métodos de desinfección para el establecimiento del cultivo aséptico de explantes así como una práctica para la aclimatación de vitroplantas a condiciones *ex vitro*, pues ambos procesos son los que más pérdidas causan en las biofábricas o laboratorios de micropropagación. También se incluye una práctica donde se estudia el efecto de diferentes longitudes de onda de luz en la respuesta de la germinación *in vitro* de semillas y el crecimiento de las vitroplantas, pues el tipo de luz es un factor de suma importancia en la micropropagación de especies vegetales.

Por otra parte, en el Manual se incluye una introducción donde se explica el uso y manejo de los diferentes equipos que se utilizan en un laboratorio de micropropagación, la clasificación de

reactivos de uso general, las reglas de laboratorio, entre otros, además de un capítulo que explica lo que son las biofábricas de vitroplantas y un anexo con ejemplos de cálculos matemáticos para la correcta elaboración de disoluciones. También se incluyen fotografías de los resultados esperados en cada práctica, con el objetivo de que las personas que no estén familiarizadas con las respuestas que se deberían de obtener, tengan una idea de qué es lo que esperarían observar en cada práctica.

Esperando que este Manual sea una guía útil para todos los docentes, productores y estudiantes interesados en el Cultivo de Células y Tejidos Vegetales *in vitro*.

MEDIDAS DE SEGURIDAD GENERALES EN EL LABORATORIO

Fabricio Ociel del Toro de la Cruz
José Manuel Rodríguez Domínguez

REGLAMENTO DE LABORATORIO

En un laboratorio de cultivo de células y tejidos vegetales *in vitro* se utilizan reactivos químicos y material biológico que requieren un manejo especial, pues algunos pudieran ser dañinos o irritantes, por lo que a continuación se presentan una serie de reglas a seguir.

Reglas para el usuario

- Lavarse las manos correctamente antes y después de la práctica.
- No comer, beber, fumar o utilizar el celular mientras se encuentra en el laboratorio.
- Prestar atención y seguir atentamente las indicaciones del instructor.
- Utilizar bata, zapato cerrado y lentes de seguridad dentro del laboratorio.
- Utilizar guantes desechables en todas aquellas tareas que lo requieran para reducir riesgos de contaminación (no utilizarlos cerca de mecheros encendidos u otras fuentes de fuego).
- Tener absoluta concentración en los materiales y/o equipos que se estén utilizando.

Reglas sobre los equipos

- Seguir detenidamente las instrucciones de operación del equipo.
- Informar al instructor o responsable de laboratorio inmediatamente sobre fallas presentadas en el equipo.
- Limpiar y guardar correctamente los equipos utilizados.

Reglas sobre el espacio de trabajo

- Limpiar el espacio de trabajo antes y después de utilizarlo.
- No dejar materiales o reactivos dentro del laboratorio o equipos.
- Seguir adecuadamente las indicaciones de desalojo ante cualquier accidente.
- Saber utilizar las medidas de seguridad como regadera, limpia ojos y extintor.
- Guardar cada material, reactivo o equipo de manera correcta.

Reglas sobre reactivos

- Manejar con extrema precaución los reactivos utilizados.
- Leer previamente la ficha de seguridad del reactivo a utilizar.
- Desechar los residuos químicos de acuerdo con su ficha de seguridad.
- Guardar los reactivos en su respectivo lugar y de forma correcta.

Reglas sobre material biológico

- Los medios de cultivo utilizados deberán ser esterilizados previo a su desecho. Si están contenidos en frascos no desechables, deberán vaciarse a una bolsa de plástico. Si el medio de cultivo está en recipientes desechables se esterilizará todo dentro de una bolsa autoclavable.
- Evitar abrir recipientes con medio de cultivo contaminado para impedir la dispersión de esporas de hongos y bacterias al laboratorio o las cabinas de bioseguridad.
- Los contenedores contaminados deberán ser esterilizados en autoclave a 121 °C y 15 lb/in² durante 15 minutos, posteriormente se vaciará el contenido dentro de una bolsa de plástico para desecharse, finalmente el contenedor deberá lavarse en la tarja. En el caso de que los

contenedores sean cajas de Petri de plástico, se esterilizarán dentro de una bolsa de plástico cerrada antes de desecharlas.

- Contenedores sin contaminar no será necesario esterilizarlos, el contenido se colocará directamente en una bolsa de plástico y se desechará en el lugar indicado, y el contenedor se lavará en la tarja.

CLASIFICACIÓN DE REACTIVOS

Los compuestos químicos se pueden clasificar de muchas maneras (figuras 1 y 2), a continuación, se presenta la clasificación de los reactivos o compuestos químicos que normalmente se utilizan en un laboratorio de cultivo de células y tejidos vegetales *in vitro*.

Clasificación de acuerdo con su naturaleza química

De acuerdo con su grado de peligrosidad. Son sustancias que pueden ubicarse dentro de una de las siguientes clasificaciones:

1) Inflamables:

- Soluciones que contengan más del 24% de alcohol en volumen.
- Líquidos con punto de fusión menor de 60 grados centígrados.
- Materiales que se incendian por fricción y cambios químicos.
- Gases comprimidos inflamables que estimulan la combustión.
- Agentes oxidantes como cloratos, manganatos, nitratos y peróxidos inorgánicos.

2) Corrosivos:

- Sustancias líquidas o en solución acuosa con un pH menor o igual a 2 y mayor o igual a 12.5.
- Líquidos capaces de corroer el acero.
- Sustancias capaces de corroer la piel.

3) Reactivos:

- Bajo condiciones normales (25 grados centígrados y presión normal) se combina o polimeriza violentamente sin detonación.
- Bajo condiciones normales, en contacto con soluciones de pH ácido y básico, reaccionan violentamente formando gases, vapores o humos.
- En su fórmula química posee cianuros y sulfuros, que cuando se exponen a condiciones de pH entre 2 y 12.5, pueden generar gases, vapores y humos tóxicos.

4) Explosivos:

- Se considera explosivo cuando tiene una constante de explosividad mayor a la del dinitrobenceno.
- Es capaz de producir una reacción explosiva a condiciones normales.

5) Tóxicos:

- Sustancias que produzcan efectos nocivos para la salud, donde se clasifican en irritantes, asfixiantes, hepatotóxicos, nefrotóxicos, neurotóxicos, anestésicos y tóxicos hematopoyéticos.

En el Cuadro 1, se presenta un listado de los reactivos que normalmente se usan en un laboratorio de cultivo de células y tejidos vegetales *in vitro*.

Cuadro 1. Clasificación de los reactivos químicos utilizados en un laboratorio de cultivo de células y tejidos vegetales de acuerdo con su grado de peligrosidad

<i>Tipo</i>	<i>Reactivos</i>	<i>Fórmula</i>	<i>Inflamable</i>	<i>Corrosivo</i>	<i>Explosivo</i>	<i>Tóxico</i>
<i>Ácidos</i>	Ácido clorhídrico	HCl		SI		
	Ácido bórico	H ₃ BO ₃				SI
	Ácido indolacético (AIA)	C ₁₀ H ₉ NO ₂				
	Ácido naftalenacético (ANA)	C ₁₂ H ₁₀ O ₂				SI
	Ácido Indolbutírico (AIB)	C ₁₂ H ₁₃ NO ₂				SI
	Ácido 2,4-diclorofenociacético (2,4-D)	C ₈ H ₆ Cl ₂ O ₃				SI
<i>Bases</i>	Hidróxido de sodio	NaOH		SI		
<i>Sales</i>	Nitrato de amonio	NH ₄ NO ₃	SI		SI	SI
	Nitrato de potasio	KNO ₃	SI		SI	SI
	Sulfato de magnesio	MgSO ₄ ·7H ₂ O				
	Sulfato de manganeso	MnSO ₄ ·H ₂ O		SI		SI
	Sulfato de zinc	ZnSO ₄ ·7H ₂ O		SI		SI
	Sulfato cúprico	CuSO ₄ ·5H ₂ O		SI		SI
	Sulfato ferroso	FeSO ₄ ·7H ₂ O				SI
	Cloruro de calcio	CaCl ₂ ·2H ₂ O				SI
	Cloruro de cobalto	CoCl ₂ ·6H ₂ O				SI
	Yoduro de potasio	KI				SI
	Molibdato de sodio	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O				
	Fosfato monopotásico	KH ₂ PO ₄				
	EDTA disódico	Na ₂ EDTA				
	Hipoclorito de sodio	NaClO			SI	SI
	<i>Alcoholes</i>	Etanol	C ₂ H ₅ OH	SI		
<i>Compuestos orgánicos</i>	Agar					
	Carbón activado		SI			
	Myo-inositol	C ₆ H ₁₂ O ₆				
	Tiamina (Vitamina B ₁)	C ₁₂ H ₁₇ N ₄ OS ⁺				
	Niacina (Vitamina B ₃)	C ₆ H ₅ NO ₂				SI
	Piridoxina (Vitamina B ₆)	C ₈ H ₁₁ NO ₃				
	Glicina	C ₂ H ₅ NO ₂				
	Sacarosa	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁				
	Bencilaminopurina	C ₁₂ H ₁₁ N ₅				SI
	Kinetina (KIN)	C ₁₀ H ₉ N ₅ O				
Zeatina (ZEA)	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O					
Thidiazuron (TDZ)	C ₉ H ₈ N ₄ OS				SI	

NOTA.- Ninguno de los compuestos presentados tienen un grado de reactividad considerable, por lo que esta columna se decidió omitir de la tabla.

PICTOGRAMAS DE SEGURIDAD EN LABORATORIOS



Figura 1. *Globally Harmonized System* (GHS por sus siglas en inglés), nuevo formato mundialmente reconocido para el manejo de sustancias peligrosas. (Fuente: Naciones Unidas. Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (SGA). Novena edición revisada)



Figura 2. Rombo de seguridad donde se muestran los principales peligros de cada sustancia química. (Fuente: NFPA. Sistema normativo para la identificación de los riesgos de materiales para respuesta a emergencias. NFPA 704).

INSTALACIONES, OPERACIÓN Y EQUIPO DE LABORATORIO

Fabricio Ociel del Toro de la Cruz
José Manuel Rodríguez Domínguez
José Juvencio Castañeda Nava

Un laboratorio dedicado a la producción o a la investigación que tenga que ver con el procesamiento de material *in vitro* requiere de un diseño, operación y equipos dedicados al mantenimiento de condiciones asépticas dentro del mismo. El diseño específico del laboratorio también se define de acuerdo al tamaño de la empresa o centro de investigación así como a la función que este desempeña; una idea general para el diseño del laboratorio es centrarse en este como si fuera una línea de ensamblaje. Las actividades y los equipos deben estar organizados en un mismo lugar con la finalidad de ahorrar tiempo y evitar el movimiento de una sala a otra, minimizando el riesgo de contaminación en las habitaciones, así como para mantener el ritmo de trabajo.

Es recomendable mantener un laboratorio lo más limpio posible debido a que el polvo encontrado sobre las superficies o en el aire contiene principalmente bacterias, virus y esporas de hongos que pueden resultar en la contaminación de los cultivos. La contaminación puede llegar hasta el 50% de los cultivos o más, lo que se traduce en una pérdida de tiempo, recursos y mano de obra, generando un entorno de baja productividad en el laboratorio, creando la necesidad de también tomar en cuenta la limpieza del aire exterior con el uso de filtros de aire HEPA y manteniendo un control de temperatura bajo para retardar el crecimiento de contaminantes. En un laboratorio de cultivo de células y tejidos vegetales *in vitro* hay una serie de habitaciones que se consideran indispensables para su operación, a continuación, se mencionan las actividades, las instalaciones

que contienen y los equipos necesarios que se llevan a cabo en cada sección (Phillips & Gamborg, 1995).

Laboratorio de usos múltiples

Es el principal espacio dentro del laboratorio de cultivo de células y tejidos vegetales *in vitro*, generalmente cuenta con microondas, refrigeradores y fregaderos.

Dentro de este espacio se hacen las actividades de:

- Preparación del explante.
- Preparación del medio de cultivo.
- Esterilización del medio de cultivo.
- Almacenamiento de reactivos y equipos.

Esta área debe de contener una fuente de agua desmineralizada o destilada para usarse en la preparación de los medios de cultivo, fuentes de electricidad y posiblemente de gas, una mesa de trabajo y fregaderos o tarjas. Los equipos que se requieren para llevar a cabo las actividades anteriormente expuestas se muestran a continuación.

Para la preparación del explante, generalmente el equipo que se usa es un microscopio estereoscópico, que es un dispositivo que permite enfocar con mayor precisión al explante, ya que permite aumentos a 10x (10 veces), 20x, 40x, etc (Figura 3a). Con la ayuda de pinzas y un bisturí (Figura 3b), se puede cortar con mayor precisión la parte que se requiere extraer. El uso de estas herramientas depende de la preparación única que cada planta necesite. Si el explante es muy grande o de fácil observación a simple vista, basta con utilizar un *cutter* o tijeras para separarlo de la planta madre.

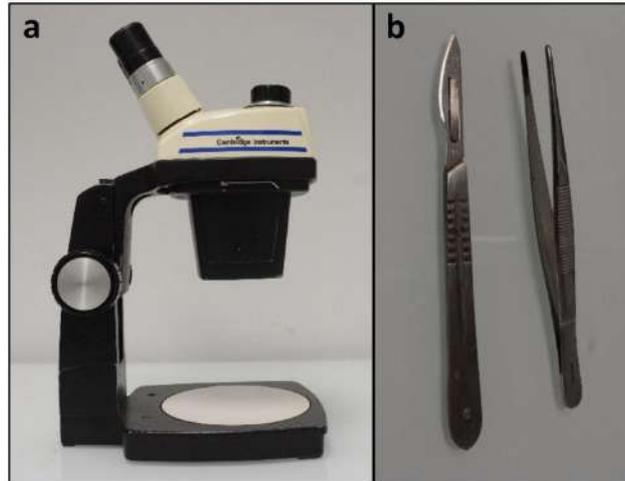


Figura 3. Equipo y herramientas utilizadas para la obtención de explantes vegetales **a)** Microscopio estereoscópico **b)** Pinzas y bisturí. (Fotografía: Juvencio Castañeda).

Para la preparación de medio de cultivo se necesitan balanzas granatarias y analíticas (Figura 4), las primeras se utilizan para pesar sustancias que se requieren en grandes cantidades, como sacarosa, agar, algunos macronutrientes, etc.; y las segundas se utilizan para pesar los compuestos que se requieren en menor cantidad, por ejemplo, reguladores de crecimiento, algunas vitaminas, micronutrientes, etc. Generalmente se usa papel aluminio o charolitas de plástico para pesar los reactivos.



Figura 4. Balanzas. Izquierda: balanza granataria (Max. 1200g, Min. 0.5g). Derecha: balanza analítica (Max. 120g, Min. 0.0001g). (Fotografía: Juvencio Castañeda).

Después de pesar los componentes del medio de cultivo, se necesitan mezclar disolviéndolos en agua destilada, para ello se puede usar un agitador magnético, el cual es un dispositivo electrónico que utiliza un campo magnético para mezclar de manera automatizada un solvente y uno o más solutos con ayuda de una barra magnética que con la ayuda de un campo magnético empieza a rotar, haciendo que la solución se mezcle automáticamente, además estos agitadores cuentan con la posibilidad de calentarse, aumentando la solubilidad de los componentes y la velocidad de solución.

Una vez mezclado el medio, se requiere de ajustar el pH del medio. Para este fin se puede usar tiras de pH, gotas de medición de pH o plumas de pH, sin embargo, la opción más precisa es el uso de un potenciómetro; este es un dispositivo electrónico que contiene un electrodo de vidrio el cual se encarga de la medición del pH de la solución con una precisión de 0.01 valores de pH, el equipo necesita de calibración esporádica, mientras que el electrodo de vidrio debe de manejarse con cuidado, ser limpiado con agua destilada y guardarse en su solución. Generalmente el pH más utilizado en los medios de cultivo para micropropagación de plantas es de 5.8 ± 0.02 , utilizando ácido clorhídrico (HCl) 0.1 M para bajar el pH, o bien, utilizar hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 M para subir el pH.

En la figura 5 se muestran un agitador magnético (para disolver los reactivos y preparar medios de cultivo) y un potenciómetro (para medir el pH de los medios de cultivo).

Para acelerar el descongelamiento de las soluciones que sirven para preparar el medio de cultivo y/o para disolver el agar de dicho medio, se puede utilizar un horno de microondas (figura 6). Se debe tener cuidado de que no se pierda volumen de agua al aumentar la temperatura, ya que puede afectar la concentración de sales dentro del medio. Es importante el uso de guantes de asbesto (o

similares) para evitar quemaduras al estar manipulando los matraces con el medio de cultivo que se introducen al horno de microondas.



Figura 5. Potenciómetro (izquierda) y agitador magnético (derecha) para medir el pH y para disolver los compuestos del medio de cultivo respectivamente. (Fotografía: Juvencio Castañeda).



Figura 6. Horno de microondas utilizado para disolver sustancias congeladas o para licuar el agar adicionado al medio de cultivo. (Fotografía: Juvencio Castañeda).

Algunos medios de cultivo requieren la incorporación de reguladores de crecimiento (hormonas) cantidades muy pequeñas (microgramos o microlitros), y dado que generalmente las soluciones stock de estos compuestos se encuentran ya disueltas en agua destilada (preparadas comúnmente a razón de miligramo por mililitro), se utilizan micropipetas (figura 7) para adicionar dichos reguladores de crecimiento al medio de cultivo. Las micropipetas tienen una precisión que puede variar (dependiendo la capacidad de la misma), pero la mayoría de ellas se utilizan para medir cantidades en microlitros.



Figura 7. Micropipetas con puntas utilizadas para medir volúmenes en microlitros. (Fotografía: Juvencio Castañeda).

Una vez preparado el medio de cultivo, se debe de esterilizar a fin de eliminar cualquier microorganismo que se pueda encontrar dentro del mismo, para esto se utiliza un autoclave (figura 8), que es un equipo cuyo funcionamiento es similar a una olla a presión, donde se calienta agua para generar vapor y por ende presión al aumentar la temperatura. Siempre que el tiempo de exposición sea suficiente, el vapor a presión puede destruir todos los microorganismos. La esterilización depende del tiempo, presión, temperatura y el volumen que se va a esterilizar, en los

laboratorios de micropropagación los medios de cultivo se esterilizan a 121 °C durante 15 minutos a una presión de 15 lb/in².



Figura 8. Autoclave semiautomática para esterilizar material mediante calor húmedo. (Fotografía: Juvencio Castañeda).

Sala de transferencia

Este es el espacio donde se lleva a cabo la mayor parte de la desinfección de los explantes, así como su siembra en los medios de cultivo, para lo cual se utiliza una campana de flujo laminar horizontal (también llamada cámara de inoculación o cabina de bioseguridad) (figura 9), en la cual,

el aire se toma del exterior y se hace pasar por un filtro HEPA (del inglés *High Efficiency Particulate Arresting*) que contiene un poro de apenas 0.3 micras de diámetro, con la finalidad de atrapar partículas de polvo, esporas de hongos o bacterias que se encuentren en el ambiente, dejando pasar solamente el aire estéril, este flujo de aire de forma laminar viaja con una dirección y velocidad uniforme (de 0.3 a 0.5 metros por segundo) a través de la campana creando una presión positiva dentro de ésta, impidiendo que el aire del cuarto entre sobre la misma. Además, la mayoría de las campanas cuentan con una fuente de luz ultravioleta capaz de dañar el ADN o ARN de los microorganismos, para así poder eliminar cualquiera que se pudiera encontrar dentro de la misma, funciona como una protección adicional a los patógenos.



Figura 9. Campana de flujo laminar horizontal. (Fotografía: Juvencio Castañeda).

Para usar la campana de flujo, esta debe limpiarse con alcohol al 96% o al 70% en todas las paredes, posteriormente, con la cubierta cerrada, se debe de encender la luz UV por 10 minutos. Al finalizar, se debe de encender el flujo de aire y dejar pasar 15 minutos con la finalidad de que se estabilice el flujo de aire, una vez efectuados estos pasos, se puede encender la luz fluorescente y levantar la cubierta para trabajar. Es necesario limpiar con alcohol al 96% o al 70% tanto las manos, como todo el material antes de ser introducido a la campana. Es aconsejable descontaminar el cuarto donde se encuentra la campana de flujo laminar a diario e instalar lámparas UV en la habitación para poder desinfectar el aire durante la noche, así como reemplazar los filtros de aire de las campanas cada año. En este espacio, el operador debe portar una bata larga que cubra su ropa y usar cubrebocas, pudiendo también utilizar cofia, cubre calzado y lentes de seguridad; además, es aconsejable retirar cualquier accesorio de las manos como relojes o anillos antes de lavarse las manos, ya que estos pueden mancharse y ser una fuente de contaminación. Los instrumentos como bisturíes, pinzas y agujas de inoculación pueden ser esterilizados por inmersión en alcohol al 96% y posterior flameado con cuidado en un mechero de alcohol, mechero de gas o esterilizarse en un mechero eléctrico. Antes de usar los instrumentos, estos deben de enfriarse, lo cual puede lograrse introduciendo el instrumento dentro del agar, en un recipiente con agua destilada estéril o dejándolo inclinado sobre una barra de apoyo o sobre papel filtro estéril.

Una manera adecuada de acomodarse dentro de la campana es colocar el mechero o fuente de esterilización a la pared adyacente, a la mitad, colocar el vidrio o papel estéril donde se llevará a cabo el trabajo, la más pegado posible al flujo de aire, cuidando que no exista ningún obstáculo entre el flujo de aire y la placa. Tomar el bisturí con una mano y las pinzas con la otra y trabajar como si se estuviera comiendo de un plato sin tocarlo; colocar los envases con cultivo de manera

Si es posible, dentro de esta sala se deben de tener instalaciones de aire acondicionado adecuadas con filtros de aire HEPA que puedan filtrar el aire de cualquier microorganismo que viene del exterior, la baja temperatura en este espacio funciona para frenar el crecimiento de hongos y bacterias que puedan existir en la sala.

Incubador o cuarto de cultivo

En la figura 11 se muestra un incubador para vitroplantas, este es el lugar donde se colocan las plantas y tejidos para su crecimiento óptimo. En este espacio se debe de colocar un aire acondicionado, con la principal finalidad de mantener a los cultivos creciendo a una temperatura controlada; la mayoría de las veces se busca mantener la temperatura constante a 25 °C o 27 °C, que es la temperatura óptima en la que la mayoría de los tejidos se desarrollan; respecto a la iluminación, es variable, según las necesidades, oscilando entre 1000 y 5000 lux y un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad. Normalmente este cuarto contiene anaqueles de alambre inoxidable con la finalidad de dejar pasar la corriente de aire y la luz que se instala sobre ellos, además, se busca que sea de acero inoxidable debido a que es un material no poroso, resistente y ayuda a reflejar la luz dentro del cuarto.

Para ingresar al cuarto de cultivo, se debe de portar bata y calzado adecuado. Se debe evitar mover los cultivos fuera del cuarto para prevenir una contaminación externa que pueda propagarse dentro del cuarto, solamente cultivos estériles deben de encontrarse en esta área; en caso de encontrarse cultivos contaminados, estos deben de retirarse inmediatamente y llevarse al área de lavado.



Figura 11. Incubador con cultivos *in vitro* creciendo en condiciones asépticas, a iluminación y temperatura constante. (Fotografía: Juvencio Castañeda).

Cuarto de lavado

La contaminación de los cultivos *in vitro* es el problema principal de los laboratorios de cultivos de células y tejidos vegetales *in vitro*, una vez que se detecta contaminación en algún cultivo o medio, este debe ser retirado inmediatamente y ser llevado al cuarto de lavado. Este espacio contiene autoclaves, fregaderos o tarjas y bolsas de basura que permiten el manejo adecuado de la contaminación y de material desechable. Los cultivos contaminados deben ser introducidos al autoclave y ser esterilizados para prevenir el escape de patógenos a lo largo del laboratorio, estos deben esterilizarse a 121 °C por 15 minutos y a una presión de 15 lb/in². Una vez terminado, se debe de esperar a que estos se enfríen para ser abiertos con seguridad, sus contenidos deben de ser vaciados en bolsas plásticas y desechados, al terminar, los materiales reutilizables se deben de lavar con agua y jabón y dejarse secar completamente para ser usados de nuevo (Phillips & Gamborg, 1995).

BIOFÁBRICAS PARA PLANTAS *IN VITRO*

Alexa Paola Plaza Ávila
Antonia Gutiérrez Mora

Las biofábricas se definen como laboratorios de cultivo de tejidos que tienen la capacidad de producir determinadas especies vegetales, de forma masiva y con protocolos establecidos; manteniendo una calidad óptima y uniforme en los productos (Iannicelli & Salvio-Escandón, 2015; Sharry, *et al* 2015). Mediante técnicas especializadas se toman pequeñas fracciones de plantas y con la adición de productos químicos se logra que éstas se desarrollen como una planta nueva dentro de frascos de vidrio. A este proceso se le denomina reproducción *in vitro* o micropropagación. Puede lograrse en corto tiempo la obtención de grandes cantidades de plántulas de alta calidad, libres de virus, plagas y enfermedades y que garanticen elevados rendimientos. Con el desarrollo de métodos eficientes es posible incrementar los rendimientos hasta en un 50 % en la producción de plantas.

Los aspectos fundamentales a tomar en cuenta para una biofábrica, de acuerdo con Orellana *et al.* (2008) incluyen la selección de genotipos, infraestructura tecnológica, disponibilidad de recursos y planificación para el proceso productivo, capacitación de recursos humanos y control de calidad. Para lograr la eficiencia es necesario considerar algunos aspectos importantes en los procesos, tales como: producir con el menor costo posible, utilizar la luz solar en la mayoría de las áreas, componentes del medio de cultivo que no necesariamente tengan una alta pureza, utilización de recipientes de bajo costo, sin embargo, antes de llevar a un proceso de propagación masiva en una biofábrica, es necesario primeramente desarrollar la experimentación antes de hacer los cambios pertinentes. De igual forma debe tenerse en cuenta la selección de los genotipos a utilizar, así como la infraestructura tecnológica y disponibilidad de insumos.

Con respecto a la reducción de costos, uno de los componentes principales de los medios de cultivo es la fuente de carbono, principalmente la sacarosa, al respecto es posible utilizar azúcar de mesa refinada, inclusive existen reportes donde se utiliza la melaza de caña para algunas especies (Saad & Elshahed, 2012). Otros elementos importantes a considerar son suplementos como agua de coco, jugos de frutas y verduras, extracto de plátanos, que aportan minerales, vitaminas, reguladores de crecimiento, entre otros componentes. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, antes de llevarlo a escala de producción masiva es necesario hacer la experimentación ya que las concentraciones pueden variar.

Acerca de la iluminación, la opción para reducir los costos es la utilización de muros de vidrio. En este aspecto es de suma importancia, que cuando se construya una biofábrica, tomar en cuenta la posición del sol y no tener obstrucción de la luz con barreras que impidan u obstaculicen la entrada de luz, por ejemplo: árboles altos, edificios, etc. De igual manera, es conveniente que los espacios de incubación, cuenten con un sistema de iluminación como apoyo en caso de ser necesario. En los últimos años el uso de luz LED, ha ido en aumento, si bien la inversión es mayor con respecto a luz fría, el retorno de inversión se refleja en poco tiempo. En este sentido, es conveniente la asesoría de especialistas para seleccionar el tipo de lámpara a adquirir para que cubran la intensidad y calidad de luz necesaria para el cultivo in vitro de plantas, así como la instalación a un temporizador programable para llevar a cabo el fotoperiodo que se requiera.

Por otro lado, los contenedores son considerados como un factor importante. Es conveniente la utilización de recipientes de vidrio cristalino o plástico transparente que se utilizan para comercializar alimentos en general, que tengan la característica de tolerar temperaturas de 121 °C. En ambos casos la tapa a utilizar debe ser transparente para que permita el paso de la luz.

Los laboratorios con un enfoque comercial por lo general tienden a ser amplios, pero a la vez más simples en cuestión de equipos e instalaciones, a diferencia de un laboratorio de investigación (Roca & Mroginski, 1991). En este sentido, por consecuencia la mano de obra es mayor que en un laboratorio de investigación, sin embargo, no necesariamente debe ser altamente especializado, esto reducirá el costo. Se estima que en el sistema de propagación de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* se destina aproximadamente un 40% de los gastos a mano de obra, 30% para actividades administrativas, 20% gastos varios (renta, servicios, entre otros) y 10% para materiales (Walker, 1986, citado en Ahloowalia & Savangikar, 2004). En la figura 12 se muestran las áreas indispensables con que debe contar una biofábrica (Se mencionan solo para la producción de plantas *in vitro*, sin embargo, es necesario indicar que posteriormente será necesario contar con un espacio para la adaptación y crecimiento de las plantas).

Con respecto a los equipos a utilizar en las biofábricas, básicamente son mínimos y en algunos de los casos, se pueden fabricar de manera “casera”, por ejemplo, la campana de flujo laminar, descrita en el capítulo “Instalaciones, operación y equipo de laboratorio”, se puede fabricar con materiales como madera y vidrio, el factor importante a considerar en este equipo es la perfecta colocación del filtro HEPA que evitará el paso de microorganismos al área de trabajo, así como que se incluya luz ultravioleta para complementar la esterilización del espacio (Figura 13). De igual manera, el sistema de esterilización (calor húmedo) puede ser por cualquier instrumento (por ejemplo, ollas exprés de doble fondo), en la medida de la automatización del equipo es posible ahorrar tiempo y por ende mano de obra.

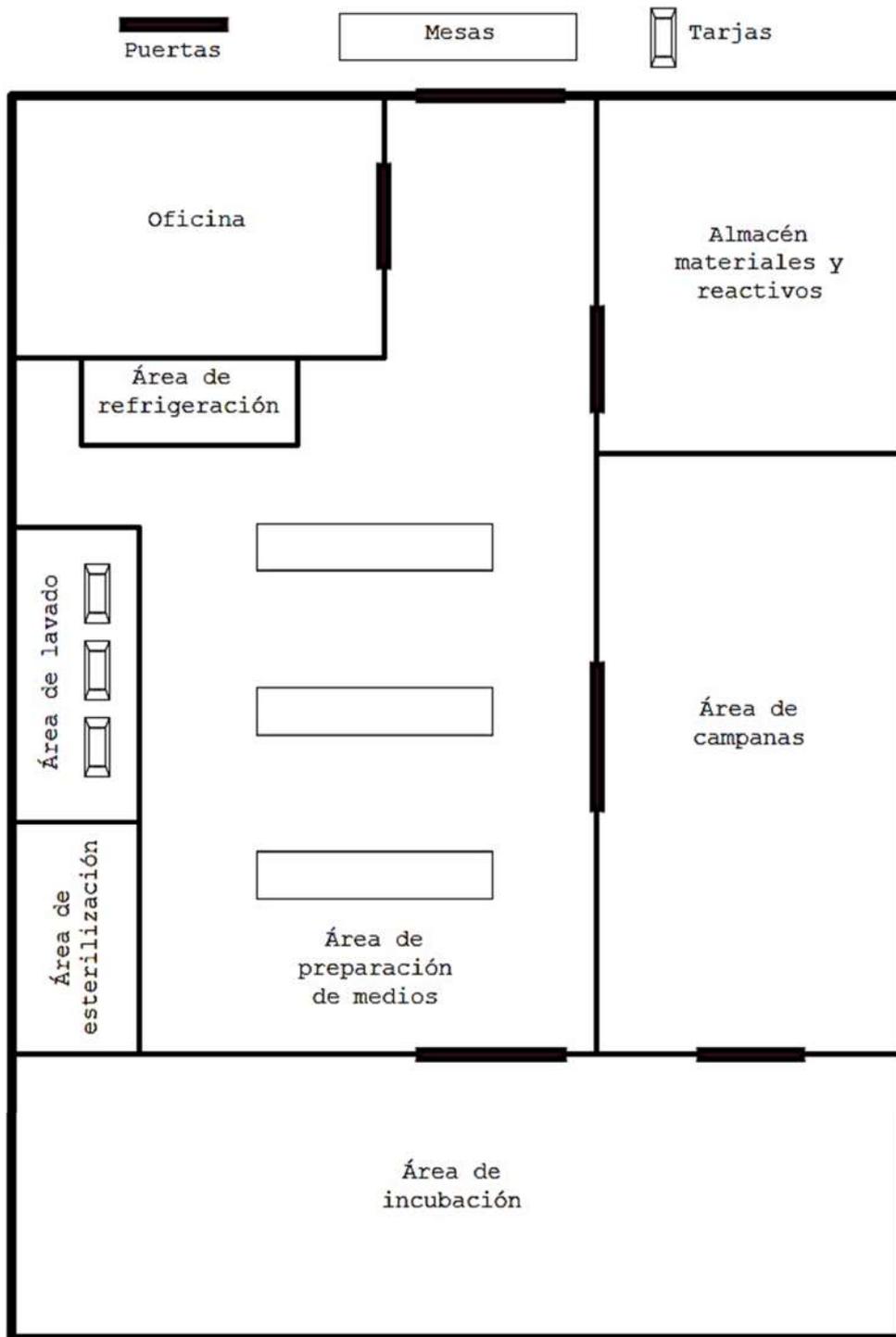


Figura 12. Áreas indispensables en una biofábrica. (Esquema: Andrea Pérez).

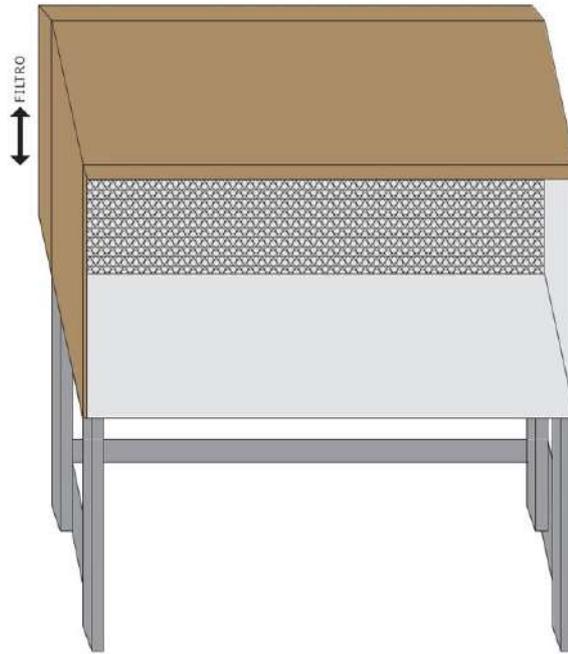


Figura 13. Campana de flujo laminar horizontal “casera” con filtro HEPA. (Imagen: Andrea Pérez).

Uno de los retos más grandes para las biofábricas a considerar es la contaminación por microorganismos pues, de no tratarse rápidamente, puede derivar en importantes pérdidas de material vegetal, lo que se traduce en un impacto negativo en el aspecto económico; por ello resulta crucial que se tomen medidas de prevención, así como de detección y control en sus primeras etapas, en caso de llegar a ser necesario.

Savangikar (2004) menciona que para resolver problemas asociados a la contaminación resulta imprescindible apegarse de forma cuidadosa a las técnicas básicas de cultivo de células y tejidos vegetales; esto quiere decir que, el control de la contaminación es dependiente de la calidad de los procedimientos, y no de su nivel de sofisticación. Referente a este punto, Ahlowaalia & Savangikar (2004) recomiendan contar con asesoría de profesionales, ya sea de centros de Investigación y Desarrollo (I+D) o de universidades.

El primer paso es la prevención, lo que involucra el llevar a cabo protocolos de desinfección adecuados para la especie que se va a propagar, pudiendo utilizar algún compuesto antimicrobiano durante la preparación de los explantes o adicionado al medio de cultivo. En este punto también se debe asegurar que las condiciones de las instalaciones y el material a utilizar sean las óptimas, además de seguir buenas prácticas de laboratorio a lo largo de todo el proceso.

La detección de la contaminación implica el monitoreo constante, facilitando que el tiempo de acción sea lo más breve posible, por lo tanto, minimizando los posibles daños. Dependiendo del tipo de microorganismo contaminante, se definirá la estrategia a seguir para eliminarlo.

Debido a la producción a gran escala que se establece en las biofábricas, en algunas ocasiones se recurre a otras estrategias de producción que, si bien pueden resultar costosas inicialmente, llegan a facilitar ciertas etapas del proceso de propagación. Se involucra tecnología que permite la automatización en cierta medida, lo que a largo plazo puede representar una disminución de los costos de mano de obra o recursos utilizados. Un ejemplo de ello son los llamados “sistemas de inmersión temporal” (SIT), los cuales tienen como fundamento que los explantes entran en contacto de forma intermitente con el medio líquido, intercalando con periodos donde los tejidos se encuentran expuestos a un ambiente gaseoso (Georgiev *et al.*, 2014). Algunas ventajas directas de este tipo de sistemas en el cultivo de tejidos incluyen la reducción de la hiperhidricidad y la asfixia, como se cita en Georgiev *et al.*, (2014).

Existen distintos tipos de sistemas de inmersión temporal comerciales, uno de los más conocidos a nivel mundial es el sistema RITA® (Recipiente para Inmersión Temporal Automatizado). Este consiste en un recipiente con dos compartimentos: en la parte superior se colocan los explantes y en la inferior el medio de cultivo (Etienne y Bertouli, 2002, citado en Lugo-Espinosa *et al.*, 2017).

Al aplicarse un flujo de aire a presión, el medio de cultivo sube, poniéndolo en contacto con los

explantes. Cuando cesa este flujo de aire, el medio de cultivo desciende por gravedad (Maldonado *et al*, 2003, citado por Lugo-Espinosa *et al*, 2017).

Las biofábricas actúan en estrecha colaboración con las entidades productivas, Institutos de Investigaciones Agrícolas, Institutos de biotecnología y otros organismos y dependencias relacionados con la agricultura. La producción masiva de plantas en biofábricas se ha extendido alrededor del mundo, principalmente en países desarrollados como Estados Unidos, China, Taiwan, entre otros. Estos países se han extendido a países en desarrollo, principalmente a Brasil, India y México (Sharry *et al.*, 2015).

PRÁCTICAS DE LABORATORIO

José Manuel Rodríguez Domínguez
Fabricio Ociel del Toro de la Cruz
José Juvencio Castañeda Nava
Antonia Gutiérrez Mora

La mayoría de las prácticas de este Manual (específicamente de la práctica 2 a la práctica 7) constan de dos etapas experimentales: la primera de ellas (a) con el procedimiento para la preparación del medio de cultivo, y la segunda (b) con el procedimiento para la siembra de explantes; debido a que el tiempo necesario para establecer la práctica completa puede extenderse, es recomendable que cada procedimiento experimental de estas prácticas, se efectúe en dos días.

Las especies vegetales que se manejan en las prácticas de este Manual, se pueden sustituir por otras, pero hay que tomar en cuenta que la formulación del medio de cultivo, así como el tiempo de respuesta pueden variar.

Siempre que sea posible, será mejor opción comenzar con explantes producidos *in vitro* con anterioridad, de esta manera se reducirán considerablemente la contaminación y el tiempo de respuesta de los mismos. En caso de que no se pueda iniciar a partir de explantes preestablecidos *in vitro*, se deben de seleccionar dichos explantes a partir de plantas madre vigorosas, tolerantes o resistentes a condiciones adversas y sanas, o por lo menos que no presenten síntomas de alguna enfermedad.

PRÁCTICA 1. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES STOCK PARA MEDIO DE CULTIVO DE MURASHIGE Y SKOOG (1962, MS) Y REGULADORES DE CRECIMIENTO

INTRODUCCIÓN

Los medios de cultivo pueden variar en composición dependiendo de la especie, el explante, el objetivo, etc. Esta variación en la composición implicará también diferentes formas de preparación y esterilización. Sin embargo, existen técnicas básicas para la preparación de medios de cultivo en general.

Es posible encontrar en la literatura diferentes medios de cultivo tales como el MS (el más ampliamente utilizado para la micropropagación de la mayoría de las especies vegetales), el medio KNUDSON C para la germinación *in vitro* de semillas de orquídeas, el medio WPM (Woody Plant Medium) para la micropropagación de especies leñosas, etc (George *et al.*, 2008)

En esta práctica se prepararán las soluciones Stock básicas para el medio de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962) que consisten en cinco soluciones: Macronutrientes, Micronutrientes, Cloruro de Calcio, Solución de Fe-EDTA y Vitaminas (Figura 14), así como soluciones de reguladores de crecimiento. Es importante señalar que al preparar medio de cultivo, además de estas soluciones Stock, se debe de agregar una fuente de carbono (por ejemplo, Sacarosa), un agente gelificante (por ejemplo, Agar) y se debe de ajustar el pH (5.8 ± 0.02).

Los reguladores de crecimiento (también conocidos como hormonas o fotohormonas) son los principales componentes que van a determinar el tipo de respuesta morfogénica que va a tener un explante en el cultivo *in vitro*, dentro de los principales reguladores de crecimiento se encuentran: auxinas, citocininas, giberelinas y ácido abscísico.

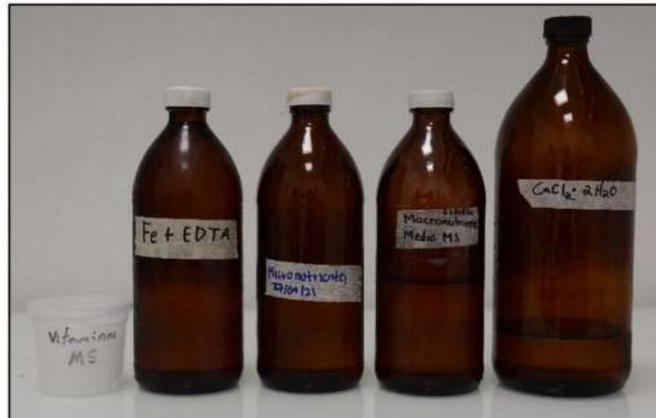


Figura 14. Soluciones stock para la preparación de medio de cultivo MS. (De izquierda a derecha: Compuestos orgánicos (principalmente vitaminas), Fe-EDTA, Micronutrientes, Macronutrientes, Cloruro de calcio). (Fotografía: Juvencio Castañeda).

Es importante mencionar que existen algunos proveedores de insumos de laboratorio donde es posible conseguir por separado los componentes para preparar el medio de cultivo MS (tal y como se presenta en esta práctica), o bien todos los componentes ya mezclados, pudiéndose encontrar incluso con sacarosa y agente gelificante ya incluidos (Figura 15).



Figura 15. Medio de cultivo MS. (Izquierda: Macronutrientes, Micronutrientes, Cloruro de calcio, Fe-EDTA y Vitaminas. Derecha: Igual que el anterior, pero incluyendo además sacarosa y agar). (Fotografía: Juvencio Castañeda).

OBJETIVO

Adquirir habilidad para la preparación de soluciones Stock de Macronutrientes, Micronutrientes, y compuestos orgánicos para preparar medio de cultivo MS, así como soluciones de Reguladores del Crecimiento.

MATERIALES

- 5 Vasos de precipitado de 500 ml
- Charolas o recipientes para pesar
- 1 Espátula para pesar
- 1 barra magnética
- 1 matraz volumétrico de 500 ml
- Una probeta de 250 ml
- Contenedores para almacenar el medio de cultivo concentrado
- 2 frascos ámbar de 25 ml (con tapa)

REACTIVOS

- Agua destilada
- HCl 1 M
- NaOH 1M
- Etanol
- Nitrato de Amonio
- Nitrato de potasio
- Sulfato de Magnesio Heptahidratado

- Fosfato de Potasio Monobásico
- Ácido bórico
- Sulfato de Manganeso Monohidratado
- Sulfato de Zinc Heptahidratado
- Yoduro de Potasio
- Molibdato de Sodio Dihidratado
- Sulfato de Cobre Pentahidratado
- Cloruro de Cobalto Hexahidratado
- Cloruro de Calcio Dihidratado
- Sulfato Ferroso Heptahidratado
- Etilendinitrilotetraacetato de Sodio
- Tiamina HCl
- Piridoxina HCl
- Myo-Inositol
- Ácido nicotínico
- Glicina

EQUIPOS

- Balanza granataria
- Balanza analítica
- Agitador magnético
- Autoclave

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

1. Preparación de las diluciones necesarias para el Medio de Cultivo MS

Pesar los compuestos en las cantidades indicadas en los cuadros 2, 3, 4, 5 y 6 dependiendo la cantidad de medio de cultivo que se desee preparar:

Cuadro 2. Solución stock de macronutrientes MS

COMPUESTO (FÓRMULA)	COMPUESTO (NOMBRE)	PARA AFORAR A 500 ml	PARA AFORAR A 1 litro	BALANZA
NH ₄ NO ₃	Nitrato de Amonio	82.5 g	165 g	Granataria
KNO ₃	Nitrato de Potasio	95.0 g	190 g	Granataria
MgSO ₄ ·7H ₂ O	Sulfato de Magnesio Heptahidratado	18.5 g	37 g	Granataria
KH ₂ PO ₄	Fosfato de Potasio Monobásico	8.5 g	17 g	Granataria

NOTAS

Disolver uno a uno los compuestos, agregar el siguiente hasta que se haya disuelto el anterior (en el mismo orden marcado en el cuadro).

Esterilizar la solución en autoclave y almacenar a temperatura ambiente

Cuadro 3. Solución stock de micronutrientes MS

COMPUESTO (FÓRMULA)	COMPUESTO (NOMBRE)	PARA AFORAR A 500 ml	PARA AFORAR A 1 litro	BALANZA
H ₃ BO ₃	Ácido bórico	620 mg	1.24 g	Analítica
MnSO ₄ ·H ₂ O	Sulfato de Manganeso Tetrahidratado	1.69 g	3.38 g	Analítica
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	Sulfato de Zinc Heptahidratado	860 mg	1.72 g	Analítica
KI	Yoduro de Potasio	83 mg	166 mg	Analítica
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	Molibdato de Sodio Dihidratado	25 mg	50 mg	Analítica
CuSO ₄ ·5H ₂ O	Sulfato de Cobre Pentahidratado	2.5 mg	5 mg	Analítica
CoCl ₂ ·6H ₂ O	Cloruro de Cobalto Hexahidratado	2.5 mg	5 mg	Analítica

NOTAS

Disolver uno a uno los compuestos, agregar el siguiente hasta que se haya disuelto el anterior (en el mismo orden marcado en el cuadro).

Esterilizar la solución en autoclave y almacenar a temperatura ambiente

Cuadro 4. Solución stock de compuestos orgánicos MS

COMPUESTO	PARA AFORAR A 500 ml	PARA AFORAR A 1 litro	BALANZA
TIAMINA HCl	5 mg	10 mg	Analítica
PIRIDOXINA HCl	25 mg	50 mg	Analítica
<i>myo</i> - INOSITOL	5 g	10 g	Granataria
ÁCIDO NICOTÍNICO	25 mg	50 mg	Analítica
GLICINA	100 mg	200 mg	Analítica

NOTAS

Disolver uno a uno los compuestos, agregar el siguiente hasta que se haya disuelto el anterior (en el mismo orden marcado en el cuadro).

No esterilizar la solución y almacenar en refrigeración a 4 °C para su uso a corto plazo o congelar a -20 °C para almacenar por más tiempo.

Cuadro 5. Solución stock de Cloruro de Calcio

COMPUESTO (FÓRMULA)	COMPUESTO (NOMBRE)	PARA AFORAR A 500 ml	PARA AFORAR A 1 litro	BALANZA
CaCl ₂ ·2H ₂ O	Cloruro de Calcio Dihidratado	10 g	20 g	Granataria

NOTA

Esterilizar la solución en autoclave y almacenar a temperatura ambiente

Cuadro 6. Solución stock de Fe·EDTA

COMPUESTO (FÓRMULA)	COMPUESTO (NOMBRE)	PARA AFORAR A 500 ml	PARA AFORAR A 1 litro	BALANZA
FeSO ₄ ·7H ₂ O	Sulfato Ferroso Heptahidratado	1.39 g	2.78 g	Granataria
Na ₂ ·EDTA	Etilendinitrilotetraacetato de Sodio	1.865 g	3.73 g	Granataria

NOTAS

Esterilizar la solución en autoclave y almacenar en refrigeración a 4 °C y en frasco color ámbar, ya que se degrada con la luz.

De las soluciones stock preparadas, medir las cantidades indicadas en el cuadro 7 dependiendo la cantidad de concentrado de medio MS que se desee preparar:

Cuadro 7. Preparación de concentrado de medio de cultivo MS

SOLUCION STOCK	PARA AFORAR A 1 LITRO	PARA AFORAR A 20 LITROS	PARA AFORAR A 50 LITROS
MACRONUTRIENTES	10 ml	200 ml	500 ml
MICRONUTRIENTES	5 ml	100 ml	250 ml
CaCl ₂ ·2H ₂ O	22 ml	440 ml	1100 ml
Fe-EDTA	10 ml	200 ml	500 ml
COMPUESTOS ORGÁNICOS	10 ml	200 ml	500 ml
SACAROSA	30 gr	600 gr	1.5 kg

2. Preparación de reguladores de crecimiento

Se mencionan como ejemplo solamente la preparación de dos reguladores de crecimiento, ya todos ellos se preparan de manera similar

2,4-D (Acido 2,4-diclorofenoxiacético)

La solución se prepara en una relación peso/volumen de 1mg/1ml. El 2,4-D se prepara agregando NaOH 1N (Hidróxido de sodio 1 Normal) o etanol absoluto, gota a gota hasta que la solución esté totalmente transparente (en caso de que se dificulte disolver, se puede utilizar un poco de calor). Posteriormente se afora con agua bidestilada al volumen deseado en un matraz volumétrico. La solución debe almacenarse a 4 °C, en un recipiente color ámbar, ya que se degrada con la luz.

BA (6-Benciladenina)

La solución se prepara en una relación peso/volumen de 1mg/1ml. El BA se prepara agregando NaOH 1N (Hidróxido de sodio 1 Normal) o HCl (Ácido clorhídrico 1 Normal) gota a gota hasta que la solución esté totalmente transparente (en caso de que se dificulte

disolver, se puede utilizar un poco de calor). Posteriormente se afora con agua bidestilada al volumen deseado en un matraz volumétrico. La solución debe almacenarse a 4 °C, en un recipiente color ámbar, ya que se degrada con la luz.

Para saber qué solventes y diluyentes utilizar en la preparación de los diferentes reguladores de crecimiento (así como otras características importantes), se puede consultar la “TABLE FOR MOLAR EQUIVALENCE AND SOLUTION PREPARATION” que se localiza en la siguiente dirección de internet:

<https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/technical-documents/technical-article/cell-culture-and-cell-culture-analysis/plant-tissue-culture/growth-regulators>

PREGUNTAS

1. ¿Por qué el Hierro o Fierro se tiene que preparar en una solución por separado?
2. ¿Cuál es la función del EDTA?
3. ¿Cuál es la diferencia entre “Hormonas” y “Reguladores de crecimiento”?

PRÁCTICA 2. EFECTO DE DIFERENTES LONGITUDES DE ONDA LUMINOSAS EN LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE JITOMATE (*Solanum lycopersicum*) IN VITRO.

INTRODUCCIÓN

La luz del sol o de cualquier fuente luminosa (lámparas, focos, etc.) está conformada por radiación electromagnética, un tipo de energía que viaja en ondas; cada onda electromagnética tiene una longitud de onda particular, que se define como la distancia de una cresta a la siguiente, entre más corta la longitud de onda, tiene más energía y entre más larga sea, su energía es menor.

El espectro visible es la única parte del espectro electromagnético que puede ver el ojo humano, comprende la radiación electromagnética que se encuentra entre 400 nm (nanómetros) y 700 nm. Dentro de este rango de longitud de onda, las plantas realizan la fotosíntesis en los cloroplastos, sin embargo, las plantas no utilizan de igual manera todas las longitudes de onda de la luz, sino que a través de moléculas llamadas pigmentos, absorben longitudes de onda específicas y reflejan otras. El conjunto de longitudes de onda que absorbe un pigmento se conoce como el espectro de absorción. El pigmento más importante en la fotosíntesis que utilizan las plantas es la clorofila (a y b). Las longitudes de onda que no son absorbidas son reflejadas, y éste es el color que vemos de las plantas. En la figura 16 se muestran los espectros de absorción de algunos pigmentos encontrados en las plantas.

La luz blanca del sol o de un tubo fluorescente es la combinación de todo el espectro de luz visible, mismo que se puede descomponer utilizando un prisma para revelar los colores que la constituyen. Utilizando un monocromador, que es un dispositivo que solo deja pasar una longitud de onda en particular, se puede irradiar a la planta únicamente con esa longitud de onda, focalizando esa energía en los espectros de emisión donde la planta es más activa, obteniendo el beneficio de

reducir el costo de producción de las plantas (si son cultivadas con luz artificial) además de obtener un mayor desarrollo en menor tiempo.

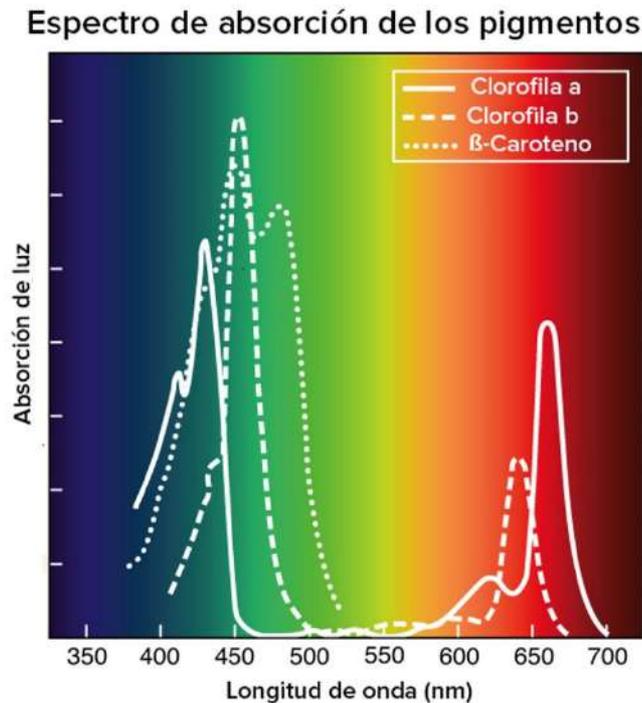


Figura 16. Espectro de absorción para diferentes pigmentos. Imagen modificada de "The Light-Dependent Reactions of Photosynthesis: Figure 5", de OpenStax College, Biología (Avisar, *et al.*, 2013). Biology: OpenStax. Licencia de CC BY 3.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>)

El papel celofán ha demostrado ser un excelente monocromador, ya que solamente deja pasar la longitud de onda del color que tiene dicho papel, por lo que es una forma sencilla de solo irradiar a la planta o semilla con una longitud de onda específica. Varias especies vegetales han reportado una mayor tasa de germinación cuando sus semillas son irradiadas por distintas longitudes de onda, especialmente en las longitudes de onda de color naranja o verde, mientras que otras longitudes de onda como el rojo han producido diferentes efectos en las plántulas (Godo, *et al.*, 2011). Sin embargo, otras especies vegetales han experimentado una inhibición de la germinación al ser

irradiados con otras longitudes de onda, especialmente en el infrarrojo lejano. Esto sucede debido a que las semillas contienen una proteína fotorreceptora llamada fitocromo que es usada para detectar la luz, la misma que interactúa en la actividad de la semilla. (Goggin & Steadman, 2012). Con base en esto, es necesario conocer la mejor longitud de onda que ayude a obtener el mayor porcentaje de germinación de semillas de una determinada especie vegetal, así como el mayor crecimiento de la misma.

OBJETIVO

Determinar la longitud de onda luminosa más eficiente en la germinación *in vitro* de semillas de jitomate (*Solanum lycopersicon*)

MATERIALES

- 1 Vaso de precipitado de 1000 ml (a)*
- 1 Probeta de 1000 ml (a)
- 1 Probeta de 500 ml (a)
- 1 Probeta de 50 ml (a)
- 4 Matraces de 500 ml (a)
- 1 Pipeta de 10 ml (a)
- 20 Frascos de cultivo de 500 ml con tapa (a)
- 2 Charolas para pesar (a)
- Espátula (a)
- Barra magnética (a)
- Recuperador de barras magnéticas (a)

- Guantes de asbesto (a)
- 2 Goteros o Pipetas Pasteur desechables (con bulbo de hule) (a)
- 5 Contenedores de plástico de 500 ml con tapa (a)
- Plástico autoadherible (a y b)
- 1 Infusor de té de malla y con mango tipo pinza (b)*
- 1 Vaso de precipitado de 100 ml (b)
- 1 Probeta de 250 ml (b)
- 1 Pinza de disección (b)
- Papel celofán de 5 colores (Rojo, Amarillo, Verde, Azul, Blanco) (b)
- 1 Marcador indeleble (b)
- 1 Sobre con semillas de jitomate (b)

REACTIVOS

- Concentrado de medio de cultivo MS (10X) (a)
- Agua destilada (a)
- HCl 1M (a)
- NaOH 1M (a)
- Sacarosa (a)
- Agar (a)
- Agua corriente (de la llave) (b)
- Cloro comercial (6%) (b)

- Detergente comercial (b)
- Alcohol etílico comercial al 96% (b)

EQUIPOS

- Balanza granataria (a)
- Potenciómetro (a)
- Horno de microondas (a)
- Autoclave (a)
- Agitador magnético (a)
- Campana de flujo laminar horizontal (b)
- Mechero Bunsen (b)

*(a) (b) Indica la etapa del procedimiento experimental en que se requiere

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

a) Preparación del medio de cultivo (1000 ml)

1. En un vaso de precipitado de 1000 ml vaciar 500 ml de agua destilada y agregar concentrado de medio MS (10X) para obtener una concentración final de 0.1X
2. Colocar el vaso de precipitado sobre un agitador magnético, agregar y disolver 3 g de sacarosa agitándolo con una barra magnética.
3. Aforar a 1000 ml utilizando agua destilada.

4. Ajustar el pH a 5.8 ± 0.02 con el potenciómetro agregando gota a gota las soluciones de NaOH 1 M o de HCl 1 M (mantener en agitación constante).
5. Dividir y colocar 250 ml del medio de cultivo en cuatro matraces de 500 ml y adicionar 2 g de agente gelificante (agar) a cada uno de ellos.
6. Calentar los matraces en un horno de microondas a fin de disolver el agar, teniendo cuidado de que no se derrame el medio de cultivo debido a la ebullición del mismo; con la ayuda de guantes de asbesto retirar el matraz del horno, agitar un poco y repetir el procedimiento hasta que el agar se disuelva completamente.
7. Dividir y vaciar 50 ml de medio de cultivo en 20 frascos de vidrio (con capacidad de 500 ml).
8. Preparar un juego de aguas destiladas para desinfectar la semilla, para lo cual, utilizar cinco contenedores de plástico de 500 ml y verter agua destilada en cada uno de ellos de la siguiente manera: Contenedor 1) Colocar 60 ml de agua destilada; Contenedor 2) Colocar 100 ml de agua destilada; Contenedores 3, 4 y 5) Colocar 200 ml de agua destilada en cada uno y tapa todos los contenedores.
9. Esterilizar en la autoclave los frascos de cultivo con la tapa sobrepuesta y los contenedores con agua destilada. De igual manera, es recomendable esterilizar las pinzas, bisturí e infusor de té, a fin de disminuir riesgos de contaminación.
10. Una vez esterilizado el medio de cultivo, dejarlo enfriar un poco dentro del autoclave y posteriormente cerrar bien la tapa (esto para evitar que se haga vacío y después se dificulte abrir la tapa).
11. Sellar los frascos con plástico autoadherible y almacenarlos para su uso posterior. De igual manera, sellar con plástico autoadherible los contenedores que contienen agua destilada.

En la figura 17 se muestra esquemáticamente los pasos a seguir:

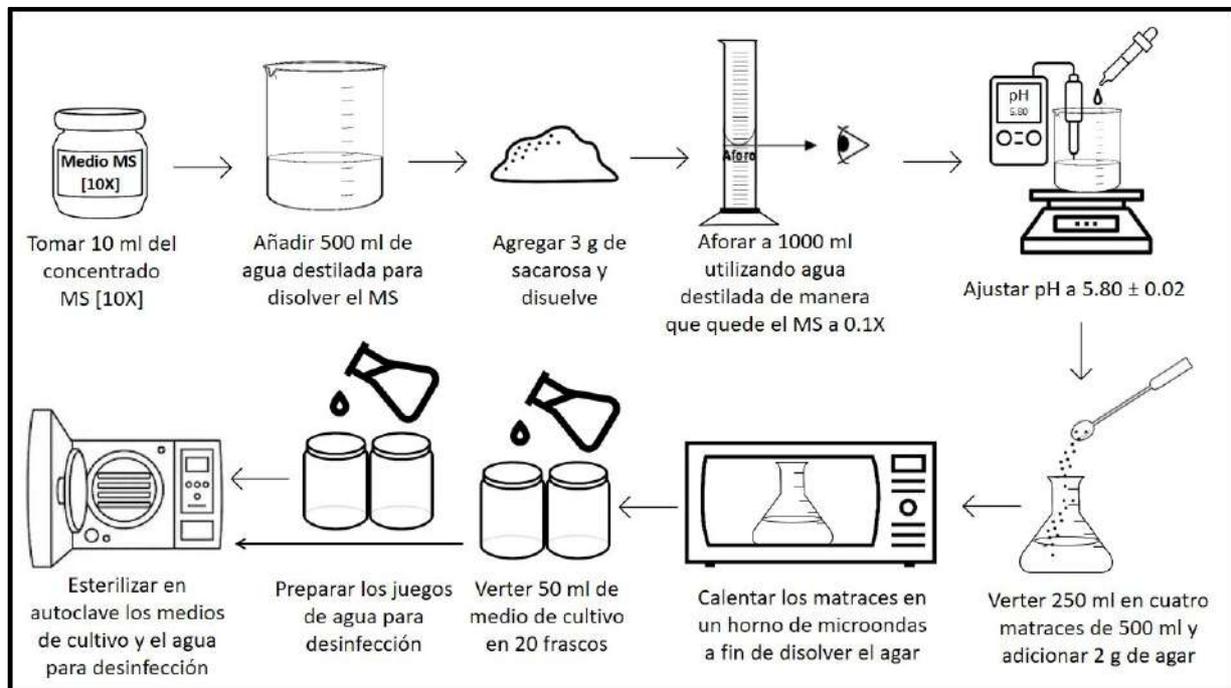


Figura 17. Preparación del medio de cultivo. (Esquema: Fabricio Ociel del Toro).

b) Desinfección y siembra de semillas

1. Preparar una solución al 3% v/v de detergente líquido y agua corriente en un vaso de 100 ml no estéril.
2. En la campana de flujo laminar horizontal preparar los juegos de desinfección (utilizando las aguas esterilizadas anteriormente en el autoclave) de la siguiente manera: Contenedor 1) Coloca 140 ml de etanol al 96% en el contenedor que tiene 60 ml de agua destilada (solución de alcohol al 70%); Contenedor 2) Coloca 100 ml de hipoclorito de sodio en el contenedor que tiene 100 ml de agua destilada (solución al 3% de cloro comercial).
3. Colocar 100 semillas de jitomate dentro del infusor de té, lavarlas en el recipiente con el jabón agitando constantemente durante 5 min y enjuagarlas a chorro de agua.

4. En la campana de flujo laminar horizontal, colocar el infusor de té con las semillas en la solución de alcohol al 70% durante un minuto, agitando constantemente.
5. Transferir a la solución de cloro comercial al 3% durante 10 min, agitando constantemente.
6. Hacer tres enjuagues en agua destilada estéril (aproximadamente 5 minutos en c/u) a fin de quitar el exceso de cloro. Agitar constantemente.
7. Con la ayuda de pinzas previamente flameadas y enfriadas, sembrar cinco semillas en cada frasco colocándolas sobre el medio de cultivo.
8. Tapar los frascos y sellar la tapa con plástico autoadherible
9. Colocar el papel celofán de color diferente a los frascos de medio de cultivo (4 frascos con cada color diferente) y rotular con un marcador indeleble, escribir una etiqueta con nombre, fecha, especie sembrada y número de práctica.
10. Colocarlos en el área de incubación.

En la figura 18 se muestra esquemáticamente los pasos a seguir:

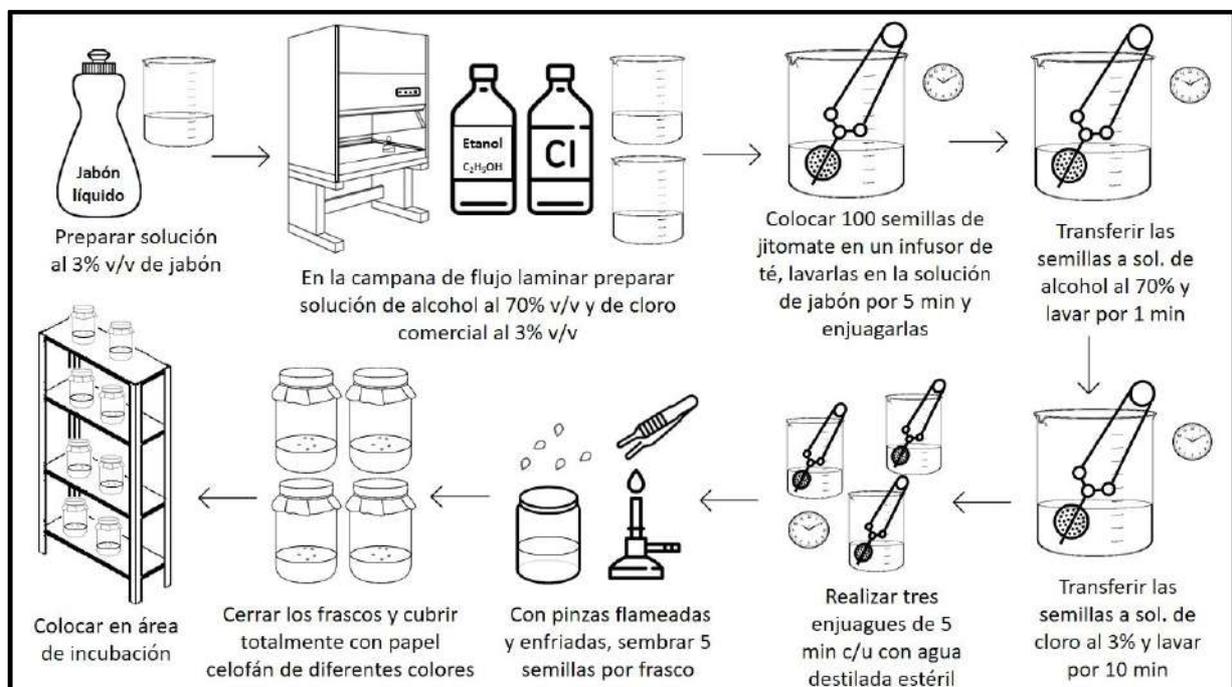


Figura 18. Desinfección y siembra de semillas. (Esquema: Fabricio Ociel del Toro).

RESULTADOS A REPORTAR

1. Porcentaje de germinación de las semillas y el tiempo de germinación.
2. Con base en los resultados anteriores, determinar cuál fue la longitud de onda luminosa más eficiente para la germinación *in vitro* de las semillas de jitomate.
3. Identificar los microorganismos que crecieron como contaminantes (si los hubo), reportar el porcentaje de contaminación y proponer la causa de dicha contaminación.

RESULTADOS ESPERADOS

En la figura 19 se presenta los resultados que se espera obtener:

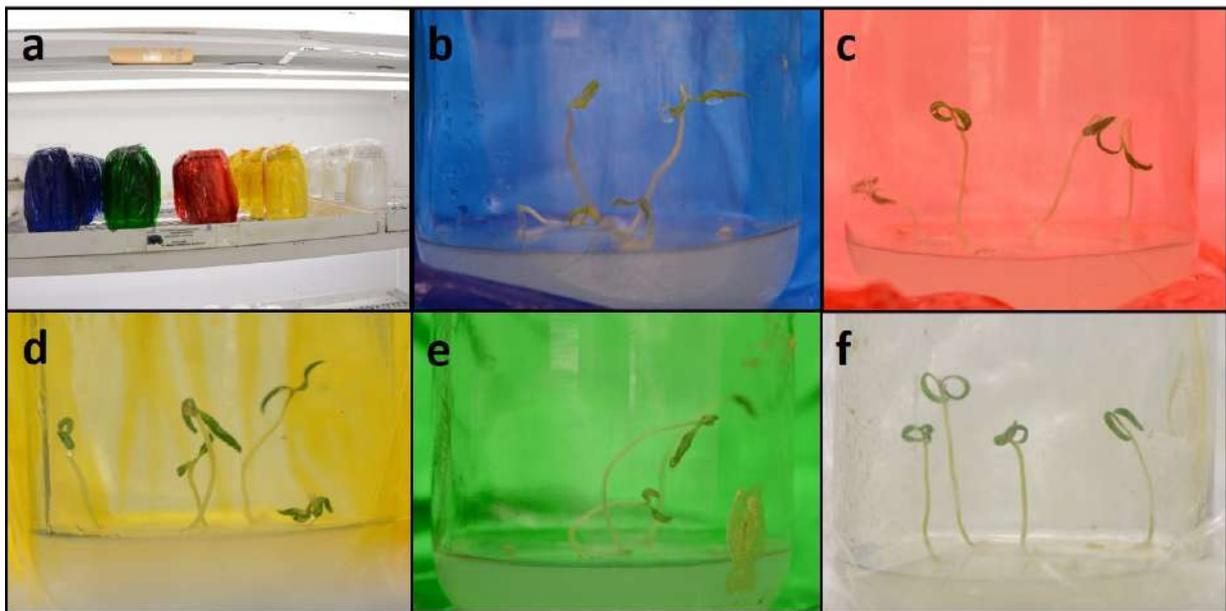


Figura 19. Efecto de diferentes longitudes de onda luminosas en la germinación de semillas y crecimiento de plántulas de jitomate (*Solanum lycopersicum*) *in vitro*. **a)** Contenedores envueltos con papel celofán de diferentes colores. **b)** Azul. **c)** Rojo. **d)** Amarillo. **e)** Verde. **f)** Blanco (control). (Fotografías: Juvencio Castañeda).

PREGUNTAS

1. ¿Cuáles son las ventajas de germinar semillas *in vitro*?
2. ¿Cuál es el objetivo de utilizar papel celofán blanco?
3. Además del papel celofán, ¿qué otro material podría ser utilizado para experimentar con diferentes longitudes de onda luminosa?
4. ¿El tipo de longitud de onda luminosa es un aspecto importante para la germinación de semillas?
5. ¿Cómo se podría implementar este experimento a gran escala?

PRÁCTICA 3. EVALUACIÓN DE DIFERENTES TRATAMIENTOS DE DESINFECCIÓN EN EXPLANTES DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris*)

INTRODUCCIÓN

La contaminación en los medios de cultivo es uno de los principales problemas que enfrentan los laboratorios de micropropagación de plantas, la cual es causada por hongos, bacterias y virus, entre otros; esto es debido a que las plantas en el medio ambiente se encuentran infestadas con estos microorganismos, los cuales se pueden encontrar de manera superficial o de manera endógena o sistémica. Una forma de disminuir los problemas de contaminación, es desde el principio seleccionar las plantas madre que se vean más vigorosas y sin síntomas aparentes de enfermedad, posteriormente se debe de elegir el explante, pudiendo seleccionar entre tallos, hojas, raíces, pétalos, semillas, meristemos, etc. (Figura 20), el cual se someterá al proceso de desinfección.



Figura 20. Diferentes tipos de explantes para la micropropagación de plantas. De izquierda a derecha: raíz, nudo con yemas, hoja, pétalo, semillas. (Fotografía: Juvencio Castañeda).

Existe una gran cantidad de agentes desinfectantes o técnicas de desinfección, entre los que se encuentran alcohol, fungicidas, bactericidas, agua oxigenada (peróxido de hidrógeno), cloro comercial (hipoclorito de sodio), cloruro de mercurio, uso de luz ultravioleta, choque térmico, entre otros. La elección del agente desinfectante y el tiempo de desinfección varía de acuerdo a varios aspectos: tipo de planta, condiciones de la planta madre, edad de la planta madre y tipo de explante. Se utilizará más tiempo de desinfección y/o agentes desinfectantes más agresivos si la planta es leñosa, si proviene de un lugar con plantas enfermas, si presenta síntomas de enfermedad, si ya es muy madura, si el explante es resistente, (por ejemplo hojas y raíces viejas, segmentos de tallos lignificados), etc. Por el contrario, se utilizará menos tiempo de desinfección y/o agentes desinfectantes menos agresivos si la planta es herbácea, si proviene de un lugar con plantas sanas, si no presenta síntomas de enfermedad, si ya es muy joven, si el explante es frágil, (por ejemplo hojas y raíces jóvenes, pétalos), etc., (Mroginski, *et al.*, 2004; George, *et al.*, 2008).

Otro problema muy importante es la contaminación causada por virus, para eliminarlos se han propuesto varias técnicas tales como el cultivo de meristemos, termoterapia, quimioterapia, crioterapia y electroterapia.

Cuando se presenta mortandad en las plántulas *in vitro*, es importante identificar si esta se debe a contaminación o a algún problema fisiológico, por ejemplo: hiperhidricidad, producción de fenoles (oxidación), etc.

OBJETIVO

Comparar diferentes métodos de desinfección de explantes, utilizando diversos agentes desinfectantes y técnicas asépticas de fácil obtención e implementación.

MATERIALES

- 1 Vaso de precipitado o matraz de 500 ml (a)*
- 1 Probeta de 500 ml (a)
- 1 Probeta de 250 ml (a)
- 1 Probeta de 100 ml
- 1 Pipeta (o micropipeta) de 5 ml (a)
- 2 Matraces de 500 ml (a)
- 20 Cajas de Petri estériles (a)
- 2 Charolas para pesar (a)
- Espátula (a)
- Barra magnética (a)
- Recuperador de barras magnéticas (a)
- 2 Goteros o Pipetas Pasteur desechables (con bulbo de hule) (a)
- 5 Contenedores de plástico de 500 ml con tapa (a)
- 1 Vidrio (20 x 20 cm) o caja de Petri de vidrio (a)
- Papel aluminio (a)
- Papel de estraza (a)
- Plástico autoadherible (a y b)
- 2 vasos de precipitado de 1000 ml (b)*
- 1 Vaso de precipitado de 500 ml (b)
- 1 Probeta de 250 ml (b)

- 1 Pinza de disección (b)
- 1 Bisturí (b)
- 1 Navaja de bisturí Núm. 11 (b)
- 1 Termómetro (b)
- 1 Marcador indeleble (b)
- Vainas de frijol inmaduro (ejotes) (b)

REACTIVOS

- Concentrado de medio de cultivo MS (10X) (a)
- Agua destilada (a)
- HCl 1M (a)
- NaOH 1M (a)
- Sacarosa (a)
- Agar (a)
- Solución de 6- Benciladenina (1mg/1ml) (a)
- Agua corriente (de la llave) (b)
- Cubos de hielo (b)
- Solución desinfectante de plata coloidal al 0.32% (b)
- Agua oxigenada al 3% (b)
- Cloro comercial (6%) (b)
- Detergente comercial (b)
- Alcohol etílico comercial al 96% (b)

EQUIPOS

- Balanza granataria (a)
- Potenciómetro (a)
- Autoclave (a)
- Agitador magnético (a)
- Campana de flujo laminar horizontal (a y b)
- Mechero Bunsen (b)
- Horno de microondas (b)

*(a) (b) Indica la etapa del procedimiento experimental en que se requiere

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

a) Preparación del medio de cultivo (500 ml)

1. En un vaso de precipitado de 500 ml colocar 250 ml de agua destilada y agregar concentrado de medio MS (10X) para obtener una concentración final de 1X
2. Colocar el vaso de precipitado sobre agitador magnético, agregar y disolver 15 g de sacarosa agitándolo con una barra magnética.
3. Con la ayuda de una pipeta o micropipeta agregar 5 ml de 6-benciladenina
4. Aforar a 500 ml utilizando agua destilada.
5. Ajustar el pH a 5.8 ± 0.02 , con el potenciómetro agregando gota a gota las soluciones de NaOH 1 M o de HCl 1 M (mantener en agitación constante).
6. Colocar 250 ml del medio de cultivo en dos matraces de 500 ml y adicionar 2 g de agente gelificante (agar) a cada uno de ellos.

7. Tapar los matraces con papel aluminio o con papel de estraza.
8. Tratamiento 1 (desinfección con cloro comercial).- Preparar un juego de aguas para desinfección, para lo cual, utilizar cinco contenedores de plástico de 500 ml y vaciar agua destilada en cada uno de ellos de la siguiente manera: Contenedor 1) Colocar 60 ml de agua destilada; Contenedor 2) Colocar 100 ml de agua destilada; Contenedores 3, 4 y 5) Colocar 200 ml de agua destilada en cada uno y tapar todos los contenedores.
9. Tratamiento 2 (desinfección con plata coloidal).- En un contenedor de plástico de 500 ml colocar 250 ml de agua destilada y tapar el contenedor
10. Tratamiento 3 (desinfección con agua oxigenada).- Preparar un contenedor de plástico de 500 ml vacío con tapa.
11. Tratamiento 4 (desinfección utilizando choque térmico).- Utilizar dos vasos de precipitado de 1000 ml.
12. Envolver en papel de estraza un vidrio o una caja de Petri de vidrio para corte.
13. Esterilizar en el autoclave los matraces con medio de cultivo, el vidrio o caja de Petri para corte, los contenedores con agua destilada y el contenedor vacío para los tratamientos 1, 2 y 3. De igual manera, es recomendable esterilizar las pinzas y bisturí, a fin de disminuir riesgos de contaminación.
14. En la campana de flujo laminar horizontal, vaciar el medio de cultivo en cajas de Petri estériles (aproximadamente 25 ml en cada una) y dejar que gelifique, (no colocar la tapa sobre la caja de Petri, mientras está gelificando el medio, ya que esto incrementa la condensación de agua).
15. Una vez gelificado el medio de cultivo, tapar las cajas de Petri, sellarlas con plástico autoadherible y almacenarlas boca abajo en un refrigerador a 4 °C para su uso posterior.

De igual manera, sellar con plástico autoadherible los contenedores que contienen agua destilada.

En la figura 21 se muestra esquemáticamente los pasos a seguir:

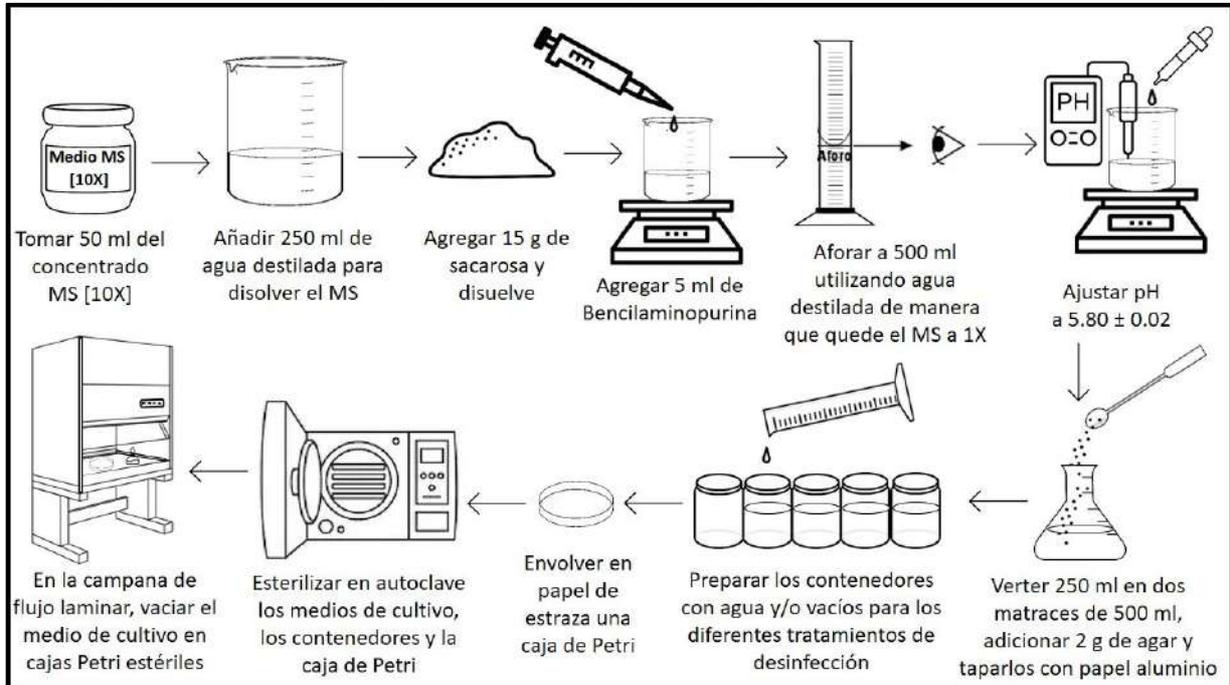


Figura 21. Preparación del medio de cultivo. (Esquema: Fabricio Ociel del Toro).

b) Desinfección y siembra de explantes

1. Preparar una solución al 3% v/v de detergente líquido y agua corriente en un vaso de precipitado o matraz de 500 ml no estéril.
2. Coloca 15 vainas de ejote dentro del vaso de precipitado (o matraz) con agua y jabón, lavarlas agitando constantemente durante 5 min y enjuagarlas con agua corriente.
3. Tratamiento 1: En la campana de flujo laminar horizontal preparar el juego de desinfección para cloro comercial (utilizando las aguas que se esterilizaron anteriormente en el autoclave) de la siguiente manera: Contenedor 1) Colocar 140 ml de etanol al 96% en el contenedor que tiene 60 ml de agua destilada (solución de alcohol al 70% v/v); Contenedor 2) Colocar 100 ml de hipoclorito de sodio en el contenedor que tiene 100 ml de agua

destilada (solución al 3% v/v de cloro comercial). Colocar las vainas de ejote en la solución de alcohol al 70% durante un minuto, agitando constantemente. Con las pinzas previamente flameadas, transferirlas a la solución de cloro comercial al 3% v/v durante 10 min, agitando constantemente. Nuevamente, con las pinzas flameadas, transferir las vainas de ejote a un contenedor con agua de enjuague, haciendo en total tres enjuagues en agua destilada estéril (aproximadamente cinco minutos en c/u) a fin de quitar el exceso de cloro. Agitar constantemente.

4. Tratamiento 2: En la campana de flujo laminar horizontal preparar el contenedor de plástico para la desinfección con plata coloidal (utilizando el contenedor de plástico con 250 ml de agua destilada que se esterilizó anteriormente en el autoclave) de la siguiente manera: colocar tres gotas de solución desinfectante de plata coloidal y agitar levemente para mezclarla homogéneamente. Colocar las vainas de ejote en la solución de plata coloidal durante 15 minutos, agitando constantemente.
5. Tratamiento 3: En la campana de flujo laminar horizontal, vaciar 250 ml de agua oxigenada al 3% en el contenedor de plástico vacío de 500 ml que se esterilizó anteriormente en el autoclave y colocar las vainas de ejote durante 10 minutos, agitando constantemente.
6. Tratamiento 4: En la campana de flujo laminar horizontal, preparar el tratamiento para choque térmico de la siguiente manera: en los vasos de precipitado de 1000 ml, vaciar 500 ml en cada uno. Colocar un vaso de precipitado en el horno de microondas para calentar el agua a 60 °C y colocar cubos de hielo al otro vaso de precipitado para enfriar el agua a 4 °C. Colocar las vainas de ejote en vaso de precipitado que tiene el agua a 60 °C durante cinco minutos, y posteriormente transferirlas inmediatamente al vaso de precipitado que

tiene el agua a 4 °C durante cinco minutos. (registrar la temperatura que tiene el agua con un termómetro).

7. Una vez efectuados todos los tratamientos de desinfección, con la ayuda de pinzas previamente flameadas y enfriadas, colocar las vainas de ejote sobre el vidrio de corte y con ayuda del bisturí abrir las vainas, sacar las semillas inmaduras y separar los cotiledones.
8. Sembrar tres semillas (6 cotiledones) en cada caja de Petri colocándolas sobre el medio de cultivo.
9. Tapar las cajas de Petri, sellarlas con plástico autoadherible y sobre la tapa roturarlas con un marcador indeleble y escribir número de tratamiento, nombre, fecha, especie sembrada y número de práctica.
10. Colocarlas en el área de incubación.

En la figura 22 se muestra esquemáticamente los pasos a seguir:

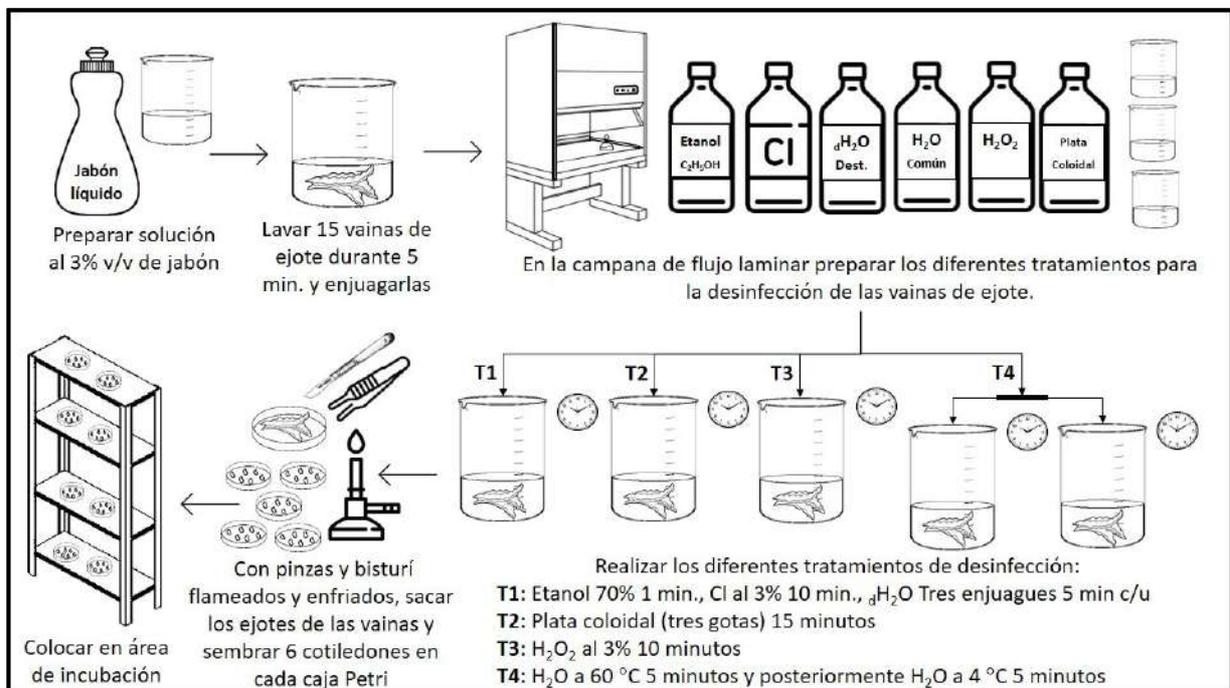


Figura 22. Desinfección y siembra de explantes. (Esquema: Fabricio Ociel del Toro).

RESULTADOS A REPORTAR

1. Porcentajes de establecimiento *in vitro*, contaminación y necrosis de los explantes en cada uno de los diferentes tratamientos de desinfección y hacer un gráfico.
2. Con base en estos resultados, determinar cuál fue el mejor tratamiento para la desinfección de los explantes.
3. Identificar los microorganismos que crecieron como contaminantes (si los hubo), reportar el porcentaje de contaminación y proponer la causa de dicha contaminación.

RESULTADOS ESPERADOS

En la figura 23 se presenta los resultados que se espera obtener:

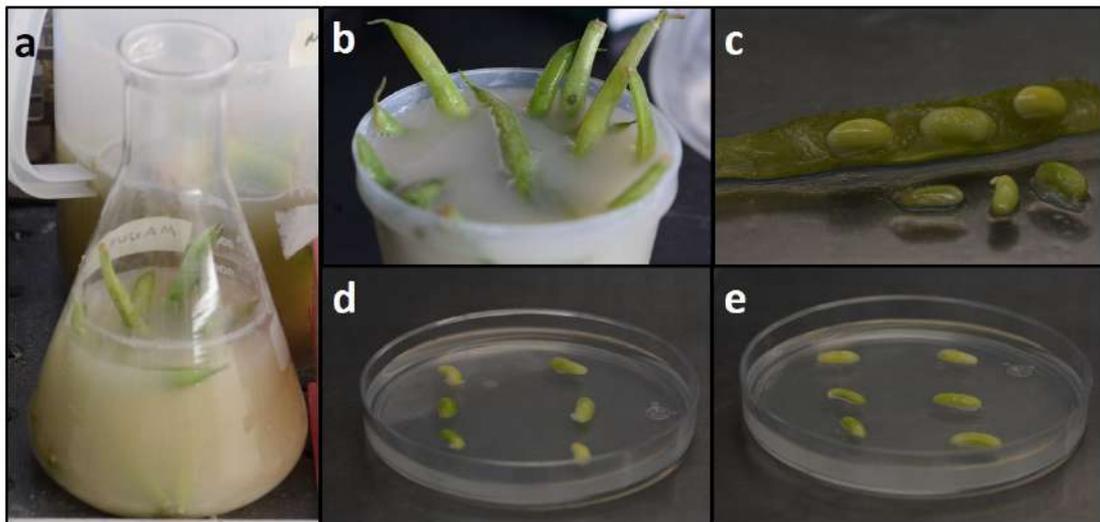


Figura 23. Algunas etapas en el proceso de desinfección y establecimiento aséptico de explantes *in vitro* de frijol (*Phaseolus vulgaris*). **a) y b)** Desinfección de vainas de frijol inmaduras (ejotes) **c)** Extracción de las semillas de la vaina. **d) y e)** Siembra *in vitro* de cotiledones. El mejor tratamiento será el que no presente crecimiento de microorganismos en el medio de cultivo. (Fotografías: Juvencio Castañeda).

PREGUNTAS

1. ¿En qué casos se recomienda utilizar el agua oxigenada como agente desinfectante?
2. ¿Cuál de los tratamientos de desinfección utilizados considera que sea menos agresivo para los explantes y por qué?
3. ¿Considera que otros agentes desinfectantes que existen en un botiquín de emergencia pueden ser útiles para desinfectar explantes?
4. Si los explantes utilizados en esta práctica hubieran sido pétalos de flores, ¿Considera que habrían sobrevivido al choque térmico utilizado?
5. Al momento de efectuar la desinfección de los explantes, desafortunadamente también se mueren bacterias u hongos benéficos para las plantas ¿cómo se pueden recuperar estos microorganismos benéficos para volvérselos a colocar a las plantas una vez que se saquen de los frascos de cultivo?

PRÁCTICA 4. CALLOGÉNESIS A PARTIR DE CACAHUATE (*Arachis hypogaea*)

INTRODUCCIÓN

Un callo es una masa amorfa de células desorganizadas y desdiferenciadas que surge de la proliferación de células del parénquima y células meristemáticas como respuesta a heridas producidas en el tejido, a la aplicación de reguladores de crecimiento, etc. Los callos tienen el potencial para desarrollar brotes adventicios, raíces adventicias o embriones somáticos, por lo que son ampliamente utilizados en los procesos de morfogénesis indirecta *in vitro* (organogénesis indirecta y embriogénesis somática indirecta). El callo se puede transferir a un medio líquido para formar agregados (masas de células), donde se puede tener un flujo constante de células individuales para formar plantas completas, principalmente vía embriogénesis somática. En muchas especies vegetales, si la concentración de auxinas y citocininas se encuentran en partes iguales, se promueve el desarrollo del callo, sin embargo, hay que tomar en cuenta excepciones a esta regla, las cuales pueden depender de las condiciones del medio de cultivo, del genotipo, etc., por ejemplo, en ciertas especies basta utilizar grandes concentraciones de auxinas (principalmente ácido 2,4-Diclorofenoxiacético) para la formación de callo (Cucco, & Rossi, 2000). De igual manera, se ha reportado que con altas concentraciones de auxina y bajas de citocinina se favorece el desarrollo de callo en especies monocotiledóneas, mientras que si se invierte esta concentración se promoverá el desarrollo de callo en especies dicotiledóneas.

En el caso de la producción de embriogénesis somática indirecta, es necesario que el callo sea altamente embriogénico, las características de este tipo de callo son que debe de ser friable (suave) y presentar coloraciones crema, amarillo o verde, nunca color marrón (Phillips, *et al.*, 1995; Pierick, 1990).

Un aspecto muy importante que se debe de tomar en cuenta, es que las técnicas de morfogénesis indirecta (donde hay formación de callo) pueden generar más variación genética en las plantas producidas comparadas a las técnicas de morfogénesis directa (donde no hay formación de callo).

OBJETIVO

Inducir callo a partir de embriones cigóticos y cotiledones de cacahuate utilizando altas concentraciones de auxina.

MATERIALES

- 1 Vaso de precipitado de 500 ml (a)*
- 1 Probeta de 500 ml (a)
- 1 Probeta de 250 ml (a)
- 1 Probeta de 100 ml
- 1 Probeta de 25 ml (a)
- 2 Matraces de 500 ml (a)
- 20 Cajas de Petri estériles (a)
- 2 Charolas para pesar (a)
- Espátula (a)
- Barra magnética (a)
- Recuperador de barras magnéticas (a)
- 2 Goteros o Pipetas Pasteur desechables (con bulbo de hule) (a)
- 5 Contenedores de plástico de 500 ml con tapa (a)
- 1 Vidrio (20 x 20 cm) o caja de Petri de vidrio (a)

- Papel aluminio (a)
- Papel de estraza (a)
- Plástico autoadherible (a y b)
- 1 Vaso de precipitado de 250 ml (b)*
- 1 Probeta de 250 ml (b)
- 1 Pinza de disección (b)
- 1 Bisturí (b)
- 1 Navaja de bisturí (b)
- 1 Marcador indeleble (b)
- Cacahuates crudos con cáscara (b)

REACTIVOS

- Concentrado de medio de cultivo MS (10X) (a)
- Agua destilada (a)
- HCl 1M (a)
- NaOH 1M (a)
- Sacarosa (a)
- Agar (a)
- Solución de Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (1mg/1ml) (a)
- Agua corriente (de la llave) (b)
- Cloro comercial (6%) (b)

- Detergente comercial (b)
- Alcohol etílico comercial al 96% (b)

EQUIPOS

- Balanza granataria (a)
- Potenciómetro (a)
- Autoclave (a)
- Agitador magnético (a)
- Campana de flujo laminar horizontal (a y b)
- Mechero Bunsen (b)

*(a) (b) Indica la etapa del procedimiento experimental en que se requiere

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

a) Preparación del medio de cultivo (500 ml)

1. En un vaso de precipitado de 500 ml vaciar 250 ml de agua destilada y agregar concentrado de medio MS (10X) para obtener una concentración final de 1X
2. Colocar el vaso de precipitado sobre agitador magnético, agregar y disolver 15 g de sacarosa agitándolo con barra magnética.
3. Agregar 25 ml de ácido 2,4-Diclorofenoxiacético
4. Aforar a 500 ml utilizando agua destilada.

5. Ajustar el pH a 5.8 ± 0.02 , en el potenciómetro agregando gota a gota las soluciones de NaOH 1 M o de HCl 1 M
6. Vaciar 250 ml del medio de cultivo en dos matraces de 500 ml y adicionar 2 g de agente gelificante (agar) a cada uno de ellos.
7. Tapar los matraces con papel aluminio o con papel de estraza.
8. Preparar un juego de aguas para desinfección, para lo cual, utilizar cinco contenedores de plástico de 500 ml y vaciar agua destilada en cada uno de ellos de la siguiente manera: Contenedor 1) Colocar 60 ml de agua destilada; Contenedor 2) Colocar 100 ml de agua destilada; Contenedores 3, 4 y 5) Colocar 200 ml de agua destilada en cada uno y tapa todos los contenedores.
9. Envolver con papel de estraza un vidrio o una caja de Petri de vidrio para corte.
10. Esterilizar en el autoclave los matraces con medio de cultivo, los contenedores con agua destilada y el vidrio o caja de Petri para corte. De igual manera, es recomendable esterilizar las pinzas y bisturí, a fin de disminuir riesgos de contaminación.
11. En la campana de flujo laminar horizontal, vaciar el medio de cultivo en cajas de Petri estériles (aproximadamente 25 ml en cada una) y dejar que gelifique, (no coloque la tapa sobre la caja de Petri, mientras está gelificando el medio, ya que esto incrementa la condensación de agua).
12. Una vez gelificado el medio de cultivo, tapar las cajas de Petri, sellarlas con plástico autoadherible y almacenarlas boca abajo en un refrigerador a 4 °C para su uso posterior. De igual manera, sellar con plástico autoadherible los contenedores que contienen agua destilada.

En la figura 24 se muestra esquemáticamente los pasos a seguir:

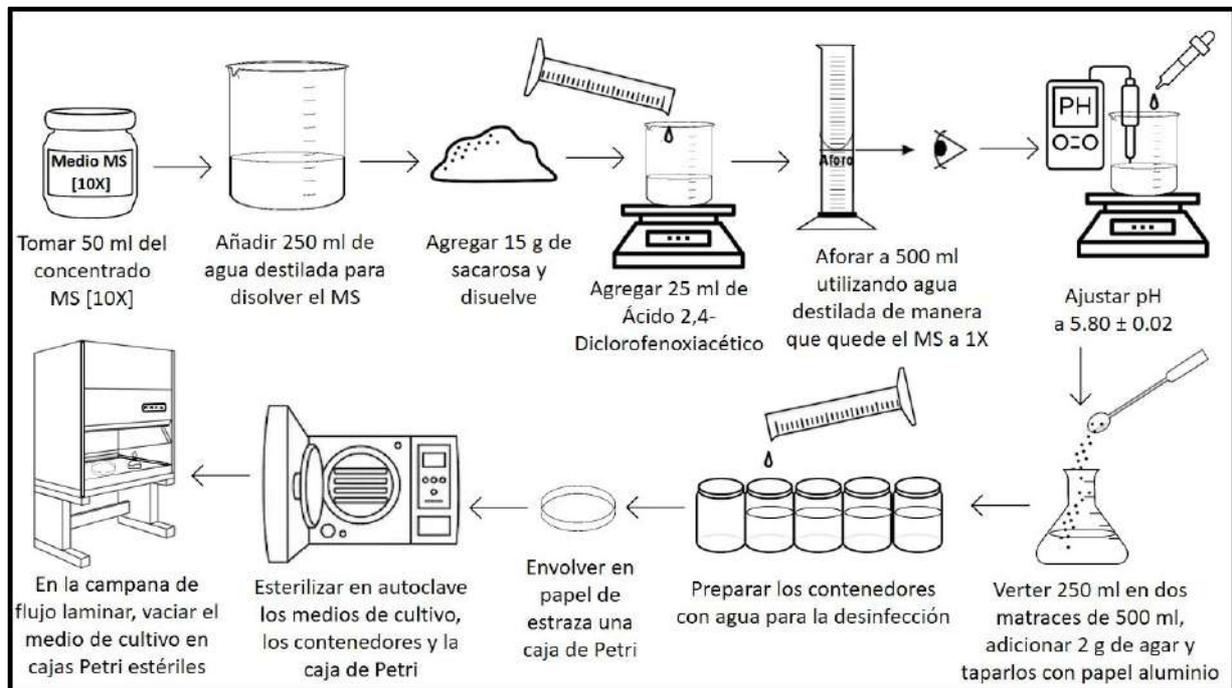


Figura 24. Preparación del medio de cultivo. (Esquema: Fabricio Ociel del Toro).

b) Desinfección y siembra de explantes

1. Preparar una solución al 3% v/v de detergente líquido y agua corriente en un vaso de 250 ml no estéril.
2. En la campana de flujo laminar horizontal, preparar los juegos de desinfección (utilizando las aguas que se esterilizaron anteriormente en el autoclave) de la siguiente manera:
Contenedor 1) Colocar 140 ml de etanol al 96% en el contenedor que tiene 60 ml de agua destilada (solución de alcohol al 70%);
Contenedor 2) Colocar 100 ml de hipoclorito de sodio en el contenedor que tiene 100 ml de agua destilada (solución al 3% de cloro comercial).

3. Quitar las cáscaras de los cacahuates y colocar 40 semillas dentro del vaso de precipitado con agua y jabón, lavarlas agitando constantemente durante 5 min y enjuagarlas con agua corriente.
4. En campana de flujo laminar horizontal, colocar las semillas de cacahuete en la solución de alcohol al 70% durante un minuto, agitando constantemente.
5. Con las pinzas previamente flameadas, transferirlas a la solución de cloro comercial al 3% durante 10 min, agitando constantemente.
6. Con las pinzas flameadas, transferir los cacahuates a un contenedor con agua destilada estéril (hacer en total tres enjuagues de aproximadamente 5 minutos en c/u) a fin de quitar el exceso de cloro. Agitar constantemente.
7. Flamear y enfriar las pinzas y colocar los cacahuates sobre el vidrio de corte y con el bisturí, separar los cotiledones y el embrión.
8. Sembrar tres semillas (cotiledones y embriones por separado) en cada caja de Petri colocándolas sobre el medio de cultivo.
9. Tapar las cajas de Petri, sellarlas con plástico autoadherible y sobre la tapa rotular con un marcador indeleble escribiendo nombre, fecha, especie sembrada y número de práctica.
10. Colocarlas en el área de incubación.

En la figura 25 se muestra esquemáticamente los pasos a seguir:

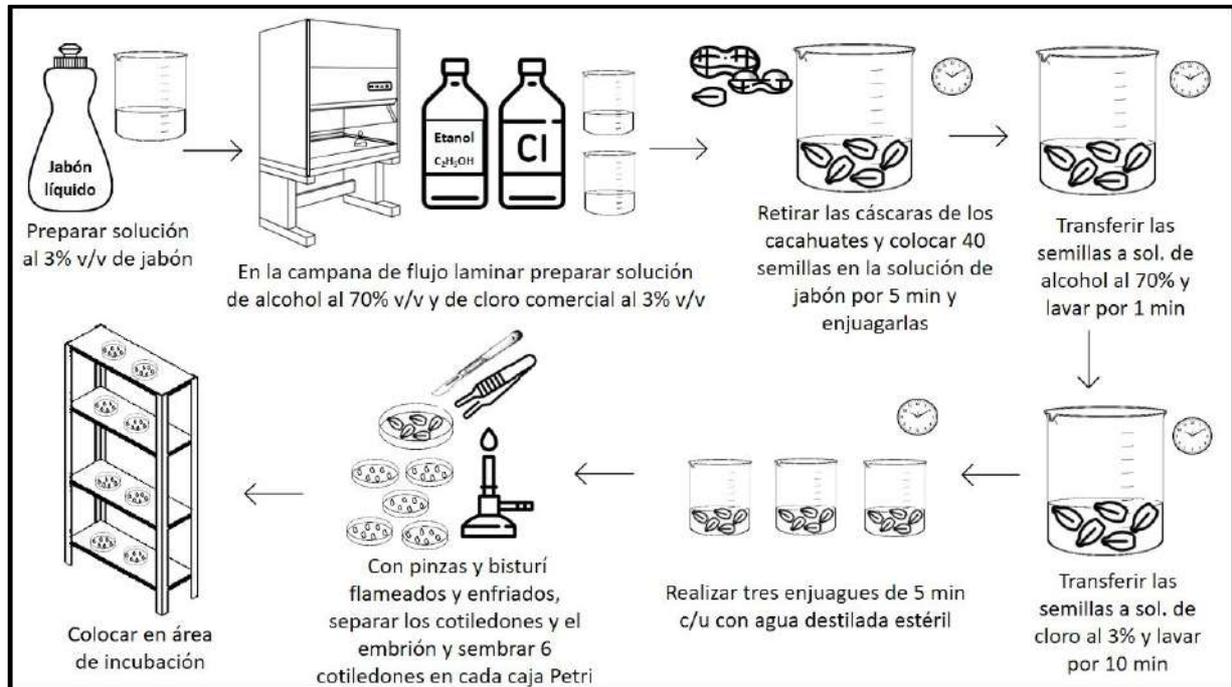


Figura 25. Desinfección y siembra de cotiledones y embriones. (Esquema: Fabricio Ociel del Toro).

RESULTADOS A REPORTAR

1. Porcentaje de generación de callo en los explantes.
2. Consistencia y color de los callos producidos.
3. Determinar el tipo de explante (embriones somáticos o cotiledones) que produjo mayor cantidad de callo.
4. Identificar los microorganismos que crecieron como contaminantes (si los hubo), reportar el porcentaje de contaminación y proponer la causa de dicha contaminación.

RESULTADOS ESPERADOS

En la figura 26 se presentan los resultados que se esperan obtener:

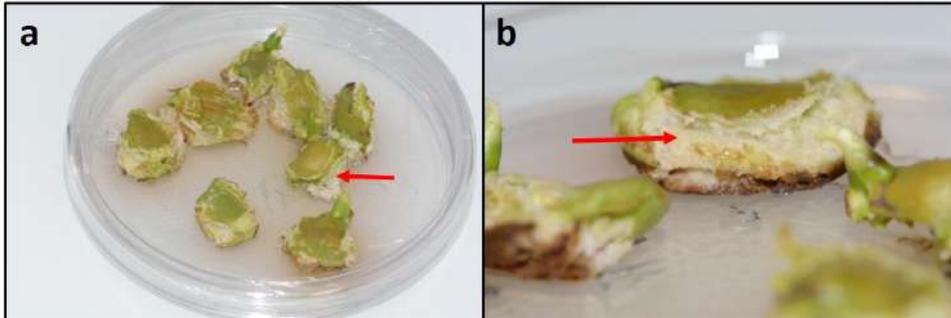


Figura 26. Calogénesis *in vitro* en explantes de cacahuete (*Arachis hypogaea*). **a)** Inicio de la formación de callo a las cuatro semanas de sembrado el explante. **b)** Incremento en la producción de callo a las cinco semanas de sembrado el explante. Las flechas señalan el tejido calloso producido. (Fotografías: Juvencio Castañeda).

PREGUNTAS

1. ¿Por qué reguladores de crecimiento como el ácido 2,4-Diclorofenoxiacético produce callo en explantes *in vitro* cuando se utiliza en grandes cantidades?
2. ¿En cuál técnica de micropropagación se induce más variación somaclonal, en la morfogénesis directa o en la morfogénesis indirecta y por qué?
3. ¿Por qué cuando se establece la clonación de plantas en el laboratorio, generalmente no se elige desarrollarla por el cultivo de callos?
4. Además de la producción de callo en el laboratorio, ¿éste se puede generar de manera natural (en condiciones *in vivo*)?

PRÁCTICA 5. ORGANOGÉNESIS EN VIOLETA AFRICANA (*Saintpaulia ionantha*)

INTRODUCCIÓN

Dentro de las técnicas de micropropagación de plantas, existen dos tipos de morfogénesis *in vitro*: organogénesis y embriogénesis somática. La organogénesis es la generación de órganos adventicios (brotes o raíces) directamente del explante o bien, indirectamente vía la formación previa de callo, por lo tanto, se distinguen dos tipos de organogénesis: directa e indirecta. A diferencia de la embriogénesis somática, en la organogénesis no se forman las plantas completas en un solo evento, de manera que se necesitan cuando menos dos medios de cultivo diferentes para generar una planta completa. El tipo de respuesta varía dependiendo de la especie, el genotipo o las interacciones entre las hormonas endógenas y los reguladores de crecimiento añadidos al medio de cultivo. El balance entre auxinas y citocininas para obtener una respuesta específica generalmente es complejo y en ocasiones se pueden obtener los mismos resultados con más de una combinación; sin embargo, se ha observado de manera general que, la adición de citocininas al medio de cultivo favorece la producción de brotes, mientras que la adición de auxinas favorece la producción de raíces.

De acuerdo al tipo de órgano que se forma, la organogénesis puede clasificarse en rizogénesis o caulogénesis; la rizogénesis se refiere a la formación de raíces, mientras que la caulogénesis se refiere a la formación de brotes o parte aérea de la planta. En los cultivos *in vitro* se pueden generar cultivos solamente con producción de brotes o bien, solamente con producción de raíces, ya que los nutrientes se encuentran directamente disponibles en el medio de cultivo haciendo que los explantes puedan vivir de esta manera. Sin embargo, cuando las plántulas se van a sacar a condiciones *ex vitro*, es necesario que la planta esté completa, por lo que los brotes se transfieren a un medio de cultivo para generar las raíces o viceversa (George, *et al.*, 2008).

OBJETIVO

Identificar cual es la función de reguladores de crecimiento en la organogénesis directa a partir de segmentos de hoja de violeta africana.

MATERIALES

- 1 Vaso de precipitado de 500 ml (a)*
- 1 Probeta de 500 ml (a)
- 1 Probeta de 250 ml (a)
- 1 Probeta de 100 ml
- 1 Micropipeta de 50 μ l con punta (a)
- 1 Micropipeta de 200 μ l con punta (a)
- 2 Matraces de 500 ml (a)
- 20 Cajas de Petri estériles (a)
- 2 Charolas para pesar (a)
- Espátula (a)
- Barra magnética (a)
- Recuperador de barras magnéticas (a)
- 2 Goteros o Pipetas Pasteur desechables (con bulbo de hule) (a)
- 5 Contenedores de plástico de 500 ml con tapa (a)
- 1 Vidrio (20 x 20 cm) o caja de Petri de vidrio (a)
- Papel aluminio (a)
- Papel de estraza (a)

- Plástico autoadherible (a y b)
- 1 Vaso de precipitado de 250 ml (b)*
- 1 Probeta de 250 ml (b)
- 1 Pinza de disección (b)
- 1 Bisturí (b)
- 1 Navaja de bisturí (b)
- 1 Tijera o *cutter* (b)
- 1 Marcador indeleble (b)
- Planta sana y joven de violeta africana (b)

REACTIVOS

- Concentrado de medio de cultivo MS (10X) (a)
- Agua destilada (a)
- HCl 1M (a)
- NaOH 1M (a)
- Sacarosa (a)
- Agar (a)
- Solución de Ácido Indolacético (1mg/1ml) (a)
- Solución de Benciladenina (1mg/1ml) (a)
- Agua corriente (de la llave) (b)
- Cloro comercial (6%) (b)

- Detergente comercial (b)
- Alcohol etílico comercial al 96% (b)

EQUIPOS

- Balanza granataria (a)
- Potenciómetro (a)
- Autoclave (a)
- Agitador magnético (a)
- Campana de flujo laminar horizontal (a y b)
- Mechero Bunsen (b)

*(a) (b) Indica la etapa del procedimiento experimental en que se requiere

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

a) Preparación del medio de cultivo (500 ml)

1. En un vaso de precipitado de 500 ml vaciar 250 ml de agua destilada y agregar concentrado de medio MS (10X) para obtener una concentración final de 1X
2. Colocar el vaso de precipitado sobre agitador magnético, agregar y disolver 15 g de sacarosa agitándolo con una barra magnética.
3. Agregar con una micropipeta 200 μ l de ácido indolacético y 40 μ l de Benciladenina (a fin de tener una concentración final de 0.4 mg/l de AIA y 0.08 mg/l de BA).

4. Aforar a 500 ml con agua destilada.
5. Ajustar el pH a 5.8 ± 0.02 , en el potenciómetro agregando gota a gota las soluciones de NaOH 1 M o de HCl 1 M
6. Vaciar 250 ml del medio de cultivo en dos matraces de 500 ml y adicionar 2 g de agente gelificante (agar) a cada uno de ellos.
7. Tapar los matraces con papel aluminio o con papel de estraza.
8. Preparar un juego de aguas para desinfección, para lo cual, utilizar cinco contenedores de plástico de 500 ml y vaciar agua destilada en cada uno de ellos de la siguiente manera: Contenedor 1) Colocar 60 ml de agua destilada; Contenedor 2) Colocar 100 ml de agua destilada; Contenedores 3, 4 y 5) Colocar 200 ml de agua destilada en cada uno y tapar todos los contenedores.
9. Envolver con papel de estraza un vidrio o una caja de Petri de vidrio para corte.
10. Esteriliza en la autoclave los matraces con medio de cultivo, los contenedores con agua destilada y el vidrio o caja de Petri para corte.
11. En la campana de flujo laminar horizontal vaciar el medio de cultivo en cajas de Petri estériles (aproximadamente 25 ml en cada una) y dejar que gelifique, (no coloque la tapa sobre la caja de Petri, mientras está gelificando el medio, ya que esto incrementa la condensación de agua).
12. Una vez gelificado el medio de cultivo, tapar las cajas de Petri, sellarlas con plástico autoadherible y almacenarlas boca abajo en un refrigerador a 4 °C para su uso posterior. De igual manera, sellar con plástico autoadherible los contenedores que tienen agua destilada.

En la figura 27 se muestra esquemáticamente los pasos a seguir:

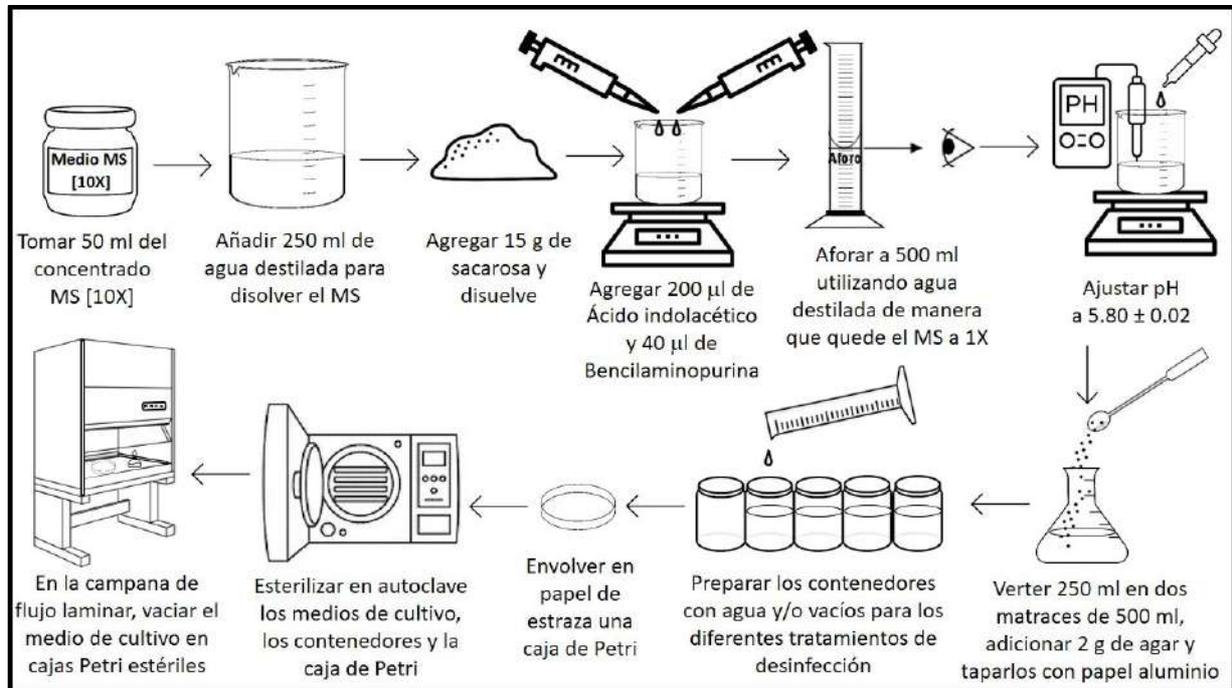


Figura 27. Preparación del medio de cultivo. (Esquema: Fabricio Ociel del Toro).

b) Desinfección y siembra de explantes

1. Preparar una solución al 3% v/v de detergente líquido y agua corriente en un vaso de 250 ml no estéril.
2. En la campana de flujo laminar horizontal preparar los juegos de desinfección (utilizando las aguas que esterilizaste anteriormente en la autoclave) de la siguiente manera:
Contenedor 1) Colocar 140 ml de etanol al 96% en el contenedor que tiene 60 ml de agua destilada (solución de alcohol al 70%);
Contenedor 2) Colocar 100 ml de hipoclorito de sodio en el contenedor que tiene 100 ml de agua destilada (solución al 3% de cloro comercial).

3. De la planta de violeta africana, seleccionar hojas jóvenes con peciolo, cortarlas con tijeras o *cutter* y colocarlas dentro del vaso de precipitado con agua y jabón, lávalas agitando constantemente durante 5 min y enjuagarlas con agua corriente.
4. En la campana de flujo laminar horizontal, colocar las hojas en la solución de alcohol al 70% durante un minuto, agitando constantemente.
5. Con las pinzas previamente flameadas, transferir las hojas a la solución de cloro comercial al 3% durante 10 min, agitando constantemente.
6. Con las pinzas flameadas y enfriadas, transferir las hojas a un contenedor con agua destilada estéril (hacer en total tres enjuagues de aproximadamente 5 minutos en c/u) a fin de quitar el exceso de cloro. Agitar constantemente.
7. Con las pinzas previamente flameadas y enfriadas, colocar las hojas sobre el vidrio de corte y con el bisturí, cortar los extremos quemados y cortar segmentos de 1 cm² de hoja.
8. Con el bisturí, hacer heridas en los segmentos de hojas a fin de facilitar la penetración de los reguladores de crecimiento y nutrientes del medio de cultivo.
9. Sembrar los segmentos de hoja colocándolos sobre el medio de cultivo procurando que el lado donde se hicieron las heridas quede en contacto con el medio de cultivo.
10. Tapar las cajas de Petri, sellarlas con plástico autoadherible y sobre la tapa roturarlas con un marcador indeleble escribiendo nombre, fecha, especie sembrada y número de práctica.
11. Colocarlas en el área de incubación.

En la figura 28 se muestra esquemáticamente los pasos a seguir:

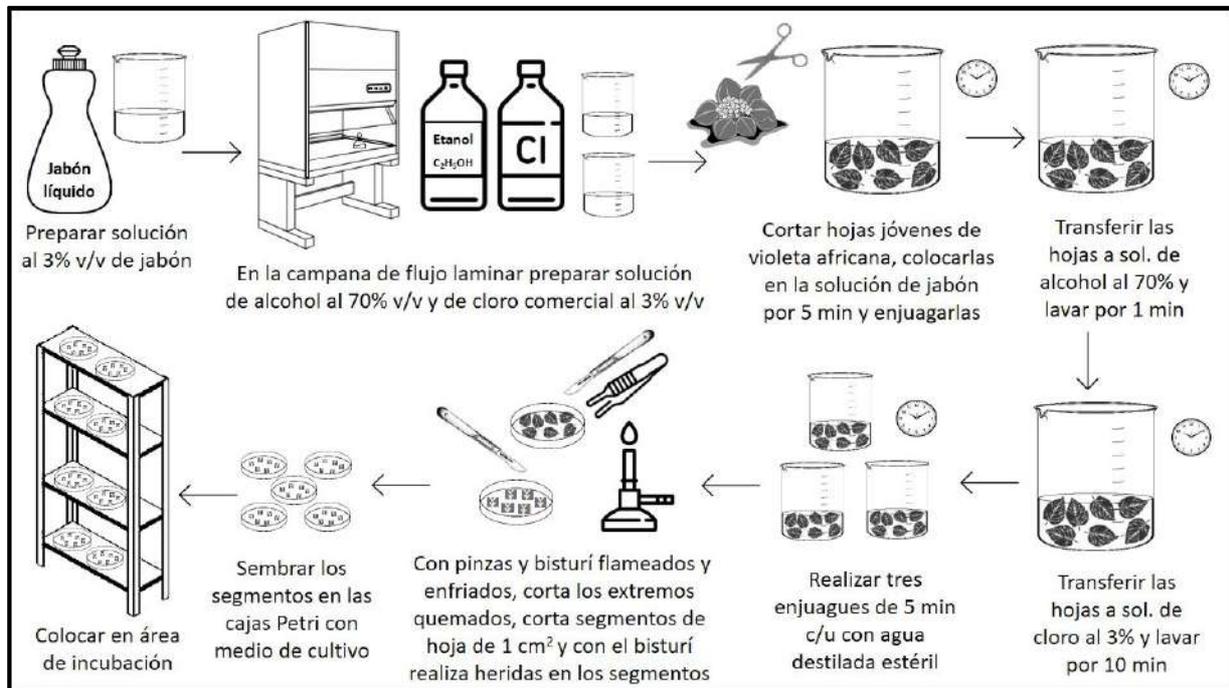


Figura 28. Desinfección y siembra de explantes. (Esquema: Fabricio Ociel del Toro).

RESULTADOS A REPORTAR

1. Tipo de organogénesis obtenida en relación a la formación de callo.
2. Tipo de organogénesis lograda con respecto al tipo de órgano que se produjo en los explantes.
3. Determinar el porcentaje de explantes que produjeron organogénesis.
4. Identificar los microorganismos que crecieron como contaminantes (si los hubo), reportar el porcentaje de contaminación y proponer la causa de dicha contaminación.

RESULTADOS ESPERADOS

En la figura 29 se presentan los resultados que se esperan obtener:

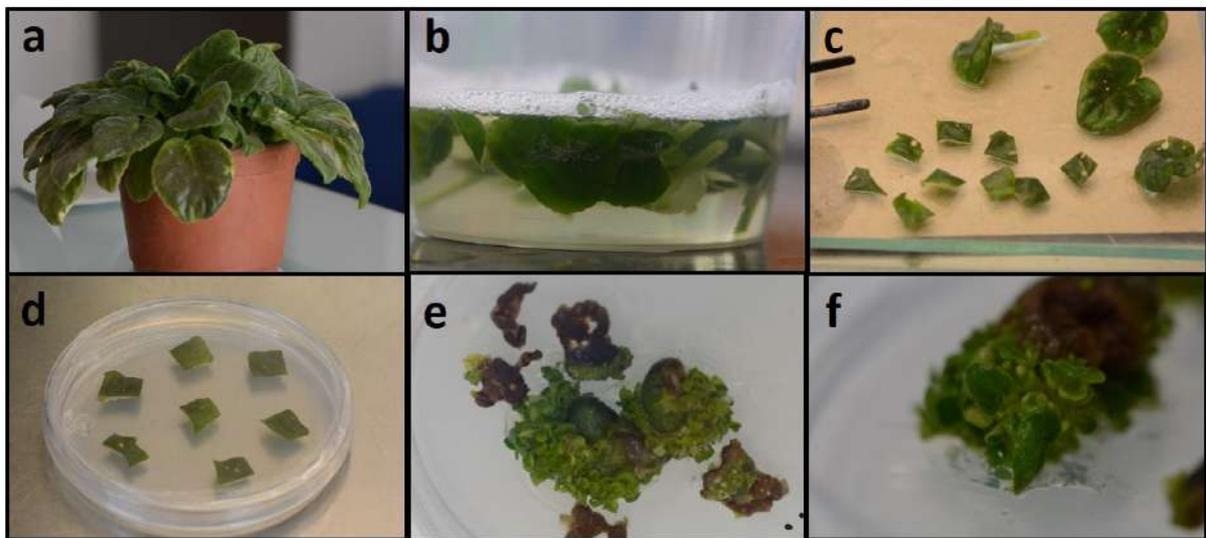


Figura 29. Proceso de desinfección, establecimiento *in vitro* y organogénesi directa a partir de explantes de violeta africana (*Saintpaulia ionantha*). **a)** Planta madre. **b)** Desinfección de hojas **c)** Corte de segmentos de hoja. **d)** Siembra en medio de cultivo. **e)** y **f)** Organogénesis directa tipo caulogénesis obtenida después de 6 semanas de sembrados los explantes. (Fotografías: Juvencio Castañeda).

PREGUNTAS

1. De acuerdo a los resultados de este experimento, ¿Se verificó que concentraciones mayores de auxina que de citocinina generan rizogénesis? Argumentar la respuesta.
2. ¿Qué tipo de reguladores de crecimiento tendrán los polvos enraizadores comerciales, auxinas o citocininas?
3. Las plántulas producidas por organogénesis ¿Se pueden considerar clones?, es decir, ¿conservan la información genética exactamente igual a la planta madre de donde se obtuvieron los explantes?
4. Genéticamente hablando, ¿cuáles plantas tendrán mayor variación genética, las producidas por organogénesis directa o las producidas por organogénesis indirecta? Argumentar la respuesta.

PRÁCTICA 6. PROLIFERACIÓN DE YEMAS AXILARES DE SAUCE (*Salix bonplandiana*)

INTRODUCCIÓN

Se conoce como yema a cualquier parte de la planta capaz de brotar y crecer, son tejidos meristemáticos presentes en todas las plantas los cuales dan origen al crecimiento de la misma, de sus ramas, raíces, flores, etc.; están presentes en todo tipo de plantas, en algunas especies se pueden observar a simple vista, sin embargo, en otras son tan pequeñas que se necesita un microscopio para identificarlas. La yema situada en el extremo terminal del eje de una planta, se conoce como yema apical, mientras que las yemas que se encuentran en la unión de las hojas con el tallo se conocen como yemas axilares.

Las plantas que de forma natural presentan pocas ramas o brotes se debe a que tienen una marcada dominancia apical, la cual es controlada por hormonas vegetales, principalmente ácido indolacético, hormona de tipo auxina que evita el crecimiento y la proliferación de las nuevas yemas; por el contrario, si una planta presenta una gran cantidad de ramas o brotes, significa que su dominancia apical es débil. La dominancia apical se puede romper fácilmente al cortar la parte superior de la planta, lo que estimula el desarrollo de brotes o ramas a partir de las yemas existentes; esto es precisamente lo que ocurre cuando se “poda” una planta. En el laboratorio, a fin de estimular la proliferación de yemas, se utilizan reguladores de crecimiento específicos, los cuales actúan como “tijeras bioquímicas” (George, *et al.*, 2008; Pierick, 1990).

A diferencia de la organogénesis o la embriogénesis somática, la técnica de proliferación de yemas axilares es la que produce la menor variación genética dentro de todas las técnicas de micropropagación de plantas, por lo que es la única que se puede considerar una “clonación”.

Consiste en estimular el crecimiento de las yemas existentes en las plantas rompiendo la dominancia apical de la misma, lo cual se efectúa utilizando reguladores de crecimiento del tipo citocinina, los cuales presentan efectos contrarios a las auxinas, permitiendo que las yemas crezcan y se produzcan nuevas plantas, las que a su vez desarrollarán más plantas a partir de sus yemas y así sucesivamente (Dhir, *et al.*, 1984).

OBJETIVO

Conocer la respuesta *in vitro* que se obtiene mediante la utilización de reguladores de crecimiento para la proliferación de yemas axilares en una planta dicotiledónea (Sauce)

MATERIALES

- 1 Vaso de precipitado de 500 ml (a)*
- 1 Probeta de 500 ml (a)
- 1 Probeta de 250 ml (a)
- 1 Probeta de 100 ml (a)
- 1 Probeta de 50 ml (a)
- 1 Micropipeta de 1000 µl con punta (a)
- 2 Matraces de 500 ml (a)
- 10 Frascos de cultivo de 500 ml con tapa (a)
- 2 Charolas para pesar (a)
- Espátula (a)
- Barra magnética (a)
- Recuperador de barras magnéticas (a)

- Guantes de asbesto (a)
- 2 Goteros o Pipetas Pasteur desechables (con bulbo de hule) (a)
- 5 Contenedores de plástico de 500 ml con tapa (a)
- 1 Vidrio (20 x 20 cm) o caja de Petri de vidrio (a)
- Papel de estraza (a)
- Plástico autoadherible (a y b)
- 1 Vaso de precipitado de 250 ml (b)*
- 1 Probeta de 250 ml (b)
- 1 Pinza de disección (b)
- 1 Bisturí (b)
- 1 Navaja de bisturí (b)
- 1 Tijera o *cutter* (b)
- 1 Marcador indeleble (b)
- Pequeñas ramas jóvenes de sauce (b)

REACTIVOS

- Concentrado de medio de cultivo MS (10X) (a)
- Agua destilada (a)
- HCl 1M (a)
- NaOH 1M (a)
- Sacarosa (a)

- Agar (a)
- Solución de Benciladenina (1mg/1ml) (a)
- Agua corriente (de la llave) (b)
- Cloro comercial (6%) (b)
- Detergente comercial (b)
- Alcohol etílico comercial al 96% (b)

EQUIPOS

- Balanza granataria (a)
- Potenciómetro (a)
- Horno de microondas (a)
- Autoclave (a)
- Agitador magnético (a)
- Campana de flujo laminar horizontal (b)
- Mechero Bunsen (b)

*(a) (b) Indica la etapa del procedimiento experimental en que se requiere

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

a) Preparación del medio de cultivo (500 ml)

1. En un vaso de precipitados de 500 ml vaciar 250 ml de agua destilada y agregar concentrado de medio MS (10X) para obtener una concentración final de 1X

2. Colocar el vaso de precipitado sobre agitador magnético, agregar y disolver 15 g de sacarosa agitándolo con una barra magnética.
3. Con una micropipeta agregar 500 μ l de Benciladenina (a fin de tener una concentración final de 1 mg/l).
4. Aforar a 500 ml utilizando agua destilada.
5. Ajustar el pH a 5.8 ± 0.02 , en el potenciómetro agregando gota a gota las soluciones de NaOH 1 M o de HCl 1 M
6. Dividir y vaciar 250 ml del medio de cultivo en dos matraces de 500 ml y adicionar 2 g de agente gelificante (agar) a cada uno de ellos.
7. Calentar los matraces en un horno de microondas a fin de disolver el agar, teniendo cuidado de que no se derrame el medio de cultivo debido a la ebullición del mismo; con unos guantes de asbesto retirar el matraz del horno, agitar un poco y repetir el procedimiento hasta que el agar se disuelva completamente.
8. Dividir y vaciar 50 ml de medio de cultivo en 10 frascos (con capacidad de 500 ml).
9. Preparar un juego de aguas para desinfección, para lo cual, utilizar cinco contenedores de plástico de 500 ml y vaciar agua destilada en cada uno de ellos de la siguiente manera: Contenedor 1) Colocar 60 ml de agua destilada; Contenedor 2) Colocar 100 ml de agua destilada; Contenedores 3, 4 y 5) Colocar 200 ml de agua destilada en cada uno y tapar todos los contenedores.
10. Envolver con papel de estraza un vidrio o una caja de Petri de vidrio para corte.
11. Esterilizar en la autoclave los frascos de cultivo con la tapa sobrepuesta, el vidrio o caja de Petri para corte y los contenedores con agua destilada.

12. Una vez esterilizado el medio de cultivo, dejar enfriarlos un poco dentro del autoclave y posteriormente cerrar bien la tapa (esto para evitar que se haga vacío y después se dificulte abrir la tapa).
13. Sellar los frascos con plástico autoadherible y almacenarlos para su uso posterior. De igual manera, sellar con plástico autoadherible los contenedores que contienen agua destilada.

En la figura 30 se muestra esquemáticamente los pasos a seguir:

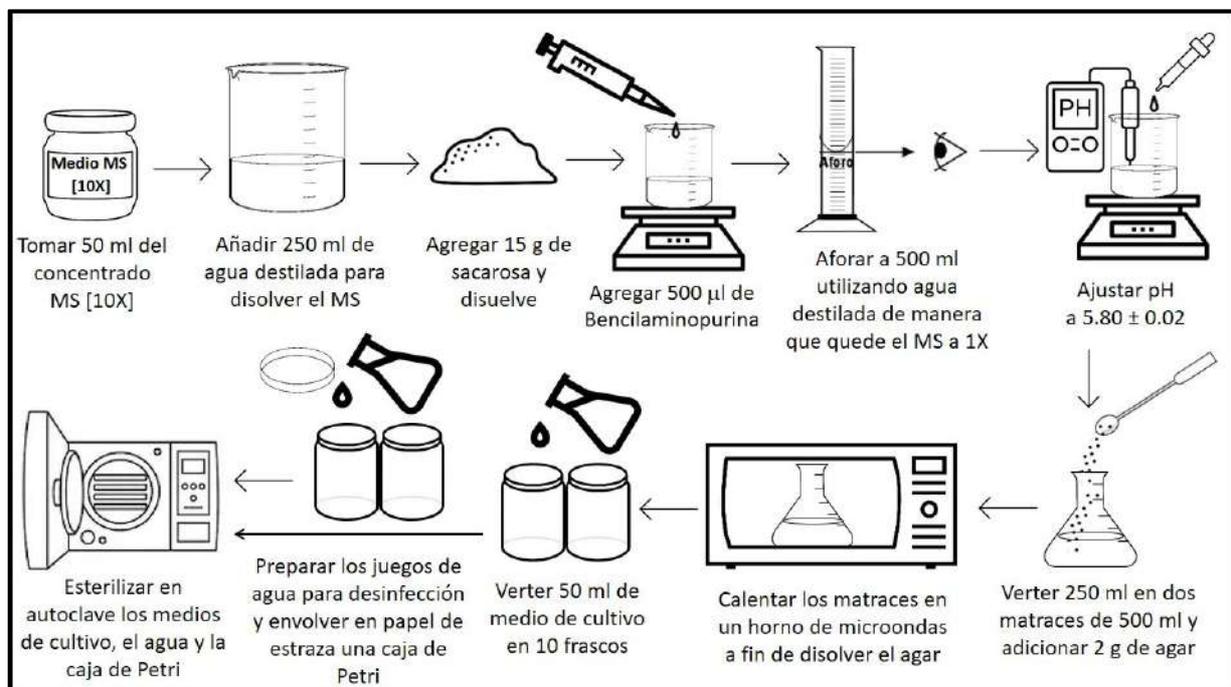


Figura 30. Preparación del medio de cultivo. (Esquema: Fabricio Ociel del Toro).

b) Desinfección y siembra de explantes

1. Preparar una solución al 3% v/v de detergente líquido y agua corriente en un vaso de 250 ml no estéril.

2. En la campana de flujo laminar horizontal, preparar los juegos de desinfección (utilizando las aguas que se esterilizaron anteriormente en el autoclave) de la siguiente manera: Contenedor 1) Colocar 140 ml de etanol al 96% en el contenedor que tiene 60 ml de agua destilada (solución de alcohol al 70%); Contenedor 2) Colocar 100 ml de hipoclorito de sodio en el contenedor que tiene 100 ml de agua destilada (solución al 3% de cloro comercial).
3. De las ramas de sauce, seleccionar segmentos que contengan nudos con yemas, cortarlas con las tijeras o *cutter* quitándoles las hojas y colocarlas dentro del vaso de precipitados con agua y jabón, lavarlos agitando constantemente durante 5 min y enjuagarlos con agua corriente.
4. En campana de flujo laminar horizontal, colocar los explantes en la solución de alcohol al 70% durante un minuto, agitando constantemente.
5. Con las pinzas previamente flameadas, transferir las hojas a la solución de cloro comercial al 3% durante 10 min, agitando constantemente.
6. Con las pinzas flameadas y enfriadas, transferir los explantes a un contenedor con agua destilada estéril (hacer en total tres enjuagues de aproximadamente 5 minutos en c/u) a fin de quitar el exceso de cloro. Agitar constantemente.
7. Con pinzas previamente flameadas y enfriadas, colocar los explantes sobre el vidrio de corte y con el bisturí, cortar los extremos quemados y fraccionar segmentos con al menos un nudo, procurando que el extremo inferior quede un poco más largo que los demás, pues es el que quedará inmerso en el medio de cultivo (procurar eliminar la yema apical en los segmentos donde exista, ya que esta acción promueve una mejor proliferación de las yemas axilares).

8. Sembrar los explantes sobre el medio de cultivo de manera vertical procurando que el extremo inferior quede un poco inmerso en el medio de cultivo y respetando la orientación original que tenían en la planta (coloca 5 explantes por frasco).
9. Tapar los frascos, sellarlos con plástico autoadherible y sobre la tapa rotular con un marcador indeleble escribiendo nombre, fecha, especie sembrada y número de práctica.
10. Colocarlos en el área de incubación.

En la figura 31 se muestra esquemáticamente los pasos a seguir:

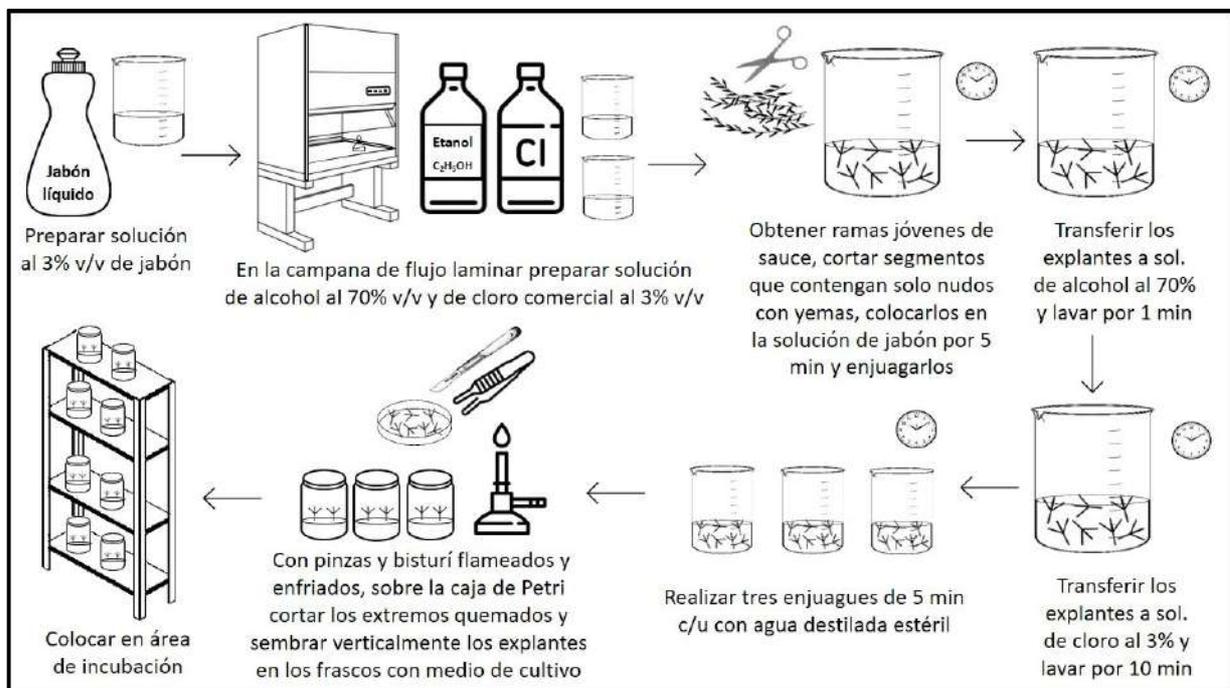


Figura 31. Desinfección y siembra de explantes. (Esquema: Fabricio Ociel del Toro).

RESULTADOS A REPORTAR

1. Porcentaje de explantes a partir de los cuales crecieron y se desarrollaron las yemas axilares.

2. Promedio de yemas originadas por explante sembrado *in vitro*.
3. Identificar los microorganismos que crecieron como contaminantes (si los hubo), reportar el porcentaje de contaminación y proponer la causa de dicha contaminación.

RESULTADOS ESPERADOS

En la figura 32 se presentan los resultados que se esperan obtener:

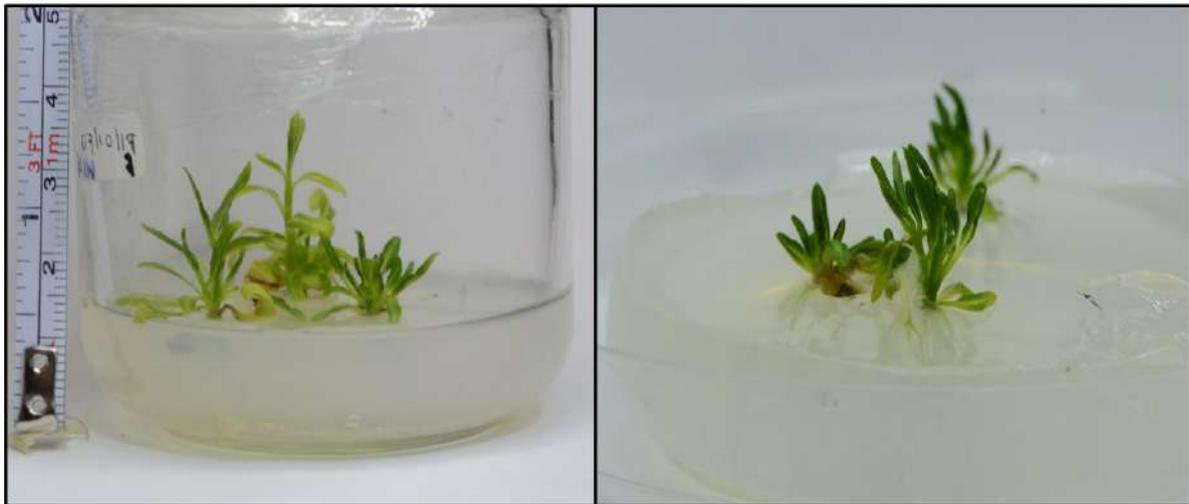


Figura 32. Proliferación de yemas axilares *in vitro* en explantes de sauce (*Salix bonplandiana*). De cada yema se desarrollará una nueva planta, la cual a su vez generará más yemas. (Fotografías: Juvencio Castañeda).

PREGUNTAS

1. Si se utilizan como explantes segmentos de tallo que no contengan nudos, ¿se obtendrá crecimiento de yemas axilares? ¿Por qué?
2. En las plantas dicotiledóneas las yemas axilares se localizan en la axila, que es la región donde se une la hoja con el tallo, ¿dónde se localizarán las yemas axilares en las plantas monocotiledóneas?

3. La técnica conocida como “cultivo de meristemas” es una forma de proliferación de yemas, ¿en qué casos se recomienda hacer la técnica de cultivo de meristemas?
4. ¿Podrá establecerse la proliferación de yemas axilares utilizando callo como explante inicial?
5. ¿Por qué se requieren mayores cantidades de citocininas que de auxinas en la proliferación de yemas axilares?

PRÁCTICA 7. INDUCCIÓN DE RAÍCES *IN VITRO* EN PLÁNTULAS DE JITOMATE (*Solanum lycopersicum*)

INTRODUCCIÓN

La rizogénesis *in vitro* es un proceso mediante el cual se producen raíces en las plántulas, este evento depende de la especie o el genotipo de cada planta, de manera que algunas pueden enraizar en medio de cultivo sin reguladores de crecimiento, otras sólo producen raíces cuando se oscurece el medio de cultivo lo cual se puede obtener al agregar suplementos no definidos al medio tales como el carbón activado, el cual al oscurecer el medio de cultivo, simula las condiciones en que se encuentran las plantas en la naturaleza, otras especies enraízan cuando se adicionan reguladores de crecimiento tipo auxina al medio de cultivo (Olmos, *et al.*, 2004; Baye, *et al.*, 2020); de hecho la mayoría de los polvos enraizadores comerciales contienen una auxina o una mezcla de ellas.

Es importante mencionar que en la literatura, existen varios trabajos en los que, para algunas especies se prefiere hacer el enraizamiento de las vitroplantas en condiciones *ex vitro*, en lugar de hacerlo *in vitro*; a este respecto, se puede mencionar lo siguiente: si bien, el generar la plántula con raíces *in vitro* significa obtener plantas más desarrolladas, generalmente estas raíces no son 100% funcionales ya que podrían tener poca conexión vascular con el brote, haciendo que la captación de agua sea baja lo que ocasiona que en la aclimatación, las plantas presenten mayor estrés.

OBJETIVO

Conocer la respuesta *in vitro* del ácido indolbutírico en la rizogénesis de vitroplantas de jitomate

MATERIALES

- 1 Vaso de precipitado de 100 ml (a)*

- 1 Probeta de 50 ml (a)
- 1 Probeta de 100 ml (a)
- 1 Probeta de 10 ml
- 1 Micropipeta de 100 µl con punta (a)
- 1 Matraz de 250 ml (a)
- 10 Tubos de cultivo de 50 ml (25 x 150 mm) (a)
- 2 Charolas para pesar (a)
- Espátula (a)
- Barra magnética (a)
- Recuperador de barras magnéticas (a)
- Guantes de asbesto (a)
- 2 Goteros o Pipetas Pasteur desechables (con bulbo de hule) (a)
- 1 Vidrio (20 x 20 cm) o caja de Petri de vidrio (a)
- Papel de estraza (a)
- Papel aluminio (a)
- Gradilla para tubos de ensayo (a y b)
- Plástico autoadherible (a y b)
- 1 Pinza de disección larga (25-30 cm) (b)*
- 1 Bisturí (b)
- 1 Navaja de bisturí (b)
- 1 Marcador indeleble (b)

- Plántulas de jitomate obtenidas a partir de germinación de semillas *in vitro* (b)

REACTIVOS

- Concentrado de medio de cultivo MS (10X) (a)
- Agua destilada (a)
- HCl 1M (a)
- NaOH 1M (a)
- Sacarosa (a)
- Agar (a)
- Solución de Ácido indolbutírico (1mg/1ml) (a)

EQUIPOS

- Balanza granataria (a)
- Potenciómetro (a)
- Horno de microondas (a)
- Autoclave (a)
- Agitador magnético (a)
- Campana de flujo laminar horizontal (b)
- Mechero Bunsen (b)

*(a) (b) Indica la etapa del procedimiento experimental en que se requiere

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

a) Preparación del medio de cultivo (100 ml)

1. En un vaso de precipitado de 100 ml vaciar 50 ml de agua destilada y agregar concentrado de medio MS (10X) para obtener una concentración final de 1X
2. Colocar el vaso de precipitado sobre un agitador magnético, agregar y disolver 3 g de sacarosa agitándolo con la ayuda de una barra magnética.
14. Con una micropipeta agregar 100 μ l de ácido indolbutírico (a fin de tener una concentración final de 1 mg/l).
3. Aforar a 100 ml utilizando agua destilada.
4. Ajustar el pH a 5.8 ± 0.02 , en el potenciómetro agregando gota a gota las soluciones de NaOH 1 M o de HCl 1 M
5. Vaciar el medio de cultivo en un matraz de 250 ml y adicionar 0.8 g (800 mg) de agente gelificante (agar).
6. Calentar el matraz en un horno de microondas a fin de disolver el agar, teniendo cuidado de que no se derrame el medio de cultivo debido a la ebullición del mismo; con guantes de asbesto retirar el matraz del horno, agitar un poco y repetir el procedimiento hasta que el agar se disuelva completamente.
7. Dividir y vaciar 10 ml de medio de cultivo en 10 tubos de cultivo y tapar con un fragmento de papel aluminio.
8. Envolver con papel de estraza un vidrio o una caja de Petri de vidrio repetir corte.
9. Esterilizar en la autoclave los tubos de cultivo y el vidrio o caja de Petri para corte.

- Una vez esterilizado el medio de cultivo, sellar los frascos con plástico autoadherible y almacenarlos para su uso posterior.

En la figura 33 se muestra esquemáticamente los pasos a seguir:

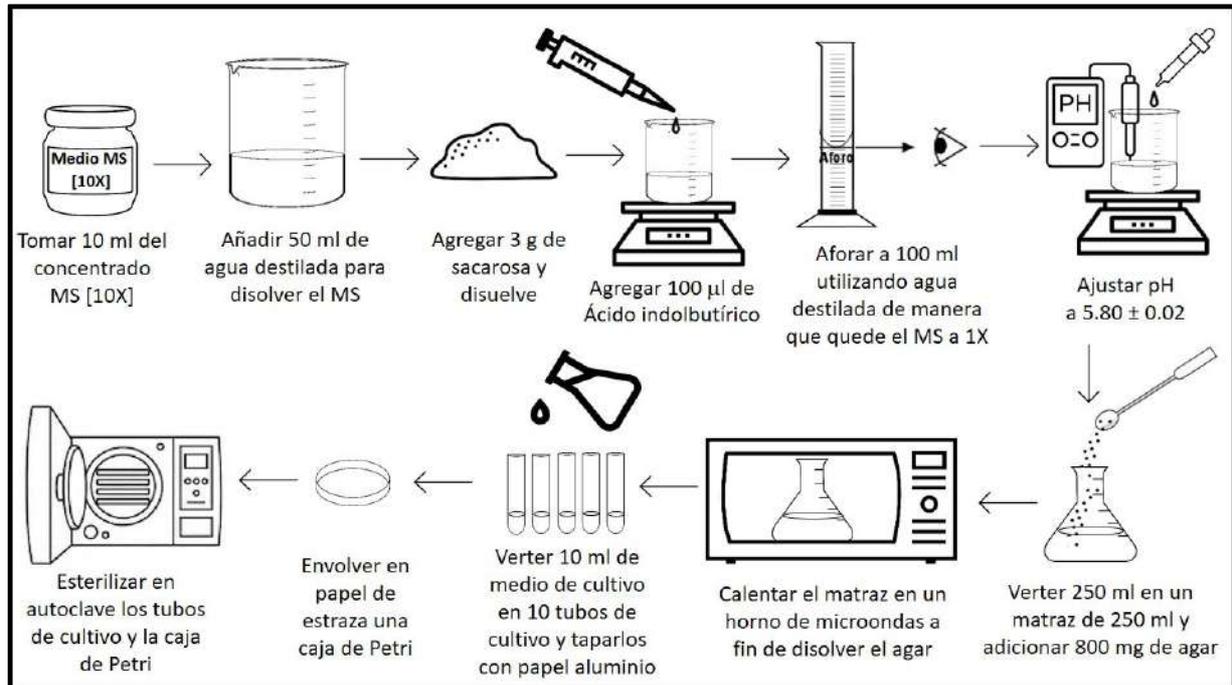


Figura 33. Preparación del medio de cultivo. (Esquema: Fabricio Ociel del Toro).

b) Siembra de explantes

- En la campana de flujo laminar horizontal colocar los frascos que contienen las plántulas de jitomate obtenidas a partir de la germinación *in vitro* de semillas (práctica 2 de este manual).
- Con las pinzas de disección previamente flameadas y enfriadas, sacar las plántulas de los frascos de cultivo, colocarlas sobre el vidrio de corte estéril y con el bisturí también previamente flameado y enfriado, cortar las raíces preexistentes.

3. Utilizar las pinzas de disección para transferir las plántulas sin raíz a los tubos de cultivo con medio de cultivo para enraizamiento, colocarlas de manera vertical procurando que el extremo inferior quede un poco inmerso en el medio de cultivo (colocar 1 plántula por tubo).
4. Tapar los frascos de cultivo con la misma cubierta de papel aluminio.
5. Sellar los frascos con plástico autoadherible y roturarlos con un marcador indeleble escribiendo nombre, fecha, especie sembrada y número de práctica y ponerlos en una gradilla.
6. Colocarlos en el área de incubación.

En la figura 34 se muestra esquemáticamente los pasos a seguir:

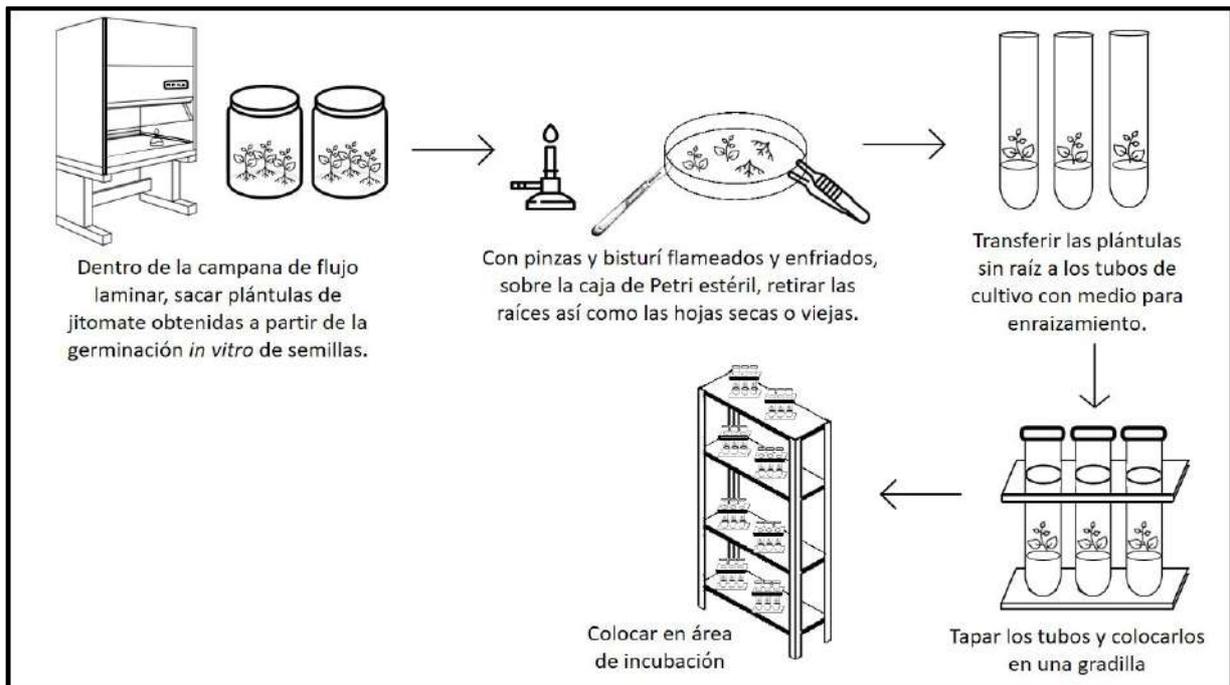


Figura 34. Siembra de explantes. (Esquema: Fabricio Ociel del Toro).

RESULTADOS A REPORTAR

1. Porcentaje de explantes que desarrollaron raíz.
2. Promedio de número de raíces por explante.
3. Identificar los microorganismos que crecieron como contaminantes (si los hubo), reportar el porcentaje de contaminación y proponer la causa de dicha contaminación.

RESULTADOS ESPERADOS

En la figura 35 se presentan los resultados que se esperan obtener:

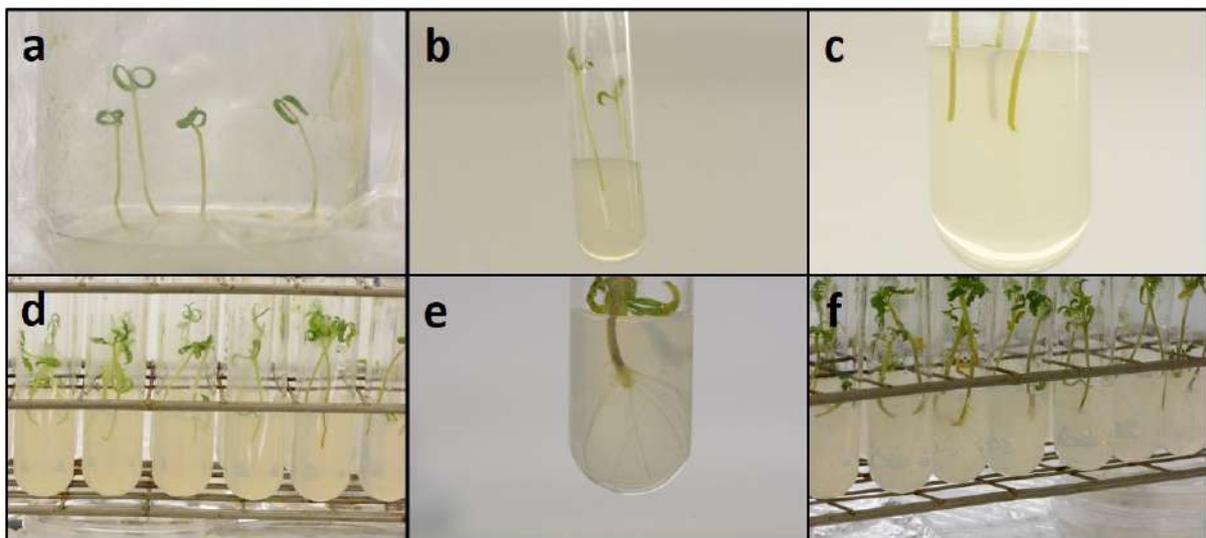


Figura 35. Enraizamiento *in vitro* de plántulas de jitomate (*Solanum lycopersicum*) **a)** Plántulas originadas por germinación *in vitro* de semillas. **b), c) y d)** Corte de raíz y siembra en medio de cultivo con Ácido indolbutírico. **e) y f)** Generación de raíz en las plántulas después de tres semanas de sembradas en el medio de cultivo para rizogénesis. (Fotografías: Juvencio Castañeda).

PREGUNTAS

1. ¿Qué tipo de reguladores de crecimiento son los más utilizados para la rizogénesis?
2. ¿Por qué las plantas dentro de los contenedores con medio de cultivo pueden sobrevivir aún sin tener raíces?
3. Si las plantas que se utilizaron en esta práctica, ya tenían raíces, ¿por qué al retirarlas, éstas vuelven a generarse en el nuevo medio de cultivo?
4. Si no se hubieran obtenido raíces utilizando el ácido indolbutírico, ¿Qué otras alternativas funcionarían para producir raíces en las plántulas utilizadas en esta práctica?

PRÁCTICA 8. PRODUCCIÓN DE SEMILLAS SINTÉTICAS DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris*)

INTRODUCCIÓN

En el cultivo de tejidos vegetales *in vitro* existen técnicas para la producción de embriones somáticos a gran escala, estos tienen que llevar un proceso de germinación bajo el cultivo *in vitro*, una alternativa es el encapsulamiento de los embriones en una matriz de alginato sódico donde contenga los nutrientes y reguladores del crecimiento necesarios para que la germinación se lleve a cabo. El principio de esta tecnología es simular la presencia del endospermo el cual en las semillas es el que provee los nutrientes al embrión, además de una cubierta que evite la entrada de microorganismos que puedan contaminar el medio de cultivo (Rey & Mroginski, 2004; Rihan, *et al.*, 2017).

OBJETIVO

Conocer el procedimiento para encapsular embriones de frijol en una matriz para que posteriormente se efectúe la germinación

MATERIALES

- 1 Recipiente de vidrio o de plástico de 250 ml
- 1 Caja de Petri (no estéril)
- 2 Matraces de 250 ml
- 2 Charolas para pesar
- Barra magnética
- Recuperador de barras magnéticas

- 1 Probeta de 100 ml
- Micropipeta de 1000 μ l
- Punta de micropipeta de 1000 μ l
- 1 Vidrio para corte (20 x 20 cm)
- 1 Pinza de disección
- 1 Bisturí
- 1 Navaja de bisturí
- *Cutter*
- Coladera
- Semillas de frijol

REACTIVOS

- Alginato de sodio
- Cloruro de calcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- Agua destilada

EQUIPOS

- Balanza granataria
- Agitador magnético

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

1. Remojar durante la noche en un recipiente de vidrio o de plástico, 25 semillas de frijol en agua corriente (agua de la llave).
2. Preparar 100 ml de solución de alginato de sodio a una concentración de 3% disuelto en agua destilada (En la Industria el alginato de sodio se disuelve en solución de sales MS sin cloruro de calcio, pero por fines didácticos, en esta práctica se disolverá en agua).
3. Colocar la solución de alginato de sodio en una caja de Petri.
4. Preparar 100 ml de solución de cloruro de calcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) a una concentración de 150 mM disuelto en agua destilada.
5. Colocar las semillas de frijol sobre el vidrio de corte y con ayuda de las pinzas y el bisturí, separar los cotiledones y el embrión.
6. Colocar los embriones en el recipiente que contiene la solución de alginato de sodio.
7. Con un *cutter* cortar la punta de micropipeta de manera que el embrión pueda entrar por ella.
8. Colocar la punta cortada en la micropipeta y tomar un embrión junto con la solución de alginato de sodio, posteriormente presionar suavemente el émbolo de la micropipeta haciendo que el embrión baje junto con la solución formando una gota, la cual tendrá que caer en la solución de cloruro de calcio. Dejar reposar las esferas formadas en la solución por al menos diez minutos a fin de que gelifique correctamente la matriz de alginato.
9. Finalmente, decantar la solución de cloruro de calcio quedando únicamente las semillas sintéticas.

En la figura 36 se muestra esquemáticamente los pasos a seguir:

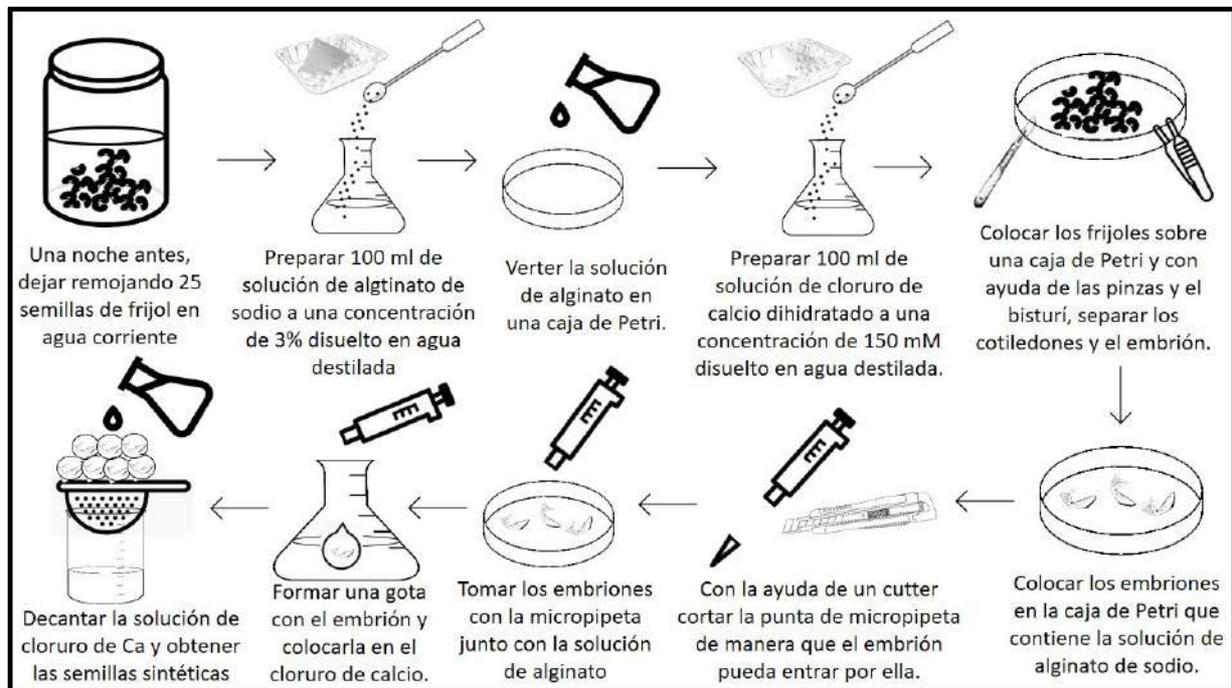


Figura 36. Metodología para la preparación de semillas sintéticas. (Esquema: Fabricio Ociel del Toro).

RESULTADOS A REPORTAR

1. Describir la forma y la textura de las semillas sintéticas producidas.
2. Explicar los principales problemas encontrados durante el encapsulamiento de embriones.
3. Identificar a través de la cubierta de alginato, las partes que forman el embrión, ¿Son claramente visibles?

RESULTADOS ESPERADOS

En la figura 37 se presentan los resultados que se esperan obtener:

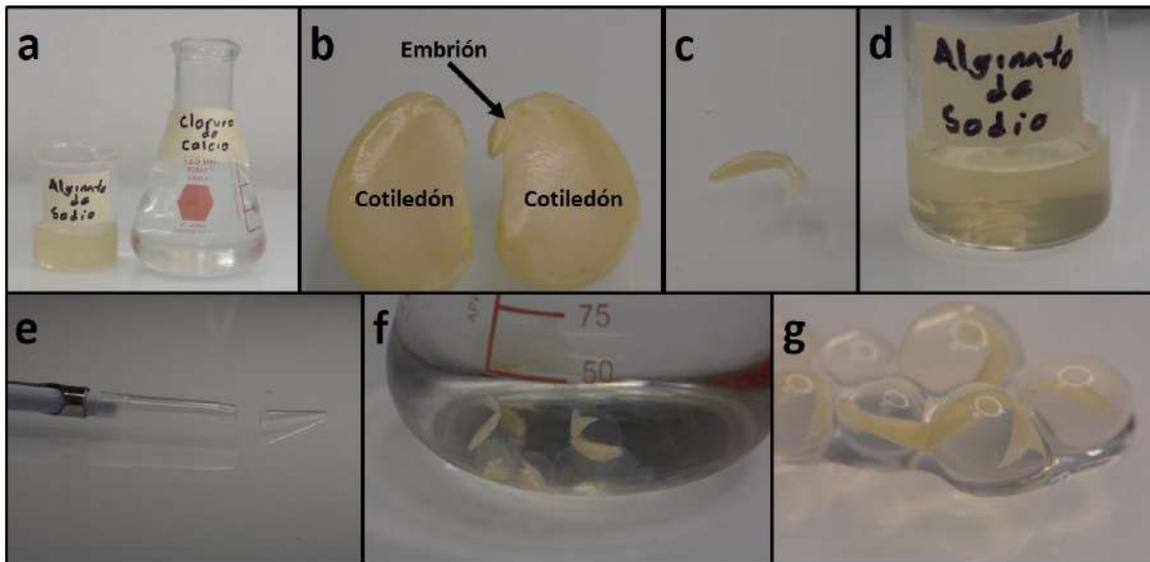


Figura 37. Producción de semillas sintéticas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) **a)** Soluciones de alginato de sodio y cloruro de calcio. **b)** Corte de la semilla de frijol mostrando los cotiledones y el embrión. **c)** Embrión. **d)** Embiones en la solución de alginato de sodio. **e)** Corte de la punta de micropipeta para transferir los embriones a la solución de cloruro de calcio. **f)** Embiones en la solución de cloruro de calcio. **g)** Embiones encapsulados en una matriz de alginato formando las semillas sintéticas o artificiales. (Fotografías: Juvencio Castañeda).

PREGUNTAS

1. ¿Cuáles son las principales diferencias entre las semillas naturales y las semillas sintéticas o artificiales?
2. Menciona las ventajas o desventajas que tiene el uso de semillas sintéticas vs el uso de semillas naturales.
3. Investigar por qué en las empresas de producción de semillas sintéticas, el encapsulado de los embriones somáticos se hace disolviendo el alginato de calcio en solución de sales MS sin cloruro de calcio.
4. ¿Qué especies de plantas o en qué casos específicos es mejor la reproducción de las mismas mediante semillas sintéticas?

PRÁCTICA 9. ACLIMATACIÓN DE VITROPLANTAS DE SAUCE (*Salix bonplandiana*) A CONDICIONES *EX VITRO*

INTRODUCCIÓN

Además de la etapa del establecimiento del cultivo aséptico de los explantes *in vitro*, otra de las etapas críticas en el proceso de micropropagación es la adaptación de las plántulas provenientes de cultivo *in vitro* a condiciones *ex vitro* ya que, si no se tienen las precauciones adecuadas, pueden originarse grandes pérdidas principalmente debido a las siguientes causas:

- a) Choque por estrés hídrico.- esto se debe principalmente a que en los sistemas *in vitro* las plántulas están dentro de contenedores donde existe una alta humedad relativa (> 90%) y al sacarlas de dicho contenedor se deshidratan muy rápidamente. A fin de evitar esto, una vez que las plántulas se pasan a los contenedores con sustrato, se debe de colocar una cubierta de plástico (por ejemplo, una bolsa) con el objeto de crear un microambiente húmedo que provoque que la plántula no tenga un cambio brusco de ambiente, posteriormente se le van haciendo cortes a la bolsa de plástico para que la plántula se vaya adaptando poco a poco a las condiciones en invernadero.
- b) Contaminación causada por microorganismos.- las plántulas crecidas dentro de los contenedores de laboratorio, viven en condiciones asépticas, libres de cualquier tipo de microorganismo que pueda afectar su crecimiento, por lo que, una vez que son transferidas a sustrato, pueden sufrir ataques por hongos, bacterias, etc., causando su muerte. Para evitar esto, antes de transferir las plántulas al sustrato, se les debe de dar un “baño” con solución fungicida-bactericida para que tenga protección contra microorganismos presentes en el sustrato; de igual manera, se recomienda esterilizar el sustrato antes de utilizarlo. En el caso de que las plántulas necesiten de microorganismos benéficos que formen simbiosis con ellas

para poder vivir (por ejemplo, hongos micorrízicos, bacterias fijadoras de nitrógeno, etc.), éstos se deben de transferir a la plántula antes de colocarla en el sustrato.

- c) Falta de agua y nutrientes.- dado que en condiciones *in vitro* las plántulas viven en un medio de cultivo con un pH establecido, y además tienen los nutrientes y el agua disponibles en todo momento, éstas pueden vivir hasta sin formar raíces, e incluso se les agrega fuentes de carbono como la sacarosa (para restablecer su tasa fotosintética), haciendo que su nutrición sea de tipo mixótrofa. Sin embargo, una vez que son transferidas al sustrato, es necesario estar pendiente de que no les falten nutrientes, agua y mantener un pH del sustrato óptimo para la absorción de dichos nutrientes, ya que de no ser así, es posible que se retrase el crecimiento y desarrollo de las plantas, llegando incluso a morir.

El proceso de adaptación es dependiente de la especie de la planta, una planta acuática que crece de manera *in vitro* podría no necesitar un periodo de adaptación, y colocarse directamente bajo el agua en un estanque o pecera; sin embargo, un cactus que en la naturaleza vive en un ambiente desértico, requerirá de un periodo de adaptación más largo para soportar el gran cambio en la humedad. Se debe de conocer con exactitud las condiciones ambientales en los que la planta de interés crece de manera más favorable para llevar a cabo el proceso de adaptación (Pierick, 1990; Azcón-Bieto & Talón, 2000; Hazarika, 2003).

OBJETIVO

Adaptar plántulas de sauce *in vitro*, a condiciones *ex vitro* en invernadero

MATERIALES

- 10 Macetas de plástico (chicas o medianas)
- 10 Bolsas de plástico (que cubran las macetas)

- 1 Pinza de disección
- 2 contenedores de plástico
- Agua corriente (de la llave)
- Cinta Masking Tape
- Guantes de nitrilo o de látex
- Marcador indeleble
- Vitroplantas de Sauce

REACTIVOS

- Peat Moss (musgo canadiense)
- Perlita o vermiculita
- Polvo fungicida (por ejemplo: CAPTAN)
- Polvo bactericida (por ejemplo: BACTROL)
- Polvo enraizador (por ejemplo: RADIX)

EQUIPOS

- Cámara de adaptación o invernadero

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

1. En un contenedor de plástico, hacer una mezcla de 7 partes de Peat Moss con 3 partes de vermiculita o perlita. (O bien, se puede utilizar un sustrato con la mezcla ya hecha).
2. Humedecer la mezcla con agua corriente hasta que, al exprimirla levemente, comience a salir el agua (prueba del puño)

3. Colocar la mezcla de sustrato en las macetas
4. En un contenedor de plástico, preparar una solución fungicida-bactericida (1 g/l de CAPTAN + 1 g/l de BACTROL) disueltos en agua corriente
5. Con las pinzas de disección, sacar las plántulas de los contenedores *in vitro*, lavar las raíces en agua corriente para quitarle los restos de medio de cultivo y colocarlas en la solución fungicida-bactericida durante 10 minutos y agitarlas eventualmente
6. Sacar las plántulas de la solución fungicida-bactericida y poner un poco de polvo enraizador en la base de la misma.
7. Colocar las plántulas en las macetas donde previamente se puso el sustrato, procurando que la raíz quede totalmente cubierta
8. Colocar una bolsa de plástico sobre la maceta y fijarla muy bien con cinta masking-tape
9. Rotular la maceta con el marcador indicando la especie, el nombre del operario, pero sobre todo la fecha de siembra, a fin de saber cuándo se van a hacer los cortes posteriores.
10. Colocar la maceta en la cámara de adaptación o en el invernadero.
11. Hacer cortes en la bolsa de plástico de la siguiente manera: un corte en la esquina derecha de la bolsa a los 12 días de la siembra, 3 días después un corte en la esquina izquierda, 3 días después hacer el corte a lo largo de la parte superior de la bolsa, finalmente, 2 días después, remover la bolsa y transferir la plántula al vivero.

En la figura 38 se muestra esquemáticamente los pasos a seguir:

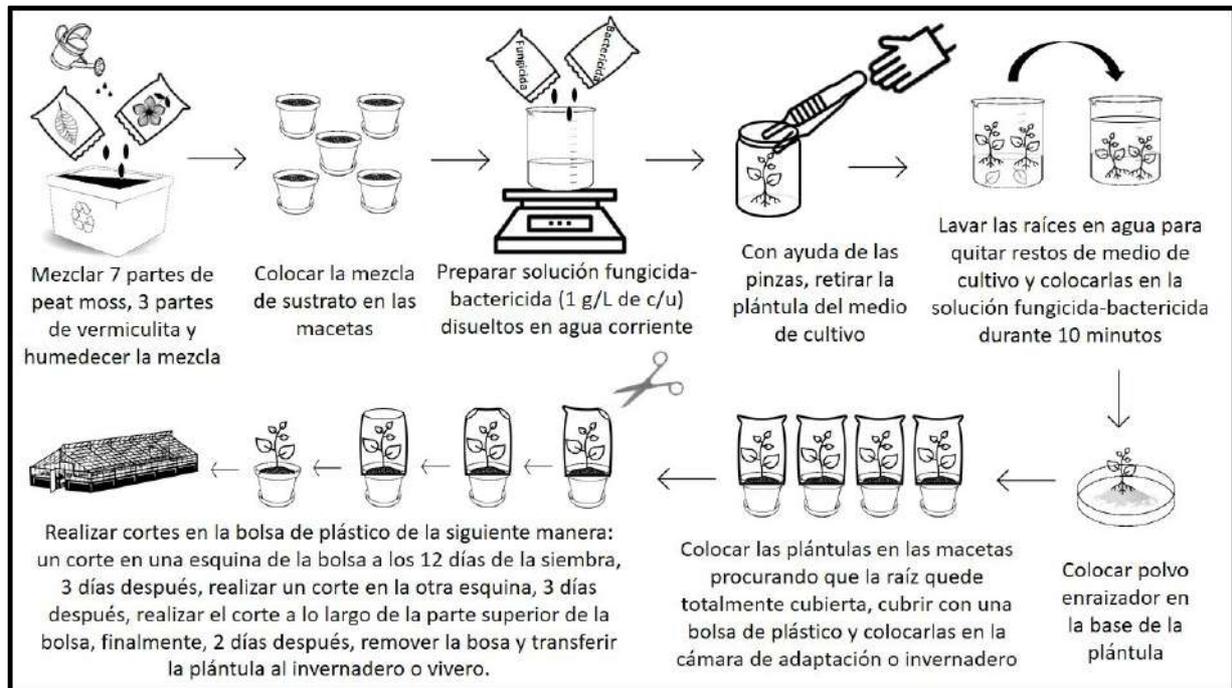


Figura 38. Aclimatación de vitroplantas de Sauce. (Esquema: Fabricio Ociel del Toro).

RESULTADOS A REPORTAR

1. Tasa de supervivencia de las plántulas adaptadas.
2. Identificar los microorganismos que crecieron como contaminantes (si los hubo) en el proceso de aclimatación, reportar el porcentaje de contaminación y encontrar las probables causas de dicha contaminación.

RESULTADOS ESPERADOS

En la figura 39 se presentan los resultados que se esperan obtener:

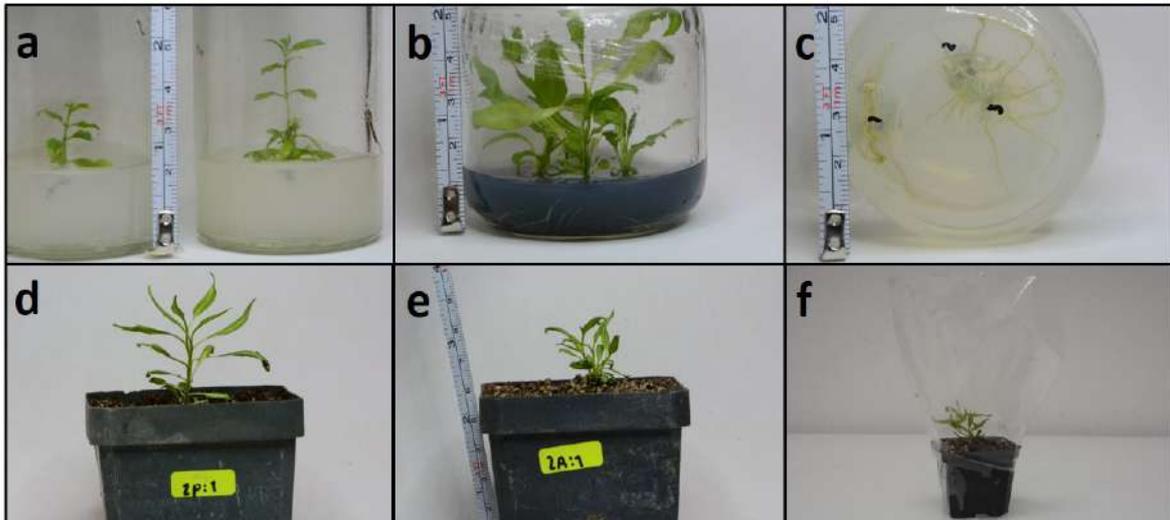


Figura 39. Aclimatación de plántulas de sauce (*Salix bonplandiana*) a condiciones *ex vitro*. **a)** Propagación *in vitro* (proliferación de yemas axilares). **b) y c)** Enraizamiento *in vitro*. **d) y e)** Transferencia de las vitroplantas a contenedores con sustrato. **f)** Colocación de bolsa de plástico para crear un microclima que evita pérdidas debido al estrés hídrico. (Fotografías: Juvencio Castañeda).

PREGUNTAS

1. ¿Qué diferencias se presentan en los estomas de las plantas antes y después de llevar a cabo el proceso de aclimatación?
2. ¿Qué sucede si no se hace la aclimatación de las plántulas producidas *in vitro* antes de transferirse al invernadero o campo?
3. En el sustrato para la adaptación, ¿Qué compuestos podrían sustituir al Peat Moss?
4. En las Empresas donde se producen miles de plantas, el proceso de la colocación de bolsas de plástico en cada maceta, no resulta redituable ¿Cómo se soluciona este problema?
5. ¿Cómo se podría mejorar el proceso de adaptación para una planta de interés particular?

BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA:

- Ahloowalia, B.S. & Savangikar, V. A. (2004). Low cost options for energy and labour. *En: International Atomic Energy Agency. Low cost options for tissue culture technology in developing countries* (pp. 41-45). Viena, Austria: Proceedings of a technical meeting Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture and held in Vienna 26-30 August 2002.
- Avisar, Y., Choi, J., DeSaix, J., Jurukovski, V., Wise, R., & Rye, C. (2013). Biology: OpenStax.
- Azcón-Bieto, J. & Talón, M. (2000). Fundamentos de fisiología vegetal. McGraw-Hill Interamericana.
- Baye, E., Matewos, T. & Belew, D. (2020). Optimization of in vitro rooting protocol for tomato (*Lycopersicon esculentum* mill.) varieties. *J. Appl. Nat. Sci.* 12(3):365-371. <https://doi.org/10.31018/jans.v12i3.2223>
- Cucco, M.F. & Rossi J.A.D. (2000). Protocol for regeneration in vitro of *Arachis hypogaea* L. *Electron. J. Biotechnol.* 3(2):154-160.
- Dhir, K.K., Angrish, R. & Bajaj, M. (1984). Micropropagation of *Salix babylonica* through in vitro shoot proliferation. *Proc. Indian Acad. Sci. (Plant Sci.)* 93:655-660. <https://doi.org/10.1007/BF03053063>
- George, E.F, Hall, M.A, DeKlerk, G.J. (2008) Plant propagation by tissue culture 3rd Edition: Volume 1. The Background. Springer, The Netherlands.
- Georgiev, V., Schumann, A., Pavlov, A. & Bley, T. (2014). Temporary immersion systems in plant biotechnology. *Eng. Life. Sci.* 14:607-621.
- GHS (2021). Globally Harmonized System on Classification and Labelling of Chemicals (GHS Rev 9). 556 pp. New York, NY, USA and Geneva, Switzerland: United Nations. Website <https://unece.org/transport/standards/transport/dangerous-goods/ghs-rev9-2021> (Accessed 18.09.21).
- Godo, T., Fujiwara, K., Guan, K., & Miyoshi, K. (2011). Effects of wavelength of LED-light on in vitro asymbiotic germination and seedling growth of *Bletilla ochracea* Schltr. (Orchidaceae). *Plant Biotechnol.* 28:397-400. DOI: 10.5511/plantbiotechnology.11.0524a
- Goggin, D.E., & Steadman, K.J. (2012). Blue and green are frequently seen: Responses of seeds to short- and mid-wavelength light. *Seed Sci. Res.* 22:27-35. doi:10.1017/S0960258511000444
- Hazarika, B.N. (2003). Acclimatization of tissue-cultured plants. *Curr. Sci.* 85(12):1704-1712. <http://www.jstor.org/stable/24109975>
- Iannicelli, J. & Salvio-Escandón, A. (2015). Desde un área estéril a las biofábricas de producción masiva. *En: Sharry, S., Adema, M. y Abedini, W. (coord.). Plantas de probeta: Manual*

- para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro* (pp. 22-45). Editorial de la Universidad de La Plata.
- Lugo-Espinosa, O., Arellano-Ostoa, G. & Hernández-Cote, D. (2017). Automatización de un sistema de inmersión temporal con base en plataformas abiertas de hardware y software. *Terra Latinoam.* 35:269-277.
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15(3):473-497.
- Mroginski, L., Sansberro, P. & Flaschland, E. (2004). Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. En: Levitus, G., Echenique, V., Rubinsten, C., Hopp, E. & Mroginski, L. (Eds). *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal*. Editorial INTA. Buenos Aires. pp. 35-42.
- NFPA. Sistema normativo para la identificación de los riesgos de materiales para respuesta a emergencias. NFPA 704.
- Olmos, S., Luciani, G. & Galdeano, E. (2004). Micropropagación. *En: Levitus, G., Echenique, V., Rubinsten, C., Hopp, E. & Mroginski, L. (Eds). Biotecnología y Mejoramiento Vegetal*. Editorial INTA. Buenos Aires. pp. 353-362.
- Orellana, P., Suárez-Castellá, M., Triana, R., Sarría, Z., Pons, M., León, M. & González, M., Pérez, Z. (2008). Métodos y elementos básicos para la planificación de la producción *in vitro* en biofábricas. *Biotecnol. Veg.* 8(2):73-80.
- Phillips, G.C., & Gamborg, O.L. (1995). Laboratory Facilities, Operation, and Management. *In: Phillips, G. C., & Gamborg, O. L. (Eds.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture: Fundamental Methods*. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Phillips, G.C., Hubstenberger & Hansen, E.E. (1995). Plant Regeneration from Callus and Cell Suspension Cultures by Somatic Embryogenesis. *In: Phillips, G. C., & Gamborg, O. L. (Eds.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture: Fundamental Methods*. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Pierick, R.L.M. (1990). Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ediciones Mundi Prensa. Madrid. 324 p.
- Rey, H.Y. & Mroginski, L.A. (2004). Semilla sintética. *En: Levitus, G., Echenique, V., Rubinsten, C., Hopp, E. & Mroginski, L. (Eds). Biotecnología y Mejoramiento Vegetal*. Editorial INTA. Buenos Aires. pp. 363-368.
- Rihan, H.Z., Kareem, F., El-Mahrouk, M.E., & Fuller, M.P. (2017). Artificial seeds (principle, aspects and applications). *Agronomy* 7(4):71.
- Roca, W.M. & Mroginski, L.A. (1991). Establecimiento de un laboratorio para el cultivo de tejidos vegetales. *En: Roca, W. M. y Mroginski, L. A. (Ed). Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones* (pp. 1-18). Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical.

- Saad, A.I.M. & Elshahed, A.M. (2012). Plant Tissue Culture Media. *In: Leva, A. and Rinaldi, L.M.R., Eds., Recent Advances in Plant in Vitro Culture, Chap. 2, InTech, Winchester, 29-40.*
- Sharry, S., Adema, M. & Abedini, W. (2015). Biofábricas. *In: Plantas de probeta. Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro. Editorial de la Universidad de La Plata.*
- Savangikar, V.A. (2004). Role of low cost options in tissue culture. *En: International Atomic Energy Agency. Low cost options for tissue culture technology in developing countries (pp. 11-15). Viena, Austria: Proceedings of a technical meeting Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture and held in Vienna 26-30 August 2002.*

ANEXO 1. ABREVIATURAS:

AIA	Ácido indolacético
AIB	Ácido Indolbutírico
ANA	Ácido naftalenacético
BAP/BA	Bencilaminopurina / Benciladenina
KIN	Kinetina o Cinetina
ZEA	Zeatina
EDTA	Etilendiaminotetraacetato
MS	Murashige y Skoog (1962)
G	Gramos
Mg	Miligramos
mg/ml	Miligramos por mililitro
mg/L	Miligramos por litro
L	Litros
ml	Mililitros
pH	Potencial de hidrógeno.
p/v, m/v	Peso por volumen o masa por volumen (concentración)
v/v	Volumen por volumen (concentración)
UV	Ultravioleta
W	Watts
°C	Grados centígrados
0.1 X	Concentración al 10% o 0.1 veces
1 X	Concentración al 100% o 1 vez
10 X	Concentración al 1000% o 10 veces
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

ANEXO 2. CONCEPTOS BÁSICOS DE CONCENTRACIÓN DE SOLUCIONES Y

CÁLCULOS COMÚNMENTE UTILIZADOS:

Tabla de equivalencias

1 mg/l	0.001 mg/ml
1 ml	1000 µl
1 mg	1000 µg
1 mol	1000 mmol
1 ml	1 cc

Porcentaje (%)

Es una de las maneras más simples de expresar una concentración

- a) Porcentaje masa-masa. - se define como la masa de soluto (expresado en g), por cada 100 g de solución. Para su determinación, utilizar la ecuación:

$$\% \text{ m/m} = \frac{\text{masa de soluto (g)}}{\text{masa de solución (g)}} * 100$$

Se expresa en % p/p o bien % m/m

- b) Porcentaje masa-volumen. - se define como la masa de soluto (expresado en g), por cada 100 ml de solución. Para su determinación, utilizar la ecuación:

$$\% \text{ m/v} = \frac{\text{masa de soluto (g)}}{\text{volumen de solución (ml)}} * 100$$

Se expresa en % p/v o bien % m/v

- c) Porcentaje volumen-volumen. - se define como el volumen de soluto (expresado en ml), por cada 100 ml de solución. Para su determinación, utilizar la ecuación:

$$\% \text{ v/v} = \frac{\text{volumen de soluto (ml)}}{\text{volumen de solución (ml)}} * 100$$

Se expresa en % v/v

Cálculos:

1.- Si se disuelven 30 g de sacarosa en 1000 g de agua ¿Cuál será el % m/m de dicha solución?

Utilizar la fórmula % m/m donde

$$M_{\text{solute}} = 30 \text{ g}$$

$$M_{\text{solvente}} = 1000 \text{ g}$$

$$M_{\text{solución}} = 1030 \text{ g}$$

$$\% \text{ m/m} = ?$$

Sustituyendo los valores en la fórmula se tiene que:

$$\% \text{ m/m} = \frac{\text{masa de soluto (g)}}{\text{masa de solución (g)}} * 100$$

$$\% \text{ m/m} = \frac{30 \text{ g}}{1030 \text{ g}} * 100 = 3$$

El porcentaje masa/masa es 3%, es decir, que por cada 100 g de solución existen 3 g de sacarosa.

2.- ¿Qué cantidad de jabón líquido y de agua se necesitan para preparar 100 ml de solución de jabón al 5%?

Utilizar la fórmula % v/v donde

$$V_{\text{solute}} = ?$$

$$V_{\text{solvente}} = ?$$

$$V_{\text{solución}} = 100 \text{ ml}$$

$$\% \text{ v/v} = 5\%$$

Sustituyendo los valores en la fórmula y despejando la incógnita se tiene que:

$$\% \text{ v/v} = \frac{\text{volumen de soluto (ml)}}{\text{volumen de solución (ml)}} * 100$$

$$\frac{(\text{volumen de solución}) * (\% \text{ v/v})}{100} = \text{volumen de soluto}$$

$$\frac{100 \text{ ml} * 5\%}{100} = 5 \text{ ml}$$

Dado que $V_{\text{solución}} = V_{\text{solvente}} + V_{\text{soluta}}$ para calcular el volumen de agua necesario, se despeja la fórmula y se sustituyen los valores:

$$V_{\text{solución}} - V_{\text{soluta}} = V_{\text{solvente}}$$

$$100 \text{ ml} - 5 \text{ ml} = 95 \text{ ml}$$

Se necesitan diluir 5 ml de jabón líquido en 95 ml de agua, para tener 100 ml de volumen de solución final.

Dilución de soluciones concentradas

En el laboratorio, es común preparar soluciones concentradas (conocidas como soluciones madre o soluciones stock), a partir de las cuales se preparan soluciones diluidas, las cuales se preparan basándose en la siguiente fórmula (ecuación de dilución):

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Donde,

C_1 = Concentración de la solución concentrada (solución inicial)

V_1 = Volumen necesario de la solución concentrada

C_2 = Concentración de la solución diluida (solución final)

V_2 = Volumen final de la solución diluida

En donde siempre se cumple la relación: $C_1 > C_2$ y $V_2 > V_1$

En los laboratorios de Micropropagación de plantas, generalmente se prepara una solución stock de concentrado de medio de cultivo MS, el cual es de los medios más ampliamente utilizados.

Cálculos:

1.- ¿Cuántos ml de una solución de medio de cultivo MS concentrado (10X) se deben tomar para preparar 1 litro de medio de cultivo a una concentración de 1X?

Utilizar la fórmula $C_1V_1 = C_2V_2$ donde

$$C_1 = 10X$$

$$V_1 = ?$$

$$C_2 = 1X$$

$$V_2 = 1000 \text{ ml}$$

Sustituyendo los valores en la fórmula y despejando la incógnita se tiene que:

$$(10X)(V_1) = (1X)(1000 \text{ ml})$$

$$V_1 = \frac{(1X) (1000 \text{ ml})}{10X} = 100 \text{ ml}$$

Se necesitan 100 ml de la solución Stock (10X)

Las soluciones de reguladores de crecimiento generalmente se preparan en una relación de 1 mg/ml, es decir que en esta solución hay 1 mg de soluto por cada ml de volumen de la disolución.

2.- Si se necesitan preparar 700 ml de medio de cultivo MS con 12 mg/l de Benciladenina (BA) y 0.5 mg/l de Ácido indolacético (AIA), ¿cuántos ml de una solución de BA [1 mg/ml] y cuántos ml de una solución de AIA [1 mg/ml] se deben tomar?

Para BA:

$$C_1 = 1 \text{ mg/ml}$$

$$V_1 = ?$$

$$C_2 = 12 \text{ mg/l} = 12 \text{ mg}/1000 \text{ ml} = 0.012 \text{ mg/ml}$$

$$V_2 = 700 \text{ ml}$$

Sustituyendo los valores en la fórmula $C_1V_1 = C_2V_2$ y despejando la incógnita tenemos que:

$$(1 \text{ mg/ml}) (V_1) = (0.012 \text{ mg/ml}) (700 \text{ ml})$$

$$V_1 = \frac{(0.012 \text{ mg/ml}) (700 \text{ ml})}{(1 \text{ mg/ml})} = 8.4 \text{ ml}$$

Se necesitan 8.4 ml de la solución de BA

Las soluciones de reguladores de crecimiento generalmente se preparan en una concentración de 1 mg/ml, es decir que en esta solución existe 1 mg de soluto por cada ml de solvente, por lo que al agregar 8.4 ml equivale a agregar 8.4 mg de BA

Para AIA:

$$C_1 = 1 \text{ mg/ml}$$

$$V_1 = ?$$

$$C_2 = 0.5 \text{ mg/l} = 0.5 \text{ mg}/1000 \text{ ml} = 0.0005 \text{ mg/ml}$$

$$V_2 = 700 \text{ ml}$$

Sustituyendo los valores en la fórmula $C_1V_1 = C_2V_2$ y despejando la incógnita tenemos que:

$$(1 \text{ mg/ml}) (V_1) = (0.0005 \text{ mg/ml}) (700 \text{ ml})$$

$$V_1 = \frac{(0.0005 \text{ mg/ml}) (700 \text{ ml})}{(1 \text{ mg/ml})} = 0.35 \text{ ml} = 350 \text{ }\mu\text{l}$$

Se necesitan 0.35 ml (350 μ l) de la solución de AIA

Las soluciones de reguladores de crecimiento generalmente se preparan en una concentración de 1 mg/ml, es decir que en esta solución existe 1 mg de soluto por cada ml de solvente, por lo que al agregar 0.35 ml (350 μ l) equivale a agregar 0.35 mg (350 μ g) de AIA

Molaridad (M)

Para comprender qué es la molaridad, es necesario primeramente definir qué es un MOL (mol).

El MOL es una medida del Sistema Internacional (SI) para medir cantidad de sustancia; equivale a $6.02214076 \times 10^{23}$ (*) unidades elementales (átomos, moléculas, iones, fotones, electrones, radicales u otras partículas o grupos específicos de éstas).

Para entenderlo mejor: en la tabla periódica de los elementos químicos un átomo de Hierro (Fe) tiene una masa atómica de 55.845 u (unidades de masa atómica)**, entonces $6.02214076 \times 10^{23}$ átomos de Fe, tendrán una masa atómica de 55.845 g, es decir, 1 mol (55.845 g/mol).

$$55.845 \text{ g de Fe} = 1 \text{ mol de Fe}$$

(1 mol equivale a la masa atómica expresada en gramos)

Otro ejemplo: Una molécula de agua (H₂O), de acuerdo a los valores de la tabla periódica de los elementos químicos, tiene una masa molecular de 18.01528 u [la suma de las masas atómicas de 2 átomos de Hidrógeno y un átomo de Oxígeno: $(1.00794 \times 2) + 15.9994 = 18.01528$], entonces $6.02214076 \times 10^{23}$ moléculas de H₂O, tendrán una masa molecular de 18.01528 g, es decir, 1 mol (18.01528 g/mol).

$$18.01528 \text{ g de H}_2\text{O} = 1 \text{ mol de H}_2\text{O}$$

(1 mol equivale a la masa molecular expresada en gramos)

*Valor numérico de la constante N_A de Avogadro

**Las unidades de masa atómica se expresan como “u” o como “Da”, ésta última en honor de John Dalton, químico británico al que se debe la primera formulación moderna de la teoría atómica.

Una vez comprendiendo esto, se procede a definir Molaridad.

Molaridad es una unidad de concentración que expresa el número de moles de soluto disuelto por litro de solución

Fórmula general para calcular la Molaridad:

$$M = \frac{\text{Número de moles de soluto}}{\text{litro de solución}}$$

Cálculos:

1.- ¿Cuántos gramos de hidróxido de sodio (NaOH) se necesitan para preparar 100 ml de una solución 1 M?

Paso 1. Transformar los mililitros a litros:

$$100 \text{ ml} * \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ ml}}$$

Paso 2. Escribir el significado de la concentración a preparar

$$\frac{1 \text{ mol}}{1 \text{ L}}$$

Paso 3. Escribir la masa molar de la sustancia (suma de las masas atómicas de cada elemento que la forman)

$$\frac{40 \text{ g NaOH}}{1 \text{ mol}}$$

Paso 4. Agrupar los pasos del 1 al 3 y resolver las operaciones

$$100 \text{ ml} * \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ ml}} * \frac{1 \text{ mol}}{1 \text{ L}} * \frac{40 \text{ g}}{1 \text{ mol}} = 4 \text{ g}$$

Se necesita pesar 4 g de NaOH para preparar 100 ml de una solución 1M.

2.- ¿Cuántos mililitros de ácido clorhídrico (HCl) con una pureza de 37% y una densidad de 1.14 g/ml se necesitan para preparar 100 ml de una solución 1 M?

Paso 1. Transformar los mililitros a litros:

$$100 \text{ ml} * \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ ml}}$$

Paso 2. Escribir el significado de la concentración a preparar

$$\frac{1 \text{ mol}}{1 \text{ L}}$$

Paso 3. Escribir la masa molar de la sustancia (suma de las masas atómicas de cada elemento que la forman)

$$\frac{36.46 \text{ g HCl (puros)}}{1 \text{ mol HCl}}$$

Paso 4. Tomar en cuenta la pureza

$$\frac{100 \text{ g HCl (impuros)}}{37 \text{ g HCl (puros)}}$$

Paso 5. Transformar de gramos a mililitros tomando en cuenta la densidad

$$\frac{1 \text{ ml HCl (impuros)}}{1.14 \text{ g HCl (impuros)}}$$

Paso 6. Agrupar los pasos del 1 al 5 y resolver las operaciones

$$100 \text{ ml} * \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ ml}} * \frac{1 \text{ mol}}{1 \text{ L}} * \frac{36.46 \text{ g HCl (puros)}}{1 \text{ mol HCl}} * \frac{100 \text{ g HCl (impuros)}}{37 \text{ g HCl (puros)}} * \frac{1 \text{ ml HCl (impuros)}}{1.14 \text{ g HCl (impuros)}}$$

Se necesita 8.64 ml de HCl para preparar 100 ml de una solución 1M.

3.- ¿Cuántos gramos de Cloruro de calcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) se necesitan para preparar 100 ml de una solución 150 mM?

Paso 1. Transformar los mililitros a litros:

$$100 \text{ ml} * \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ ml}}$$

Paso 2. Escribir el significado de la concentración a preparar

$$\frac{150 \text{ mmol}}{1 \text{ L}}$$

Paso 3. Escribir la masa molar de la sustancia (suma de las masas atómicas de cada elemento que la forman)

$$\frac{147.014 \text{ g CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}}{1000 \text{ mmol}}$$

Paso 4. Agrupar los pasos del 1 al 3 y resolver las operaciones

$$100 \text{ ml} * \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ ml}} * \frac{150 \text{ mmol}}{1 \text{ L}} * \frac{147.014 \text{ g}}{1000 \text{ mmol}} = 2.2 \text{ g}$$

Se necesita pesar 2.2 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ para preparar 100 ml de una solución 150 mM.

Normalidad (N)

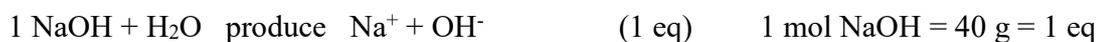
Se define como el número de pesos equivalentes-gramo del soluto por litro de solución. Indica qué tan reactiva es la solución de la especie disuelta, en lugar de qué tan alta o diluida es su concentración, por lo tanto, a diferencia de la molaridad, la normalidad varía según la reacción en la que participa el soluto.

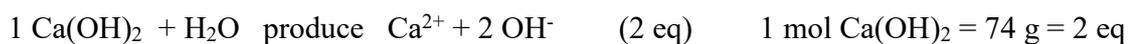
¿Qué son los equivalentes? Son las partes que tienen en común un conjunto de especies reactivas, por ejemplo ácidos, bases o hidróxidos, sales, etc., con base en esto, se pueden indicar las siguientes definiciones:

Equivalente de un Ácido: Es la cantidad de moles de H^+ proporcionada por un mol de ácido (hidrácido u oxiácido) cuando se disuelve en agua.

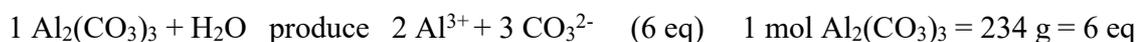


Equivalente de una Base o Hidróxido: Es la cantidad de moles de OH^- proporcionada por un mol de base cuando se disuelve en agua.





Equivalente de una Sal: Es la cantidad de moles de cargas positivas (o negativas, ya que son iguales) proporcionada por un mol de sal (haloidea u oxisal) al disolverse en agua.



Fórmula general para calcular la Normalidad:

$$N = \frac{\text{Número de equivalentes de soluto}}{\text{litro de solución}}$$

Donde para calcular los equivalentes se pueden usar las siguientes fórmulas:

Ácidos:

$$1 \text{ equivalente} = \frac{\text{Masa de un mol de moléculas o de unidades fórmula de la sustancia}}{\text{número de iones hidrógeno en la fórmula del ácido}}$$

Bases o Hidróxidos:

$$1 \text{ equivalente} = \frac{\text{Masa de un mol de moléculas o de unidades fórmula de la sustancia}}{\text{número de iones hidróxido en la fórmula}}$$

Sales:

$$1 \text{ equivalente} = \frac{\text{Masa de un mol de moléculas o de unidades fórmula de la sustancia}}{\text{número de cargas positivas totales o número de cargas negativas totales}}$$

Cálculos:

1.- ¿Cuántos gramos de hidróxido de sodio (NaOH) se necesitan para preparar 100 ml de una solución 1 N?

Paso 1. Seleccionar la fórmula a utilizar para calcular los equivalentes:

Dado que el NaOH es un hidróxido, calculamos los equivalentes utilizando la siguiente fórmula:

$$1 \text{ equivalente} = \frac{\text{Masa de un mol de moléculas o de unidades fórmula de la sustancia}}{\text{número de iones hidróxido en la fórmula}}$$

Paso 2. Sustituir los valores respectivos en la ecuación:

Si la masa de un mol de NaOH = 40 g, sustituyendo la fórmula calculamos los equivalentes:

$$1 \text{ equivalente} = \frac{40 \text{ gramos}}{1} = 40 \text{ gramos}$$

Paso 3. Sustituir el valor obtenido, en la fórmula general de la normalidad:

$$N = \frac{\text{Número de equivalentes de soluto}}{\text{litro de solución}} = \frac{40 \text{ g}}{1 \text{ L}}$$

Paso 4. Transformar los mililitros a litros:

$$100 \text{ ml} * \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ ml}}$$

Paso 5. Agrupar los pasos del 3 y 4, y resolver las operaciones

$$100 \text{ ml} * \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ ml}} * \frac{40 \text{ g}}{1 \text{ L}} = 4 \text{ g}$$

Se necesita pesar 4 g de NaOH para preparar 100 ml de una solución 1N.

Nota.- De los cálculos hechos para calcular la Molaridad y Normalidad, se observa que para preparar 100 ml de una solución 1 M de NaOH se debe de pesar 4 g y para preparar 100 ml de una solución 1 N de NaOH también se debe de pesar 4 g, por lo cual, se puede concluir que cuando el número de H^+ , OH^- o la carga de los iones sustituibles es igual a 1, el valor de $M = N$.