

MANUAL DE PRÁCTICAS DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

**VANESSA MARTOS NÚÑEZ
LUIS F. GARCÍA DEL MORAL GARRIDO**

**Departamento de Fisiología Vegetal
Facultad de Ciencias**

**Universidad de Granada
Granada, 2016**

© LOS AUTORES
© UNIVERSIDAD DE GRANADA
MANUAL DE PRÁCTICAS DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL
FACULTAD DE CIENCIAS.
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA VEGETAL
ISBN: 978-84-338-5974-7
Depósito legal: GR./1069-2016
Edita: Editorial Universidad de Granada.
Campus Universitario de Cartuja. Granada.
Diseño de cubierta:
Imprime: Gráficas La Madraza. Albolote, Granada.

Printed in Spain

Impreso en España

Cualquier forma de reproducción, distribución, comunicación pública o transformación de esta obra sólo puede ser realizada con la autorización de sus titulares, salvo excepción prevista por la ley.

INDICE

INTRODUCCIÓN	7
Laboratorio, condiciones de cultivo y material	9
Composición de los medios nutritivos	10
Esterilización de los medios nutritivos	13
Almacenado de los medios nutritivos	14
Elección del material vegetal	14
Esterilización del material vegetal	14
Aislamiento, inoculación y repicado	16
Aplicaciones de las técnicas de cultivo de tejidos	18
Práctica 1. Preparación de medios de cultivo	19
Práctica 2. Obtención y observación de protoplastos de mesófilo de hoja	22
Práctica 3. Iniciación del cultivo de callos en tejidos de tabaco y zanahoria	24
Práctica 4. Identificación de microsporas y germinación y observación del tubo polínico en polen maduro de <i>Nicotiana glauca</i>	28
Práctica 5. Cultivo de anteras de <i>Nicotiana glauca</i>	30
Práctica 6. Cultivo de embriones cigóticos de cebada y apomícticos de naranjo	33
Práctica 7. Micropropagación (clonación) de coliflor	37
Práctica 8. Organogénesis <i>in vitro</i> en violeta africana (<i>Saintpaulia</i> ssp)	40
Práctica 9. Cultivo de meristemos de patata (<i>Solanum tuberosum</i> L)	44
Práctica 10. Embriogénesis somática indirecta en plantas de zanahoria (<i>Daucus carota</i>)	48
Práctica 11. Extracción y cuantificación de ADN de hojas de espinaca	52
Práctica 12. Caracterización genómica en hoja de espinaca mediante aplicación de marcadores moleculares RAPDs	55
Práctica 13. Transformación genética de discos de hoja de tabaco mediante <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	58
Práctica 14. Transformación de inflorescencias de <i>Arabidopsis thaliana</i> por infiltración con <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	63
Apéndices:	
I. <i>Unidades para la preparación de soluciones</i>	66
II. <i>Metodología general para la preparación de medios de cultivo</i>	66
III. <i>Composición de los medios más frecuentes para cultivo in vitro de tejidos vegetales</i>	68
IV. <i>Fórmula y peso molecular de los compuestos comúnmente utilizados en el cultivo de tejidos</i>	69
V. <i>Fórmula, peso molecular y solubilidad de los reguladores del crecimiento y colchicina comúnmente utilizados en el cultivo de tejidos.</i>	70
VI. <i>Pesos atómicos de los elementos más comunes utilizados en la preparación de medios para cultivo in vitro</i>	71
VII. <i>Enlaces útiles en Biotecnología Vegetal</i>	72
Bibliografía fundamental	73
Glosario de términos relativos al cultivo in vitro	74

Introducción

La aptitud para la multiplicación vegetativa puede ser considerada como una potencialidad fundamental de los vegetales. Esta multiplicación vegetativa depende de la existencia de los meristemos, que son masas de células en proliferación que dan lugar a tejidos (meristemos histógenos, tales como el cambium o los meristemos intercalares) o a órganos (meristemos organógenos, como los meristemos primarios de la raíz o del tallo). La existencia de múltiples puntos vegetativos terminales o axilares asegura la supervivencia en caso de destrucción parcial de la planta, por lo que puede ser contemplada como un fenómeno adaptativo a un medio con gran cantidad de organismos que se alimentan directamente de órganos vegetales y donde los estreses abióticos pueden causar la muerte de un gran número de órganos y tejidos vegetales.

El cultivo *in vitro* puede definirse como el cultivo en medio nutritivo, bajo condiciones estériles, de plantas, semillas, embriones, órganos, explantes, tejidos, células y protoplastos de plantas superiores. Por tanto, las técnicas de cultivo de tejidos vegetales implican el aislamiento de protoplastos, embriones, células o pequeños fragmentos de tejido vegetal vivo denominado *explante* o *explanto* y su cultivo en un medio nutritivo adecuado en condiciones controladas y asépticas. El medio de cultivo suele contener sales minerales, azúcares, vitaminas y hormonas.

El desarrollo de las técnicas de cultivo *in vitro* ha originado un gran impacto en las investigaciones biotecnológicas de las plantas. Además de su utilidad para el estudio del *crecimiento y desarrollo vegetal*, tienen gran importancia económica por sus aplicaciones a la *propagación de plantas a escala industrial* y a la *obtención de híbridos y plantas transgénicas*, de gran interés en programas de mejora genética vegetal, así como para la obtención de *metabolitos secundarios*, importantes en la industria agroalimentaria, farmacéutica y química.

Cuando un explante se sitúa en un medio adecuado se desarrolla una masa indiferenciada de células con características meristemáticas denominada callo, que puede mantenerse casi indefinidamente como tal. De éste pueden obtenerse trozos para ser repicados en medio fresco para su conservación. Esto es lo que se conoce como subcultivo, que conviene realizar entre 2 y 8 semanas para evitar la degeneración celular y mantener el cultivo con sus características iniciales. La estructura del callo puede ser friable cuando las células están asociadas unas a otras de manera relativamente laxa; o compacta, si las células se agregan más densamente. De los callos friables pueden obtenerse fácilmente cultivos de células en suspensión, mediante agitación en medio líquido.

Cuando se transfiere el callo a un medio adecuado para la regeneración, se puede inducir la formación de vástagos caulinares o de raíces (organogénesis) o embriones somáticos. En ambos casos, pueden ser transferidos a un medio que permita la obtención de plántulas susceptibles de ser cultivadas *ex vitro*.

Laboratorio, condiciones de cultivo y material.

Para el cultivo *in vitro* se debe disponer de un equipamiento adecuado al tipo de cultivo y a los objetivos que se persigan. En términos generales, el laboratorio debe disponer de una zona protegida, dotada de una cámara de flujo laminar. Son también necesarios cámaras de cultivo, con control de temperatura e iluminación, con alternancia de luz y oscuridad; pequeñas cámaras para cultivos independientes; autoclave para esterilización de medios de cultivo; balanzas de diferente grado de precisión; refrigeradores; estufas; agitador magnético; medidor de pH; lupas binoculares y microscopios; una gran variedad de material de vidrio y de plástico para la siembra y cultivo, preparación de medios, ensayos, etc.; y una apropiada colección de productos químicos, de acuerdo al programa de trabajo que se desea desarrollar. No todos los elementos son estrictamente necesarios. Por ejemplo, si se trabaja a pequeña escala el autoclave puede ser sustituido por una olla a presión de suficiente tamaño.

El uso de cámara de flujo laminar es muy conveniente para evitar contaminaciones en la manipulación y siembra del material vegetal, y resulta imprescindible en los laboratorios de investigación o comerciales. En estas cámaras el aire se toma del exterior y se hace pasar a través de un filtro de poro muy fino, antes de que llegue a la mesa de inoculación. Este sistema de filtrado asegura que el flujo de aire sobre la mesa de trabajo es completamente estéril (este flujo, al ser laminar, da nombre a la cámara) e impide que ninguna partícula contaminante pase al material desde el aire de la habitación. En los laboratorios importantes la cámara se sitúa en una habitación que se mantiene estéril y libre de polvo mediante un sistema de filtros y además está presurizada, de manera que el aire externo no pueda entrar. Normalmente poseen lámparas de luz ultravioleta (UV) para esterilizar el área de trabajo cuando no se trabaja en la cámara. Como normas generales de utilización de la cámara de flujo laminar:

- limpiar periódicamente los filtros y reemplazarlos una vez al año.
- Conectarla 15 minutos antes de su uso y asegurarse que las lámparas UV están apagadas.
- Antes de trabajar con material aséptico, es muy conveniente lavarse las manos con agua y jabón y después con alcohol de 96°.
- Evitar introducir material infectado o contaminado.
- Controlar la interrupción o inversión del flujo de aire.
- Evitar introducir la cabeza en el interior de la cámara.
- Para su limpieza utilizar alcohol de 96° y no de 70° que deja gotitas de agua, o bien espráis desinfectantes comerciales, tipo Biocidal ZFTM u otros.
- En algunos laboratorios incluso se utilizan lámparas ultravioleta durante la noche para esterilizar el desinfectar el aire.

Composición de los medios nutritivos.

Nutrientes inorgánicos: Los elementos minerales son muy importantes para la vida vegetal, al ser constituyentes de moléculas esenciales de la estructura y metabolismo celular. Además del C, H y O, 13 elementos son esenciales para el normal crecimiento de las plantas: nitrógeno, fósforo, azufre, calcio, potasio, magnesio, hierro, manganeso, cobre, zinc, boro, molibdeno y níquel. Entre ellos, los seis primeros se requieren en comparativamente mayor cantidad (superior a 0.5 mmol/L de acuerdo con la *International Association for Plant Physiology*) y son llamados por ello, macroelementos. Los restantes son necesarios en cantidades inferiores a 0.5 mmol/L y se denominan microelementos. Cualitativamente, las necesidades en estos nutrientes inorgánicos son bastante constantes para el crecimiento *in vitro* de los tejidos vegetales.

a) Macronutrientes:

Nitrógeno: Influye sobre la tasa de crecimiento; esencial para la formación de ácidos nucleicos, aminoácidos, proteínas, clorofilas y hormonas. Indirectamente afecta al crecimiento por su influencia sobre el pH del medio. En forma de NH_4^+ es necesario para la embriogénesis somática en cultivos de callo y células en suspensión.

Fósforo: Abundante en tejidos meristemáticos y en crecimiento rápido; esencial en procesos energéticos (fotosíntesis y respiración); importante en enlaces diéster que estabilizan ácidos nucleicos y fosfolípidos de membrana.