

Universidad de San Francisco Xavier de Chuquisaca

Facultad de Ciencias Agrarias

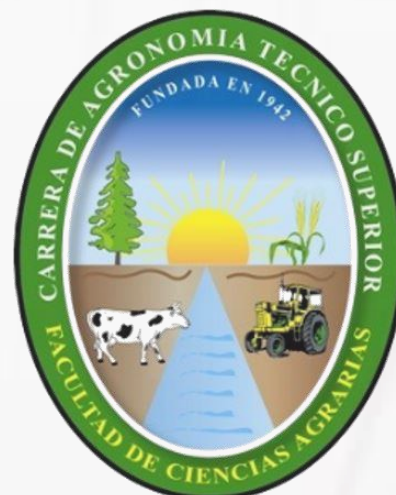
Carrera de Agronomía Técnico Superior

Instituto de Agroecología y Seguridad Alimentaria

# MANUAL DE LABORATORIO CULTIVOS IN VITRO DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN AGROTECNOLÓGICA LA BARRANCA (CIIAB)

Agr. Fátima Shirley Duarte Royder

2023





# CONTENIDO

1. Cultivos In Vitro .....	1
1.1 ¿Qué es cultivo In Vitro? .....	1
1.2 ¿Cuál es la importancia de cultivo In Vitro? .....	1
1.3 Ventajas de los cultivos In Vitro .....	1
1.4 Desventajas de los cultivos In Vitro .....	1
1.5 Diferencias entre In Vitro e In Vivo .....	2
2. Fases de la micropropagación vegetativa "In Vitro" .....	2
2.1 Fase 0: Preparación de la planta madre .....	2
2.2 Fase 1: Desinfección del material vegetal .....	2
2.3 Fase 2: Introducción del material in vitro .....	3
2.4 Fase 3: Multiplicación de los brotes .....	3
2.5 Fase 4: Elección de un medio de enraizamiento de los explantes .....	4
2.6 Fase 5: Aclimatación de los explantes enraizados .....	4
3. Localización del laboratorio .....	6
4. Distribución de laboratorio del CIAB .....	8
El laboratorio cuenta con: .....	8
4.1 Ante sala: .....	9
4.2 Área de lavado y esterilización: .....	9
4.3 Área de preparado de medios: .....	9
4.4 Área de siembra y repicaje: .....	9
4.5 Área de crecimiento: .....	9
5. Materiales y equipos que debe tener un laboratorio .....	10
6. Preparación de medios de cultivos .....	11
6.1 Preparación de los medios de cultivo .....	12
7. Reglamento general del laboratorio de cultivos In vitro .....	12
7. Bibliografía .....	14
ANEXO FOTOGRÁFICO .....	15



## 1. Cultivos In Vitro

### 1.1 ¿Qué es cultivo In Vitro?

La expresión cultivo **in vitro de plantas**, significa cultivar plantas dentro de un frasco de vidrio en un ambiente artificial. Esta forma de cultivar las plantas tiene dos características fundamentales: la asepsia (ausencia de gérmenes, etc), y el control de los factores que afectan el crecimiento.

Fuente:[https://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/46738/Documento\\_completo\\_.pdf-PDFA.pdf?sequence=1](https://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/46738/Documento_completo_.pdf-PDFA.pdf?sequence=1)

### 1.2 ¿Cuál es la importancia de cultivo In Vitro?

Los cultivos vegetales in vitro aportan en la investigación una gran cantidad de herramientas y técnicas que permiten fortalecer múltiples estudios referentes a temáticas relacionadas con el campo agrícola, la salud, la biología, y la genética, entre otras.

Fuente:<https://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/Biociencias/article/view/2222>

### 1.3 Ventajas de los cultivos In Vitro

- Permite sanear plantas con virus, mediante el cultivo de meristemos.
- Facilita la realización de una propagación clonal masiva de plantas idénticas en un corto tiempo.
- Permite la ampliación de la base genética de una especie.
- Los clones pueden ser propagados en cualquier época del año
- El costo de mantenimiento de un banco de germoplasma, en condiciones de laboratorio, es menor en comparación al mantenimiento en condiciones de campo, evitando el riesgo de pérdidas por factores climáticos (presencia de heladas, sequías prolongadas, granizadas o temperaturas elevadas) o sanitarios.
- Las plántulas se mantienen libres de plagas y enfermedades, por ser una técnica que requiere de mucha asepsia.
- Permite someter a una población de plántulas a pruebas de resistencia a factores de salinidad, temperaturas bajas (heladas) o altas (en condiciones tropicales).

Fuente:[https://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/46738/Documento\\_completo\\_.pdf-PDFA.pdf?sequence=1](https://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/46738/Documento_completo_.pdf-PDFA.pdf?sequence=1)

### 1.4 Desventajas de los cultivos In Vitro

- No todas las especies son viables de propagar in vitro; algunas son recalcitrantes



- Cada especie requiere de métodos específicos La estandarización de protocolos resulta costosa

**Fuente:**<https://www.intagri.com/articulos/nutricion-vegetal/cultivo-in-vitro-de-celulas-y-tejidos-vegetal>

## 1.5 Diferencias entre In Vitro e In Vivo

In vitro	In vitro
No realiza fotosíntesis	Realiza fotosíntesis
Crecimiento en condiciones controladas	Crecimiento en condiciones no controladas
Crecimiento en condiciones de asepsia	Exposición a los patógenos y gérmenes del ambiente
Alta humedad relativa	Humedad relativa variable
Estomas no funcionales	Estomas funcionales
Ausencia de pelos radiculares	Presencia de pelos radiculares
Ausencia de cera en la cutícula	Presencia de cera en la cutícula

**Fuente:**<http://inia.uy/en/Publicaciones/Documentos%20compartidos/111219220807102417.pdf>

## 2. Fases de la micropropagación vegetativa "In Vitro"

### 2.1 Fase 0: Preparación de la planta madre

Para poder establecer el cultivo en condiciones de asepsia, se deben obtener explantes con un nivel nutricional y un grado de desarrollo adecuado. Para obtener estos explantes es recomendable mantener a las plantas madre, es decir la planta donante de yemas, durante un período que puede oscilar entre unas semanas o varios meses en un invernadero bajo condiciones controladas. En ese ambiente se cultiva la planta en condiciones sanitarias óptimas y con un control de la nutrición y riego adecuados para permitir un crecimiento vigoroso y libre de enfermedades.

### 2.2 Fase 1: Desinfección del material vegetal

Una vez elegida la planta madre, se extraerán los fragmentos a partir de los cuales se obtendrán los explantes. Los explantes pueden ser yemas, trozos de hojas, porciones de raíces o semillas.



Para obtener estos explantes es recomendable mantener a las plantas madre, es decir la planta donante de yemas, durante un período que puede oscilar entre unas semanas o varios meses en un invernadero bajo condiciones controladas. En ese ambiente se cultiva la planta en condiciones sanitarias óptimas y con un control de la nutrición y riego adecuados para permitir un crecimiento vigoroso y libre de enfermedades.

## **2.2 Fase 1: Desinfección del material vegetal**

Una vez elegida la planta madre, se extraerán los fragmentos a partir de los cuales se obtendrán los explantes. Los explantes pueden ser yemas, trozos de hojas, porciones de raíces o semillas. Antes de extraer los explantes se hará una desinfección de los fragmentos de planta madre para eliminar los contaminantes externos. Los contaminantes más comunes son los hongos y las bacterias que habitan en forma natural en el ambiente. Una vez desinfectado el material vegetal con jabón neutro y agua de llave, se procede a hacer 3 enjuagues con agua destilada, y agregar un fungicida que puede ser el benomil o benlate 2gr/l.

## **2.3 Fase 2: Introducción del material in vitro**

Luego de la desinfección superficial, las semillas o las yemas dependiendo del material seleccionado, se debe seguir el proceso de desinfección con alcohol al 70% por 3 minutos e hipoclorito de sodio al 1% y 3% durante 3, 5, 10 minutos y hacer los respectivos enjuagues con agua destilada esterilizada para seguir con el siguiente paso de poner los explantes en medio de cultivo estéril. En un período de una semana o quince días, comienza el proceso de germinación o regeneración de nuevos tejidos vegetales, iniciando el ciclo de cultivo in vitro.

## **2.4 Fase 3: Multiplicación de los brotes**

Durante esta fase se espera que los explantes que sobrevivieron las fases anteriores originen brotes (de procedencia axilar o adventicia) con varias hojas. En la base de cada hoja hay una yema que se desarrollará luego de ser puesta en contacto con el medio de cultivo. Periódicamente estos nuevos brotes se deben subcultivar en un nuevo medio mediante divisiones y resiembras en tubos de cultivo u otros recipientes adecuados. Estas operaciones se realizan en la cámara o cabina de flujo laminar o en un lugar aislado que nos permita mantener las condiciones de asepsia. De esta forma aumenta el número de plantas en cada repique o división de las plantas. El número de plantas que se obtiene dependerá de la especie vegetal y de las condiciones del medio de cultivo. El número de plantas que se obtiene por la vía de la micro propagación permite alcanzar incrementos exponenciales, considerando que todos los factores que afectan el crecimiento hayan sido optimizados.



## 2.5 Fase 4: Elección de un medio de enraizamiento de los explantes

Para enraizar los explantes se utilizan principalmente plantines individuales de un tamaño aproximado de 2 cm. Los brotes obtenidos durante la fase de multiplicación se transfieren a un medio libre de reguladores de crecimiento o que solo contenga hormonas del tipo de las auxinas. Algunas especies de plantas no necesitan pasar por esta etapa y emiten sus raíces en el mismo medio de cultivo donde desarrollan yemas nuevas, por lo tanto, el proceso de multiplicación y enraizamiento transcurren en forma simultánea.

## 2.6 Fase 5: Aclimatación de los explantes enraizados

Los explantes recién enraizados son muy sensibles a los cambios ambientales, de manera que el éxito o el fracaso de todo el proceso dependen de la aclimatación. En esta etapa las plantas sufrirán cambios de diferente tipo que permitirán la adaptación de las mismas a vivir en condiciones naturales. En el momento en que se extraen los explantes o plantines enraizados de los frascos, están poco adaptados a crecer en un invernáculo, ya que estos explantes han enraizado y crecido en ambientes con una humedad relativa muy elevada y generalmente tienen estomas (estructuras responsables de regular la transpiración y pérdida de agua en la planta) que no son completamente funcionales frente a descensos de la humedad relativa, y por lo tanto demasiado lentos para evitar la desecación del explante.

Por otra parte, crecer en ambientes tan húmedos también suele implicar la falta de una cutícula con cera bien desarrollada, que representa la barrera física para evitar la pérdida de agua a lo largo de toda la superficie de la planta.

Los plantines enraizados, deben ser aclimatados a las condiciones de humedad del invernadero disminuyendo progresivamente la humedad relativa e incrementando progresivamente la intensidad de luz. Estos plantines se plantarán en contenedores (almacigueras) cubiertos por un plástico, para mantener la humedad relativa elevada. La elección de un sustrato con buenas características físicas, es clave para el éxito de esta etapa.

Para el trasplante, elegimos un sustrato suelto, poroso, con mezcla de arena turba, cáscara de arroz quemado, para permitir un desarrollo y crecimiento de raíces muy rápido.

Las mezclas son diferentes y muy variadas de acuerdo a la especie con la que estamos trabajando.

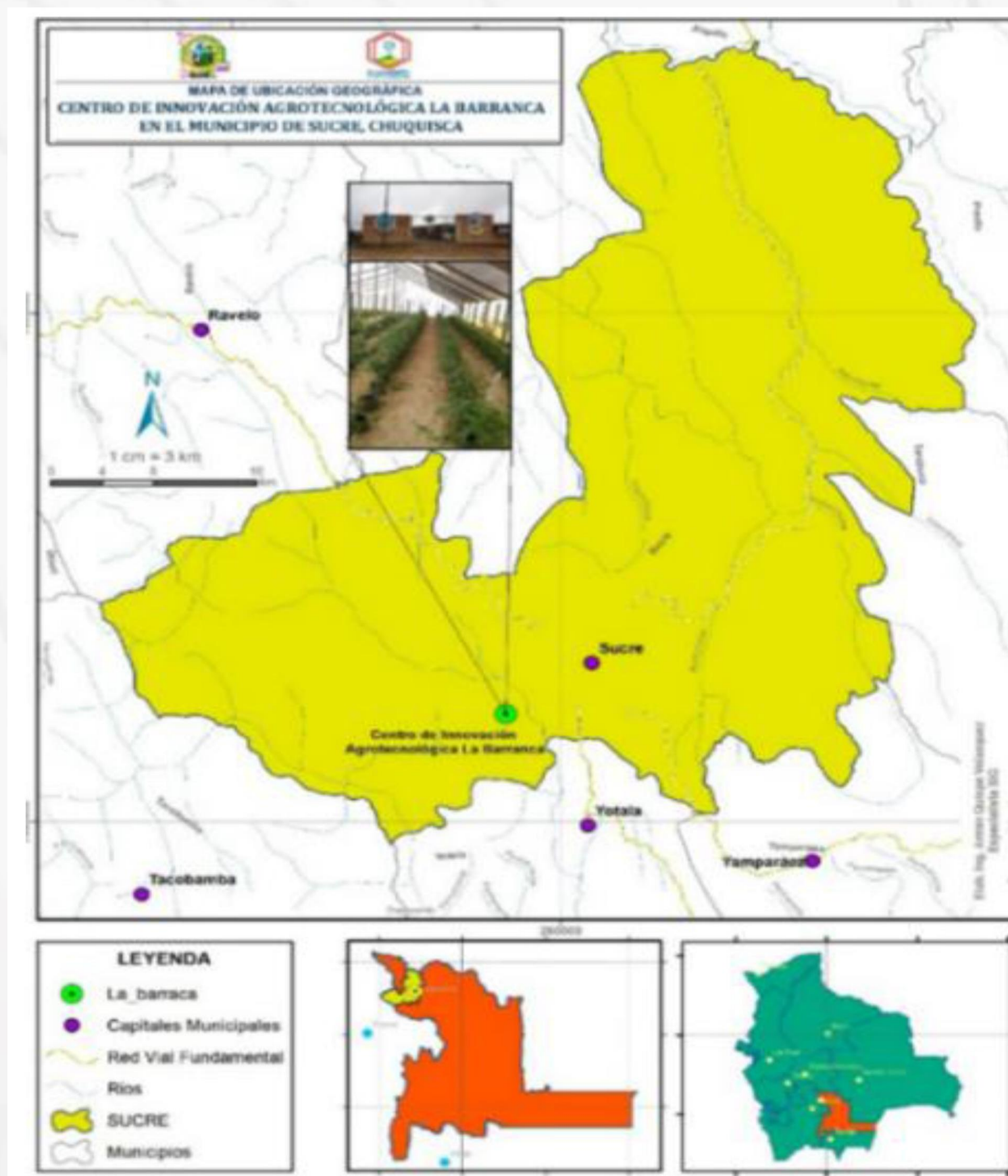
Luego de retirar cuidadosamente el agar de las raíces para evitar dañarlas, los plantines se enjuagan con agua destilada y se colocan en almacigueras con la mezcla de sustratos seleccionada y cubiertos con nylon. Todos los días se debe controlar el nivel de humedad en las almacigueras.



Si es necesario, se aplica un riego con una pulverizadora manual, para mantener un ambiente húmedo a nivel del sustrato. A los 15 días del trasplante, se puede comenzar a levantar la cobertura de nylon en las horas de menor calor (temprano en la mañana o en la última hora de la tarde). Al comienzo las plantas se dejan media hora por día destapadas. A la semana siguiente se dejan destapadas durante una hora. Al mes del trasplante, se dejan tapadas durante la noche y si hay crecimiento de nuevas hojas, las plantas pueden permanecer destapadas. Las condiciones del cultivo in vitro, generan cambios en algunos aspectos anatómicos y fisiológicos de las plantas, por esta causa, durante la aclimatación, los cambios deben ser muy graduales, para minimizar el estrés y tener mayor tasa de sobrevivencia.

### 3. Localización del laboratorio

El laboratorio está ubicado en el Centro de Investigación e Innovación Agrotecnológica La Barranca (CIIAB), dependiente de la Carrera Agronomía Técnico Superior de la Facultad de Ciencias Agrarias. El Centro se encuentra a 14 km, de la ciudad de Sucre en la comunidad La Barranca el centro se localiza en el departamento de Chuquisaca, Provincia Oropeza, Municipio de Sucre en el Distrito-6 en las coordenadas latitud sud  $19^{\circ} 05' 30''$ , longitud oeste  $68^{\circ} 18' 00''$  y a una altitud de 2940 m.



Mapa de ubicación CIIAB



La ruta de acceso principal al Centro de Investigación e Innovación Agrotecnológica La Barranca (CIIAB) es mediante dos puntos: Punto “A” de partida - plazuela San Juanillo-Sucre al Punto “B” comunidad La Barranca donde se ubica el Centro.



Vías de acceso a CIIAB  
Fuente: Google Earth (2023)



## Vía principal, tramos y distancias que conduce al CIAB

TRAMO	LONGITUD EN Km.	TIPO DE VÍA	ESTADO
Plazuela San Juanillo – Av. Circunvalación	2,5	Pavimentada	Excelente
Av. Circunvalación – Av. Atahuallpa	1,2	Pavimentada	Excelente
Av. Atahuallpa – Av. Evo Morales	2,3	Pavimentada	Excelente
Av. Evo Morales – CIAB	3,2	Tierra	Regular
<b>DISTANCIA TOTAL</b>	<b>9,2 KILÓMETROS</b>		

## Ubicación del laboratorio de cultivos In Vitro en el CIAB

El laboratorio este situado en el Centro de Investigación e Innovación La Barranca en el edificio nuevo de Agronomía en la planta baja a lado derecho de las aulas, con una superficie de 153 m<sup>2</sup>.



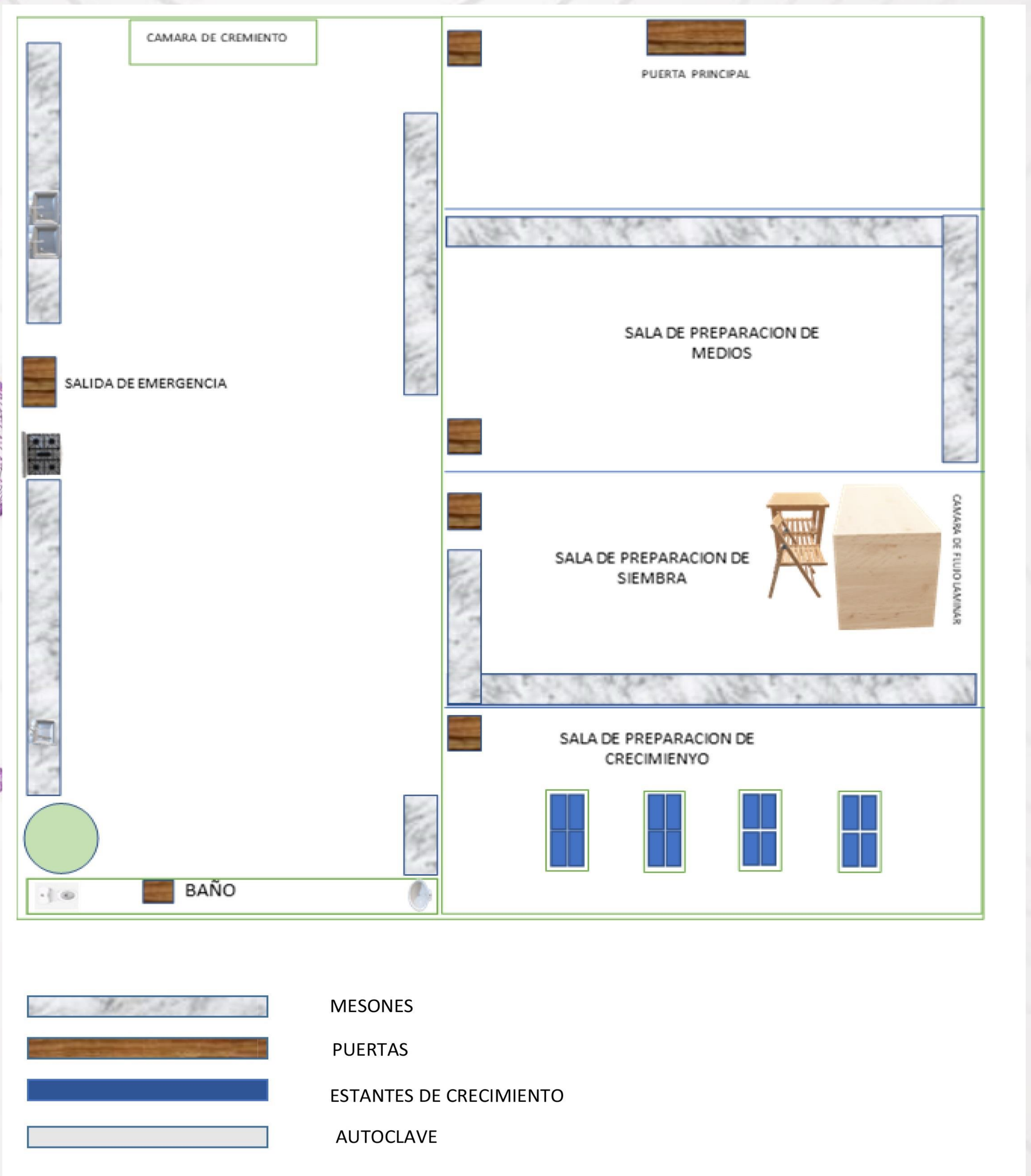
**Laboratorio de cultivo in vitro**

*Fuente: Google Earth (2023)*



## 4. Distribución de laboratorio del CIAB

El laboratorio cuenta con:





#### **4.1 Ante sala:**

Es el área donde llega el personal, estudiantes o visitantes donde dejan todas sus pertenencias y proceden a ponerse el mandil, barbijo, guantes quirúrgicos y los zapatones.

#### **4.2 Área de lavado y esterilización:**

Es el área donde llega el material vegetal contaminado, donde se realiza la desinfección y esterilización tanto de material vegetal como también de los tubos de ensayo con el medio preparado, pinzas, bisturí, cajas Petri y las gradillas.

#### **4.3 Área de preparado de medios:**

En esta área se encuentran todos los reactivos, materiales de vidrio, hornos mufla, balanzas, microondas, pH metro, bisturís, pinzas y otros. También es aquí donde se prepara los medios de cultivo, se dosifica y prepara para llevar para el procedimiento de autoclave.

#### **4.4 Área de siembra y repicaje:**

Es la más limpia y desinfectada de todo el laboratorio, cuenta con cuatro lámparas UV que se prenden directamente con el interruptor.

Por otra parte, solamente puede ingresar personal autorizado, cuenta también con los microscopios, estetoscopios y la cámara de flujo laminar.

Este ambiente nos sirve para hacer el establecimiento de la especie a propagar, se hace el cambio de medio de multiplicación y enraizamiento.

#### **4.5 Área de crecimiento:**

Es un ambiente en el que se controla los fotoperiodos que cada especie requiere como la luz, temperatura y la humedad.



## 5. Materiales y equipos que debe tener un laboratorio

Equipos	Material de vidrio
Cámara o cabina de flujo laminar	Tubos de ensayo
Balanza analítica	Frascos de vidrio
Balanza de precisión	Probetas
Agitador magnético calentador	Pipetas
pH metro	Cajas Petri
Destilador de agua	Frascos o botellas de polipropileno
Autoclave	Goteros
Horno mufla	Vasos precipitados
Refrigerador	Gradillas para tubos de ensayo
<b>Reactivos</b>	
Ms (Murashige & skoog)	Auxinas: IAA, ANA, AIB, 2,4 D
Azúcar	Citoquininas o citocininas: BAP, KINETINA, TDZ, 2IP
AG3 (Ácido Giberelico)	Giberelinas: AG3
BAP (6-N-Bencilaminopurina)	Tiamina
PaCa (Pantotenato de Calcio)	Myoinositol
ANA (Ácido Naftalenacetico)	Carbón Activado
<b>Material de desinfección</b>	
Alcohol 96 %	Agua Destilada
Hipoclorito/ lavandina	Detergente lava vajillas
Alcohol al 70 %	Algodón
<b>Material metálico</b>	
Pinzas metálicas	Bisturís
	Hojas de bisturí



## 6. Preparación de medios de cultivos

Cuadro N.º 1 Medios de cultivo para durazno

<b>DURAZNO</b>			
<b>Componentes</b>	<b>Establecimiento</b>	<b>Multiplicación</b>	<b>Enraizamiento</b>
Ms (Murashige & skoog)	Completo	Completo	3,3 gr
Azúcar	25 gr	30gr	30gr
AG3 (Ácido Giberelico)	0,3 mg.	3,2ml	-
BAP (6-N-Bencilaminopurina)	-	3ml	-
PaCa (Pantotenato de Calcio)	2ml	-	-
ANA (Ácido Naftalenacetico)	-	-	3,5ml
IBA (Ácido Indolbutirico)	-	-	4ml
Tiamina	0,4 mg.	-	3ml
Myoinositol	100 mg.	-	100mg
Carbón Activado	-	-	-
Morel	-	10ml	-
Carragenina	13 gr	13gr	13gr
pH	5,7	5,7	5,7

Cuadro N.º 2 Medios de cultivo para manzano

<b>MANZANO</b>			
<b>Componentes</b>	<b>Establecimiento</b>	<b>Multiplicación</b>	<b>Enraizamiento</b>
Ms (Murashige & skoog)	Completo	Completo	3,031 gr
Azúcar	25 gr	25gr	30gr
AG3 (Ácido Giberelico)	0,3 mg.	2,8ml	-
BAP (6-N-Bencilaminopurina)	-	8,8ml	-
PaCa (Pantotenato de Calcio)	2,2 ml	-	-
ANA (Ácido Naftalenacetico)	-	-	3ml
IBA (Ácido Indolbutirico)	-	1,5 ml	4ml
Tiamina	0,5 mg.	-	3ml
Myoinositol	100 mg.	10	100ml
Carbón Activado	-	-	1,5mg
Carragenina	1,3 gr	13gr	13gr
pH	5,7	5,7	5,7



## 6.1 Preparación de los medios de cultivo

- a) Se inicia la preparación midiendo el agua destilada 1 L en una probeta y se hecha en un vaso precipitado para la agitación.
- b) Pesamos el MS completo 4,33 gr exactos en la balanza analítica y se incorpora al agua destilada.
- c) Pesamos azúcar de la misma manera 25 gr e incorporamos.
- d) En una jeringa medimos la Tiamina 0,4 ml sin ninguna burbuja y lo echamos a la preparación.
- e) De la misma manera medimos el Ag3 que estimula el crecimiento, 0,3 mg.
- f) Se mide el reactivo PACA es promotor de crecimiento y regenerador de membranas, proteínas y hormonas, 2 ml incorporamos al mismo.
- g) El Myo-inositol que es vitamina que promueve el crecimiento de cultivo, pesamos 100 mg en la balanza de precisión.
- h) Antes de incorporar el último reactivo medimos el pH que debe de ser 5.7
- i) Por último, incorporamos Carragenina 13 gr.
- j) Todo esta preparación calentamos en el microondas de 5 a 7 minutos

## 7. Reglamento general del laboratorio de cultivos In vitro

El personal autorizado a ingresar al Laboratorio deberá:

1. Firmar la bitácora que se situará a la entrada del mismo, indicando fecha y hora de entrada/salida del mismo.
2. Utilizar bata de laboratorio más zapatones o cubre zapatos.
3. Mantener el orden y la limpieza de los ambientes más el baño.
4. Supervisar diariamente los cultivos in vitro y eliminar de inmediato aquellos que estén contaminados.

En caso que se detecten cultivos contaminados estos se eliminarán de inmediato sin previo aviso.

5. Mantener la limpieza del piso que se debe realizar 2 veces por semana con desinfectante (cloro 3-5% v/v).
6. Dejar limpio el área de trabajo y campana de flujo laminar después de utilizarse.
7. Apagar las lámparas UV 15 min antes de iniciar sus actividades.
8. Garantizar que el bote de basura quede sin residuos al finalizar la jornada.



9. Mantener la temperatura a 24°C el área de incubación y las condiciones de fotoperiodo establecida.

10. No almacenar medios y materiales por más de 15 días.

11. No introducir alimentos, cultivos bacterianos o de otros fitopatógenos, radio u objetos ajenos al uso de esta área.

12. Avisar de inmediato cualquier problema que se tenga al realizar el trabajo.

13. Mantener cerrada la puerta de entrada.

14. Solicitar con suficiente antelación permiso para laborar en dicha área fuera del horario normal de trabajo, fines de semana.

Nota: Todo esto se hace con la finalidad de mantener limpio, en orden y en buenas condiciones el área de trabajo y el equipamiento.

<https://www.uv.mx/inbioteca/files/2016/04/Reglamento-LB02-ACTV.pdf>



## 7. Bibliografía

- Aguirre, Gino; Baudoin, Jean Pierre; Leigue, Lilibeth (editores). 2018. Aplicación del Cultivo de Tejidos en la Multiplicación y Conservación de los Recursos Fitogenéticos (2da. Edición). Universidad Mayor de San Simón, Facultad de Ciencias Agrícolas, Pecuarias y Forestales. Cochabamba, Bolivia. 246p.
- Plantas de probeta: manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro / Marianelen Cedrés Gazo ... [et al.]; coordinación general de Sandra Sharry; Marina Adema; Walter Abedini. - 1a ed. adaptada. - La Plata: Universidad Nacional de La Plata, 2015. Libro digital, PDF Disponible en: [https://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/46738/Documento\\_completo\\_\\_pdf-PDFA.pdf?sequence=1](https://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/46738/Documento_completo__pdf-PDFA.pdf?sequence=1)
- Importancia de los cultivos vegetales Invitro para establecer bancos de germoplasma y su uso en investigación/ Alcántara Cortes JS1, Castilla Pérez MG2, Sánchez Mora RM3. Vol 1, 8 de diciembre de 2017  
Disponible en:  
<https://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/Biociencias/article/view/2222>
- Propagación de plantas por cultivo in vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo/Ing.Agr. Alicia Castillo, MSc Investigadora, Unidad de Biotecnología, INIA Las Brujas  
Disponible en: <http://inia.uy/en/Publicaciones/Documentos%20compartidos/111219220807102417.pdf>
- Reglamento General del Área de Cultivo de Tejidos Vegetales/Universidad Veracruzana; Ibioteca  
Disponible en: <https://www.uv.mx/inbioteca/files/2016/04/Reglamento-LB02-ACTV.pdf>
- Aguirre, Gino; Baudoin, Jean Pierre; Leigue, Lilibeth (editores). 2018. Aplicación del Cultivo de Tejidos en la Multiplicación y Conservación de los Recursos Fitogenéticos (2da. Edición). Universidad Mayor de San Simón, Facultad de Ciencias Agrícolas, Pecuarias y Forestales. Cochabamba, Bolivia. 246p.



## ANEXO FOTOGRÁFICO



RECOLECCION DE MATERIAL VEGETAL



SEGMENTOS NODALES

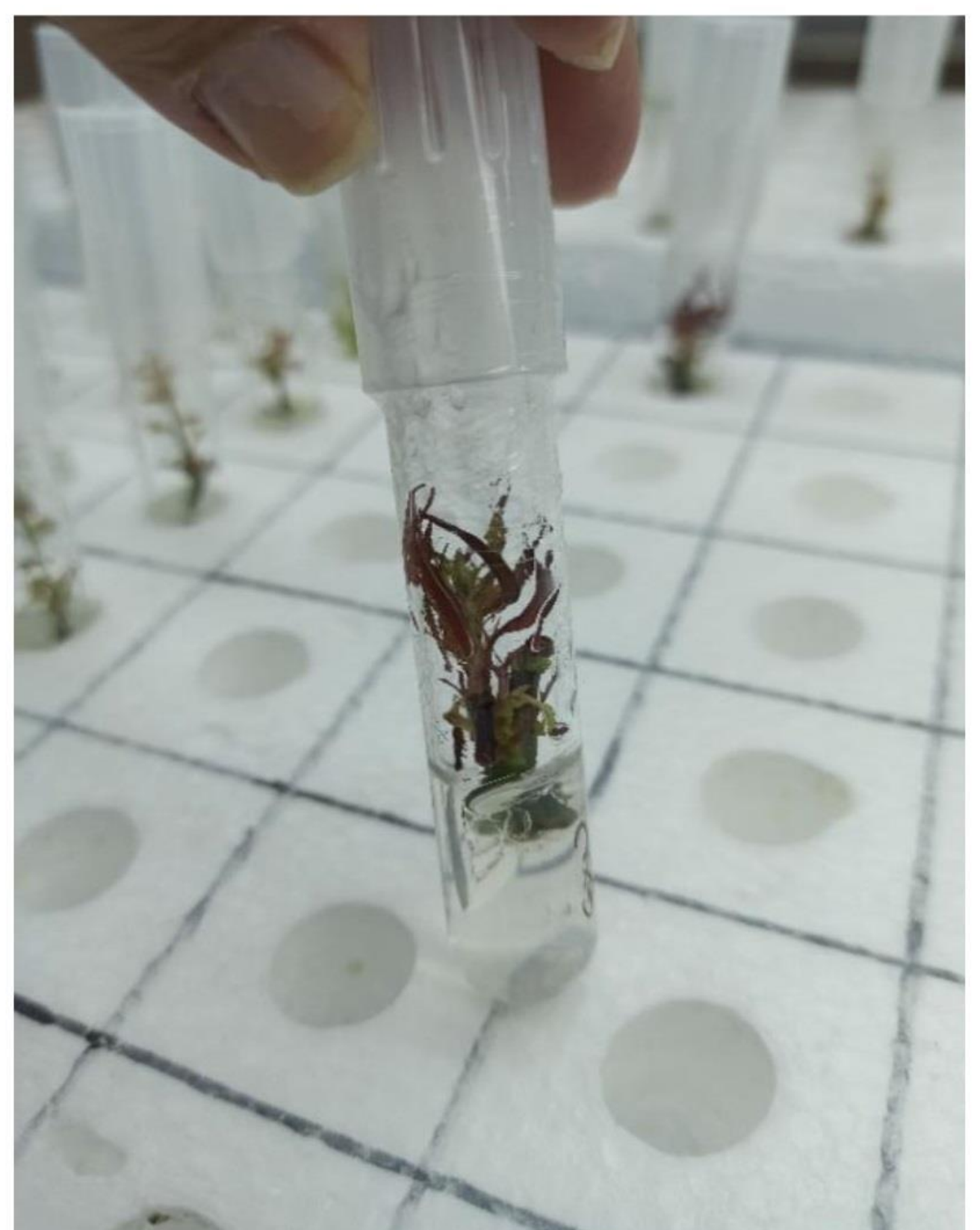


ESTABLECIMIENTO



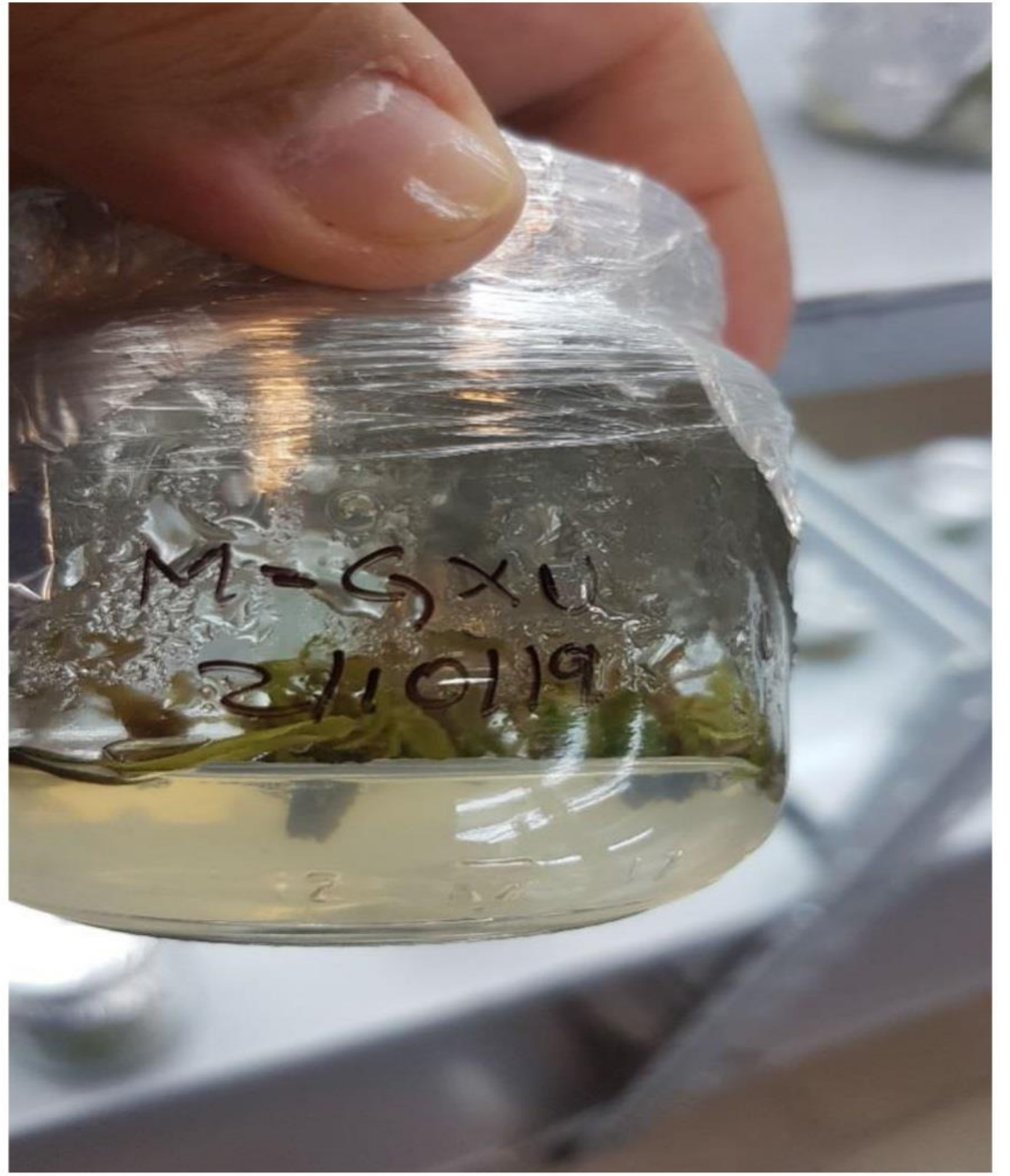


EXPLANTES MEDIO DE CULTIVO PARA ESTABLECIMIENTO A LOS 15 DIAS

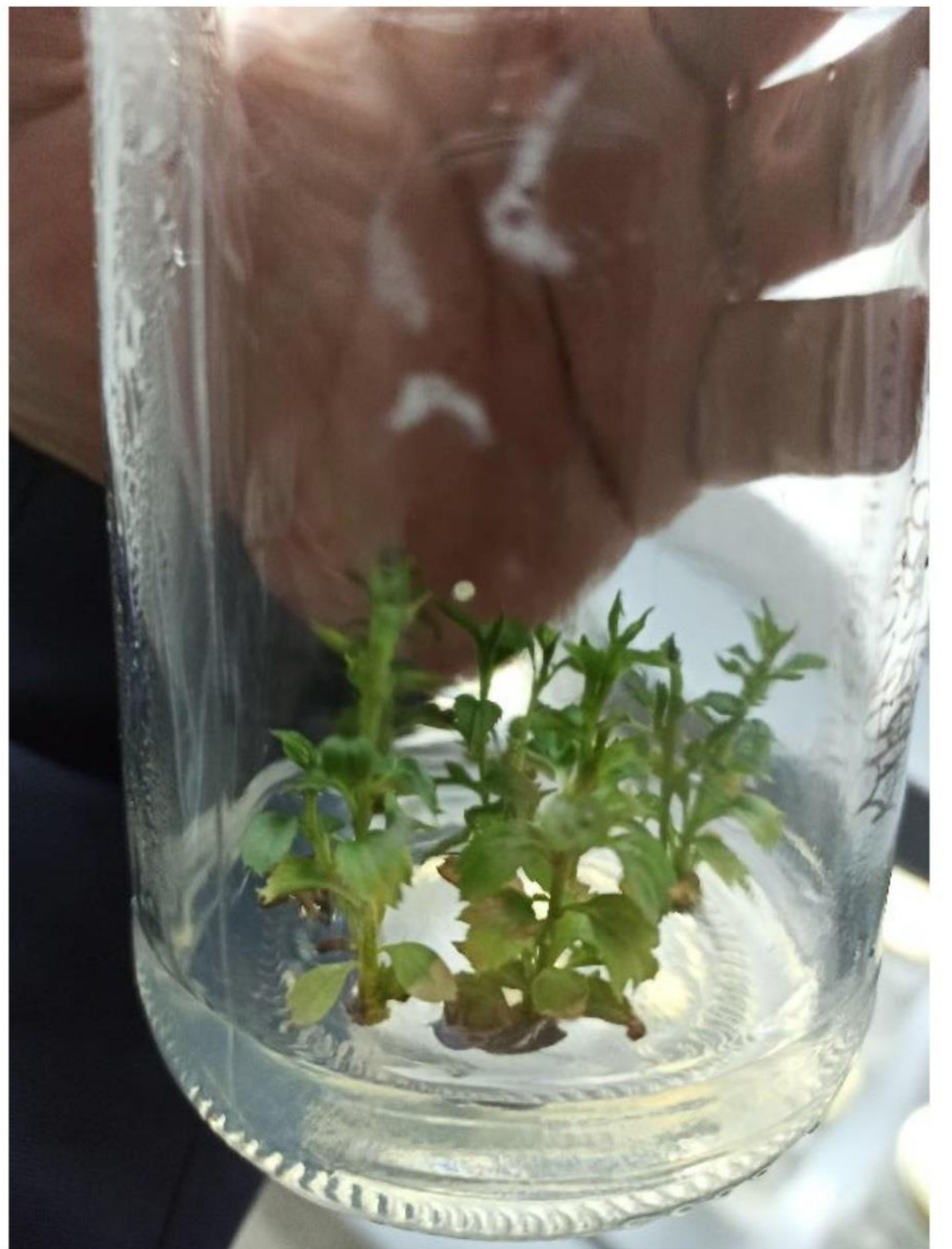
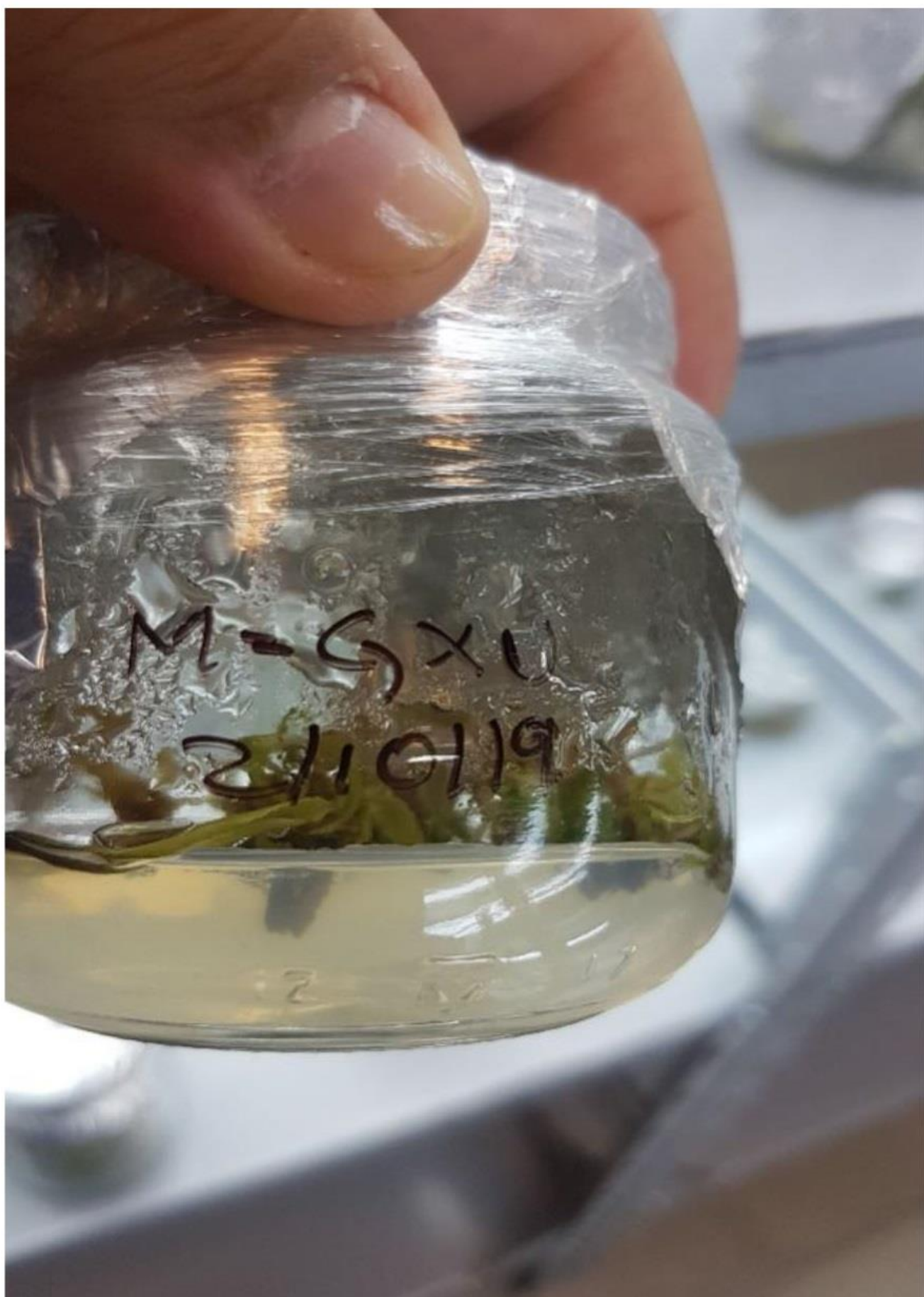


EXPLANTES MEDIO DE CULTIVO PARA ESTABLECIMIENTO A LOS 30 DIAS



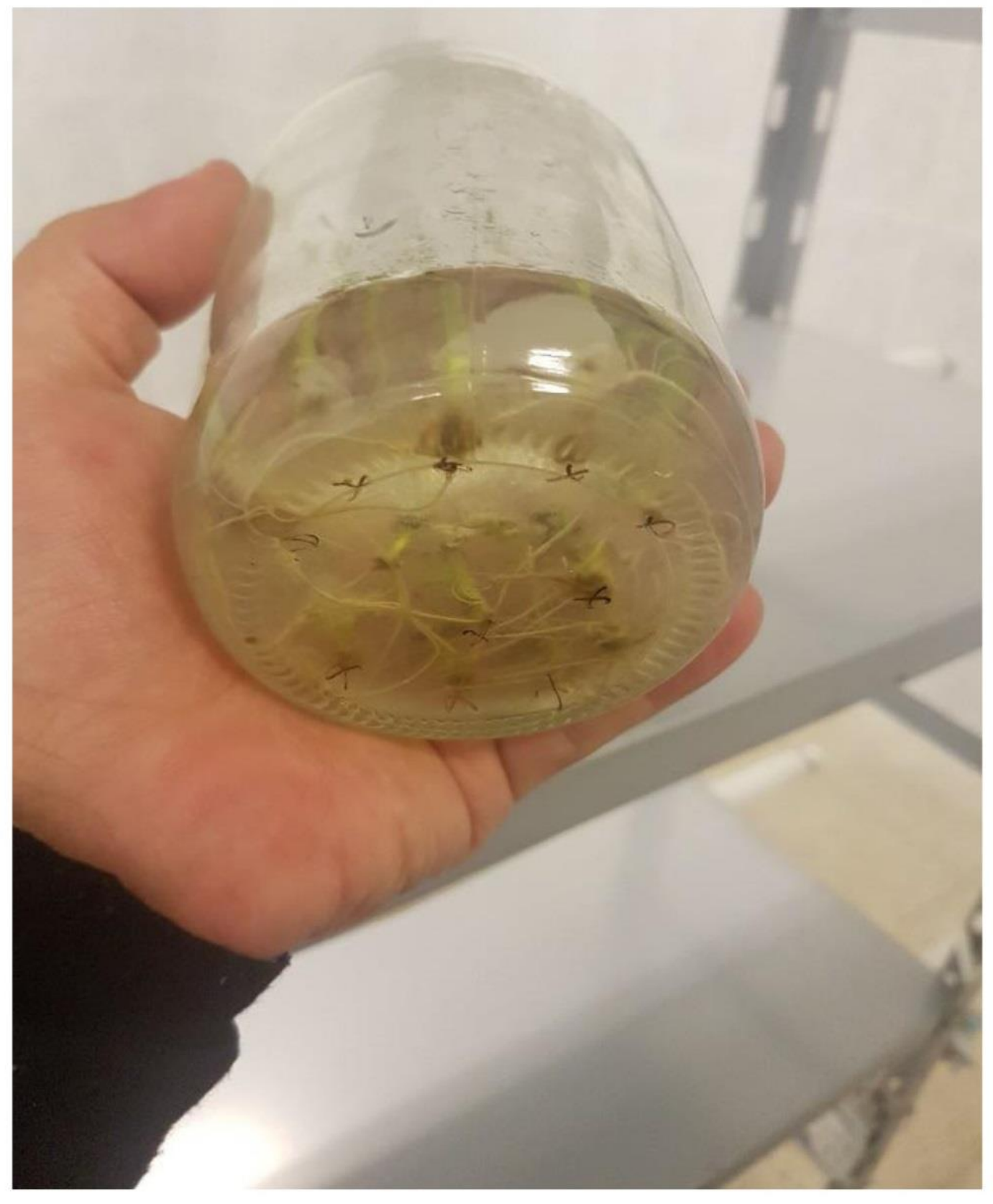


FASE DE MULTIPLICACION A LOS 15 DIAS



FASE DE MULTIPLICACION A LOS 15 DIAS





FASE DE ENRAIZAMIENTO A LOS 15 DIAS

