

**MANUAL DE PRÁCTICAS DE  
FISIOLOGÍA VEGETAL**

*Víctor Hugo Lallana*

*María del Carmen Lallana*

570	Lallana, Víctor Hugo
CDD	Manual de prácticas de fisiología vegetal / Víctor Hugo Lallana ; María del Carmen Lallana. - 1a ed. 1a reimp. - Paraná : Universidad Nacional de Entre Ríos. UNER, 2017. 226 p. ; 27 x 19 cm. - (Serie Cátedra ; 3)
	ISBN 978-950-698-329-1
	1. Fisiología Vegetal. I. Lallana, María del Carmen II. Título

Primera edición, 300 ejemplares, 2014.

Directora de EDUNER: María Elena Lothringer

Coordinación de la edición: Gustavo Esteban Martínez

Corrección: Ana Lía Pujato

Diseño gráfico: Gabriela Resett

Foto de tapa: *Bletilla striata* en cultivo *in vitro*. Víctor Hugo Lallana, 2012

© LALLANA, Víctor Hugo; LALLANA, María del Carmen

© EDUNER. Editorial de la Universidad Nacional de Entre Ríos

Entre Ríos, Argentina, 2017.

Facultad de Ciencias Agropecuarias, Resolución C.D. N° 6.794/12

Queda hecho el depósito que marca la ley 11 723.

No se permite la reproducción parcial o total, el almacenamiento, el alquiler, la transmisión o la transformación de este libro, en cualquier forma o por cualquier medio, sea electrónico o mecánico, mediante fotocopias, digitalización u otros métodos, sin el permiso previo y escrito del editor.

Su infracción está penada por las leyes 11 723 y 25 446.

Eva Perón 24, E3260FIB

Concepción del Uruguay, Entre Ríos, Argentina

eduner@uner.edu.ar

Editado e impreso en Argentina

Colección Cátedra

ISBN 978-950-698-329-1

## Desarrollo

---

---

### A. Inducción de callos *in vitro*

- A.1. Inducción de callos *in vitro*  
a partir de explantos de zanahoria
- A.2. Inducción de callos *in vitro*  
a partir de explantos de lavanda

### B. Micropropagación de especies ornamentales, aromáticas y condimentarias

- B.1. Reproducción de especies ornamentales («violeta africana» y «begonia»)
  - B.2. Multiplicación de especies aromáticas y condimentarias («orégano» y «menta»)
- 
-



## DESARROLLO

---

### INTRODUCCIÓN

Muchas especies tienen la capacidad de propagarse por vía agámica, además de la reproducción sexual. La multiplicación agámica permite la formación de un conjunto de individuos genéticamente idénticos, que se denomina clon. Se emplean órganos (tubérculos, bulbos, raíces, hojas, etc.) o trozos de órganos (estacas, raíces y hojas) que se plantan en sustratos adecuados.

En la década del 80 se desarrolló una técnica de propagación agámica, derivada de los conocimientos adquiridos en el cultivo *in vitro* de tejidos y órganos vegetales, denominada micropropagación, debido al uso de explantos pequeños, que pueden dar origen en corto tiempo a cientos de individuos idénticos, cultivados asépticamente en condiciones ambientales controladas para que las células puedan expresar su potencial intrínseco o inducido. Se basa en el concepto de totipotencia.

El explanto es la unidad básica en la propagación por cultivo de tejidos. Pueden provenir de: porciones de tejidos (hojas, tallos y pecíolos), meristemas apicales, anteras, secciones de raíz, segmentos uninodales de tallo, meristemas caulinares, yemas laterales y células.

El cultivo *in vitro* de células, tejidos y órganos vegetales permite estudiar todos los factores que influyen sobre el metabolismo, crecimiento y desarrollo de los vegetales, ya que numerosas condiciones (químicas, físicas y biológicas) pueden ser controladas y variadas según su objetivo determinado. Esto permite que dichas técnicas tengan un campo de acción muy amplio dentro de la investigación científica.

Los sistemas de cultivo de tejidos tienen potencial para la producción de productos secundarios, como sustancias farmacéuticas y muchas aplicaciones en el desarrollo de las plantas, así como la obtención de plantas libres de virus a través del aislamiento de meristemas no infectados. En micropropagación los

sistemas de cultivo de tejidos tienen dos usos principales: 1) la propagación rápida en masa de clones –ornamentales, aromáticos, medicinales– y 2) el desarrollo, mantenimiento y distribución de clones específicos probados para organismos patógenos. La aplicación de las técnicas de cultivo de tejidos a la regeneración y propagación comercial de plantas enteras es un desarrollo que se ha convertido en alternativa importante de los métodos convencionales de propagación en una amplia gama de especies de plantas.

El explanto cultivado *in vitro* puede regenerar plantas a través de dos vías: por organogénesis y por embriogénesis somática según sea la respuesta a las distintas composiciones de los medios nutritivos. En las dos vías es posible distinguir dos modelos de desarrollo morfogénico: la morfogénesis directa, cuando los órganos o embrioides se originan directamente del explanto, en ausencia de proliferación de callos y la morfogénesis indirecta, en la que la formación de callo es previa al desarrollo de estructuras organizadas. El explanto genera un callo, que en un medio adecuado puede diferenciar meristemoides que desarrollarán tallos y raíces, dando origen a numerosas plántulas. Cada una de éstas se separa del callo original y, tras un período de rusticación (adaptación) se trasplanta a una maceta y se la acondiciona en un invernáculo, con humedad relativa alta y baja irradiancia; la etapa final es cuando se llevan a campo las plantas obtenidas por vía directa o indirecta.

Es necesario además adoptar procedimientos de asepsia para mantener los cultivos libres de contaminación microbiana. Aunque estos principios son básicamente invariables en todos los laboratorios de cultivo de tejidos vegetales, su aplicación puede presentar variaciones en magnitud y complejidad, dependiendo de los objetivos del laboratorio; así mientras que un laboratorio de investigación puede ser pequeño en tamaño pero muy especializado en equipos e instalaciones, uno de producción comercial tiende a ser más grande y simple. Un laboratorio de investigación puede también tener un rol de enseñanza y en este caso es frecuente que se asignen en él áreas especiales para la enseñanza y demostración.

El laboratorio de cultivo de tejidos debe disponer de un área destinada al establecimiento, crecimiento y multiplicación de especies producidas; esta área es especialmente necesaria en los laboratorios de investigación, desarrollo y en los de producción comercial. Finalmente, la decisión de establecer un laboratorio de cultivos de tejidos requiere de un estudio y análisis crítico acerca de la necesidad de hacerlo, dentro de un contexto integral del desarrollo de la investigación y la producción agrícola o forestal de la región o país. Por lo tanto, el establecimiento y funcionamiento del laboratorio debe ser, idealmente, el producto de esfuerzos multidisciplinarios.

## A. INDUCCIÓN DE CALLOS *IN VITRO*

---

Usando técnicas de cultivo de tejidos la formación de callos puede ser inducida en numerosos órganos y tejidos de plantas, que en general no desarrollan callos en respuesta a un daño. El material vegetal comúnmente cultivado incluye cambium vascular, parénquima de reserva, periciclo de raíz, cotiledones, mesófilo de la hoja y tejido provascular (Dodd y Lorin, 1982).

Los callos no tienen patrones predecibles de organización, están presentes en centros localizados de actividad meristemática y a menudo aparecen en regiones cambiales rudimentarias con zonas de diferenciación vascular. Una de las características importantes de callo, desde un punto de vista funcional, es su irregular crecimiento, teniendo el potencial para desarrollar raíces normales, brotes y embriones que forman plántulas.

La característica general del crecimiento de callos abarca una compleja relación entre el material usado para iniciar los callos, la composición del medio y las condiciones experimentales durante el período de incubación. Algunos desarrollos de callos son fuertemente lignificados y duros en textura, y no se pueden separar fácilmente en pequeños fragmentos. Por el contrario los callos frágiles se separan fácilmente y se los denomina cultivos friables, frágiles («frieble cultures»). Los callos pueden ser amarillentos, blancos, verdes o coloreados con antocianinas. La pigmentación será en todo el callo o en algunas regiones sin pigmentar. Su anatomía es de variación considerable a lo largo de la diferenciación celular.

Los primeros estudiosos asumieron que el cultivo de callos derivados de órganos que contienen clorofila podrán ser autotróficos en su nutrición. Los callos con clorofila, de cualquier manera, son dependientes de azúcar exógeno para continuar creciendo, aun con adecuada intensidad de luz (Dodd y Lorin, 1982).

Un callo friable puede ser subdividido con una espátula fina o con un bisturí, y transferido directamente a la superficie del nuevo medio. Los callos duros deben ser transferidos a la superficie de una caja de Petri, esterilizada, y fragmentado con un bisturí. Solamente se debe transferir tejido sano, el tejido marrón, necrótico debe ser eliminado.

Después que el callo ha crecido asociado al tejido original por un tiempo se vuelve necesario pasarlo a un medio fresco, etapa denominada repique. El crecimiento en un mismo medio por un período extenso, provocará el agotamiento de nutrientes y una desecación gradual del agar por la pérdida del agua. Los metabolitos secretados por los callos, se pueden acumular en niveles tóxicos en el medio. La transferencia del fragmento del callo debe ser suficiente para asegurar el nuevo crecimiento en el medio fresco. Si el inóculo transferido es muy pequeño, va a exhibir una tasa de crecimiento muy baja, o no va a crecer. Algunos autores (Dodd y Lorin, 1982) recomiendan que el inóculo debe tener 5-10 mm de diámetro y pesar 20-100 mg. Los repiques sucesivos se realizan cada 28 días en tubos de cultivo que tienen 30 cm<sup>3</sup> de medio. El tiempo entre repiques es variable y depende de la tasa de crecimiento del callo.

Gauthered (1959, citado por Dodd y Lorin, 1982) ha descrito las características de la formación callosa en el cultivo de la raíz de zanahoria. Fragmentos del floema proliferan débilmente y producen pústulas separadas de células, o una capa fina de células del parénquima. Explantos del xilema exhiben dos respuestas diferentes dependiendo de su origen. Si el explanto se obtuvo de una zona cercana del cambium, los derivados más cercanos se dividen vigorosamente y forman un callo grande. Del tejido sacado de la región central del cambium resultan sólo callos separados en las extremidades de conductos. Los explantos del floema que bordea el cambium vascular producen los crecimientos más vigorosos.



### A.1. INDUCCIÓN DE CALLOS *IN VITRO* A PARTIR DE EXPLANTOS DE ZANAHORIA

El objetivo es inducir la formación de callos en un explanto primario extirpado de la raíz principal de zanahoria (*Daucus carota*) y mantener el crecimiento de los mismos en repiques sucesivos.

#### TÉCNICA OPERATORIA

Se utilizará un medio de cultivo solidificado en agar con diferentes concentraciones hormonales de ácido naftalenacético (ANA) y benciladenina (BA), que tienen en común componentes del medio nutritivo de Murashige & Skoog (1962), según se detalla en la Tabla 1.

TABLA 1. Descripción de los medios de cultivo a ser utilizados para la inducción a la formación de callos a partir de segmentos de raíz de zanahoria

IDENTIFICACIÓN DE MEDIOS (medio básico MyS)	CONCENTRACIÓN HORMONAL	
	ANA mg/L	BA mg/L
A	—	0,4
B	0,01	0,3
C	0,03	0,2
D	0,2	0,2

- Seleccionar una raíz de zanahoria (*Daucus carota*) bien desarrollada.
- Lavar la raíz con agua jabonosa, enjuagar, secar y raspar la superficie.
- Cortar rodajas de 3 mm de grosor.
- Sumergir las rodajas en una solución de hipoclorito de sodio al 5 % más una gota de un tensioactivo (Tween 20) durante 10 minutos, agitándolas periódicamente.
- En la cámara de flujo laminar realizar tres lavados, con intervalos de minutos, utilizando agua destilada esterilizada.
- Esterilizar pinzas y bisturí utilizando agua lavandina, alcohol 70° y mechero.
- Colocar en caja de Petri con papel de filtro (ambos elementos previamente esterilizados) las rodajas hasta que se escurran, luego pasarlas a otra caja de Petri esterilizada y cortar 10 trozos (4 mm de lado) de la zona del floema cercana al cambium para cada tratamiento.
- Flamear la boca de cada tubo de ensayo sobre mechero, utilizar una pinza esterilizada y colocar el explanto de zanahoria sobre la superficie del medio de cultivo; por último tapar el tubo y colocarlo en la cámara de crecimiento

con condiciones de temperatura y luz controladas (26 °C y fotoperíodo de 16 horas de luz, 8 horas de oscuridad).

- Realizar observaciones dos veces por semana, fraccionar los callos desarrollados y repicar (en medio fresco), una vez que éstos logren un desarrollo por lo menos del doble de su tamaño original. Se evaluará la respuesta al crecimiento en los distintos medios de cultivo.

Interpretar los resultados obtenidos y redactar el informe correspondiente.



## A.2. INDUCCIÓN DE CALLOS *IN VITRO* A PARTIR DE EXPLANTOS DE LAVANDA

El objetivo es obtener callos a partir de tejido foliar de plantas de lavanda (*Lavandula* spp.) y multiplicarlos en sucesivos repiques.

### TÉCNICA OPERATORIA

- Seleccionar hojas de una planta madre de «lavanda», en buen estado sanitario.  
- Lavar la rama seleccionada con agua jabonosa y enjuagar con abundante agua destilada, escurrir sobre papel absorbente.

- Separar las hojas y colocarlas en una solución de alcohol 70 % durante 50", escurrir.

- En la mesa de flujo laminar pasarlas a una solución de lavandina comercial al 10 % durante 20', detener el proceso si se observa decoloración del tejido. Enjuagar con abundante agua destilada esterilizada tres veces por un período de 3 minutos cada uno.

- Seleccionar, con preferencia, la parte basal de cada hoja, descartar el resto. Colocar los trozos en los diferentes medios de cultivo (ver Tabla 2) en posición vertical, manteniendo su polaridad.

TABLA 2. Descripción de los medios de cultivo, con el agregado de auxina, ANA (ácido naftalenacético) y citocinina, Kin (kinetina), a ser utilizados en la inducción a la formación de callos a partir de segmentos de hojas de *Lavandula* spp

IDENTIFICACIÓN DE MEDIOS (medio básico MyS)	CONCENTRACIÓN HORMONAL	
	ANA mg/L	Kin mg/L
A	0,2	0,2
B	0,2	0,5
C	0,5	0,2





## **B. MICROPROPAGACIÓN DE ESPECIES ORNAMENTALES, AROMÁTICAS Y CONDIMENTARIAS**

---

Los objetivos generales son:

1. Obtener embriones somáticos (embrioides) a partir de tejido foliar y de pecíolos de plantas ornamentales. Luego determinar qué combinación hormonal es la adecuada para lograr plantas enteras.
2. Obtener plantas completas de especies medicinales y aromáticas a partir de segmentos uninodales de tallos.

### **TÉCNICA OPERATORIA GENERAL**

- Elección de explantos.
- Preparación y desinfección de explantos.
- Siembra en un medio de cultivo básico de Murashige & Skoog debidamente esterilizado.
- Repique a diferentes medios según la etapa que se quiera desarrollar (multiplicación, enraizamiento)
- Trasplante a sustrato esterilizado
- Aclimatación de las nuevas plantas. Esta etapa también es denominada rusticación.



### B.1. REPRODUCCIÓN DE ESPECIES ORNAMENTALES («VIOLETA AFRICANA» Y «BEGONIA»)

El objetivo es evaluar la respuesta al desarrollo de segmentos de láminas foliares y pecíolos colocados en distintos medios de cultivo.

#### TÉCNICA OPERATORIA

-A partir de una planta madre que esté bien desarrollada y sana se seleccionan las hojas con  $\frac{3}{4}$  de su desarrollo y con sus respectivos pecíolos.

- Cortar la lámina foliar en forma irregular, dejando los pecíolos enteros.

Lavar con agua destilada y gotas de detergente.

- Sumergir los trozos en alcohol al 70 % durante 50 segundos.

- Luego colocar los trozos en hipoclorito de sodio al 6 % de la concentración comercial y 2 a 3 gotas de un tensioactivo (tween 20), durante 15 minutos.

- Llevar el material a cámara de flujo laminar, realizar 3 enjuagues con agua esterilizada, durante 5, 3 y 3 minutos respectivamente.

- Dejar escurrir los trozos vegetales sobre papel de filtro esterilizado, siempre en el área de la mesa de flujo laminar.

- En la cámara de flujo laminar, cortar con instrumental esterilizado los trozos de lámina foliar en secciones de 10 mm × 10 mm aproximadamente, descartar los bordes, seleccionar aquellos que involucren secciones de nervadura.

- Cortar los pecíolos en segmentos de 0,5 a 1 cm de longitud.

- Con la ayuda de pinzas colocar los explantos en un medio básico de Murashige & Skoog esterilizado con el agregado de ácido naftalenacético y cinetina (Tabla 3).

A los siete (7) días después de la siembra seleccionar los explantos que no estén contaminados y repicarlos a distintos medios de cultivo, indicados en la Tabla 3.

TABLA 3. Descripción de los medios de cultivo a ser utilizados en la etapa de desarrollo

IDENTIFICACIÓN DE MEDIOS (medio básico MyS)	CONCENTRACIÓN HORMONAL	
	ANA mg/L	Kin mg/L
A	0,2	0,5
B	0,1	0,5
C	0,5	0,2
D	0,0	0,5

Realizar observaciones dos veces por semana, realizándose el repique de los explantos desarrollados a medios frescos conteniendo igual cantidad de las hormonas correspondientes.

Interpretar los resultados obtenidos y redactar el informe correspondiente.



## B.2. MULTIPLICACIÓN DE ESPECIES AROMÁTICAS Y CONDIMENTARIAS («ORÉGANO» Y «MENTA»)

El objetivo es obtener plantas completas de especies medicinales y aromáticas a partir de segmentos uninodales de tallos.

### TÉCNICA OPERATORIA

Utilizar tallos vegetativos de «orégano» y «menta» provistos por una planta madre en buen estado sanitario y/o tallos de plantas mantenidas *in vitro*.

1. Si se parte de segmentos uninodales de plantas cultivadas *in vitro* se procede a:

- desinfectar los instrumentos,
- extraer con una pinza las plántulas del tubo de ensayo,
- cortar los segmentos,
- repicar a los medios correspondientes (Tabla 4).

2. Si se parte de plantas cultivadas en invernáculo:

- Quitar las hojas de los tallos y cortar segmentos uninodales ó binodales, lavarlos con agua destilada y 2 a 3 gotas de detergente durante 10 minutos, escurrir.
- Sumergirlos en alcohol al 70 % durante 50 segundos.
- Luego colocarlos en una solución de hipoclorito de sodio al 2 % de la concentración comercial y 2 a 3 gotas de tween 20, durante 15 minutos, escurrir. (En caso de observar pérdida de color antes de los 15 minutos suspender el tratamiento y proceder a realizar el próximo paso).
- En la cámara de flujo laminar, realizar 3 enjuagues con agua esterilizada, durante 5, 3 y 3 minutos respectivamente. Colocar los explantos sobre papel de filtro esterilizado.

Una vez obtenidos los explantos se procede a la siembra, cuidando de mantener su orientación (polaridad) en un medio inicial de Murashige & Skoog (M&S) sin el agregado de hormonas.

Los brotes desarrollados a partir del explanto original (segmento de tallos) se repicarán a medios que tienen como base el M & S con el agregado de hormonas como auxina: ANA (ácido naftalenacético) y citocinina: Kin (kinetina) según se detalla en la Tabla 4.

TABLA 4. Descripción de los medios de cultivo a ser utilizados en la etapa de desarrollo

IDENTIFICACIÓN DE MEDIOS (medio básico MyS)	CONCENTRACIÓN HORMONAL	
	ANA mg/L	Kin mg/L
A	—	—
B	0,2	0,2
C	0,2	0,5
D	0,5	0,2

Una vez efectuada la siembra y los repiques, los tubos se colocan en cámara de crecimiento, en la que se controlan las condiciones de temperatura y luz (26 °C y fotoperíodo de 16 horas de luz, 8 horas de oscuridad).

Interpretar los resultados obtenidos y redactar el informe correspondiente.

## GLOSARIO

**Asepsia:** técnicas empleadas para impedir el acceso de microorganismos al campo de trabajo.

**Callo:** masa amorfa surgida de la proliferación de células del parénquima.

**Clon:** conjunto de individuos genéticamente idénticos.

**Cultivo *in vitro*:** literalmente quiere decir «en vidrio». Se utiliza, porque al menos inicialmente se usaron recipientes de vidrio para el cultivo.

**Embrioides:** embrión somático.

**Explanto:** unidad básica en la propagación por cultivo de tejidos. Parte de un vegetal que se cultivará *in vitro*, pueden ser protoplastos –células desprovistas de pared celular– células, tejidos u órganos

**Medio nutritivo-medio de cultivo:** formulación de sales inorgánicas y compuestos orgánicos requeridos para la nutrición y manipulación de los cultivos.

**Meristemoide:** a partir de una célula epidérmica o del mesófilo foliar se suceden una serie de divisiones mitóticas. Este conjunto de células agrupadas a modo de esferas se denomina meristemoides. Son los responsables de la diferenciación de nuevos órganos.

**Segmentos uninodales:** trozos de tallo con un solo nudo, con yemas axilares.

**Totipotencia:** «una célula vegetal o grupo de células colocadas en condiciones adecuadas es capaz de regenerar un individuo completo e idéntico al que le dio origen».

Totipotente: tejidos o células que son capaces de formar cualquier estructura del individuo maduro.

## LECTURAS COMPLEMENTARIAS

AZCÓN-BIETO, J. y M. TALÓN (2003). *Fundamentos de Fisiología vegetal*. Cap. XVIII y XXIX. McGraw-Hill Interamericana, 522 p.

BILLARD, C. (1995). *Inducción de callos utilizando la técnica de cultivo «in vitro»*. Guía de trabajos prácticos de Fisiología vegetal. Facultad de Ciencias Agropecuarias, UNER, 3 p.

DODDS, J.H. and R.LORIN (1982). *Experiments in plant tissue culture*. Chapter 4. Initiation and maintenance of callus.

ECHENIQUE, V.; C. RUBINSTEIN; L. MROGINSKI, edit. (2004). *Biotecnología y mejoramiento vegetal*. INTA, 446 p.

HARTMANN, H.T. y D.E. KESTER (1999). *Propagación de plantas: principios y prácticas*. Cap. 16, pp. 549-578. CECSA, 7ª reimpresión. México, 760 p.

MONTALDI, E.R. (1995). *Principios de Fisiología vegetal*. Cap. XVIII. Sur, 298 p.

MURASHIGE, T & SKOOG, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*. 15:473-497.

PIERIK, R.L.M. (1990). *Cultivo in vitro de las plantas superiores*. Mundi-Prensa, 326 p.

RAVEN, P.; R. EVERT y S. EICHHORN. (1992). *Biología de las plantas* Tomo II, Cap.24. Reverté, 402 p.

ROCA, W.M. y L.A. MROGINSKI (1991). *Cultivo de tejidos en la agricultura*. Fundamentos y aplicaciones. México: CIAT, 969 p.

TIZIO, R.M., O. STAHLSCHMIDT, C. AGUERO y otros (1995). *Guía de trabajos prácticos Fisiología vegetal*. Facultad de Ciencias Agrarias (UN de Cuyo), 27 p.

