

## CURSO CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES (SEMESTRAL)

COORDINADORES: DR. GREGORIO GODOY/ DRA. NANCY SANTANA  
BUZZY

TEMA	HORAS	PROFESOR
Introducción al CTV. Principios básicos del CTV. Tipos de cultivo	6	Dra. Nancy Santana
Composición de los medios de cultivo. Reguladores del crecimiento	4	Dra. Ileana Echeverría
Saneamiento y conservación del germoplasma	4	Dr. Manuel Martínez
Morfogénesis <i>in vitro</i> . Organogénesis y embriogénesis somática	4	Dra. Nancy Santana
Caracterización y análisis de los cultivos <i>in vitro</i> .	2	Dra. Nancy Santana
Aplicaciones del CTV.	2	Dr. Gregorio Godoy
Micropropagación	4	Dr. Gregorio Godoy
Cultivo de protoplastos. Híbridos somáticos	2	Dr. Gregorio Godoy
Variación somaclonal	4	Dra. Rosa M. Escobedo
Obtención de plantas haploides	4	Dra. Rosa M. Escobedo
Obtención de plantas transformadas	4	Dr. Gregorio Godoy
Estudios moleculares en el CTV	4	Dra. Renata Rivera
Metabolismo secundario	4	DR. Felipe Vázquez

Martes y Jueves de 8:00 am a 10.00 am

### I. JUSTIFICACIÓN

La forma tradicional de propagación de la mayoría de las especies vegetales es por medio de semillas (frijol, maíz, chile, etc), aunque algunas especies también se propagan vegetativa (papa, agaves, etc.). Sin embargo, en la actualidad, con el uso de la diversidad de técnicas del cultivo de tejidos vegetales, a partir de diferentes

tipos de explantes vegetales se han establecido diversos tipos de cultivos (callos, suspensiones celulares, protoplastos, embriones, yemas axilares, meristemos, inflorescencias, etc) y en muchos casos se han logrado regenerar plantas completas *in vitro* y escalar dichos procesos para multiplicar en forma masiva (micropropagación) algunas especies. Lo anterior ha permitido propagar millones de plantas sin necesidad de disponer de semillas o de depender del limitado número de brotes de la propagación vegetativa. Por otra parte, estos diferentes tipos de cultivos, permitieron un gran avance en los estudios bioquímicos, fisiológicos y moleculares de diferentes rutas biosintéticas de un gran número de metabolitos primarios y secundarios. El conocimiento adquirido con las diferentes técnicas del cultivo de tejidos vegetales, acopladas a las de la ingeniería genética, en la actualidad permiten obtener plantas transformadas con nuevas características genéticas, las cuales serán de gran importancia en la agricultura actual. Por lo anterior, en este curso se pretende dar un panorama general de los principios básicos a considerar cuando se establecen cultivos vegetales *in vitro*, sus aplicaciones, limitaciones y perspectivas.

## II. UBICACIÓN DE LA MATERIA

Materias previas	
	Química
	Física
	Fisicoquímica
	Biología Celular
	Biología
<b>BIOQUIMICA</b>	
Materias Posteriores	Todos los cursos optativos referentes a Biología Experimental
	Regulación Metabólica

## III. OBJETIVO GENERAL.

Que el alumno adquiera el conocimiento de las diversas técnicas empleadas en el cultivo de tejidos vegetales y las herramientas necesarias para establecer cultivos *in vitro* en el laboratorio, a partir de explantes que se hayan reportado en la literatura para la regeneración y multiplicación de las especies vegetales o las aplique en la generación de nuevos modelos para realizar estudios bioquímicos, fisiológicos, genéticos y moleculares. O en la micropropagación de especies de interés agrícola o en la regeneración de plantas transformadas.

#### IV. METODOLOGIA.

El curso tiene una duración de 48 horas.

Se imparte martes y jueves, en sesiones de 2 dos horas.

Las sesiones serán tipo seminario por parte del profesor como de los alumnos y frecuentemente se analizarán y discutirán artículos de investigación o revisiones de los diferentes temas impartidos/profesor. En ocasiones, se plantearán preguntas para resolver en casa (tareas).

El alumno será evaluado con los siguientes parámetros:

Participación en clase (40%)

Las tareas (30%)

Los exámenes parciales y final tendrán el 30% restante del valor de la calificación final.

Los profesores que impartan clases, otorgarán una calificación global del módulo correspondiente al tema o a los temas que les corresponde impartir, en el caso de que impartan varios temas. La calificación final del curso/alumno, será proporcionada por el coordinador del curso y será el promedio general de las calificaciones otorgadas por los profesores participantes.

Para tener derecho a acreditar el curso el alumno deberá haber asistido a por lo menos al 80% de las sesiones y entregar los trabajos oportunamente.

La calificación mínima aprobatoria es de ochenta (80) puntos.

#### V. CONTENIDO PROGRAMATICO.

##### **Introducción. Principios básicos de cultivo de tejidos. Tipos de cultivo**

##### OBJETIVOS ESPECIFICOS

Que el alumno tenga conocimiento de los trabajos pioneros en el desarrollo de las bases del cultivo de tejidos vegetales, así como de los principios básicos que hay que considerar cuando se establecen los diferentes tipos de cultivos *in vitro*.

##### 1. Introducción

##### 1.1. Historia

##### 2. Principios básicos de cultivo de tejidos vegetales

- 2.1. Definiciones
- 2.2. Planta madre
- 2.3. Explantes
  - 2.3.1. Técnicas de asepsia.
- 2.4. Medios de cultivo
  - 2.4.1. Ingredientes básicos
  - 2.4.2. Ingredientes opcionales
- 2.4.1. Esterilización
- 2.5. Ambiente
  - 2.5.1. Temperatura
  - 2.5.2. Luz,
  - 2.5.3. Humedad relativa
  - 2.5.4. Composición del espacio gaseoso
- 2.6. Contenedores
- 2.7. Aparatos para realizar CTV
- 3. Tipos de cultivos
  - 3.1. Callos
  - 3.2. Células en suspensión
  - 3.3. Protoplastos
  - 3.4. Órganos
  - 3.5. Embriones
    - 3.5.1. Semillas artificiales
  - 3.6. Semillas
  - 3.7. Inflorescencias

### **Composición de los medios de cultivo. Reguladores del crecimiento**

#### **OBJETIVOS EPECÍFICOS**

Que el alumno tenga conocimiento de los medios de cultivos que se utilizan para el establecimiento de los cultivos *in vitro*, sus diversos constituyentes, y características. Así como el efecto de la manipulación de las concentraciones de sus constituyentes (fuente de carbono, nitrógeno, fosfatos, agente gelificantes, reguladores de crecimiento y vitaminas) sobre los diferentes explantes, para que sea capaz de diseñar experimentos y/o generar nuevos modelos de estudio.

1. Componentes de los medios de cultivo
2. Preparación de los medios de cultivo
3. Medios de cultivo y crecimiento
4. Efecto del pH sobre el cultivo
5. Agentes gelificantes
6. Reguladores del crecimiento que se usan en el cultivo de tejidos
7. Papel de los reguladores del crecimiento.
8. Ejemplos de su uso en el cultivo *in vitro*

## **Saneamiento y conservación del germoplasma**

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Que el estudiante se familiarice con conceptos básicos sobre la conservación y el saneamiento de materia vegetal, para con ello se promueva la sensibilidad a conservar y le permita definir cuales son los métodos mas adecuados de conservación.

1. Breve historia de la conservación
2. Definición de biodiversidad
3. Diferentes formas de destrucción de la biodiversidad
4. Evolución de la extinción de especies
5. Definición de conservación
6. Definición de germoplasma
7. Conservación del germoplasma. Tipos de conservación
8. Principales ventajas y desventajas de los tipos de conservación
9. Conservación *in vitro*
10. Definición de crioconservación
11. Diferentes técnicas de crioconservación
12. Protocolo de crioconservación
13. Concepto de saneamiento
14. Formas de saneamiento
15. Cultivo de meristemos
16. Factores que afectan la erradicación de virus
17. Erradicación *in vitro* de otros patógenos

### **Morfogénesis *in vitro*. Organogénesis y embriogénesis somática**

#### OBJETIVOS ESPECIFICOS

Que el estudiante profundice en los factores que inducen la morfogénesis en los diferentes explantes y se familiarice con los mecanismos regulatorios involucrados en los procesos de organogénesis y embriogénesis somática. Y de esta última, en su aplicación como fuente de semillas artificiales

Morfogénesis. Concepto.

1. Organogénesis. Concepto.
  - 1.1. Organogénesis Directa.
  - 1.2. Organogénesis Indirecta.
2. Embriogénesis somática. Concepto.
  - 2.1. Embriogénesis Somática Directa.
  - 2.2. Embriogénesis Somática Indirecta.
  - 2.3. Embriogénesis Secundaria.

3. Etapas de la embriogénesis somática.
  - 3.1. Inducción.
  - 3.2. Histodiferenciación.
  - 3.3. Maduración.
  - 3.4. Germinación.
4. Factores relacionados con la morfogénesis.
  - 4.1. Genotipo.
  - 4.2. Explante
  - 4.3. Estado fisiológico de la planta. Edad.
  - 4.4. Procedencia.
  - 4.5. Medio de cultivo. Reguladores del crecimiento.
  - 4.6. Condiciones de cultivo. Luz y temperatura.

### **Caracterización de los cultivo *in vitro***

#### **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

Que el estudiante se familiarice con los métodos de caracterización de los cultivos *in vitro* y pueda aplicarlos a nuevos cultivos.

Cultivo de células en suspensión.

1. Fases del crecimiento del cultivo celular.
  - 1.1. *Fase inicial de reposo (Fase lag).*
  - 1.2. *Fase logarítmica (Fase log).*
  - 1.3. *Fase linear.*
  - 1.4. *Fase de desaceleración progresiva.*
  - 1.5. *Fase estacionaria.*
2. Factores que afectan el crecimiento celular *in vitro*.
3. Métodos para medir el crecimiento celular.
  - 3.1. Volumen del paquete celular.
  - 3.2. Número de células por unidad de volumen.
  - 3.3. Peso fresco y peso seco.
  - 3.4. Conductividad eléctrica.
  - 3.5. Contenido de proteína y de ADN.
  - 3.6. Viabilidad celular.

### **Aplicaciones del cultivo de tejidos**

#### **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

Que el alumno conozca las aplicaciones que pueden tener las diferentes técnicas de cultivo de tejidos vegetales, independientes o combinadas, así como la posibilidad de instrumentar nuevas aplicaciones.

1. Tipos de cultivos
  - 1.1. Callos
  - 1.2. Diferenciación celular
  - 1.3. Células en suspensión
  - 1.4. Producción de metabolitos
    - 1.4.1. Elicitación (Incitación o inducción)
    - 1.4.2. Bioconversión
2. Regeneración de plantas completas
  - 2.1. Organogénesis
  - 2.2. Embriogénesis somática
  - 2.3. Micropropagación
3. Otros Usos del CTV
  - 3.1. Fusión de protoplastos
  - 3.2. Variación somaclonal
  - 3.3. Almacenamiento de germoplasma
  - 3.4. Ingeniería genética de plantas
    - 3.4.1. Métodos de transformación genética
      - 3.4.1.1. Bombardeo de micropartículas
      - 3.4.1.2. *Agrobacterium tumefaciens*
4. Aplicaciones de la Ingeniería genética
  - 4.1. Mejoramiento de Cosechas
  - 4.2. Ingeniería de Características Genéticas:
    - 4.2.1. Resistencia a Herbicidas
      - 4.2.1.1. Glifosato
      - 4.2.1.2. Glufosinato
    - 4.2.2. Resistencia a Insectos
    - 4.2.3. Resistencia a Virus
    - 4.2.4. Contenido de aceite alterado
    - 4.2.5. Retraso en la maduración de la fruta
  - 4.3. Tolerancia a frío y sequía
  - 4.4. Plantas Mejoradas Nutricionalmente (Arroz dorado)—Golden Rice:
  - 4.5. Granjas Moleculares
    - 4.5.1. Producción de Anticuerpos
    - 4.5.2. Vacunas comestibles
    - 4.5.3. Biopolímeros

## **Micropropagación**

### OBJETIVOS ESPECIFICOS

Que el alumno conozca las variables que hay que considerar cuando se requiere realizar la propagación masiva de plantas y al final sea capaz de escalar procesos de regeneración *in vitro*, para la disminución de costos de producción

#### 1. Introducción

2. Que es la micropropagación
  - 2.1. Etapas
  - 2.2. Ventajas
  - 2.3. Aplicaciones
  - 2.4. Limitaciones
  - 2.5. Problemas
    - 2.5.1. Contaminación
    - 2.5.2. Oscurecimiento del tejido
    - 2.5.3. Ecofisiología
    - 2.5.4. Hiperhidricidad o vitrificación
  - 2.5.5. Variabilidad somaclonal
3. Aclimatización
  - 3.1. Autotrofia vs heterotrofia
  - 3.2. Calidad de la planta
  - 3.3. Infraestructura
  - 3.4. Ambiente y químicos
4. Uso de biorreactores
5. Automatización
6. Situación mundial de árboles forestales

### **Cultivo de protoplastos. Híbridos somáticos**

#### OBJETIVOS ESPECIFICOS

Que el alumno conozca las variables involucradas en la obtención de protoplastos y al final sea capaz de establecer protocolos de aislamiento, purificación y cultivo de protoplastos, con la finalidad de producir híbridos somáticos de especies de interés agrícola.

1. Introducción
2. Estructura de la pared celular
3. Métodos para la obtención de protoplastos
4. Aislamiento, purificación y cultivo de protoplastos
  - 4.1. Densidad de plaqueo
  - 4.2. Pruebas de viabilidad de protoplastos
  - 4.3. Medios de cultivo para protoplastos
5. Regeneración de plantas a partir de protoplastos
6. Fusión de protoplastos
  - 6.1. Agentes fusigénicos
  - 6.2. Electrofusión de protoplastos
- 6.3. Selección de productos de fusión
7. Aplicaciones
  - 7.1. Sincariocitos o híbridos somáticos
  - 7.2. Cíbrido

## **Variación somaclonal**

### **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

Que el alumno conozca los factores involucrados en la generación de la variación somaclonal, que aprenda a abordar e interpretar los resultados derivados de su estudio, de tal manera que entienda como manipular dichos factores para lograr obtener plantas con nuevas características, sin necesidad de utilizar técnicas de la ingeniería genética.

Mecanismos involucrados en el proceso de la variación somaclonal

1. Cambios a nivel cromosómico numérico y estructural: aberraciones cromosómicas, alteraciones en la cantidad de ADN nuclear, y cambios en el nivel de ploidía.
2. Alteraciones en patrones de metilación del ADN
- 3 Amplificación y/o reducción de ciertas secuencias del ADN
4. Actividad de transposones inducida por el CTV
5. Daño a la molécula de ADN y mutaciones puntuales
6. Alteración de la capacidad celular para reparar el ADN dañado

## **Obtención de plantas haploides**

### **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

Que el alumno conozca los factores involucrados en la obtención de plantas haploides para manipularlos y lograr obtener plantas con nuevas características genéticas que sean útiles en los programas de fitomejoramiento.

1. Ginogénesis *in vitro*
2. Androgénesis *in vitro*, directa e indirecta
3. Importancia de las plantas haploides y/o doble haploides en el fitomejoramiento de cultivos tropicales

## **Obtención de plantas transformadas**

### **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

Que el alumno conozca los diferentes sistemas de transformación genética de plantas y las variables involucradas en el proceso. Y que se familiarice con las ventajas, desventajas y la percepción que tiene la sociedad de este tipo de plantas y tenga los elementos para decidir sus futuras aplicaciones

1. Características
2. Sistemas de transformación genética en plantas
  - 2.1. Transferencia de ADN basado en sistemas biológicos
    - 2.1.1. *Agrobacterium tumefaciens*
    - 2.1.2. *Agrobacterium rhizogenes*
    - 2.1.3. Basados en virus vegetales
  - 2.2. Transferencia directa de ADN
    - 2.2.1. Bombardeo de microparticulas o biobalística
    - 2.2.2. Electroporación y/o agentes químicos
    - 2.2.3. Whiskers de carburo de silicio
    - 2.2.4. Microinyección
3. Ventajas
  - 3.1. Nuevas variedades
  - 3.2. Mayor productividad
  - 3.3. Ahorro en pesticidas
4. Desventajas:
  - 4.1. Ambientales
  - 4.2. Salud Humana
  - 4.3. Aspectos Económicos
5. Producción Mundial
6. Producción Nacional
7. Alternativas
8. Futuro

### **Estudios moleculares en el CTV**

#### OBJETIVOS ESPECIFICOS

Que el estudiante se familiarice con los conceptos básicos de los marcadores moleculares y los use como herramienta para el mejoramiento genético de las plantas de interés agrícola.

1. Conceptos básicos de genética de la herencia y polimorfismos
2. Técnicas moleculares para el estudios de genética en plantas
3. Tipos de polimorfismos y su detección
4. Tipos de marcadores moleculares
5. Herramientas moleculares para el mejoramiento genético en plantas

### **Metabolismo secundario**

#### OBJETIVOS ESPECIFICOS

Que el estudiante conozca la diversidad de metabolitos que se producen el metabolismo secundario en plantas, los principios básicos de la ingeniería metabólica y sus aplicaciones en los cultivos *in vitro*.

1. La diversidad de metabolismo secundario.
  - 1.1. Terpenos
  - 1.1. Fenoles
  - 1.3. Alcaloides
2. Producción de metabolitos secundarios en cultivos *in vitro*
  - 2.1. Callos y células en suspensión
  - 2.2. Cultivo de raíces
  - 2.3. Cultivo de brotes
3. Principios y aplicaciones de la ingeniería metabólica en plantas
  - 3.1. Principios básicos de la ingeniería metabólica
  - 3.2. Ejemplos de aplicaciones de la ingeniería metabólica

## **BIBLIOGRAFIA BÁSICA Libros**

- AITCHISON P. A., MACLEOD A. J., YEOMAN M. M. (1977). Growth patterns in tissue (callus) cultures. En: Street H. E. (Ed.) Plant tissue and cell culture. Blackwell Sci. Publ., Oxford., England. pp. 267-306.
- BENITEZ BURRACO A. 2005. Avances recientes en biotecnología vegetal e ingeniería genética de plantas. Reverté. Barcelona
- BHOJWANI S.S. 1990. Plant tissue culture: applications and limitations: Elsevier. Amsterdam.
- BHOJWANI S.S., RAZDAN M.K. 1996. Plant tissue culture : theory and practice. Elsevier. New York.
- CARPITA N., MCCANN M. (2000). The cell wall. En: BUCHANAN B., GRUISSEM W., JONES R. (Eds.) Biochemistry and Molecular Biology of Plants. USA: American Society of Plant Physiologists, pp. 52-108.
- CASSELLS A.C., GAHAN P.B. 2006. Dictionary of plant tissue culture. Food Products Press. New York.
- DODDS, J.H. 1985. Experiments in plant tissue culture. Cambridge University Press. Cambridge.
- FOWLER M. W. (1987). Products from plant cells. En: Bu'lock J., Kristiansen B. (Eds.) Basic Biotechnology. Academic Press, M., London, England. pp. 525-544.
- HOOD E.E., HOWARD J. A. 2002. Plants as factories for protein production. Kluwer Academic Pub. Dordrecht.
- HURTADO M. D., MERINO M.M.A. 2000. Cultivo de tejidos vegetales. Trillas, México.
- LOYOLA-VARGAS V.M. VAZQUEZ-FLOTA F.A. 2006. Plant cell culture protocols. Humana Press. Totowa, New Jersey
- MARTIN S. M. (1980). Mass culture systems for plant cell suspensions. En: Staba E. J. (Ed.) Plant tissue culture as a source of biochemicals. C.R.C. Press. Inc. Boca Raton. Florida., U.S.A. pp. 149-166.
- PEÑA L. 2005. Transgenic plants. Methods and protocols. Humana Press. Totowa, New Jersey
- PEREZ MOLPHE BACH E.M., RAMÍREZ MALAGON R., NÚÑEZ PALENIUS H.G. Y OCHOA ALEJO. 1999. Introducción al Cultivo de tejidos vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes.

- REINERT J. , YEOMAN M.M. 1982. Plant cell and tissue culture : a laboratory manual: Springer-Verlag. Berlin.
- REINERT J., BAJAJ Y.P.S. 1977. Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture. Springer-Verlag. Berlin.
- ROBERT M.L. HERRERA-HERRERA, J.L, HERRERA-HERRERA G. HERRERAALAMILLO M.A., FUENTES-CARRILLO P. 2006. A new temporary inmersión bioreactor system for micropropagation. In: Loyola-Vargas V.M. Vazquez-Flota F.A. 2006. Plant cell culture protocols. Humana Press. Totowa, New Jersey. 121129.
- SEABROOK J. E. A. (1980). Laboratory culture. En: Staba, E. J. (Ed.) Plant tissue culture as a source of biochemicals. C.R.C. Press, Inc, Boca Raton, Florida, U.S.A. pp 1-20
- SMITH R.H. 2000. Plant tissue culture : techniques and experiments. Academic Press. San Diego.
- STABA E.J.1980. Plant tissue culture as a source of biochemicals. CRC. Boca Ratón.
- STREET H. E. (1977). Cell (suspension) cultures techniques. En: Street H. E. (Ed). Plant tissue and cell culture. Blackwell Scientific Publishing., Oxford., England. pp. 61-102.
- TRIGIANO R.N., GRAY D.J. 2000. Plant tissue culture concepts and laboratory exercises.CRC Press. Boca Ratón FL
- TRIGIANO R.N., GRAY D.J. 2005. Plant development and biotechnology.CRC Press. Boca Ratón FL

## **BIBLIOGRAFIA ESPECIALIZADA**

Los artículos especializados de cada tema serán proporcionados por los profesores participantes.