

UNIVERSIDAD AUTONOMA CHAPINGO
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
INTRODUCCIÓN AL CULTIVO DE CÉLULAS, TEJIDOS Y ÓRGANOS VEGETALES

I. DATOS GENERALES

Unidad Académica:	Departamento de Fitotecnia
Programa educativo:	Ingeniería Agronómica en Fitotecnia
Nivel Educativo:	Licenciatura
Línea Curricular:	Agrobiología
Asignatura:	Introducción al cultivo de células, tejidos y órganos vegetales
Área:	Genética
Carácter:	Optativo
Tipo:	Teórico - Práctico
Prerrequisitos:	Fisiología Vegetal, Genética, y Propagación de plantas.
Profesor:	Dr. José Luis Rodríguez De La O
Horas Teoría/semana:	3.0
Horas Práctica/Semana:	2.0
Horas Totales del Curso:	80
Horas Trabajo Independiente:	2.5
Créditos:	7.5

II. INTRODUCCIÓN

El curso Introducción al Cultivo de Células, Tejidos y Órganos Vegetales es opcional. Se ubica en el séptimo año de la Ingeniería Agronómica en Fitotecnia, participa como herramienta de tipo Biotecnológico y básica, que permite conocer las principales respuestas de tipo morfogénico a partir del cultivo de células y tejidos vegetales y puede participar con otras áreas de investigación y del conocimiento de manera multidisciplinaria y a un contexto general de la Biología celular de plantas, en la actualidad, coadyuva de manera básica en la micropropagación de plantas socioeconómicamente importantes y a las técnicas del ADN recombinante, o sobre la ingeniería genética de plantas, regenerando plantas completas a partir de células y tejidos transformados genéticamente, por lo que sus aplicaciones son muy diversas tanto en la agricultura como en la industria.

La metodología del curso, se desarrolla mediante la exposición de los temas por el profesor. En la parte práctica se utilizarán las herramientas y materiales propios de cada práctica.

El trabajo independiente se realizará cada semana con resolución de tareas tales como cuestionarios y lecturas de apoyo.

La evaluación consistirá en la aplicación de dos exámenes parciales, reporte de prácticas y trabajo extra clase como parte del tiempo de estudio independiente.

III. PRESENTACIÓN

El curso sobre Introducción al Cultivo de Células, Tejidos y Órganos Vegetales toma como base el objeto de aprendizaje las diversas disciplinas que integran las técnicas *in vitro*, y cumplir con el objetivo general en la formación de profesionales dentro del campo de la biotecnología vegetal, adquiriendo los conocimientos, habilidades y aptitudes, que le permitan conocer y optimizar los aspectos técnicos, y biológicos que conlleven al conocimiento de la biología celular de las plantas. El curso Introducción al cultivo de Células, Tejidos y Órganos Vegetales, incluye básicamente el los procesos para aislar y cultivar tanto células y tejidos vegetales y evaluar sus diferentes respuestas de tipo, así como morfogenético y sus múltiples aplicaciones de esta herramienta biotecnológica en la agricultura y de otras disciplinas que participan de manera conjunta como

estrategias, y alternativas de solución que presentan diversos cultivos agrícolas de interés socioeconómico de nuestro país. El cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales ha sido un área prioritaria dentro de los programas de desarrollo agrícola nacional, por los beneficios que se pueden obtener a corto, mediano y largo plazo, ya sea en la disponibilidad masiva de plantas sanas o acelerando los programas de mejoramiento genético. Por otra parte, ha sido reconocido ampliamente que la investigación dentro del cultivo de tejidos vegetales, ofrece un acceso directo a una tecnología con un alto valor potencial y de aplicabilidad en la agricultura, producción masiva de plantas con excelente calidad fitosanitaria, industria farmacéutica y química, y otras, por lo que el alumno en este curso adquirirá y desarrollará los conocimientos de los principios básicos en el manejo de esta tecnología, así como sus principales aplicaciones en la Agricultura.

V. OBJETIVOS GENERALES

Revisar los conocimientos teórico - prácticos necesarios para aplicar los principios de las técnicas *in vitro* así como aislar y cultivar células, tejidos y órganos vegetales, además, determinar sus principales respuestas morfogénicas y sus aplicaciones en la agricultura.

Plantear diferentes opciones de desarrollo biotecnológico para proponer alternativas de solución a diversos problemas que enfrentan los cultivos agrícolas económicamente importantes en México.

VI. CONTENIDO (48 horas)

Unidad I. La Historia, terminología y control de contaminantes en el cultivo *in vitro* de Células y Tejidos Vegetales (10 horas).

Objetivo. Analizar la cronología y desarrollo del cultivo *in vitro* de células y la comprensión del glosario de términos y eventos científicos que han coadyuvado a su desarrollo así como aplicaciones a la agricultura.

- 1.1 Introducción cronológica.
- 1.2 Descubrimientos, países, años y científicos
- 1.3 Descripción de Metodologías básicas
- 1.4. Terminología comúnmente empleada en las técnicas *in vitro*.
- 1.5 Los principales agentes contaminantes
- 1.6. La detección e identificación de organismos contaminantes.
- 1.7. Control, prevención y erradicación de la contaminación en: En los medios de cultivo, desinfestación de explantes.
- 1.8. Fuente de aire, esterilización de vidriería, instrumento de disección y otros materiales

Unidad II. Características, composición fisicoquímica de los medios de cultivo y condiciones de incubación (10 horas).

Objetivo. Identificar las diversas formulaciones y constituyentes básicos, y el empleo de los reguladores del crecimiento, así como determinar las condiciones tanto de luz y temperatura requeridas en las respuestas morfogénicas de los diferentes explantes sembrados *in vitro*.

- 2.1 Composición básica de los medios de cultivo,
- 2.2. Las sales inorgánicas y compuestos orgánicos e inorgánicos
- 2.3 Los reguladores del crecimiento, disolución y preparación.
- 2.4. Equipos y materiales para preparar el medios de cultivo.
- 2.5. Reactivos, Preparación de soluciones concentradas cuidados, pH y usos
- 2.6. Disolución de agar, distribución, esterilización y almacenamiento del medio
- 2.7. Siembra *in vitro*, luz, intensidad y calidad lumínica
- 2.8. Fotoperíodo y Termoperíodo, humedad relativa.

Unidad III. La propagación clonal *in vitro* y obtención de plantas libres de patógenos. (10 horas).

Objetivo. Analizar diferentes explantes para la propagación clonal *in vitro*, considerando la fisiología y su metabolismo, constituyentes básicos del medio de cultivo así como las diferentes estrategias que permiten obtener plantas libres de patógenos con calidad certificada.

- 3.1 Totipotencia celular, morfogénesis, diferenciación y dediferenciación celular *in vitro*
- 3.2. Organogénesis y la Embriogénesis somática.
- 3.3 Características fisiológicas, y tamaño de los explantes.
- 3.4. Medios de cultivo, reguladores y etapas de manejo *in vitro*..
- 3.5. Bioensayos, establecimiento, multiplicación, enraizamiento, y aclimatación
- 3.6. Evaluación de posibles variantes en las plantas propagadas *in vitro*.
- 3.7. Pruebas de diagnóstico fitosanitario, pruebas de indeciación- con plantas indicadoras
- 3.8. Cultivo *in vitro* de meristemas apicales, microinjertos, y uso de tejidos especializados.
- 3.9. Termoterapia, y Quimioterapia *in vitro*, etiolación, y la influencia estacional
- 3.10. Tamaño del explantes, cirugía, medios, reguladores, y certificación fitosanitaria

Unidad IV. Técnicas *in vitro* aplicadas al mejoramiento genético y Biosíntesis de compuestos (10 horas).

Objetivo. Usar diferentes estrategias y metodologías en el mejoramiento genético *in vitro* de plantas para valorar las posibilidades de integración de éstas en los programas de fitomejoramiento convencional, así mismo estudiar la síntesis de ingredientes activos resultado del metabolismo secundario de plantas y analizar los mecanismos de la extracción y aprovechamiento, incluyendo, fármacos, bioinsecticidas, aromas, pigmentos y saborizantes.

- 4.1. Fertilización *in vitro*, a nivel de estigma o placenta, cultivo de óvulos, ovarios de flores.
- 4-2. Cultivo *in vitro* de embriones inmaduros, obtención de haploides por cultivo de anteras.
- 4.3. La obtención, cultivo y uso de protoplastos, variación somaclonal y gametoclinal.
- 4.4. Cultivo *in vitro* de células y tejidos transformados genéticamente
- 4.5. Importancia del metabolismo secundario en plantas.
- 4.6. Clasificación de metabolitos e ingredientes activos en plantas.
- 4.7. Principales rutas de síntesis y expresión génica
- 4.8. Incorporación de cofactores y coadyuvantes para incrementar la síntesis de compuestos
- 4.9. Productos obtenidos *in vitro*

Unidad V. Establecimiento de bancos de germoplasma *in vitro* y criopreservación (8 horas).

Objetivo. Manejar las principales ventajas, desventajas, metodologías y usos de los bancos de germoplasma *in vitro* para preservar células, tejidos y órganos vegetales a corto, mediano y largo plazo.

- 5.1 Bancos de germoplasma *in vitro*.
- 5.2 Características de los medios de cultivo
- 5.3 Reguladores- Inhibidores del crecimiento
- 5.4 Fuentes de explantes
- 5.5 Pretratamientos, deshidratación, vitrificación, encapsulación de tejidos.
- 5.6 inhibición del crecimiento a corto mediano y largo plazo.
- 5.7 Congelamiento y descongelamiento de muestras, uso de crioprotectores.

VII. ACTIVIDADES PRÁCTICAS (32 horas)

PRACTICA I. IDENTIFICAR DENTRO DE LA INFRAESTRUCTURA DEL LABORATORIO, PRINCIPALES AREAS Y SUMINISTROS, EQUIPOS, MATERIALES, Y REACTIVOS, ASI COMO DEL INVERNADERO. 3 h

Objetivo. Distinguir las principales áreas y suministros básicos de un laboratorio e invernaderos necesarios para llevar a cabo exitosamente el cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales.

Apoya a la unidad 1 y 2.

PRACTICA II. ELABORACION DE MEDIOS DE CULTIVO. 3 h

Objetivo. Identificar los principales componentes y características necesarias para elaborar un medio de cultivo específico y propagar una especie vegetal.

Apoya a la unidad 3.

PRACTICA III. SIEMBRA *in vitro* DE TEJIDOS PARA OBSERVAR LAS RESPUESTAS MORFOGENETICAS. 4 h

Objetivo. Realizar el aislamiento y establecimiento *in vitro* de tejidos de tabaco, para observar la organogénesis y la embriogénesis somática en tejidos de zanahoria.

Apoya a la unidad 3.

PRACTICA IV. LA PROPAGACION CLONAL *in vitro*. 4 h

Objetivo. Realizar la propagación *in vitro* de una especie vía la organogénesis directa, mediante la multiplicación de yemas axilares y ápices de tallo estimando un escalamiento de producción de plantas.

Apoya a la unidad 3.

PRACTICA V. LA OBTENCION DE PLANTAS LIBRES DE PATOGENOS. 4 h

Objetivo. Obtener plantas sanas, identificando, aislando y sembrando *in vitro* de meristemos apicales de tallo de clavel (*Dianthus caryophyllus*) o crisantemo *Dendrathera spp.*

Apoya a la unidad 4.

PRÁCTICA VI. CULTIVO *in vitro* DE CELULAS EN EL MEJORAMIENTO GENÉTICO 4 h

Objetivo. Explorar el cultivo *in vitro* de ovarios y anteras a fin de producir frutos con semilla y plantas haploides en jitomate y tabaco, respectivamente.

Apoya a la unidad 4.

PRÁCTICA VII. CULTIVO *in vitro* DE EMBRIONES INMADUROS Y MADUROS DE SEMILLAS. 3 h

Objetivo. Identificar medios de cultivo y reguladores que promuevan la germinación de embriones y o semillas cultivadas *in vitro*.

Apoya a la unidad 4.

PRÁCTICA VIII. TRANSFERENCIA DE PLANTAS OBTENIDAS *in vitro* AL SUELO Y su ACLIMATACIÓN EN INVERNADERO. 3 h

Objetivo. Identificar las condiciones bajo invernadero que influyen sobre los trasplantes a suelo de plantas obtenidas *in vitro* y su acondicionamiento.

Apoya a la unidad 5.

PRACTICA IX. LA TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE CÉLULAS Y TEJIDOS VEGETALES. 4h

Objetivo. Identificar los mecanismos involucrados en la inserción, integración, expresión y herencia de secuencias introducidas a células y tejidos vegetales *de novo*.

Apoya a la unidad 5.

VIII. METODOLOGÍA

El contenido del curso se desarrolla en 16 semanas; tres sesiones a la semana, dos teóricas presenciales de 1.5 horas y otra práctica de dos horas en el campo, mediante la exposición de los temas por el profesor. Los medios a emplear serán pizarrón, proyector multimedia, material vegetal, muestrarios, folletos, artículos científicos y técnicos. En la parte práctica se utilizarán las herramientas y materiales propios de cada práctica.

El trabajo independiente se realizará cada semana con resolución de tareas tales como cuestionarios y lecturas de apoyo.

IX. EVALUACIÓN DEL CURSO

El curso se evaluará de acuerdo a los criterios y ponderaciones siguientes:

1. Dos exámenes Parciales	40 %
2. Trabajos extraclase*	10 %
3. Reportes de prácticas	50 %

*Trabajo independiente

X. BIBLIOGRAFÍA

Barz, W. E., Reinhard, and M.H. Zenk. 1977. Plant tissue culture and its biotechnological Application Springer Verlag 419 pp.

Conger, B.V. 1981. Cloning agricultural plants via *in vitro* techniques. CRC Press Inc. Boca Raton, Fla. 273p.

Constantin, M.J. R.R., Henke K.W. Hughes, and B.V. Conger, 1981. Propagation of higher plants through tissue Culture. Procc. Int. Symposium. October 12-15, 1980. University of Tennessee, Knoxville. Pergamon Press. 452 pp.

Dixon, R.A., Gonzales. 1994 . Plant cell culture. Oxford Univ. Press. 230 p.

Gamborg, O.L. T., Murashige, T.A. Thorpe, and I.K. Vasil. 1976. Plant tissue culture Media. In vitro 12 (7) 473 - 478.

Handbook of Plant Cell Culture. Vol. 2,3,4,5,6. 1984, 1990. Sharp. W.R., D.A. Evans, P.V. Ammirato, Y. Yamada (eds). Macmillan Publishing Co.

Islam, A. S. 2004. In vitro transformation and Molecular Markers for crop improvement. Science Publishers. Inc. Post Office Box 699 Eufield. New Hampshire 03348. USA ISBN 1-57808-336-2

Murashige, T. 1974. Plant Propagation Through tissue culture, Ann Rev, Plant Physiol 25: 135 - 166

Reinert, J., and M.M. Yeoman 1982, Plant cell and tissue culture. Springer - Verlag. 83 pp.

Sant, S.B., Woong. Y. S. 2003. Agrobiotechnology and Plant Tissue Culture. Science Publishers. Inc. (NH), USA ISBN 1-57808-243-9

Tzotzos, G.T, 1995. Genetically modified organism a guide to biosafety. CAB International Wallingford oxon ox 108 DE UK ISBN 085198972 1

Vasil, I.K., W.R. Scowcroft and K.J. Frey, 1982. Plant Improvement and Somatic Cell Genetics. Academic Press. 330 pp.

TESIS

Brusco, G. C. Cárdenas, A.M. Y Madrigal, L.R. 1985. Certificación de plantas de fresa *Fragaria x ananassa* Duch, Libres de virus; obtenidas por cultivo *in vitro* de ápices de tallo. Revista Chapingo, Vol. IX No. 45 Jul - Dic. 1984. (en prensa).

Coutiño, A. D., y Madrigal, L.R. 1983. Propagación *in vitro* de jojoba *Simmondsia chinensis* (Lin) Schneider. Revista Chapingo Vol. VIII. No. 42, Oct - Dic. 1983. P. 39 - 41.

Granada, C. L. 1980 Propagación *in vitro* de *Dioscorea composita* Hemsl. Tesis Profesional UACH. Chapingo, Méx. pp. 56.

Granada, C. L., Cárdenas, A. M., y Madrigal L. R. 1985. Propagación *in vitro* de plantas de fresa. Revista Chapingo. Vol. IX No. 45 - 46 Jul. Dic, 1984. (sobretiro).

Rosas, M. V. 1995. Obtención y propagación de plantas de alcatraz (*Zantedeschia sp.*) a partir del cultivo *in vitro* de yemas de bulbo. Tesis profesional. UACH. Chapingo, Méx. 66 pp.

Rodríguez, O.J.L. 1982. Obtención de plantas de vid (portainjerto R-110) libres de virus hoja de abanico (GELV) por cultivo *in vitro* de yemas axilares termoterapia. Tesis Profesional. UACH. Chapingo, Méx.,. 10l pp.