

UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



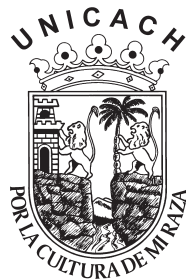
# MANUAL DE PRÁCTICAS DE FISIOLOGÍA VEGETAL AVANZADA



*Clara Luz Miceli Méndez  
Raúl Pérez López  
Lisette de Jesús García Ruiz*

# MANUAL DE PRÁCTICAS DE FISIOLOGÍA VEGETAL AVANZADA

Clara Luz Miceli Méndez  
Raúl Pérez López  
Lisette de Jesús García Ruiz



UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS  
2013

**Colección  
Jaguar**



**UNICACH**

El jaguar es una de las especies más representativas de la fauna chiapaneca y el símbolo por antonomasia de la biodiversidad en nuestro estado. Bajo su nombre están contenidos todos los títulos pertenecientes al ámbito de las ciencias naturales producidos en la universidad.

Primera impresión: 2013

D. R. ©2013. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas

1ª Avenida Sur Poniente número 1460

C. P. 29000, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.

[www.unicach.mx](http://www.unicach.mx)

[editorial@unicach.mx](mailto:editorial@unicach.mx)

Diseño de portada: Luis Felipe Morgan Vázquez

ISBN: 978-607-8240-17-3

Impreso en México

## Índice de prácticas

Número de práctica		Sesiones	Página
1	Polinización artificial	1	12
2	Preparación de medios para el cultivo <i>in vitro</i> de embriones	1	14
3	Desinfestación de embriones y cultivo <i>in vitro</i> de especies forestales	2	18
4	Preparación de medios selectivos para inducción de brotes en yemas axilares y apicales, enraizamiento y formación de callos <i>in vitro</i> utilizando fitorreguladores de crecimiento	2	21
5	Cultivo de meristemos apicales y axilares para la formación de brotes y raíces aplicando fitorreguladores	2	26
6	Efecto de fitorreguladores en la formación de callos a partir de hojas de especies forestales	2	30
7	Organogénesis directa mediante raíces de orquídeas	4	33
8	Cambio de sustrato y aclimatación de plántulas cultivadas <i>in vitro</i>	3	37

## Presentación

La Biotecnología es una de las expresiones más importantes de la ciencia hoy día. Su alcance está estrechamente vinculado con el futuro de la Humanidad. Encuentra campo fértil de intervención en problemáticas impostergables de las sociedades modernas, como la producción de alimento, el combate de plagas agrícolas, el desarrollo económico y social de comunidades campesinas, la conservación de especies en peligro de extinción o bajo alguna categoría de riesgo y de aquellas de importancia económica, medicinal y cultural. Estos son sólo algunos ejemplos.

Esta condición privilegiada encuentra especial progreso, y trascendencia, en el campo de la Fisiología Vegetal, y muy particularmente en las plantas vasculares.

El Biólogo encuentra en la Biotecnología aplicada a plantas vasculares una oportunidad invaluable de hacer de su proceso de formación científica una práctica transformadora de límites aún por imaginar en la conservación y manejo sustentable de la biodiversidad, en el mejoramiento de la calidad de vida de la población y en el desarrollo económico de una región.

Y todo comienza en el arte de saber armonizar el saber con el saber hacer y con el valor del saber.

Con estas ideas base, este Manual buscar desarrollar en el estudiante habilidades que le permitan participar propositivamente en proyectos de investigación, de gestión ambiental y de producción comercial de especies de plantas vasculares, especialmente aplicable a aquellas de valor para la conservación y el aprovechamiento comercial. Es una guía práctica diseñada para introducir en el conocimiento y la práctica de técnicas relacionadas con el cultivo *in vitro* de plantas vasculares.

Este manual forma parte del proceso formativo correspondiente a la asignatura Fisiología Vegetal Avanzada y se centra en vincular los fundamentos conceptuales del cultivo *in vitro* con la formación tecnológica de los Biólogos en el campo de la Fisiología Vegetal. Representa un componente imprescindible para este profesional de los sistemas vivos: traducir su conocimiento en propuestas concretas, viables y constructivas.

*Así pues, la Biotecnología vegetal es un área estratégica en el desarrollo del Biólogo*  
Dr. Felipe de J. Reyes Escutia

## Indicaciones para el reporte escrito

- **Generales.** Usar hojas blancas, tamaño carta. Escribir con letra arial número doce y margen izquierdo de 3 cm, los otros de 2.5 cm, espacio entre líneas de 2.5 cm. Entregar en carpeta con broche baco. El docente podrá señalar otra(s) forma(s) de elaborar el reporte. La entrega se realizará ocho días después de haberla concluido.
- **Portada.** Anotar el nombre de la asignatura, el número de práctica y nombre de la misma, número de equipo e integrantes, lugar y fecha.
- **Introducción.** Ser breve, no mayor de dos cuartillas y anotar las citas bibliográficas respectivas.
- **Objetivo.**
- **Descripción de la zona de estudio.**
- **Método.** Describir de forma detallada cómo se realizó la práctica.
- **Resultados.** Es la parte medular del reporte. Describir y analizar los resultados, anotar los cuadros comparativos que realizaron junto con los compañeros. Es conveniente anexar tablas, gráficas, dibujos, mapas, fotografías o esquemas de lo que observó durante la práctica. Si existen dibujos, éstos deberán estar entintados y coloreados cuando corresponda.
- **Discusión.** Esta es la parte más difícil de escribir, pero es la más importante. Aquí se debe señalar las diferencias y similitudes que se hallaron y comparar con los resultados de trabajos similares o referencias documentales. Utilizar cuadros comparativos u otra herramienta que te sea útil para presentar la información.
- **Conclusiones.** Redactar con relación al objetivo y a los resultados obtenidos.
- **Cuestionario.** Contestar las preguntas que se encuentran al final de cada práctica, citará la bibliografía empleada.
- **Referencias documentales.** Citar *siempre* la fuente de donde obtuvo la información, ya sea escrita o visual. Utilice revistas especializadas, libros, etcétera.

## Normas de higiene y seguridad en el laboratorio

Las medidas de seguridad en laboratorios son un conjunto de disposiciones preventivas, destinadas a proteger la salud de los que allí se desempeñan frente a los riesgos derivados de la actividad con el fin de evitar accidentes y contaminaciones tanto dentro de su ámbito de trabajo, como hacia el exterior. Las reglas básicas aquí indicadas son un conjunto de prácticas de sentido común realizadas en forma rutinaria, pero elemento clave es la actitud proactiva hacia la seguridad y la información que permita reconocer y combatir los riesgos presentes en el laboratorio.

1. Conocer la ubicación de los elementos de seguridad en el lugar de trabajo, tales como: extintores, salidas de emergencia, mantas ignífugas, lavaojos, gabinete para contener derrames, accionamiento de alarmas, etcétera.

2. No comer, beber, fumar o maquillarse dentro del laboratorio.
3. No se deberá guardar alimentos en el laboratorio ni en refrigeradores que contengan reactivos, drogas o material biológico.
4. Utilizar vestimenta apropiada para realizar el trabajo de laboratorio y cabello recogido (bata preferentemente de algodón y de mangas largas, zapatos cerrados, evitando el uso de accesorios colgantes).
5. Mantener el orden y la limpieza. Cada equipo o persona es responsable directo de la zona que le ha sido asignada y de todos los lugares comunes.
6. Lavarse las manos cuidadosamente después de cualquier manipulación de laboratorio y antes de retirarse del mismo.
7. Utilizar guantes apropiados para evitar el contacto con sustancias químicas o material biológico. Toda persona cuyos guantes se encuentren contaminados no deberá tocar objetos, ni superficies, tales como: computadoras, teléfono, lapiceras, manijas de cajones o puertas, cuadernos, etcétera.
8. No pipetear con la boca.
9. No correr en los laboratorios.
10. Siempre que sea necesario proteger los ojos y la cara de salpicaduras o impactos, utilizar anteojos de seguridad, viseras o pantallas faciales u otros dispositivos de protección. Cuando se manipulen productos químicos que emitan vapores o puedan provocar proyecciones, evitar el uso de lentes de contacto.
11. No bloquear las rutas de escape o pasillos con equipos, máquinas u otros elementos que entorpezcan la correcta circulación.
12. Todo material corrosivo, tóxico, inflamable, oxidante, radiactivo, explosivo o nocivo deberá estar adecuadamente etiquetado.
13. No hacer instalaciones eléctricas precarias o provisionarias.
14. Dar aviso de inmediato al responsable del laboratorio en caso de filtraciones o goteras que puedan afectar las instalaciones o equipos y provocar incendios por cortocircuitos.
15. Usar mascarillas desechables cuando exista riesgo de producción de aerosoles (mezcla de partículas en medio líquido) o polvos, durante operaciones de pesada de sustancias tóxicas o biopatógenas, apertura de recipientes con cultivos después de agitación, etcétera.
16. Las prácticas que produzcan gases, vapores, humos o partículas, aquéllas que pueden ser riesgosas por inhalación deben llevarse a cabo bajo campana.
17. Se deberá verificar la ausencia de vapores inflamables antes de encender una fuente de ignición. No se operará con materiales inflamables o solventes sobre llamas directas o cerca de las mismas. Para calentamiento, sólo se utilizarán resistencias eléctricas o planchas calefactores blindadas. Se prestará especial atención al punto de inflamación y de autoignición del producto.
18. El material de vidrio roto no se depositará con los residuos comunes. Será conveniente ubicarlo en cajas resistentes, envuelto en papel y dentro de bolsas plásticas.
19. Será necesario que todo recipiente que hubiera contenido material inflamable, y deba ser descartado sea vaciado totalmente, escurrido, enjuagado con un solvente apropiado y luego con agua varias veces.
20. Está prohibido descartar líquidos inflamables o tóxicos o corrosivos o material biológico por los desagües de las piletas, sanitarios o recipientes comunes para residuos. En cada caso se deberán seguir los procedimientos establecidos para la gestión de residuos.

21. Cuando sea necesario manipular grandes cantidades de materiales inflamables (más de 5 litros) deberá tenerse a mano un extintor apropiado para ese material en cuestión.
22. Cuando se trasvase material combustible o inflamable de un tambor a un recipiente más pequeño, realizar una conexión con una cadena del tambor a tierra y con otra entre el tambor y el recipiente de manera de igualar potenciales y eliminar la posible carga estática.
23. Al almacenar sustancias químicas considerar que hay cierto número de ellas que son incompatibles pues almacenadas juntas pueden dar lugar a reacciones peligrosas.
24. No almacenar en estantes sobre mesas sustancias corrosivas, hágalo en estantes bajo mesas y en caso de ácidos o álcalis concentrados (mayor de 2N) deben ser mantenidas dentro de lo posible en bandejas de material adecuado.
25. Asegurar los cilindros de gases comprimidos y licuados en posición vertical con pinzas, grampas y correas o cadenas a la pared en sitios de poca circulación, protegidos de la humedad y fuentes de calor, de ser posible en el exterior.
26. Contar en el laboratorio con un botiquín de primeros auxilios que contenga los elementos indispensables para atender casos de emergencia.
27. Informar al responsable del laboratorio cuando se necesiten dejar equipos funcionando en ausencia del personal del laboratorio.

### **Procedimientos ante emergencias**

#### *Emergencias médicas*

Si ocurre una emergencia tal como: cortes o abrasiones, quemaduras o ingestión accidental de algún producto químico, tóxico o peligroso, se deberá proceder:

1. A los accidentados se les proveerán los primeros auxilios.
  2. Simultáneamente avise al responsable del laboratorio o autoridad de la escuela, quienes solicitarán la asistencia necesaria según corresponda.
  3. El responsable del laboratorio notificará el accidente a la Dirección para su evaluación, donde, una vez determinadas las causas, se elaborarán las propuestas para modificar dichas causas y evitar futuras repeticiones.
- Teléfonos de emergencias:  
Cruz Roja: 6120492, 6129514, 6120096.

#### *Incendio*

1. Mantener la calma. Lo más importante es ponerse a salvo y dar aviso a los demás.
2. Accionar la alarma, si se cuenta con ella, si no, avisar para alertar al resto.
3. Avisar de inmediato al responsable del laboratorio informando el lugar y las características del siniestro.
4. Usar un extintor, si se sabe considerando si el fuego es pequeño. Si éste es de consideración, no se arriesgue. Es importante mantener la calma y poner en marcha el plan de evacuación.
5. Si se debe evacuar el sector apagar los equipos eléctricos y cerrar las llaves de gas y ventanas.
6. Evacuar la zona por la ruta asignada.
7. No correr, caminar rápido, cerrar a su paso la mayor cantidad de puertas. No utilizar ascensores. Descender siempre que sea posible.



8. No llevar consigo objetos, pueden entorpecer su salida.
  9. Si se pudo salir por ninguna causa volver a entrar. Dejar que los equipos especializados se encarguen.
- Teléfonos de emergencias:  
Bomberos: 6135025, 6112019.

### *Derrame de productos químicos*

1. Atender a cualquier persona que haya resultado afectada.
2. Notificar al responsable del laboratorio y a las personas que se encuentren en las áreas cercanas acerca del derrame.
3. Evacuar el área.
4. Utilizar los elementos de protección personal tales como bata, lentes y guantes.

## Práctica número 1. Polinización artificial

### Introducción

La floración es la etapa de desarrollo con la que se inicia la fase reproductiva o madura de una planta (Bidwell, 1979; Salisbury y Ross, 2000). El paso desde la fase vegetativa hasta la fase reproductiva conlleva cambios morfológicos, citológicos, bioquímicos y genéticos. En este sentido, la floración supone un cambio en el patrón de desarrollo básico de los fitómeros, que una vez alcanzado un tamaño determinado, alteran su estructura (López *et al.*, 1994). El desarrollo de la hoja se inhibe, formando una bráctea, al tiempo que el meristemo de la yema axilar (de crecimiento indeterminado) se transforma en un meristemo floral (de crecimiento determinado).

### Objetivo

- Reconocer cada una de las estructuras florales e inducir el proceso de polinización en orquídeas.

### Materiales

- Microscopio estereoscopio.
- Pinza de disección.
- Aguja de disección.
- Charola de disección.
- Pincel.
- Etiquetas.
- Plumón indeleble.
- Hilo cáñamo.

### Material biológico

Planta de orquídea con flores jóvenes grandes. (figura 1)



Figura 1. Orquídea con flores grandes para polinización.

### **Procedimiento**

1. Identificar en el microscopio estereoscopio las partes florales y realizar un diagrama.
2. Con ayuda de un pincel o de una aguja de disección, remover de manera muy cuidadosa los sacos polínicos que se encuentran debajo de una cubierta que se encuentra cubriendo la antera.
3. Colocar los sacos polínicos en el estigma del ovario.

### **Cuestionario**

1. ¿De qué manera se lleva a cabo la floración?
2. ¿Qué factores influyen sobre el proceso de la floración?
3. ¿De qué manera se da la inhibición natural en la floración?
4. ¿Existe participación hormonal durante el proceso? Explique.

### **Referencias documentales**

- Bidwell, R. G.S. 1979. *Fisiología vegetal*. AGT. Editores. México, D.F.
- López B. A., M. Sosa y J.M. Mejía. 1994. "Plantas del sureste de México con potencial ornamental: orquídeas". En: *Revista Chapingo* 1(3).
- Salisbury, F.B. y C.R. Ross. 2000. *Fisiología de las plantas*. International Thomson Editores Spain Paraninfo, S.A. Madrid, España.

## Práctica número 2. Preparación de medios para el cultivo *in vitro* de embriones

### Introducción

El éxito que se obtenga en el cultivo de tejidos vegetales depende del uso del medio nutritivo adecuado, como también del empleo de tejidos viables, incubación y calidad de reactivos (Hurtado y Merino, 1987).

### Objetivos

- Conocer la composición y las características de cada uno de los componentes de un medio de cultivo.
- Identificar que existen diferentes tipos de medios para el cultivo *in vitro*.

### Materiales

- 2 Vidrios de reloj.
- 1 Espátula.
- 2 Barras magnéticas.
- 2 Matraces Erlenmeyer de 100 ml.
- 1 Matraz Erlenmeyer de 500 ml, 1 000 ml.
- 2 Matraces aforados 100 ml.
- 1 Matraz aforado de 500 ml, 1 000 ml.
- 1 Matraz Erlenmeyer com tapón de rosca 1 000 ml.
- Etiquetas (masking).
- 1 Probeta de 10 ml.
- 1 Pipeta graduada de 1 ml.
- 1 Pipeta graduada de 5 ml.
- 1 Vaso de precipitado 100 ml.
- 1 Vaso de precipitado 1 000 ml.
- 1 Perilla.
- 2 Cajas Petri.
- 1 Pinza de disección sin diente.
- 1 Mango para bisturí.
- 1 Navaja para bisturí.
- Frascos tipo Gerber.
- Tapas de polipropileno para los frascos tipo Gerber.
- Plumón indeleble.
- Papel estroza.
- Kleen pack.
- Papel aluminio.

## Equipo (figura 2)

- Balanza analítica.
- Balanza granataria.
- Parilla con agitación magnética.
- Potenciómetro.
- Autoclave.



Balanza analítica



Autoclave

Figura 2. Equipo utilizado en laboratorio.

## Reactivos

- Agar-agar.
- Sacarosa o azúcar comercial.
- Agua destilada.
- Mioinositol 10 mg/L.
- NaOH y HCl al 1N.
- Más los utilizados en la preparación de soluciones madre (macroelementos, microelementos y quelatos).

## Procedimiento

Preparación de soluciones madre

### Macroelementos

- 10X= 100 ml (1 litro solución madre).
- $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (nitrato de amonio). 16.5 g
- $\text{KNO}_3$  (nitrato de potasio). 19.0 g
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (cloruro de calcio). 4.4 g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (sulfato de magnesio). 3.7 g
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (fosfato de potasio monobásico). 1.7 g

*Microelementos*

● 100X= 10 ml (1 litro solución madre).	
● KI (yoduro de potasio).	83 mg
● H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (ácido bórico).	620 mg
● MnSO <sub>4</sub> 4H <sub>2</sub> O (sulfato de manganeso).	1 690 mg
● ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O (sulfato de zinc).	860 mg
● Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O (molibdato de sodio).	25 mg
● CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O (sulfato cúprico).	2.5 mg
● CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O (cloruro cobalto).	2.5 mg

*Quelatos*

● 100X= 10 ml (1 litro solución madre).	
● Na <sub>2</sub> EDTA 2H <sub>2</sub> O.	4 123 g
● FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O.	2 780 g

Una vez preparada la solución madre, mantener en refrigeración (figura 3).



Figura 3. Conservación de solución madre.

### **Preparación del medio MS (Murashige y Skoog, 1962) 1 litro**

1. Colocar 500 ml de agua destilada en un matraz aforado de 1 000 ml.
2. Posteriormente agregar 100 ml de macroelementos, 10 ml de microelementos, 10 ml de quelatos, 30 g de sacarosa.
3. Una vez mezclado lo anterior, aforar a 1 000 ml.
4. Medir pH 5.6± 0.1, ajustar con una solución de hidróxido de sodio o de ácido clorhídrico a 1 N, una vez obtenido el pH deseado, agregar 8 g de agar.
5. Calentar (hervir 1 minuto).
6. Vaciar en frascos de cristal (40 frascos) tapar y etiquetar.
7. Esterilizar a 121º C (15lb/pulg2) durante 15 minutos, dejar solidificar, sellar con kleen pack y colocar en lugar fresco por tres días.

## Medidas de bioseguridad

Tipo de desechos	Cómo descartarlos	Observaciones
Reactivos sobrantes no utilizables	Desecharlos poco a poco bajo chorro de agua en las tarjas indicadas por el responsable del laboratorio	
Basura producida en la práctica (papel destraza, material vegetativo, gasas, algodón, cubreboca, guantes, etcétera)	Colocarla en el depósito de basura correspondiente en el laboratorio	

Equipos y reactivos	Uso y manejo	Observaciones
Reactivos como el HCl y el NaOH	Tener cuidado al manejarlos y realizar la preparación a utilizar	
Parrilla y autoclave	Manejarlas con cuidado, estar pendientes siempre de lo que se esté agitando, calentando o esterilizando	
Soluciones madre	Mantenerlas siempre bajo refrigeración y en frascos ámbar o en su defecto cubrirlos con papel aluminio, rotular siempre con fecha de elaboración	

## Cuestionario

1. Mencionar al menos 4 tipos de medios útiles en el cultivo *in vitro*.
2. ¿Para qué tipo de explantes se han utilizado los medios que se indicaron anteriormente?
3. ¿Que función tienen los componentes del medio de cultivo?
4. ¿Por qué regular el pH del medio de cultivo?
5. ¿Qué tipo de reactivos son el HCl y el NaOH y cuál es su función?

## Referencias documentales

- Hartman H. y Kester D. 1992. *Propagación de plantas principios y prácticas*. Editorial CECSA, México, D.F.
- Hurtado M. D. Merino M. E. 1987. *Cultivo de tejidos vegetales*. Editorial Trillas, México.
- Rojas G. M. Rovalo Merino M. 1982. *Fisiología vegetal experimental*. Editorial Limusa, México

## Practica número 3. Desinfestación de embriones y cultivo *in vitro* de especies forestales

### Introducción

El cultivo *in vitro* es una manera de experimentar la acción de diferentes factores sobre las células y los tejidos, aislándolos de los organismos vivos donde se encuentran y plantándolos en un medio de cultivo donde proliferan (Paniagua *et al.*, 1993).

### Objetivos

- Cultivar *in vitro* embriones de especies forestales para obtener plántulas con potencial para la propagación.
- Evaluar el efecto del medio sobre la germinación de embriones.

### Materiales

- 1 Vidrios de reloj.
- 1 Espátula.
- 1 Barra magnética.
- Etiquetas (masking).
- 2 Vaso de precipitado 200 ml.
- 1 Perilla.
- 2 Cajas Petri estériles.
- 1 Pinza de disección sin diente estéril.
- 1 Mango para bisturí.
- 1 Navaja para bisturí.
- 2 mecheros de alcohol.

### Equipo

- Balanza analítica.
- Parrilla con agitación magnética.
- Campana de flujo laminar.

### Reactivos

- Benzal.
- Alcohol etílico puro y al 70 %.
- Hipoclorito de sodio al 4 % o cloro comercial (Cloralex al 10 %).
- Agri-mycin 500.
- Medios de cultivo estériles.

### Material biológico

Semillas de especies forestales



## Procedimiento

### Disección de embriones

1. Colocar aproximadamente 100 semillas en un frasco con agua destilada y dejar remojando hasta que la testa se ablande (aproximadamente toda la noche, 12 horas).
2. Lavar con detergente y agua de la llave las semillas, colocar en un vaso de precipitado conteniendo agua destilada estéril y 0.1 g de Agri-mycin 500, agitar durante 20 minutos.
3. Eliminar la testa y separar los cotiledones.
4. Retirar cuidadosamente el embrión utilizando navajas de bisturí del número 11.

## Asepsia e inoculación de embriones

1. Dentro de la campana de flujo laminar, transferir los embriones a un matraz Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 90 ml de agua destilada estéril.
2. Adicionar 10 ml de Cloralex al 10 % y dejar en agitación durante 20 minutos.
3. Colectar los embriones en una gasa estéril colocada en la boca de un frasco de 500 ml.
4. Lavar los embriones con agua destilada estéril (5 veces).
5. Inocular dos embriones en cada frasco tipo Gerber conteniendo el medio correspondiente, incubar a 25° C en un cuarto de crecimiento.

## Medidas de bioseguridad

Tipo de desechos	Cómo descartarlos	Observaciones
Reactivos sobrantes no utilizables	Desecharlos poco a poco bajo chorro de agua en las tarjetas indicadas por el responsable del laboratorio	
Basura producida en la práctica (papel destraza, material vegetativo, gasas, algodón, cubreboca, guantes, etcétera)	Colocarla en el depósito de basura correspondiente en el laboratorio	

Equipos y reactivos	Uso y manejo	Observaciones
Reactivos como el HCl y el NaOH, Agri-mycin 500	Tener cuidado al manejarlos y realizar la preparación a utilizar	
Parrilla	Manejarla con cuidado, estar pendientes siempre de lo que se esté calentando o agitando	
Soluciones madre	Mantenerlas siempre bajo refrigeración y en frascos ámbar o en su defecto cubrirlos con papel aluminio, rotular siempre con fecha de elaboración	

**Cuestionario:**

1. ¿Se observa alguna diferenciación en los embriones que se cultivaron?
2. ¿Cuál es la finalidad de añadir aminoácidos al medio de cultivo?
3. Mencionar una aplicación de esta técnica en estudios de fisiología vegetal.
4. ¿Por qué considerar que se utilizó esta semilla?

**Referencias documentales**

- Hartman H. y Kester D. 1992. *Propagación de plantas. Principios y prácticas*. Editorial CECSA, México, D.F.
- Paniagua R. 1993. *Citología e histología vegetal y animal*. Editorial Interamericana, México.
- Rojas G. M. Rovalo Merino M. 1982. *Fisiología vegetal experimental*. Editorial Limusa, México.

## Práctica número 4. Preparación de medios selectivos para inducción de brotes en yemas axilares y apicales, enraizamiento y formación de callos *in vitro* utilizando fitorreguladores de crecimiento

### Introducción

Usando las sustancias químicas necesarias y las combinaciones apropiadas de nutrientes, así como una forma química adecuada, es posible establecer cultivos para casi todas las partes de una planta, en diversas especies vegetales (Edwin *et al.*, 1987; Arditti, 1993). Existen productos llamados fitorreguladores que al aplicarse a la planta o la semilla se absorben y afectan la fisiología de diversas maneras, que pueden ser ventajosas desde un punto de vista aplicado (Rojas y Rovalo, 1982).

### Objetivos

- Conocer la composición y las características de cada uno de los fitoreguladores del crecimiento útiles en los medios de cultivo.
- Identificar para que tipo de explantes se utilizan cada uno de los fitorreguladores existentes.

### Materiales

- 2 Vidrios de reloj.
- 1 Espátula.
- 2 Barras magnéticas.
- 2 Matraces Erlenmeyer de 100 ml.
- 1 Matraz Erlenmeyer de 500 ml.
- 2 Matraces aforados 100 ml.
- 1 Matraz aforado de 500 ml.
- Etiquetas (masking).
- 1 Probeta de 10 ml.
- 1 Pipeta graduada de 1 ml.
- 1 Pipeta graduada de 5 ml.
- 1 Vaso de precipitado 100 ml.
- 1 Perilla.
- 2 Cajas Petri.
- 1 Pinza de disección sin diente.
- 1 Mango para bisturí.
- 1 Navaja para bisturí.
- Frascos tipo Gerber.
- Tapas de polipropileno para los frascos tipo Gerber.
- Plumón indeleble.
- Papel estroza.
- Kleen pack.
- Papel aluminio.

## Equipo

- Balanza analítica.
- Balanza granataria.
- Parilla con agitación magnética.
- Potenciómetro.
- Autoclave.

## Reactivos

- Agar-agar.
- Vitaminas.
- Sacarosa o azúcar comercial.
- Agua destilada.
- Mioinositol 10 mg/L.
- NaOH y HCl al 1N.
- Reguladores del crecimiento.
- Más los utilizados en la preparación de soluciones madre (macroelementos, microelementos y quelatos).

## Procedimiento

Preparación de soluciones madre

### *Macroelementos*

- |  |        |
|--|--------|
| ● 10X= 100 ml (1 litro solución madre).                            |        |
| ● $\text{NH}_4\text{NO}_3$ (nitrato de amonio).                    | 16.5 g |
| ● $\text{KNO}_3$ (nitrato de potasio).                             | 19.0 g |
| ● $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (cloruro de calcio).   | 4.4 g  |
| ● $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (sulfato de magnesio). | 3.7 g  |
| ● $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (fosfato de potasio monobásico).        | 1.7 g  |

### *Microelementos*

- |   |        |
|---|--------|
| ● 100X= 10 ml (1 litro solución madre).                                     |        |
| ● KI (yoduro de potasio).   | 83 mg  |
| ● $\text{H}_3\text{BO}_3$ (ácido bórico).                                   | 620 mg |
| ● $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (sulfato de manganeso).         | 690 mg |
| ● $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (sulfato de zinc).              | 860 mg |
| ● $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (molibdato de sodio). | 25 mg  |
| ● $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (sulfato cúprico).              | 2.5 mg |
| ● $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (cloruro cobalto).              | 2.5 mg |

### *Quelatos*

- |  |         |
|--|---------|
| ● 100X= 10 ml (1 litro solución madre).                |         |
| ● $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . | 4 123 g |
| ● $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .          | 2 780 g |

*Vitaminas y compuestos orgánicos*

- 100X= 10 ml (1 litro solución madre).
- Tiamina HCL. 0.10 g
- Piridoxina HCL. 0.05 g
- Glicina (aminoácido). 0.20 g
- Ácido nicotínico. 0.05 g
- Mioinositol (carbohidrato). 10.0 g
- Reguladores del crecimiento (figura 4). 10 mg/100 ml de H<sub>2</sub>O destilada
  
- Diluir (HCL al 1N bases, NaOH al 1N ácidos).

**Preparación del medio MS (Murashige y Skoog, 1962) 1 litro**

1. Colocar 500 ml de agua destilada en un matraz aforado de 1 000 ml.
2. Posteriormente agregar 100 ml de macroelementos, 10 ml de microelementos, 10 ml de quelatos, vitaminas y compuestos orgánicos 10 ml, 30 g de sacarosa.
3. Una vez mezclado lo anterior, aforar a 1 000 ml.
4. Medir pH 5.6± 0.1, ajustar con una solución de hidróxido de sodio o de ácido clorhídrico al 1 N, una vez obtenido el pH deseado, agregar 8 g de agar.
5. Agregar reguladores del crecimiento.
6. Calentar (hervir 1 minuto)
7. Vaciar en frascos de cristal (40 frascos) tapar y etiquetar.
8. Esterilizar a 15 libras durante 15 minutos, dejar solidificar, sellar con kleen pack y colocar en lugar fresco por tres días.



Figura 4. Preparación de fitorreguladores.

Una vez preparado el medio de cultivo adicionado con los fitorreguladores y después de pasar la prueba de esterilidad, es necesario manipularlos dentro de la campana de flujo laminar con material estéril (figura 5).



Figura 5. Material estéril utilizado en la cámara de flujo laminar.

### Medidas de bioseguridad

Tipo de desechos	Cómo descartarlos	Observaciones
Reactivos sobrantes no utilizables	Desecharlos poco a poco bajo chorro de agua en las tarjas indicadas por el responsable del laboratorio	
Basura producida en la práctica (papel destroza, material vegetativo, gasas, algodón, cubreboca, guantes, etcétera)	Colocarla en el depósito de basura correspondiente en el laboratorio	

Equipos y reactivos	Uso y manejo	Observaciones
Reactivos como el HCl y el NaOH	Tener cuidado al manejarlos y realizar la preparación a utilizar	
Parrilla y autoclave	Manejarlas con cuidado, estar pendientes siempre de lo que se esté agitando, calentando o esterilizando	
Soluciones madre	Mantenerlas siempre bajo refrigeración y en frascos ámbar o en su defecto cubrirlos con papel aluminio, rotular siempre con fecha de elaboración	

## **Cuestionario**

1. ¿Cuál es la función de la sacarosa?
2. Mencionar y clasificar los diferentes fitorreguladores del crecimiento útiles en la micropropagación y enunciar la función de cada uno de ellos.
3. Esquematizar la fórmula química de los fitorreguladores utilizados.
4. ¿Qué concentraciones se usaron de cada fitorregulador?

## **Referencias documentales**

Arditti B. B.; Joseph y E. Robert. 1993. *Micropropagación de orquídeas*. John Wiley & Sons. Inc. New York, USA.

Edwin, F. G., Ph, D., Puttock, B., D, J. M. and Heather, J. G. 1987. *Plant culture media*. Volumen 1 (formulations and usos), Ed. Exegetics Limited, England P: 12, 420-421.

Hartman H. y Kester D. 1992. *Propagación de plantas. Principios y prácticas*. Editorial CECSA, México, D.F.

Rojas G. M. Rovalo Merino M. 1982. *Fisiología vegetal experimental*. Editorial Limusa, México.

## Práctica número 5. Cultivo de meristemos apicales y axilares para la formación de brotes y raíces aplicando fitorreguladores

### Introducción

En fisiología vegetal se ha utilizado la técnica de cultivo de tejidos, órganos y células vegetales que consisten en cultivar en medios nutritivos adecuados y de forma aséptica, ápice de las raíz y de tallo, primordios de la hoja, primordios o partes inmaduras de las flores, frutos inmaduros, órganos aislados, embriones maduros o inmaduros, segmentos de órganos de tallo, hoja y algunas veces ovarios, óvulos, anteras y polen (Hurtado y Merino, 1987).

### Objetivos

- Observar el efecto de los fitorreguladores sobre la formación de brotes y raíces en los meristemos axilares y apicales.
- Evaluar el efecto de los fitorreguladores del crecimiento en los explantes utilizados.

### Materiales

- 1 Vidrios de reloj.
- 1 Espátula.
- 1 Barra magnética.
- Etiquetas (masking).
- 2 Vaso de precipitado 200 ml.
- 1 Perilla.
- 2 Cajas Petri estériles.
- 1 Pinza de disección sin diente estéril.
- 1 Mango para bisturí.
- 1 Navaja para bisturí.
- 2 Mecheros de alcohol.

### Equipo

- Balanza analítica.
- Parrilla con agitación magnética.
- Campana de flujo laminar.

### Reactivos

- Benzal.
- Alcohol etílico puro y al 70 %.
- Hipoclorito de sodio al 4 % o cloro comercial (Cloralex al 10 %).
- Agri-mycin 500.
- Medios de cultivo estériles.



## Material biológico

Meristemos axilares y apicales de especies forestales (figura 6)



Figura 6. Meristemos utilizados para la formación de brotes y raíces.

## Procedimiento

Desinfestación y siembra *in vitro* del explante

1. Para la desinfestación de los explantes (yemas apicales, axilares), se lavarán con agua corriente; en seguida se sumergirán por 15 minutos en una solución al 1% de Agri-mycin 500 y detergente, enjuagándose 3 veces con agua destilada estéril.
2. Posteriormente se sumergirán en etanol al 70 % durante 5 minutos, se enjuagarán 4 veces con agua destilada estéril.
3. Finalmente se colocarán en una solución de cloro comercial al 10 % o hipoclorito de sodio al 4 % durante 20 minutos y se enjuagarán 6 veces con agua destilada estéril y se colocarán en una caja Petri (90 x 20 mm) estéril.
4. Una vez que los explantes se desinfestan bajo condiciones asépticas, se sembrarán en frascos de cristal conteniendo 25 ml del medio.
5. Los instrumentos a utilizar (pinzas, bisturís y tijeras de disección) previamente esterilizados, se sumergirán en etanol al 96 % y se flamearán antes del corte y siembra de cada inóculo en el medio de cultivo.
6. Dentro de una campana de flujo laminar, se utilizará una pinza de disección sin dientes, estéril, la cual se sumergirá en etanol al 96 %. Antes de tomar los explantes se flamea y enfría en el medio de cultivo.
7. El material vegetativo se maneja bajo condiciones asépticas.
8. Se distribuye un segmento de 1 cm del explante sobre el medio de cultivo contenido en el frasco, cerrando y sellando los frascos con kleen pack, y se etiquetan para su posterior incubación.

9. Después de transplantar los inóculos en el medio de cultivo, los frascos se taparán con tapas de polipropileno y se sellarán con kleen pack.
10. La incubación será dentro de una cámara bioclimática con control de temperatura y fotoperiodo. La temperatura de incubación será de  $25^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$  y el fotoperiodo 16/8 horas luz/oscuridad a una intensidad lumínica 1 800 lux.

### Medidas de bioseguridad

Tipo de desechos	Cómo descartarlos	Observaciones
Reactivos sobrantes no utilizables	Desecharlos poco a poco bajo un chorro de agua en las tarjas indicadas por el responsable del laboratorio	
Basura producida en la práctica (papel destroza, material vegetativo, gasas, algodón, cubreboca, guantes, etcétera)	Colocarla en el depósito de basura correspondiente en el laboratorio	

Equipos y reactivos	Uso y manejo	Observaciones
Reactivos como el HCl y el NaOH, Agri-mycin 500	Tener cuidado al manejarlos y realizar la preparación a utilizar	
Parrilla y autoclave	Manejarlas con cuidado, estar pendientes siempre de lo que se esté agitando, calentando o esterilizando	
Soluciones madre	Mantenerlas siempre bajo refrigeración y en frascos ámbar o en su defecto cubrirlos con papel aluminio, rotular siempre con fecha de elaboración	

### Cuestionario

1. ¿Qué fitorregulador presenta mayor acción en los explantes utilizados?
2. Escribir la definición de meristemo axilar y meristemo apical, brote y raíz.
3. ¿Cuál es la diferencia entre meristemo axilar y apical?
4. ¿Por qué usar especies forestales?

### **Referencias documentales**

- Hartman H. y Kester D. 1992. *Propagación de plantas. Principios y prácticas*. Editorial CECSA, México, D.F.
- Hurtado M. D. Merino M. E. 1987. *Cultivo de tejidos vegetales*. Editorial Trillas, México.
- Rojas G. M. Rovalo Merino M. 1982. *Fisiología vegetal experimental*. Editorial Limusa, México.

## Práctica número 6. Efecto de fitorreguladores en la formación de callos a partir de hojas de especies forestales

### Introducción

Los fitorreguladores son considerados generalmente como sustancias producidas en pequeñas cantidades en una parte de un organismo y transportadas a otras partes del mismo, en donde ejercen marcados efectos sobre el metabolismo y su crecimiento (Greulach, 1990).

### Objetivos

- Observar el efecto de los fitorreguladores sobre la formación de callos en hojas de especies forestales.
- Evaluar el efecto de los fitorreguladores del crecimiento en el explante utilizado.

### Materiales

- 1 Vidrios de reloj.
- 1 Espátula.
- 1 Barra magnética.
- Etiquetas (masking).
- 2 Vasos de precipitado 200 ml.
- 1 Perilla.
- 2 Cajas Petri estériles.
- 1 Pinza de disección sin diente estéril.
- 1 Mango para bisturí.
- 1 Navaja para bisturí.
- 2 Mecheros de alcohol.

### Equipo

- Balanza analítica.
- Parrilla con agitación magnética.
- Campana de flujo laminar.

### Reactivos

- Benzal
- Alcohol etílico puro y al 70 %.
- Hipoclorito de sodio al 4 % o cloro comercial (Cloralex al 10 %).
- Agri-mycin 500.
- Medios de cultivo estériles.

### Material biológico

Hojas de especies forestales cultivadas *in vitro*

## Procedimiento

### Desinfección y siembra *in vitro* del explante

1. Para la desinfección de los explantes (hojas), se lavarán con agua corriente; en seguida se sumergirán por 15 minutos en una solución al 1 % de Agri-mycin 500 y detergente, enjuagándose 3 veces con agua destilada estéril.
2. Posteriormente se sumergirán en etanol al 70 % durante 5 minutos, se enjuagarán 4 veces con agua destilada estéril.
3. Finalmente se colocarán en una solución de cloro comercial al 10 % o hipoclorito de sodio al 4 % durante 20 minutos y se enjuagarán 6 veces con agua destilada estéril y se colocarán en una caja Petri (90 x 20 mm) estéril.
4. Una vez que los explantes se desinfectan bajo condiciones asépticas, se sembrarán en frascos de cristal conteniendo 25 ml del medio.
5. Los instrumentos a utilizar (pinzas, bisturís y tijeras de disección) previamente esterilizados, se sumergirán en etanol al 96 % y se flamearán antes del corte y siembra de cada inóculo en el medio de cultivo.
6. Dentro de una campana de flujo laminar, se utilizará una pinza de disección sin dientes, estéril, la cual se sumergirá en etanol al 96 %. Antes de tomar el explante se flamea y enfría en el medio de cultivo.
7. El material vegetativo se maneja bajo condiciones asépticas.
8. Se distribuye un segmento de 1 cm del explante sobre el medio de cultivo contenido en el frasco, cerrando y sellando los frascos con kleen pack, y se etiquetan para su posterior incubación.
9. Después de transplantar los inóculos en el medio de cultivo, los frascos se taparan con tapas de polipropileno y se sellaran con kleen pack.
10. La incubación será dentro de una cámara bioclimática con control de temperatura y fotoperiodo. La temperatura de incubación será de  $25^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$  y el fotoperiodo 16/8 horas luz/oscuridad a una intensidad lumínica 1 800 lux.

## Medidas de bioseguridad

Tipo de desechos	Cómo descartarlos	Observaciones
Reactivos sobrantes no utilizables	Desecharlos poco a poco bajo chorro de agua en las tarjas indicadas por el responsable del laboratorio	
Basura producida en la práctica (papel destroza, material vegetativo, gasas, algodón, cubreboca, guantes, etcétera)	Colocarla en el depósito de basura correspondiente en el laboratorio	

Equipos y reactivos	Uso y manejo	Observaciones
Reactivos como el HCl y el NaOH, Agri-mycin 500	Tener cuidado al manejarlos y realizar la preparación a utilizar	
Parrilla	Manejarlas con cuidado, estar pendientes siempre de lo que se esté agitando y calentando	
Soluciones madre	Mantenerlas siempre bajo refrigeración y en frascos ámbar o en su defecto cubrirlos con papel aluminio, rotular siempre con fecha de elaboración	

## Cuestionario

1. ¿Qué fitorregulador presenta mayor acción en el explante utilizado?
2. Anotar la definición de callo
3. ¿Por qué usar hojas y no otro tipo de explante?

## Referencias documentales

- Hartman H. y Kester D. 1992. *Propagación de plantas principios y prácticas*. Editorial CECSA, México, D.F.
- Hurtado M. D. Merino M. E. 1987. *Cultivo de tejidos vegetales*. Editorial Trillas, México.
- Greulach V. 1990. *Las plantas. Introducción a la botánica moderna*. Editorial Limusa, México.

## Práctica número 7. Organogénesis mediante raíces de orquídeas

### Introducción

La organogénesis se ha observado de manera más rápida y más frecuente en especies herbáceas (Wolter, 1968). También se puede iniciar con raíces la emisión de brotes, siendo la organogénesis más común el fenómeno más confinado a especies que enraízan en esquejes en diferentes prácticas hortícolas comunes y la iniciación de brotes se da por un adecuado balance hormonal reconociendo el papel de la aplicación de las citocininas (Street, 1977; Dodds y Roberts, 1982).

### Objetivos

- Observar el efecto de los fitorreguladores sobre la organogénesis en raíces de orquídeas.
- Evaluar el efecto de los fitorreguladores del crecimiento en las raíces de orquídeas.

### Materiales

- 1 Vidrios de reloj.
- 1 Espátula.
- 1 Barra magnética.
- Etiquetas (masking).
- 2 Vasos de precipitado 200 ml.
- 1 Perilla.
- 2 Cajas Petri estériles.
- 1 Pinza de disección sin diente estéril.
- 1 Mango para bisturí.
- 1 Navaja para bisturí.
- 2 Mecheros de alcohol.

### Equipo

- Balanza analítica.
- Parilla con agitación magnética.
- Campana de flujo laminar.

### Reactivos

- Benzal.
- Alcohol etílico puro y al 70 %.
- Hipoclorito de sodio al 4 % o cloro comercial (Cloralex al 10 %).
- Agri-mycin 500.
- Medios de cultivos estériles.

### Material biológico

Raíces de orquídeas cultivadas *in vitro* (figura 7)



Figura 7. Raíces de vainilla cultivada *in vitro*.

## Procedimiento

Desinfestación y siembra *in vitro* del explante

1. Para la desinfestación de los explantes (raíces), se lavarán con agua corriente; en seguida se sumergirán por 15 minutos en una solución al 1 % de Agri-mycin 500 y detergente, enjuagándose 3 veces con agua destilada estéril.
2. Posteriormente se sumergirán en etanol al 70 % durante 5 minutos, se enjuagarán 4 veces con agua destilada estéril.
3. Finalmente se colocarán en una solución de cloro comercial al 10 % o hipoclorito de sodio al 4 % durante 20 minutos y se enjuagarán 6 veces con agua destilada estéril y se colocarán en una caja Petri (90 x 20 mm) estéril.
4. Una vez que los explantes se desinfectan bajo condiciones asépticas, se sembrarán en frascos de cristal conteniendo 25 ml del medio.
5. Los instrumentos a utilizar (pinzas, bisturís y tijeras de disección) previamente esterilizados, se sumergirán en etanol al 96 % y se flamearán antes del corte y siembra de cada inóculo en el medio de cultivo.
6. Dentro de una campana de flujo laminar, se utilizará una pinza de disección sin dientes, estéril, la cual se sumergirá en etanol al 96 %. Antes de tomar los explantes se flamea y enfría en el medio de cultivo.



7. El material vegetativo se maneja bajo condiciones asépticas.
8. Se distribuye un segmento de 1 cm del explante sobre el medio de cultivo contenido en el frasco, cerrando y sellando los frascos con kleen pack, y se etiquetan para su posterior incubación.
9. Después de trasplantar los inóculos en el medio de cultivo, los frascos se taparán con tapas de polipropileno y se sellarán con kleen pack.
10. La incubación será dentro de una cámara bioclimática con control de temperatura y fotoperiodo. La temperatura de incubación será de  $25^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$  y el fotoperiodo 16/8 horas luz/oscuridad a una intensidad lumínica 1 800 lux.

### Medidas de bioseguridad

Tipo de desechos	Cómo descartarlos	Observaciones
Reactivos sobrantes no utilizables	Desecharlos poco a poco bajo chorro de agua en las tarjas indicadas por el responsable del laboratorio	
Basura producida en la práctica (papel destroza, material vegetativo, gasas, algodón, cubreboca, guantes, etcétera)	Colocarla en el depósito de basura correspondiente en el laboratorio	

Equipos y reactivos	Uso y manejo	Observaciones
Reactivos como el HCl y el NaOH, Agri-mycin 500	Tener cuidado al manejarlos y al realizar la preparación a utilizar	
Parrilla	Manejarlas con cuidado, estar pendientes siempre de lo que se esté agitando y calentando	
Soluciones madre	Mantenerlas siempre bajo refrigeración y en frascos ámbar o en su defecto cubrirlos con papel aluminio, rotular siempre con fecha de elaboración	

### **Cuestionario**

1. ¿Qué fitorregulador presenta mayor acción en el explante utilizado?
2. Mencionar los tipos de organogénesis y en qué consiste cada una de ellas.
3. ¿Por qué usar raíces de orquídeas cultivadas *in vitro*?

### **Referencias documentales**

- Dodds, J. H. and Roberts, L. W. 1982. *Experiments in plant tissue culture*. Cambridge University Press. Pp. 79-97
- Hurtado M. D. Merino M. E. 1987. *Cultivo de tejidos vegetales*. Editorial Trillas, México.
- Street, H. E. 1977. "The anatomy and physiology of morphogenesis. Studies in involving tissue and cell cultures". En: *La culture destisus des vegetaux. Resultats geneaux et realisations practiques* (Ed) Gautheret, R. J. Paris, Masson et. Cie Pp. 29-33.
- Wolter, K. E. 1963. *Root and shoot. Initiation in aspen callus cultures*. Nature 219: 509-510.

## Práctica número 8. Cambio de sustrato y aclimatación de plántulas cultivadas *in vitro*

### Introducción

Sin duda la transferencia de plantas obtenidas *in vitro* al suelo es una de las etapas más importantes y críticas dentro del proceso de la micropropagación, ya que de esta etapa depende el éxito o el fracaso del trabajo realizado en el laboratorio en cuanto a la obtención de plantas *in vitro*. Al realizar el trasplante de plantas obtenidas del suelo es necesario controlar ciertos factores ambientales, seguir ciertas recomendaciones y cuidados para lograr un alto índice de sobrevivencia, sobre todo cuando las plantas obtenidas son de gran valor económico (Aguilar; García y Rodríguez, 2007).

### Objetivos

- Observar el efecto de los sustratos, la temperatura y la humedad en las diferentes plántulas a aclimatar.
- Evaluar la aclimatación de las plántulas en los sustratos a utilizar.

### Materiales

- 1 Vidrios de reloj.
- 1 Espátula.
- 1 Barra magnética.
- Etiquetas (masking).
- 2 Vasos de precipitado 200 ml.
- 2 Cajas Petri estériles.
- 1 Pinza de disección sin diente estéril.
- Tijeras.
- 10 bolsas de polipapel de 25 x 35 cm.
- 10 vasos de unicel del núm. 10.
- 10 popotes de 20 cm de longitud.
- 2 recipientes de 1 000 ml.
- 25 ligas.
- Agrolita.
- Vermiculita.
- Peat-moss.

### Equipo

- Balanza analítica.
- Balanza granataria.
- Parilla con agitación magnética.

### Reactivos

- Captan.
- Agri-mycin 500.
- Agua.

## Material biológico

Plántulas cultivadas *in vitro* (figura 8a y 8b)



Figura 8. a) Plántulas cultivadas *in vitro*

b) Aclimatación de las plántulas cultivadas *in vitro*.

## Procedimiento

Se utilizarán dos tratamientos uno compuesto de 50 % de Peat-moss y 50 % de Agrolita y el otro de 50 % de Peat-moss y 50 % de Vermiculita.

1. Sacar las plántulas cultivadas *in vitro* del frasco donde se encuentran y eliminar el agar con agua de la llave.
2. Sumergir a la planta completa en una solución de Agri-mycin 500 al 1 % durante 3 minutos.
3. Sacar las plántulas de la solución fungicida y transplantar en el vaso de unicel que contiene el sustrato húmedo estéril.
4. Colocar el vaso de unicel con la nueva plántula en una bolsa de polipapel.
5. Colocar un popote dentro del vaso de unicel, en la orilla, sumergiéndolo en el sustrato 3 cm.
6. Cerrar la bolsa completamente con una liga, procurando que no tenga contacto con la plántula.
7. Etiquetar la bolsa para su identificación.

Para aclimatar las plantas transplantadas dentro del mismo laboratorio, a un lado de una ventana se simularán las condiciones de un invernadero, donde:

- a) Las condiciones ambientales en que permanecerán las plántulas transplantadas serán: la temperatura de  $25^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$  y el fotoperiodo 16/8 horas luz/oscuridad a una intensidad lumínica 1 800 lux.
- b) Una semana después del transplante al suelo, la bolsa se va a abrir 3 cm por la parte de la cavidad principal, esto para reducir la humedad relativa dentro de la misma y así ayudar a la aclimatación de la planta en condiciones *in vitro*, además de evitar la proliferación de hongos en el sustrato o en la plántula.
- c) En la segunda semana después del transplante a suelo se deberá realizar un riego, con una solución que contenga los nutrientes de la fórmula salina de Murashige y Skoog (MS, 1962) al 50 %.

- d) En la tercera semana después del trasplante a suelo, la bolsa se abrirá completamente y se aplicará otro riego igual al anterior.
- e) A la cuarta semana después del trasplante al suelo, la bolsa se retirará completamente y se realizarán riegos iguales cada seis días.

### Medidas de bioseguridad

Tipo de desechos	Cómo descartarlos	Observaciones
Reactivos sobrantes no utilizables	Desecharlos poco a poco bajo chorro de agua en las tarjas indicadas por el responsable del laboratorio	
Basura producida en la práctica (papel destroza, material vegetativo, gasas, algodón, cubreboca, guantes, etcétera)	Colocarla en el depósito de basura correspondiente en el laboratorio	

Equipos y reactivos	Uso y manejo	Observaciones
Reactivos como el HCl y el NaOH, Agri-mycin 500, Captan	Tener cuidado al manejarlos y al realizar la preparación a utilizar	
Parrilla	Manejarlas con cuidado, estar pendientes siempre de lo que se esté agitando y calentando	
Soluciones madre	Mantenerlas siempre bajo refrigeración y en frascos ámbar o en su defecto cubrirlos con papel aluminio, rotular siempre con fecha de elaboración	

### Cuestionario:

1. ¿Qué sustrato es el óptimo para la aclimatación de las especies utilizadas y por qué?
2. Mencionar la composición de los tres sustratos utilizados.
3. ¿Qué temperatura fue la óptima para cada especie utilizada?
4. ¿Qué factor es el más importante en la aclimatación de plantas cultivadas in vitro?

### Referencias documentales

- Hartman H. y Kester D. 1992. *Propagación de plantas. Principios y prácticas*. Editorial CECSA, México, D.F.
- Rojas G. M. Rovalo Merino M. 1982. *Fisiología vegetal experimental*. Editorial Limusa, México.
- Rodríguez- De la o J.L., J. R. García y N. D. Aguilar. 2007. *Cultivo in vitro de células, tejidos y órganos vestales*. Manual de Prácticas. Universidad Autónoma de Chapingo. México, D. F.

## *Rectoría*

Ing. Roberto Domínguez Castellanos  
RECTOR

Dr. José Rodolfo Calvo Fonseca  
SECRETARIO GENERAL

C.P. Miriam Matilde Solís Domínguez  
AUDITORA GENERAL

Lic. Adolfo Guerra Talayero  
ABOGADO GENERAL

Mtro. Pascual Ramos García  
DIRECTOR DE PLANEACIÓN

Mtro. Florentino Pérez Pérez  
SECRETARIO ACADÉMICO

Dra. María Adelina Schlie Guzmán  
DIRECTORA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

Lic. María de los Ángeles Vázquez Amancha  
ENCARGADA DE LA DIRECCIÓN DE EXTENSIÓN UNIVERSITARIA

Lic. Ricardo Cruz González  
DIRECTOR DE ADMINISTRACIÓN

L.R.P. Aurora Evangelina Serrano Roblero  
DIRECTORA DE SERVICIOS ESCOLARES

Mtra. Brenda María Villarreal Antelo  
DIRECTORA DE TECNOLOGÍAS DE INFORMACIÓN Y COMUNICACIONES

Lic. Noé Fernando Gutiérrez González  
DIRECTOR DEL CENTRO UNIVERSITARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN

## *Dependencias de Educación Superior*

Mtro. Jesús Manuel Grajales Romero  
DIRECTOR DE OFERTA EDUCATIVA REGIONALIZADA

L.G. Tlayuhua Rodríguez García  
DIRECTORA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN Y ALIMENTOS

Dr. Ernesto Velázquez Velázquez  
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Mtro. Alberto Ballinas Solís  
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS ODONTOLÓGICAS Y SALUD PÚBLICA

Mtro. Martín de Jesús Ovalle Sosa  
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS HUMANAS

Dr. José Armando Velasco Herrea  
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE INGENIERÍA

Antrop. Julio Alberto Pimentel Tort  
DIRECTOR DEL CENTRO DE ESTUDIO SUPERIORES EN ARTES

Dr. Alain Basail Rodríguez  
DIRECTOR DEL CENTRO DE ESTUDIOS SUPERIORES DE MÉXICO Y CENTROAMÉRICA (CESMECA)

Dra. Silvia Guadalupe Ramos Hernández  
DIRECTORA DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN GESTIÓN DE RIESGOS Y CAMBIO CLIMÁTICO

Lic. Jorge Luis Taveras Ureña  
COORDINADOR DEL CENTRO DE LENGUAS

**Colección  
Jaguar**



**UNICACH**

## **Manual de prácticas de fisiología vegetal avanzada**

Se terminó de imprimir en el mes de junio de 2013, con un tiraje de 300 ejemplares, en los Talleres de Ediciones de la Noche, Madero núm. 687, 44100, Guadalajara, Jalisco. Teléfono: 33-3825-1301. El diseño tipográfico estuvo a cargo de Luis Felipe Morgan Vázquez, la corrección de Luciano Villarreal Rodas y el cuidado de la edición de la Oficina Editorial de la UNICACH, durante el rectorado del Ing. Roberto Domínguez Castellanos.