

PROYECTO FINAL DE INGENIERÍA

DESARROLLO Y PUESTA A PUNTO DE LA MICROPROPAGACION DE *ARABIDOPSIS THALIANA*

Iruretagoyena, Santiago – LU1036247

Licenciatura en Biotecnología

Tutor:

Cámara, María de los Milagros, Fundación UADE

MARZO 19, 2018



**UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA
FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS**

Este proyecto no hubiese sido posible sin el apoyo, paciencia y colaboración de:

Sabino, Claudia, Maite y toda mi familia entera.

Mili Cámara.

Guille, Nacho, Pablo, Nati y todo el equipo de UADE Labs.

Mica, Fran y Juli.

Fede Espinosa.

Fede Prada.

Romina Gargarello, Mitar Begenisic y Mariana Daccorso.

Todos mis compañeros y amigos que me dio la facultad.

Mis amigos de mi Macachín querido.

Mis compañeros de trabajo.

A todos ellos ¡Gracias!

Resumen.

En la primera parte del presente trabajo se sientan las bases generales de la micropropagación como así de todo tipo de cultivos de tejidos vegetales. Explicando a partir de la preparación y selección de la planta donante de explantes, siguiendo por la elección y desinfección de estos y posteriormente se hace foco en la morfogénesis, desde la formación de un callo celular hasta el enraizamiento de este y la aparición de brotes adventicios terminando en la aclimatación de la planta resultante.

Se detalla la función de hormonas vegetales auxinas y citocininas, su rol dentro de los cultivos de tejidos vegetales y cuáles de estas fueron utilizadas en el presente trabajo. Al mismo tiempo se hace referencia a *Arabidopsis thaliana* y *Nicotina tabacum L*, especies utilizadas como organismos modelos dentro de las ciencias biológicas y en este trabajo.

Se detallan las generalidades de un sistema de cultivo hidropónico, los componentes nutricionales del mismo y como afecta al normal desarrollo del cultivo la ausencia de cada uno de ellos.

En la segunda parte del trabajo se hace referencia a la parte experimental la cual comprende los materiales utilizados, hormonas, vitaminas, medios de cultivos, soluciones y también se establece la metodología a seguir, su puesta a punto y los resultados obtenidos en la micropropagación de las especies mencionadas y paralelamente, su desarrollo en un cultivo hidropónico bajo diferentes condiciones nutricionales.

Abstract.

In the first part of the present work, the general bases of micropropagation **are felt** as well as of all types of vegetable tissue cultures. Explaining from the preparation and selection of the explants donor plant, following the choice and disinfection of these and then focus on morphogenesis, **from the formation of a cell callus to the rooting of this and the emergence of adventitious buds ending in the acclimatization of the resulting plant.**

The role of plant hormones auxins and cytokinins, their role in plant tissue cultures and which of these were used in the present work is detailed. At the same time reference is made to *Arabidopsis thaliana* and *Nicotina tabacum L*, species used as model organisms within the biological sciences and in this work.

The generalities of a hydroponic culture system, its nutritional components and how the normal development of the crop affects the absence of each of them are detailed.

In the second part of the work, reference is made to the experimental part which includes the materials used, hormones, vitamins, culture media, solutions and also **establishes** the methodology to be followed, its development and the results obtained in the micropropagation of the mentioned species and, in parallel, their development in a hydroponic culture under different nutritional conditions.

Contenido.

Resumen.	3
Abstract.	4
Introducción.	7
Hormonas vegetales.	11
Auxina.	12
Citocininas.	13
Modelos vegetales.	14
<i>Arabidopsis thaliana</i> .	14
<i>Nicotina tabacum L.</i>	15
Hidroponía.	17
Solución hidropónica.	17
Función de los elementos esenciales.	19
Macronutrientes.	19
Nitrógeno (N).	19
Fósforo (P).	20
Potasio (K).	20
Magnesio (Mg).	21
Azufre (S).	21
Calcio (Ca).	21
TABLA II: Resumen macronutrientes.	22
Micronutrientes.	23
Hierro (Fe).	23
Manganeso (Mn).	23
Zinc (Zn).	23
Boro (B).	24
Molibdeno (Mo).	24
Cloro (Cl).	24
TABLA III: Resumen micronutrientes.	25
Antecedentes.	26
Materiales.	27

Auxina.	27
Citoquinina.	27
Solución stock de hormonas.	27
Medios de cultivo.	27
Medio basal Murashige and Skoog (MS).	27
Medio basal Murashige and Skoog (MS) suplementado con vitaminas de Gamborg.	29
TABLA IV: Vitaminas de Gamborg.	29
Stock de Sacarosa.	31
Medio de germinación.	31
Medio 1. Medio de establecimiento.	31
Medio 2. Medio de multiplicación.	31
Medio 3. Medio de enraizamiento.	32
Sustrato tierra.	32
Contenedor hidropónico.	33
Soluciones hidropónicas.	34
Metodología.	36
Esterilización de semillas.	36
Micropropagación.	36
Hidroponía.	38
Resultados.	40
Micropropagación.	40
Hidroponía.	48
Conclusiones.	52
Referencias.	53

Introducción.

La micropropagación es una de las principales aplicaciones dentro de los cultivos de tejidos vegetales. Estos juegan un rol importante en el mejoramiento vegetal ya que posibilita la obtención de un elevado número de plantas a partir de un único genotipo seleccionado, que en ocasiones puede tener una tasa de multiplicación limitada, de manera uniforme y reproducible lo que los hace aplicable a escala comercial (Gimnos, et al 2004).

Independientemente de la forma empleada, en todos los cultivos de tejidos vegetal se dan etapas bien definidas que varían levemente de técnica a técnica y otras que en ocasiones son comunes a todas.

La primera de las etapas es la fase 0 o fase preparativa. Es una fase fundamental para el desarrollo de un esquema de trabajo eficiente y repetible. Tiene una marcada influencia sobre la calidad posterior de las plantas resultantes del proceso desde el punto de vista sanitario, fisiológico y genético (Debergh & Maene, 1981).

Esta etapa comprende la selección de las plantas donantes. Cualquier proceso puede carecer de sentido si se emplea un material de partida inadecuado, para la mayoría de las plantas micropropagadas el material inicial es una planta élite seleccionada, sana y de crecimiento activo. Esto puede no cumplirse en ocasiones en donde el objetivo del cultivo sea la preservación de una especie amenazada o de multiplicación limitada, o por alguna cualidad intrínseca al organismo independientemente de cuál sea su estado general.

No solo importa las características genotípicas del material de partida, sino que también se hace foco en todo el estado fisiológico general. El éxito de los sistemas de propagación de plantas por técnicas biotecnológicas depende en gran medida del control y prevención de la contaminación microbiana. La fuente de contaminación primaria en los cultivos *in vitro* proviene en la mayoría de las veces de la planta madre. Si se logra establecer un explante sin transmisión de contaminantes, toda propagación posterior que no sea la del material en estudio será debida a errores de procedimiento. Por este motivo se tiende a uniformar y lograr un buen estado fisiológico de las plantas que serán micropropagadas mediante el crecimiento en ambientes higiénicos controlados.

La segunda etapa denominada como fase 1 consiste en la elección de explante y la desinfección de este para dar inicio a un cultivo axénico. (Roca y Mroginski, 1991).

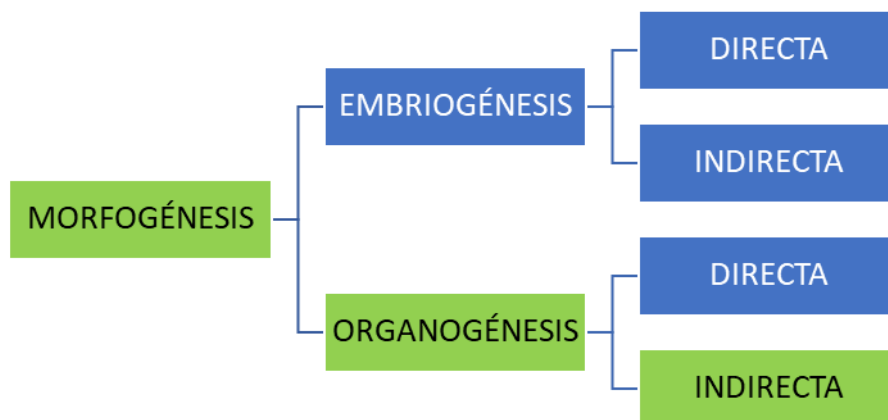
Un cultivo de tejido vegetales puede iniciarse a partir de diferentes órganos, independientemente del tipo de tejido que lo forme, aunque este junto con el tamaño y la edad de la planta madre son factores muy influyentes en el posterior desarrollo del explante. Los que son extraídos de plantas jóvenes o zonas de crecimiento activas tienen un mejor desarrollo que aquellos tomados de plantas adultas o tejido en reposo, esto se da porque cuando menos diferenciado este el tejido, mejor se va a establecer por lo que mejora la respuesta *in vitro* (Villalobos y García, 1982). El tamaño influye en la correcta desinfección y regeneración de plantas. A medida que el explante es más pequeño es menor el riesgo de contaminación pero más difícil su regeneración, a diferencia de que a mayor tamaño del explante es más difícil una correcta desinfección pero más fácil el establecimiento y regeneración del mismo. **La edad de la planta también influye**, es más difícil de desinfectar explantes de plantas jóvenes que explantes adultos (Mroginski y otros, 2004). Para la eliminación de microorganismos contaminantes los explantes son desinfectados superficialmente. El procedimiento para la desinfección superficial debe permitir eliminar los microorganismos con el menor daño posible para los explantes.

La tercer etapa o fase 2 **es la multiplicación del material y morfogénesis *in vitro* a partir de un explante**. La morfogénesis son todos los cambios morfológicos que ocurren como resultado de cambios estructurales o de organización durante el desarrollo de un organismo. Esta etapa se desarrolla de diferentes formas según sea mediante embriogénesis somática directa o indirecta u organogénesis directa o indirecta.

La organogénesis es la formación órganos, raíces y brotes adventicios, *de novo* a partir de explantes cultivados *in vitro*. La embriogénesis somática consiste en la formación de embriones a partir de células somáticas las cuales al germinar dan origen a individuos completos. Ambos procesos tienen como material de partida células somáticas provenientes de la planta a micropropagar o planta madre. Una yema, producto de la organogénesis, es una estructura monopolar que desarrolla una conexión con el tejido vascular preexistente disperso en el callo o el explante cultivado, en cambio un embrión somático es una estructura bipolar que no posee

conexión vascular con el tejido del explante o callo. Que la embriogénesis somática o la organogénesis, y por lo tanto entonces la morfogénesis sea directa o indirecta se debe a que, si la proliferación de brotes axilares o la formación de embriones somáticos se producen directamente a partir de los tejidos de partida, es decir de forma directa, o si se da mediante el establecimiento del explante en un medio de cultivo con la subsecuente proliferación celular a través de la formación de un callo, es decir de forma indirecta. Como se explica luego, en este trabajo se buscó la micropropagación mediante organogénesis indirecta.

Tabla I: Rutas morfogénicas.



El callo es una a masa de células desdiferenciadas de crecimiento continuo y desorganizado provenientes del aislamiento de órganos o tejidos vegetales. Se produce naturalmente ante una herida, son un mecanismo de cicatrización vegetal.

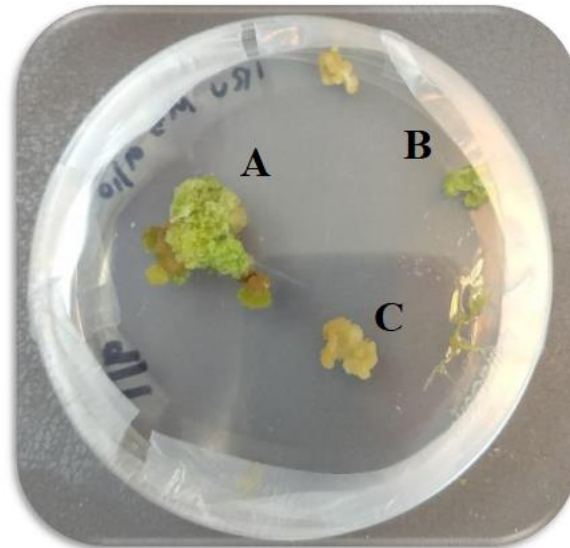


Figura 1: Callo celular en crecimiento desorganizado (A). Callo celular con poco grado de desarrollo (B). Callo celular inviable (C).

No todas las células tienen capacidad organogénica o embriogénica, aquellas que la tienen son llamadas células competentes. Durante el proceso de morfogénesis las células competentes reciben el estímulo y esto hace que el tejido se desdiferencie para luego dispararse el inicio de la organogénesis o embriogénesis según el estímulo que se le haya proporcionado. Luego las células de dicho tejido sufren sucesivas divisiones formando el callo que posteriormente dará origen al embrión o los órganos.

El proceso de desdiferenciación y diferenciación depende del balance entre auxinas y citoquininas (Skoog y Miller, 1957) junto con el correcto medio de cultivo y de las condiciones ambientales que hacen que las células competentes muestren su capacidad intrínseca para el desarrollo organizado que es el resultado de activación selectiva de genes la cual se manifiesta a través de cambios bioquímicos, fisiológicos y estructurales del tejido cultivado *in vitro*.

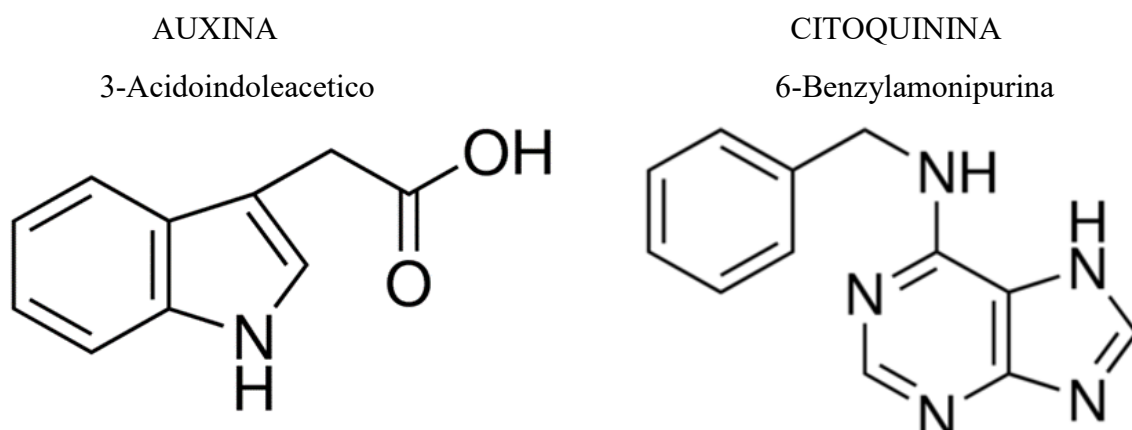
La cuarta etapa o fase 3 tiene como objetivo el enraizamiento y obtención de plantulas completas. Para la rizogénesis *in vitro* pueden usarse varios tipos de auxinas y de sustratos. Los brotes obtenidos de la fase de multiplicación se deben transferir a un medio libre de reguladores de crecimiento o que contenga solo auxina en baja cantidad.

La quinta y última etapa o fase 4 consiste en la aclimatación de la planta micropropagada. En muchos casos el éxito de la micropropagación se ve restringido por el alto porcentaje de pérdidas o daños al momento en que las plantas son transferidas a condiciones *ex vitro*. Por este motivo, las plantas necesitan un periodo de aclimatación donde se tiene en cuenta la humedad, ciclos de luz/oscuridad, temperatura, flujo de aire, entre otros, una vez que salieron de condiciones *in vitro* (Altman y Loberant, 1998).

Hormonas vegetales.

No existen dudas que en todo intento de propagación vegetal *in vitro* el carácter del proceso de diferenciación depende del genoma de la especie, el balance hormonal propio y el estado fisiológico del órgano, tejido o célula puesta en cultivo. Sin embargo, también se sabe que ese balance puede ser modificado exógenamente por el agregado de hormonas.

Las principales clases de hormonas son auxinas y citoquininas, entre otras. Son moléculas relativamente pequeñas. Su transporte de célula a célula con frecuencia implica el paso a través de paredes celulares que impiden el movimiento de las moléculas más grandes.



Fuente: www.sigmaaldrich.com

En general, las hormonas afectan el crecimiento y el desarrollo afectando la división, el alargamiento y la diferenciación de las células. Cada una tiene múltiples efectos dependiendo de su sitio de acción, su concentración y el estado de desarrollo de la planta. Naturalmente las hormonas vegetales se producen en muy bajas concentraciones, una cantidad mínima puede

tener profundos efectos en el crecimiento y el desarrollo de un órgano de la planta. Una hormona puede actuar alterando la expresión de ciertos genes, afectando la actividad de enzimas existentes o modificando las propiedades de la membrana.

La respuesta a una hormona es más dependiente de la concentración relativa en comparación a otras más que la cantidad absoluta de la misma, el equilibrio, más que hormonas individuales, es lo que permite el crecimiento y desarrollo.

Auxina.

La auxina presente en las plantas es el Ácido Indoleacético (AIA), pero otros compuestos, algunos de estos sintéticos, tienen actividad auxina.

Aunque la auxina afecta varios aspectos del desarrollo de las plantas, una de sus funciones principales es estimular el alargamiento de las células dentro de los brotes jóvenes en desarrollo. La auxina estimula el crecimiento solo por encima de un intervalo de concentración que va desde 10^{-8} a 10^{-4} M, a concentraciones superiores puede inhibir el alargamiento celular al inducir la producción de etileno, una hormona inhibitoria del mismo.

Las bombas de protones desempeñan un papel importante en la respuesta de crecimiento de las células ante la auxina. En la región de un brote la auxina estimula las bombas de protones de la membrana plasmática. Este bombeo de H^+ forma un potencial de membrana y disminuye el pH en la pared celular en cuestión de minutos. La acidificación de la pared activa enzimas denominadas expansinas que rompen los puentes de hidrógeno entre las microfibrillas de celulosa y otros componentes de la pared celular, desarmando la trama de la pared. La formación de un potencial de membrana facilita el ingreso de iones a la célula, lo que ocasiona la captación de agua y aumento de la turgencia. La plasticidad adquirida entonces por la pared celular y el aumento de la turgencia hacen que la célula se alargue.

La auxina a su vez altera la expresión de genes, ocasionado que las células en la región del alargamiento produzcan nuevas proteínas. También participa en la ramificación de las raíces, si se trata un disco de una hoja o un tallo de una planta con una solución que contenga auxina

disuelta se ocasiona la formación de raíces adventicias. Las semillas en desarrollo sintetizan auxina que promueve el crecimiento de los frutos.

Citocininas.

Naturalmente las citocininas se producen en tejidos en crecimiento activo, en particular en las raíces, embriones y frutos. Actuando en conjunto con las auxinas, estimulan la división celular e influyen en la diferenciación.

Cuando un fragmento de tejido parenquimatoso se cultiva en ausencia de citocininas las células crecen alcanzando gran tamaño, pero no se dividen. Si se cultivan en presencia de estas y auxinas, las células crecen y se dividen. Solas las citocininas no producen ningún efecto, la relación de concentraciones con la auxina es lo que controla la diferenciación celular. Existe una determinada proporción entre ambas en donde la masa de células continúa creciendo y se conserva un cúmulo de células indiferenciadas denominadas callo. Si se aumenta la proporción de citocininas las yemas del brote se desarrollan a partir del callo, en cambio sí se aumenta los niveles de auxina se forman las raíces.

Las citocininas retrasan el envejecimiento de algunos órganos de las plantas, inhibiendo la degradación proteica y estimulando la síntesis de RNA y proteínas. También retrasan el deterioro de las hojas en plantas sanas.

Modelos vegetales.

Para este trabajo se utilizaron dos especies vegetales como organismos donantes de explantes. Si bien la puesta punto estaba apuntada a la micropropagación de *Arabidopsis thaliana* también se trabajó en paralelo con *Nicotina tabacum L.*

Arabidopsis thaliana.



Arabidopsis thaliana es una planta herbácea, crucífera y dicotiledónea de la familia Brassicaceae. No tiene valor agronómico ni tampoco usos medicinales ni alimentarios, pero posee enorme importancia en biología molecular. Presenta un ciclo de vida corto que va desde 60 a 90 días en laboratorios, con una altura de aproximadamente 45 cm. Es autógama y muy prolífica capaz de producir 10000 semillas por planta (Meyerowitz, 1989). Cuenta con un genoma diploide pequeño (125Mb) con aproximadamente 25500 genes divididos en 5 cromosomas con baja proporción de secuencias repetitivas que fue completamente secuenciado en el año 2000 (The Arabidopsis Genome Initiative). Se han identificado varios **ecotipos pero solo dos son los más usados en laboratorio**, Columbia (**Col**), que fue el utilizado para la secuenciación del genoma y Landsberg *erecta* (Ler) que fue utilizado para la resecuenciación del mismo. Comparte numerosos genes funcionales con plantas de valor comercial como el arroz, soja, trigo, maíz y algodón, entre otras, por lo que lo que la hacen una de las plantas con el mayor número de publicaciones científicas, sólo superada por el arroz (*Oryza sativa*) (www.seresmodelicos.csic.es).



Figura 2: Ejemplar de *Arabidopsis thaliana* adulto en floración.

Fuente: www.seresmodelicos.csic.es

 ***Nicotina***  ***tabacum L.***

Nicotina  *tabacum L.*, es uno de los cultivos no alimentarios más ampliamente trabajados en el mundo y a su vez un organismo vegetal modelo para estudiar procesos biológicos  especial aquellos relacionados con la susceptibilidad a enfermedades.

Su genoma es alotetraploide complejo de 5,5 Gb en el cual más del 70% son regiones repetitivas. Debido a su complejidad e importancia su genoma es uno de los objetivos del proyecto de secuenciación SOL-100.



Figura 3: Ejemplares de *Nicotina tabacum L* donantes de explantes cultivados en los laboratorios de UADE.

Hidroponía.

Como complemento a la puesta a punto de la micropropagación se desarrolló también la puesta a punto de un sistema hidropónico con el fin de que la fase 0 de la morfogénesis, es decir la preparación de la planta madre, transcurra bajo esta modalidad de cultivo. El propósito de esto era que las plantas lleguen no sólo en menor tiempo al desarrollo óptimo para donar el explante, sino que también lo hagan en crecimiento activo, parejo y en grandes cantidades.

Como esto no se logró de forma óptima y rápida el objetivo de esta puesta a punto cambió y una vez lograda la misma, este sistema se usó para ver el efecto producido por la ausencia de cada una de las sales aportantes de macronutrientes en las soluciones preparadas para los dos modelos biológicos estudiados.

Un cultivo hidropónico es un sistema aislado del suelo utilizado para cultivar plantas cuyo crecimiento es posible gracias al suministro adecuado de los requerimientos hídricos y nutricionales a través de la solución nutritiva y en el cual los rendimientos por unidad de área cultivada son altos debido a una mayor densidad, mayor productividad por planta y eficiencia en el uso de los recursos.

Solución hidropónica.

Las plantas a través de su sistema radicular obtienen oxígeno, agua y los nutrientes minerales necesarios para su normal crecimiento y desarrollo. Los nutrientes esenciales son aquellos imprescindibles para la vida del organismo vegetal y cuya función en la célula es tan específica que no pueden ser reemplazados por otros. Están implicados directamente en el metabolismo celular y son imprescindibles en la mayoría de las plantas superiores. Los nutrientes esenciales son requeridos por los vegetales en cantidades variables. En este sentido, podemos indicar que algunos de ellos forman las estructuras cuantitativamente más importantes o activas en el metabolismo, y por lo tanto son requeridos en cantidades relativamente elevadas. Estos se denominan elementos mayores o macronutrientes, los que son requeridos en orden de g/L de solución, en este grupo se encuentra el C, H, O, N, P, K, Ca y Mg. Otro grupo de nutrientes esenciales se necesitan en cantidades más reducidas y son denominados elementos menores o

micronutrientes. Estos se requieren en orden de mg/L de solución y entre ellos figuran el Fe, Mn, Zn, B, Mo y Cl. La necesidad de menor cantidad no implica que tengan menor importancia, solo que son requeridos en menores cantidades relativas respecto a los macronutrientes.

En el sistema hidropónico los elementos minerales esenciales son aportados por la solución nutritiva, donde se encuentran en forma iónica y como tal son absorbidos por las raíces.

Una de las claves para el éxito del cultivo hidropónico es la composición de la solución nutritiva, ya que la misma deberá contener todos los elementos mencionados en forma adecuada y en las cantidades apropiadas para que cumplan de manera correcta el rol que desempeñan en el metabolismo vegetal. Dichos elementos minerales deben estar disponibles de manera similar a cómo se encuentran en el suelo.

La carencia o falta de alguno de los elementos esenciales trae aparejada la aparición de anomalías en el crecimiento que se manifiesta en síntomas de deficiencia característicos para cada nutriente. La carencia absoluta de algún elemento esencial producirá anormalidades en el crecimiento y desarrollo que pueden conducir a la muerte de la planta. Si un elemento mineral esencial se encuentra por debajo del óptimo afectará la tasa de crecimiento convirtiéndose en un factor limitativo. Cuando son dos o más los elementos que restringen el crecimiento, aquel que se encuentra en menor proporción relativa determinará la tasa de crecimiento. Esta respuesta es conocida como Ley del Mínimo que fue enunciada por Liebig en 1843 y rige también para otros factores que determinan el crecimiento vegetal. Es decir que el crecimiento del vegetal estará determinado por el elemento o factor que se encuentre en menor proporción relativa.

Función de los elementos esenciales.

Macronutrientes

Nitrógeno (N).

Es el elemento más abundante en las plantas luego del C, H y O. El N forma parte de las proteínas constituyendo el armazón de la estructura subcelular, y de diversos organoides como cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas dónde ocurren numerosos procesos metabólicos. Además, es constituyente de las membranas plasmáticas y de diversos pigmentos y hormonas vegetales. Forma parte constitutiva de los ácidos nucleicos, ARN (ácido ribonucleico) y ADN (ácido desoxiribonucleico). La importancia del rol ejercido por los compuestos nitrogenados en las plantas indica que cuando su aporte es restringido, aparecen claros síntomas de disminución del crecimiento y la productividad. Las plantas tienen escasas reservas móviles de compuestos nitrogenados, lo que hace que cuando la deficiencia aparece se manifiesta frenando el crecimiento del vegetal. Generalmente, las plantas reaccionan a la deficiencia de nitrógeno con la proteólisis o ruptura de las proteínas para movilizar el mismo ya que es necesario para el metabolismo celular. Los cloroplastos son los primeros órganos afectados, comienzan a degradarse por lo que las hojas adquieren una coloración amarilla clara (clorosis) luego viene la necrosis y posterior muerte de tejidos y algunos órganos vegetales. Estos síntomas aparecen primero en hojas inferiores y se va extendiendo hacia la zona media y superior. En casos de carencia extrema, todas las hojas adquieren coloración amarilla, pudiendo afectar las nervaduras y adquirir partes de las hojas una coloración púrpura. Las raíces también modifican su crecimiento ante la deficiencia de nitrógeno, ya que se extienden en longitud y son más frágiles y delgadas. En situaciones de toxicidad por exceso de disponibilidad de nitrógeno en los cultivos hidropónicos, se registran quemaduras en los bordes de las hojas inferiores.

Fósforo (P).

El fósforo (como PO_4^{3-}) es un constituyente fundamental de los ácidos nucleicos (ARN y ADN) y nucleótidos. Interviene en numerosas reacciones metabólicas promoviendo potencial de reducción a través de coenzimas como el NAD (nicotinamida dinucleótido) y NADP (nicotinamida dinucleótido fosfato). El metabolismo celular requiere de PO_4^{3-} para la regeneración de ADP y ATP, que son imprescindibles como fuente de energía que proviene de los procesos de fotosíntesis y respiración. Los fosfolípidos son importantes componentes de las membranas celulares y juegan un rol importante en la absorción de nutrientes. Asimismo, es constituyente de la molécula de ácido fítico, que es el principal reservorio de fósforo en las semillas. En caso de carencia, las elevadas necesidades de fósforo en estos tejidos obligan a la movilización de del mismo desde otras partes de la planta. Este traslado se realiza desde las hojas viejas, donde se visualizarán los primeros síntomas de deficiencias. El diagnóstico foliar muestra decoloraciones irregulares marrones en algunas especies y coloración púrpura en las nervaduras y en el envés de las hojas. Se reduce significativamente el crecimiento de la planta y si la carencia es severa se observan claros síntomas de enanismo.

Potasio (K).

Es el único nutriente esencial que no forma ninguna estructura química en la célula vegetal. Cumple un rol fundamental en la economía del agua de la planta, su movilidad dentro de la planta es elevada. El potasio es un activador de procesos metabólicos, determinando que las cantidades necesarias a absorber de este ion sean elevadas. La rápida difusión de los iones K^+ dan una elevada movilidad en la estructura subcelular jugando un rol esencial en el proceso fotosintético y en la respiración. Los síntomas característicos de la carencia son observados en las hojas basales, con un amarillamiento en bordes y posterior necrosis conforme avanza la carencia. Se observa un acortamiento de los entrenudos pudiendo llegar a producir defoliación de las hojas viejas.

Magnesio (Mg).

Se encuentra en las plantas como elemento estructural de la molécula de clorofila y a su vez es cofactor de las enzimas que intervienen sobre sustratos fosforilados, cumpliendo un rol fundamental en el metabolismo energético. Promueve la absorción y translocación del forforo en la planta. La absorción es con gasto de energía y se da en forma de ion o quelato. La sintomatología de la carencia se manifiesta en las hojas adultas o basales de la planta. Estas presentan una clorosis internerval que se mueve hacia el borde de la lámina foliar y de las hojas inferiores hacia las superiores. La diferencia con la carencia de potasio es que en esta última se mueve a la inversa, es decir desde los bordes de las hojas hacia la zona central.

Azufre (S).

El azufre forma parte de los aminoácidos esenciales cistina, cisteína y metionina, como también de los compuestos biotina, tiamina y coenzima A. Todos estos metabolitos son imprescindibles en el metabolismo vegetal, ya que actúan como cofactores o coenzimas en numerosos procesos. Los síntomas de carencia de azufre son muy similares a los del nitrógeno, ya que las plantas manifiestan una clorosis generalizada, pero a diferencia del nitrógeno, los síntomas aparecen primero en las hojas jóvenes debido a que es un compuesto con escasa movilidad.

Calcio (Ca).

El calcio es utilizado en la síntesis de la pared celular, siendo el componente estructural de la laminilla media, que separa las células recién formadas. Participa en la formación del huso mitótico durante la división celular y es necesario para el normal funcionamiento de las membranas celulares. Este mineral está implicado, como segundo mensajero, en numerosas respuestas de las plantas a señales ambientales y hormonales. Actúa como cofactor de numerosas enzimas, por ej. fosfastasas, ATPasas de cloroplastos y fosfolipasas ejerciendo un rol primordial sobre la elasticidad y elongación de las células jóvenes de la planta. Este

elemento se absorbe en forma de ion Ca^{+2} o quelato, sin gasto de energía metabólica. La sintomatología de deficiencia sea observada en los órganos jóvenes y meristemas apicales limitando el crecimiento del vegetal. Estos tejidos jóvenes se muestran necróticos y son un punto de ingreso para el ataque de enfermedades fúngicas.

TABLA II: Resumen macronutrientes.

Nitrógeno	Función	Es el elemento más abundante en las plantas luego del C, H y O.
	Deficiencia	Clorosis y disminución del crecimiento.
	Fuente	KNO_3 y $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$
Fósforo	Función	Es un constituyente fundamental del ARN y ADN. Interviene en numerosas reacciones metabólicas promoviendo el potencial de membrana a través de las coenzimas como el NAD y NADP.
	Deficiencia	Enanismo
	Fuente	K_2HPO_4
Potasio	Función	Es el único nutriente esencial que no forma ninguna estructura química en la célula vegetal. Está involucrado en el balance hídrico de la planta.
	Deficiencia	Clorosis y acortamiento de los entrenudos.
	Fuente	KNO_3 y K_2HPO_4
Magnesio	Función	Es un componente estructural de la clorofila.
	Deficiencia	Clorosis internerval.
	Fuente	MgSO_4
Azufre	Función	Forma parte de los aminoácidos cisteína, cistina y metionina, como también de la biotina, tiamina y la coenzima A.
	Deficiencia	Clorosis generalizada, principalmente en hojas jóvenes.
	Fuente	MgSO_4
Calcio	Función	Es un componente estructural de la pared celular. Participa en la formación del huso mitótico durante la división celular. Es un segundo mensajero en numerosas vías de señalización y un cofactor de muchas enzimas.
	Deficiencia	Necrosis de tejidos y limitación de crecimiento.
	Fuente	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$

Micronutrientes. 

Hierro (Fe).

Este elemento es un componente estructural y funcional de numerosos complejos enzimáticos como citocromos, catalasas, peroxidasas y ferredoxinas. Alrededor del 75% del hierro celular se encuentra asociado con los cloroplastos indicando el rol importante que juega este elemento en el proceso fotosintético. La carencia de hierro en las plantas se manifiesta con clorosis internerval en las hojas jóvenes, debido a que este elemento no se moviliza rápidamente desde las hojas más viejas. En condiciones extremas o severas de carencia la clorosis en la zona apical se intensifica, la división celular se inhibe y consecuentemente se detiene el crecimiento.

Manganeso (Mn).

El manganeso desempeña un rol importante en la fotosíntesis como transportador de electrones entre el agua y el fotosistema II e interviene como activador de numerosas enzimas. Es absorbido como ion Mn^{+2} o en forma quelatada. Los síntomas de carencia aparecen en la zona media de la planta con clorosis internerval pudiendo llegar a observarse necrosis en caso de que la deficiencia sea severa.

Zinc (Zn).

Este elemento se encuentra como catión divalente (Zn^{+2}) jugando un rol fundamental en la síntesis de las auxinas. El síntoma característico de su carencia es la reducción del crecimiento, observándose acortamiento de entrenudos y aparición de un patrón de crecimiento en roseta. Se requiere su presencia para la biosíntesis de clorofila siendo frecuente que ante su carencia se observe la aparición de hojas viejas más pequeñas con clorosis internerval. Este elemento posee movilidad intermedia una vez que es absorbido.

Boro (B).

Este elemento se absorbe en forma de ácido bórico y ejerce un rol importante en la síntesis de ácido giberélico (AG) y ácidos nucleicos (ARN y ADN), en las respuestas hormonales y en la funcionalidad de las membranas celulares. Una vez que es absorbido presenta escasa movilidad presentando diversos síntomas de carencia como necrosis en las hojas jóvenes y en las yemas terminales. Los tallos pueden ser rígidos y quebradizos y es frecuente la pérdida de la dominancia apical pudiendo observarse plantas muy ramificadas. Los frutos, las raíces carnosas y los tubérculos pueden manifestar necrosis o deformaciones relacionadas con la ruptura de los tejidos internos.

Molibdeno (Mo).

El Mo participa en reacciones de transferencia de electrones, su absorción se realiza como anión molibdato (MoO_4^{2-}) por mecanismos activos. El primer síntoma de carencia es una clorosis general internerval y posterior necrosis de las hojas más maduras. En algunas especies, las hojas pueden no presentar necrosis, pero aparecer curvadas y terminar muriendo (enfermedad conocida como cola de látigo), también se puede ver frenada la formación de la flor o provocar su pérdida prematura.

Cloro (Cl).

Este elemento se absorbe como Cl^- , y se requiere en pequeñas cantidades. Está relacionado con la liberación de O_2 en el proceso fotosintético. Su carencia produce deterioro de los cloroplastos, disminuyendo el crecimiento aéreo y radicular del vegetal.

TABLA III: Resumen micronutrientes.

Hierro	Función	Se encuentra asociado a los cloroplastos donde interviene en los procesos redox.
	Deficiencia	Clorosis y enanismo.
	Fuente	FeEDTA
Manganeso	Función	Es un transportador de electrones en la fotosíntesis y es un activador de numerosas enzimas.
	Deficiencia	Clorosis internerval y necrosis.
	Fuente	MnCl ₂
Zinc	Función	Participa en la síntesis de auxinas naturales y de la clorofila.
	Deficiencia	Enanismo y acortamiento de entrenudos.
	Fuente	ZnSO ₄
Boro	Función	Participa en la síntesis del ácido giberélico y ácidos nucleicos.
	Deficiencia	Tallos rígidos y quebradizos. Plantas muy ramificadas.
	Fuente	H ₃ BO ₃
Molibdeno	Función	Participa en reacciones de transferencia de electrones.
	Deficiencia	Clorosis internerval. Plantas curvas (enfermedad de látigo) y se puede llegar a ver frenada la aparición de la flor o perderse prematuramente.
	Fuente	Na ₂ MoO ₄
Cloro	Función	Interviene en la liberación del O ₂ durante la fotosíntesis.
	Deficiencia	Disminución del crecimiento.
	Fuente	NaCl, MnCl ₂ y CaCl ₂

Antecedentes.



Dada la importancia de la micropropagación vegetal como de todas las formas de cultivos de tejidos vegetales, tanto en investigación y desarrollo como con fines comerciales, existe gran cantidad de trabajos al respecto sobre numerosas especies y reguladores de crecimiento empleados. Entre los más recientes se pueden citar:

Parray JA, *et al* (2018). Manipulation of Plant Growth Regulators on Phytochemical Constituents and DNA Protection Potential of the Medicinal Plant *Arnebia benthamii*.

Faisal M, *et al* (2017). Auxin-cytokinin synergism *in vitro* for producing genetically stable plants of *Ruta graveolens* using shoot tip meristems.

Cheesman. Tripathi J, *et al* (2017). Efficient regeneration system for rapid multiplication of clean planting material of *Ensete ventricosum* (Welw.).

Sharma U, *et al* (2017). *In vitro* propagation, *ex vitro* rooting and leaf micromorphology of *Bauhinia racemosa* Lam.: a leguminous tree with medicinal values.

Pence VC, *et al* (2017). Tools for the *ex situ* conservation of the threatened species, *Cycladenia humilis* var. *jonesii*.

Quiroz K, *et al* (2017). *In vitro* asymbiotic germination for micropropagation of the recalcitrant terrestrial orchid *Chloraea crispa* (Orchidaceae).

Choudhary SK, *et al* (2017). An improved micropropagation system, *ex vitro* rooting and validation of genetic homogeneity in wild female *Momordica dioica*: an underutilized nutraceutical vegetable crop.

Materiales.

Hormonas.

Se utilizaron hormonas compradas a Sigma Aldrich (<https://www.sigmaaldrich.com>)

Auxina.

Product Name	Product N°	Mol. Wt.	µM for 1mg/L	Solvent	Diluent	Powder Storage	Liquid Storage	Sterilization*	Working Conc. (mg/L)
Indole-3-acetic acid Free acid (IAA)	I2886	175.2	5.71	EtOH 1N NaOH	Water	-0°C	-0°C	CA/F	0.01-3.0

Citoquinina.

Product Name	Product No.	Mol. Wt.	µM for 1mg/L	Solvent	Diluent	Powder Storage	Liquid Storage	Sterilization*	Working Conc. (mg/L)
6-Benzylaminopurine (BA)	B3408	225.3	4.44	1N NaOH	Water	RT	2-8°C	CA/F	0.1-5.0

Solución stock de hormonas.

Se preparó 1 stock de 10ml de solución para cada hormona. Dicho stock tiene una concentración de 1mg/ml y luego de preparado se esterilizó por filtración de 0,2µm y fue almacenado a 4°C el correspondiente a 3-Acidoindoleacético y en -0°C el correspondientes a 6-Benzylaminopurina.

Medios de cultivo.

Para este trabajo se compraron dos tipos diferentes de medio de cultivo en PhytoTechnology Laboratories (<https://www.phytotechlab.com>).

Medio basal Murashige and Skoog (MS).

Es el medio de cultivo vegetal por excelencia contiene los micronutrientes y macronutrientes necesarios para el cultivo de tejidos vegetales descritos en Murashige & Skoog (1967). Este medio es codificado con el código M519 por el proveedor.

Ficha técnica:



PhytoTechnology Laboratories, LLC™
 Helping to Build a Better Tomorrow through Plant Science™

Product Information Sheet

**M519
 Murashige & Skoog (MS)
 Basal Medium w/ Vitamins**

Synonym: MS Medium

Properties

Form: Fine to Fluffy Powder
 Appearance: White to Yellow Powder
 Application: Plant Tissue Culture
 Solubility: Water
 Typical Working Concentration: 4.43 g/L
 Storage Temp: 2-6°
 Storage Temp of Stock Solution: Preparation of concentrated solutions is not recommended as insoluble precipitates may form.
 Other Notes: Contains the macro- and micronutrients and vitamins as described by Murashige and Skoog (1962).
 pH = 3.5-4.5

Formula (mg/L)

Ammonium Nitrate	1650
Boric Acid	6.2
Calcium Chloride, Anhydrous	332.2
Cobalt Chloride•6H ₂ O	0.025
Cupric Sulfate•5H ₂ O	0.025
Na ₂ EDTA•2H ₂ O	37.26
Ferrous Sulfate•7H ₂ O	27.8
Magnesium Sulfate, Anhydrous	180.7
Manganese Sulfate•H ₂ O	16.9
Molybdcic Acid (Sodium Salt)• 2H ₂ O	0.25

Potassium Iodide	0.83
Potassium Nitrate	1900
Potassium Phosphate, Monobasic	170
Zinc Sulfate•7H ₂ O	8.6
Glycine (Free Base)	2
myo-Inositol	100
Nicotinic Acid (Free Acid)	0.5
Pyridoxine•HCl	0.5
Thiamine•HCl	0.1

Application Notes

Plant Tissue Culture Tested

Plant species: This medium is used for a numerous species.

References

Murashige, T and F Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.

Revised 3/2007

PhytoTechnology Laboratories, LLC

P.O. Box 12205; Shawnee Mission, KS 66282-2205

Phone: 1-888-749-8682 or 913-341-5343; Fax: 1-888-449-8682 or 913-341-5442

Web Site: www.phytotechlab.com

© 2007 PhytoTechnology Laboratories, LLC

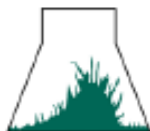
Medio basal Murashige and Skoog (MS) suplementado con vitaminas de Gamborg.

Este medio es formado por las macronutrientes y micronutrientes descritos en Murashige & Skoog (1967) suplementado con las vitaminas descritas en Gamborg, et al. (1968) las cuales son necesarias para los cultivos de callos celulares. Es codificado con el código M404 por el proveedor.

TABLA IV: Vitaminas de Gamborg.

Vitamina	Concentración (Mg/l)
Mioinositol	100
Ácido Nicotínico	0,5
Hidrocloruro de Piridoxina	0,5
Clorhidrato de Tiamina	0,1

Ficha técnica:



PhytoTechnology Laboratories®
 Helping to Build a Better Tomorrow through Plant Science™

Product Information Sheet

**M404
 Murashige & Skoog (MS)
 Modified Basal Medium w/ Gamborg Vitamins**

Properties

Form: Powder
 Appearance: White to Yellow
 Application: Plant Tissue Culture
 Solubility: Water
 Typical Working Concentration: 4.44 g/L
 Storage Temp: 2-6°C
 Storage Temp of Stock Solution: Preparation of concentrated solutions is not recommended as insoluble precipitates may form.
 Other Notes: Contains the macro- and micronutrients as described by Murashige and Skoog (1962) and vitamins as described by Gamborg, et al. (1968).
 pH = 3.5 – 4.5

Formula (mg/L)

Ammonium Nitrate	1650
Boric Acid	6.2
Calcium Chloride, Anhydrous	332.2
Cobalt Chloride•6H ₂ O	0.025
Cupric Sulfate•5H ₂ O	0.025
Na ₂ EDTA•2H ₂ O	37.26
Ferrous Sulfate	27.8
Magnesium Sulfate, Anhydrous	180.7
Manganese Sulfate•H ₂ O	16.9

Molybdic Acid (Sodium Salt)•2H ₂ O	0.25
Potassium Iodide	0.83
Potassium Nitrate	1900
Potassium Phosphate Monobasic	170
Zinc Sulfate•7H ₂ O	8.6
myo-Inositol	100
Nicotinic Acid (Free Acid)	1
Pyridoxine•HCl	1
Thiamine•HCl	10

Application Notes

Plant species: *Cannabis sativa* L (Feeney & Punja, 2003; Wang et al, 2009).
 Tobacco (Murashige and Skoog, 1962)

References

Feeney M & ZK Punja (2003) Tissue culture and Agrobacterium-mediated transformation of hemp (*Cannabis sativa* L.) *In Vitro Cell. Dev. Biol-Plant* 39, 578–585.
 Gamborg, OL, RA Miller and K Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50: 151-158.
 Murashige, T and F Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
 Wang R, L He, B Xia, JF Tong, N Li & F Peng (2009) A micropropagation system for cloning of hemp (*Cannabis sativa* L.) by shoot tip culture. *Pak. J. Bot.*, 41(2): 603-608.

PhytoTechnology Laboratories®

P.O. Box 12205; Shawnee Mission, KS 66282-2205

Phone: 1-888-749-8682 or 913-341-5343; Fax: 1-888-449-8682 or 913-341-5442

Web Site: www.phytotechlab.com

© 2014 PhytoTechnology Laboratories®

Stock de Sacarosa.

Dado que la sacarosa es un suplemento de los medios de desarrollo, previamente a cada preparación de los mismos se armó una solución madre de sacarosa al 20% la cual luego era esterilizada por filtración de 0,2µm.

Medio de germinación.

El medio de germinación consistió en medio basal MS (4,43 g/L) con 0,8% de agar bacteriológico.

Medio 1. Medio de establecimiento.

TABLA V: Composición medio de establecimiento.

Medio 1	
Componente	Concentración
Medio MS c/vitaminas Gamborg.	4,44 g/L
Sacarosa.	3%
Agar Bacteriológico.	1,5%
3-Acidoindoleacético.	1 mg/L
6-Benzylaminopurina.	0,05 mg/L

Medio 2. Medio de multiplicación.

TABLA VI: Composición medio de multiplicación.

Medio 2	
Componente	Concentración
Medio MS c/vitaminas Gamborg.	4,44 g/L
Sacarosa.	3%
Agar Bacteriológico.	1,5%
3-Acidoindoleacético.	0,5 mg/L
6-Benzylaminopurina.	0,1 mg/L

Medio 3. Medio de enraizamiento.

TABLA VII: Composición medio de rizogénesis.

Medio 3	
Componente	Concentración
Medio MS c/vitaminas Gamborg.	2,22 g/L
Sacarosa.	1%
Agar Bacteriológico.	1%
3-Acidoindoleacético.	0,3 mg/L

Nota: Tanto la sacarosa como las diferentes hormonas eran agregadas al medio a partir de la solución madre anteriormente preparadas en las cantidades requeridas cuando el medio tenía una temperatura inferior a los 60°C.

Sustrato tierra.

Para el pasaje en mazetines con tierra que se da entre el medio de germinación y medio 1 se utilizó sustrato GrowMix® Multipro™ de Terrafertil ya que es un sustrato definido lo que permitió estandarizar el paso por tierra de todos los lotes.

GROWMIX® Multipro™

Características Físicas

Densidad Sustrato Seca:	175 - 200 Kg/m3
Densidad de Partícula:	1600 Kg/m3
Porosidad Total:	80 - 85%
Capacidad de Retención de agua:	60%
Porosidad de Aire:	20 - 25%
Agua Fácilmente disponible:	30 - 35%

Características Químicas (relación 2:1)*

*pH:	5.2 - 5.8
*CE:	0,3 - 0,45 mmhos/cm
Humedad:	55 - 65%
**MO:	85 - 90%
**Cenizas:	15 - 10%
Rel. C/N	

**Valores referidos a materia seca.

Componentes
 Turba de Musgo Sphagnun de fibras medias, Compost de Corteza, Dolomita.



Estos sustratos están hechos con turba:






Figura 4: Características del sustrato GrowMix® Multipro™ el cual fue utilizado para este proyecto. Fuente: http://www.terrafertil.com/fichas_pdf/growmix_multipro.pdf

Nota:

Se realizó riego por inmersión con agua destilada para no agregar ningún componente extra y en cantidades desconocidas.

Contenedor hidropónico.

Para los ensayos hidropónicos se utilizaron como contenedores cajas recicladas de tips para micropipetas p1000, que tienen un volumen de 200 ml, las cuales fueron pintadas de negro para evitar que la luz incida sobre la raíz de las plantas. A las mismas se le adaptó un soporte tipo multiwell de 28 pocillos formado con tubos Eppendorf de PCR los cuales hacían de soporte para cada planta.

Soluciones hidropónicas.



Las **solucione** hidropónicas fueron preparadas en el 10mo piso de UADE LABs con sales propias del laboratorio. Dichas soluciones derivan de la solución descrita por Hoagland y Arnon (1950). Cada una de ellas carece de una de las sales aportantes de macronutrientes a excepción de una que contiene todas las sales que, junto a una solución comercial, son usadas como control positivo.

TABLA VIII: Solución completa.

Tipo de nutriente	Sal	Concentración
Macronutriente	KNO ₃	1,250 mM
Macronutriente	K ₂ HPO ₄	0,625 mM
Macronutriente	MgSO ₄	0,500 mM
Macronutriente	Ca(NO ₃) ₂	0,500 mM
Micronutriente	H ₃ BO ₃	17,500 μM
Micronutriente	MnCl ₂	5,500 μM
Micronutriente	ZnSO ₄	0,500 μM
Micronutriente	Na ₂ MoO ₄	0,062 μM
Micronutriente	NaCl ₂	2,500 μM
Micronutriente	CoCl ₂	0,004 μM
Micronutriente	FeEDTA	12,500 μM

TABLA IX: Solución sin KNO₃

Tipo de nutriente	Sal	Concentración
Macronutriente	KNO ₃	0
Macronutriente	K ₂ HPO ₄	0,625 mM
Macronutriente	MgSO ₄	0,500 mM
Macronutriente	Ca(NO ₃) ₂	0,500 mM
Micronutriente	H ₃ BO ₃	17,500 μM
Micronutriente	MnCl ₂	5,500 μM
Micronutriente	ZnSO ₄	0,500 μM
Micronutriente	Na ₂ MoO ₄	0,062 μM
Micronutriente	NaCl ₂	2,500 μM
Micronutriente	CoCl ₂	0,004 μM
Micronutriente	FeEDTA	12,500 μM

TABLA X: Solución sin K₂HPO₄

Tipo de nutriente	Sal	Concentración
Macronutriente	KNO ₃	1,250 mM
Macronutriente	K ₂ HPO ₄	0
Macronutriente	MgSO ₄	0,500 mM
Macronutriente	Ca(NO ₃) ₂	0,500 mM
Micronutriente	H ₃ BO ₃	17,500 μM
Micronutriente	MnCl ₂	5,500 μM
Micronutriente	ZnSO ₄	0,500 μM
Micronutriente	Na ₂ MoO ₄	0,062 μM
Micronutriente	NaCl ₂	2,500 μM
Micronutriente	CoCl ₂	0,004 μM
Micronutriente	FeEDTA	12,500 μM

TABLA XI: Solución sin MgSO₄

Tipo de nutriente	Sal	Concentración
Macronutriente	KNO ₃	1,250 mM
Macronutriente	K ₂ HPO ₄	0,625 mM
Macronutriente	MgSO ₄	0
Macronutriente	Ca(NO ₃) ₂	0,500 mM
Micronutriente	H ₃ BO ₃	17,500 μM
Micronutriente	MnCl ₂	5,500 μM
Micronutriente	ZnSO ₄	0,500 μM
Micronutriente	Na ₂ MoO ₄	0,062 μM
Micronutriente	NaCl ₂	2,500 μM
Micronutriente	CoCl ₂	0,004 μM
Micronutriente	FeEDTA	12,500 μM

TABLA XII: Solución sin Ca(NO₃)₂

Tipo de nutriente	Sal	Concentración
Macronutriente	KNO ₃	1,250 mM
Macronutriente	K ₂ HPO ₄	0,625 mM
Macronutriente	MgSO ₄	0,500 mM
Macronutriente	Ca(NO ₃) ₂	0
Micronutriente	H ₃ BO ₃	17,500 μM
Micronutriente	MnCl ₂	5,500 μM
Micronutriente	ZnSO ₄	0,500 μM
Micronutriente	Na ₂ MoO ₄	0,062 μM
Micronutriente	NaCl ₂	2,500 μM
Micronutriente	CoCl ₂	0,004 μM
Micronutriente	FeEDTA	12,500 μM

TABLA XIII: Elementos por cada sal en estudio.


Sal	Elemento que aporta
KNO ₃	K y N
Ca(NO ₃) ₂	Ca y N
K ₂ HPO ₄	K y P
MgSO ₄	Mg y S

Metodología.

Esterilización de semillas.

- A- Las semillas se toman del banco de UADE, las cuales fueron traídas de la Fundación Instituto Leloir.
- B- Semillas tomadas del banco son esterilizadas mediante vapores de cloro. Lindsey III, B. E., Rivero, L., Calhoun, C. S., Grotewold, E., Brkljacic, J. Standardized Method for High-throughput Sterilization of Arabidopsis Seeds. J. Vis. Exp. (128), e56587, doi:10.3791/56587 (2017).

Micropropagación.

- A- Se plaquean entre 9 y 12 semillas estériles en placas de 9 cm. de diámetro con medio MS (Murashige & Skoog 1962), y se dejan 72 hs en oscuridad a 4°C **lo que permite una sincronización en el ciclo de vida las plantas resultant** 
- B- Pasadas las 72 hs de sincronización las mismas placas pasan a estar 5 días a 18°C con un ciclo de luz de 16 hs/día a fin de promover la germinación de las semillas y dar un ambiente óptimo, libre de contaminantes para los primeros días de desarrollo de la planta.
- C- Pasado este tiempo los brotes son trasplantados a macetas con sustrato definido (Terra Fertil GrowMix® MultiPro™). A partir de este momento el ambiente deja de ser estéril. Continúan su crecimiento entre un mes y mes y medio aproximadamente, dependiendo del desarrollo.
- D- Entre los 30 y 45 días de crecimiento en maceta se seleccionan los mejores ejemplares del lote y se le cortan algunas hojas al azar.
- E- Cada una de las hojas cortadas es esterilizada. Para ello, dentro de una cabina de flujo laminar, se lavan por inmersión en una placa de Petri con alcohol 90% y se enjuaga 3 veces con agua destilada estéril. Luego se hace un segundo lavado en inmersión con hipoclorito de sodio 2,5% (lavandina comercial) durante 10 minutos y en agitación. Para

finalizar la limpieza esterilizante de las hojas se enjuagan 5 veces con agua destilada estéril.

- F- De dichas hojas se cortan pequeños fragmentos de unos 5mm de diámetro con un bisturí estéril y dentro de una cabina de flujo laminar a fin de conservar la esterilidad.
- G- Los fragmentos de hojas se colocan en una placa de Petri con medio 1 con la cara abaxial o cara inferior hacia abajo y se sella con parafilm. Se cubre con papel aluminio y se incuba a 25°C por 4 semanas. Se colocan entre 1 y 5 fragmentos de hoja por cada placa, dependiendo el tamaño del fragmento. En este paso se espera la formación de un callo celular a partir de cada fragmento.
- H- Pasado en tiempo de incubación en oscuridad el callo se transfiere asépticamente a placas de Petri de 9 cm. de diámetro que contienen medio 2 y se dejan a 25°C con un ciclo de 16hs/día de luz por aproximadamente 4 semanas. Este tiempo depende de la evolución de callo. **En esta etapa se espera un crecimiento exponencial del mismo, por lo que la densidad de callos por placa es menor a la de las placas con medio 1.**
- I- Pasado el tiempo de incubación en medio 2, los callos que tienen más de 2 hojas se seleccionan y se llevan asépticamente a placas de Petri de 9 cm. de diámetro que contienen medio 3. Se incuban nuevamente a 25°C con 16hs/día de luz aproximadamente 4 semanas o hasta que la planta se desarrolle.
- J- Cuando la planta desarrollada en medio 3 tiene más de 1 cm o no tiene más lugar de crecimiento dentro de la placa está en condiciones de salir de la esterilidad y trasplantarse a tierra sin hormonas ni reguladores de crecimiento para continuar su desarrollo y aclimatarse a las condiciones *ex vitro*.



Figura 5: Primer paso del proceso de esterilización de explantes. Hojas inmersas en alcohol 90% previo a ser enjuagadas con agua destilada estéril y lavadas con hipoclorito de sodio.

Hidroponía.

- A- Se preparan 6 soluciones hidropónicas diferentes, una solución completa con todos los macronutrientes necesarios para el normal desarrollo de la planta que junto a una solución comercial actúan de control positivo. Las restantes 4 soluciones presentan ausencia de determinadas sales.
- B- En cada uno de los contenedores hidropónicos se colocan 200ml de una de las soluciones anteriormente preparadas.
- C- Dentro de una cabina de flujo laminar se llena con medio MS (Murashige & Skoog 1962) cada uno de los 28 pocillos de 0,2 ml del adaptador multiwell.
- D- Una vez solidificado el medio se siembra en cada Well una semilla estéril y se pone el adaptador multiwell dentro de contenedor.
- E- Se coloca la tapa transparente, se cubre con parafilm y se deja en oscuridad por 72hs a 4°C para sincronizar el ciclo de las plantas resultantes.
- F- Pasadas las 72 hs de sincronización los contenedores pasan a estar 5 días a 18°C con un ciclo de luz de 16 hs/día a fin de promover la germinación de las semillas.

- G- Luego de la germinación pasan a temperatura ambiente, con igual ciclo de luz y sin quitar el parafilm para continuar en esterilidad.
- H- La tapa es removida, terminando con la esterilidad cuando las plantas ya están establecidas y ya no es suficiente el espacio dentro del contenedor con la tapa para seguir creciendo.

Resultados.

Micropropagación.

En base a la bibliografía pertinente se comenzó trabajando diferentes variables para así poder lograr el protocolo de trabajo definitivo el cual está anteriormente explicado en la sección metodología.

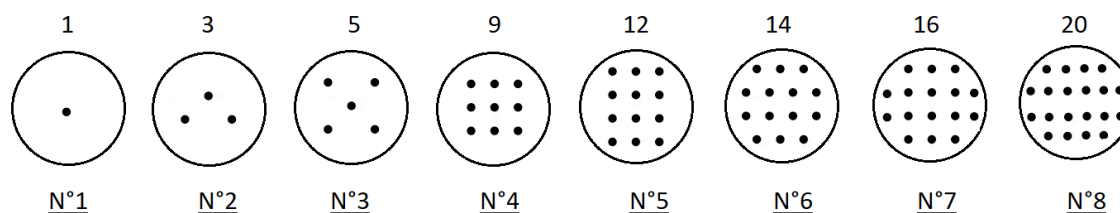
En primer lugar, se analizaron las formas más apropiadas de esterilización de semillas, siendo los mecanismos propuestos por la bibliografía:

1. Esterilización en inmersión de alcohol 70% durante media hora en agitación.
2. Esterilización en inmersión de hipoclorito de sodio 2% durante media hora.
3. Esterilización por vapores de cloro.
4. Esterilización en inmersión peróxido de hidrógeno 5% durante 20 minutos.
5. Esterilización en inmersión de Espadol[®] 5% durante 10 minutos.
6. Esterilización en inmersión de Pervinox[®] 5% durante 10 minutos.



Se Optó por la esterilización por vapores de cloro ya que es una técnica sencilla de realizar y económica. Se hizo siguiendo el protocolo de Lindsey III, B. E., Rivero, L., Calhoun, C. S., Grotewold, E., Brkljacic, J. y los resultados fueron los esperados, casi la totalidad de las semillas mantuvieron el poder de germinación y ninguna contaminó cuando se la colocó en una placa con medio MS.

Posteriormente se siguió analizando cuál era la cantidad óptima de semillas por placa que debía disponer para lograr una correcta germinación. Para esto se colocaron 8 placas con medio MS con 1, 3, 5, 9, 12, 14, 16 y 20 semillas por placa respectivamente.



Entre la placa N°1 y placa N°5 no hubo diferencias aparentes en la germinación y supervivencia del brote. A partir de una densidad de 14 semillas por placa la germinación no se vio afectada, pero si la supervivencia del brote.

Este ensayo se realizó por duplicado y ambos arrojaron los mismos resultados por lo que se llegó a la conclusión q de que la densidad máxima es de entre 9 u 12 semillas por placa para lograr una correcta germinación y establecimiento del brote.

Luego se probó cuál es el tiempo de oscuridad y temperatura óptima para lograr una correcta sincronización. La bibliografía establece 48 hs o 72 hs para una correcta sincronización y 4°C.

Contando con esa información previa se hizo un ensayo con 8 placas con medio MS en la cual se sembraron 9 semillas cada una. Dos placas se pusieron a sincronizar a 4°C durante 72 hs de oscuridad, otras dos también se estuvieron sincronizando durante 72 hs de oscuridad, pero a temperatura ambiente. Lo mismo se realizó con 48 hs de oscuridad, dos placas a 4°C y otras dos a temperatura ambiente.

Como era de esperar en los 5 días posteriores a que salieron de oscuridad se observó que la germinación más uniforme entre todas las semillas era en las condiciones de 72 hs de oscuridad y 4°C.

Finalmente, los días comprendidos entre la sincronización y el trasplante a tierra también fue un parámetro a poner a punto.

Inicialmente las semillas brotaban a temperatura ambiente e inmediatamente después los brotes pasaban a tierra. Los resultados no eran los esperados ya que la tasa de supervivencia que obtenía era muy baja. La razón era que el brote se había originado en un ambiente de estéril y era muy débil para salir del mismo y resistir el ambiente externo. La acción inmediata para corregir ese problema fue no sacar los brotes de la esterilidad de la placa y dejarlos crecer más tiempo dentro, pero los resultados tampoco fueron los esperados, los brotes igual morían dentro de la placa en los primeros días de desarrollo. Se llegó a la conclusión de que la temperatura ambiente era muy elevada para los brotes nacientes. Por ese motivo se optó por una vez terminado el tiempo de sincronización dejar las placas en la heladera de 18°C.

A partir de una semana en la placa los brotes comenzaban a ponerse blancos y cuanto antes se pasaban a tierra más sufrían ese trasplante por lo que a prueba y error se estableció que 48hs luego de la germinación era el tiempo óptimo a 18°C para el trasplante a tierra, lo que va desde 3 a 5 días.

Una vez puesto a punto el protocolo a seguir se largaron 3 lotes con el fin de lograr micropropagación de las especies en estudio.

TABLA XIV: Resultados lote 1.

Lote 1					
Sustrato	Medio de germinación	Tierra	Medio 1	Medio 2	Medio 3
Días	7	27	48	8	
Semillas	9				
Planta		6			
Placas iniciales			5	5	
Placas finales			5	0	
Total días de ensayo:		90			

El primer lote fueron 9 semillas sembradas en medio de germinación el 02/06/2017 y luego de 7 días se pasaron a tierra. Se lograron 6 plantas.



Figura 6: Germinación primer lote.

Luego de 27 días de crecimiento en tierra, de esas 6 plantas resultantes se obtuvieron varios fragmentos de tejido, principalmente de las hojas, las cuales se repartieron en 5 placas de Petri que contenían medio 1. En este pasaje se esperaba la formación de un callo de células (masa de células no diferenciadas) pero los resultados no fueron los esperados ya que el tejido vegetal en cuestión no formaba callo por lo que se decidió extender el tiempo de cultivo establecido para medio 1.

A pesar de haber extendido aproximadamente un 50% el tiempo de cultivo en medio 1 la formación de callos fue casi nula, pero de todos modos se decidió seguir adelante con el ensayo siguiendo el protocolo.

Luego de 48 días en medio 1 se pasaron a medio 2 las porciones que aún tenían tejido vegetal viable en 5 placas, pero 8 días después ya no quedaba tejido vegetal viable por lo que se decidió descartar todo y terminar el lote 1 sin resultados positivos.

Durante el transcurso del primer lote, repasando la bibliografía pertinente y viendo como fue el desarrollo del tejido se concluyó que la no formación de callos fue producto de un exceso de fragmentos de planta por placa. Por tal motivo se estableció, para los lotes siguientes, en 5 la densidad de fragmentos por placa de Medio 1.

TABLA XV: resultados lote 2.

Lote 2					
Sustrato	Medio de germinación	Tierra	Medio 1	Medio 2	Medio 3
Días	6	32	30	33	30
Semillas	>50				
Plantas		48			
Placas iniciales			20	15	5
Placas finales			15	5	0
Total días de ensayo:		131			

El segundo lote se sembró en medio de germinación el 30/06/2017 del cual se lograron 48 plantas que pasaron a tierra 6 días después.

Pasados 32 días, se armaron 20 placas de Petri que contenían medio 1 con porciones de tejido vegetal provenientes de las 48 plantas que estaban en tierra con el fin de promover la formación de callos celulares.



Figura 7: Ejemplares de *Arabidopsis thaliana* en de fase 0 a partir de los cuales se obtendrán explantes.

Efectivamente, durante el lapso de desarrollo en medio 1 se vio la formación de callos celulares. Cumplido el mismo, se tomó la decisión de a 5 de esas 20 placas dejarlas 15 días más en medio 1 ya que si bien había formación de callo, no eran lo suficientemente grandes en comparación con los formados en las 15 placas restantes. De todos modos, pasados los 15 días extras dichos callos no sufrieron evolución alguna por lo que fueron descartados. De las 15 placas con callos en medio 1 considerados aptos para pasar a medio 2 cultivados durante 30 días, se obtuvieron también 15 placas con callos en medio 2. Esto se debió a que proporción de callos formados respecto del total de los fragmentos de tejido vegetal depositados fue alta, fueron pocos los fragmentos que no formaron callos y pocos los callos que no evolucionaron en medio 1, por lo que se decidió bajar la densidad de callos por placas a 3 para pasarlos a medio 2. Por ese motivo

pese a una pérdida normal de material vegetal en el primer medio la cantidad de placas en el segundo medio fue la misma.

Luego 33 días fue el momento del pasaje al tercer medio, 9 de las de las 15 placas fueron descartadas porque ninguno de sus callos eran viables. Una se decidió continuarla en medio 2 para observar si el callo seguía evolucionando, aunque con el correr del tiempo no hubo cambios significativos, se infiere que es por el agotamiento del medio. Las 5 placas restantes, que eran en las que los callos habían evolucionado mejor, pasaron a también 5 placas con medio 3.

Lo esperado antes del paso a medio 3 es que ya el callo presente algunas hojas, esto no sucedió. El medio 3 es un medio que promueve el enraizamiento, efectivamente los callos tímidamente formaron raíces pero no crecieron más y finalmente murieron.

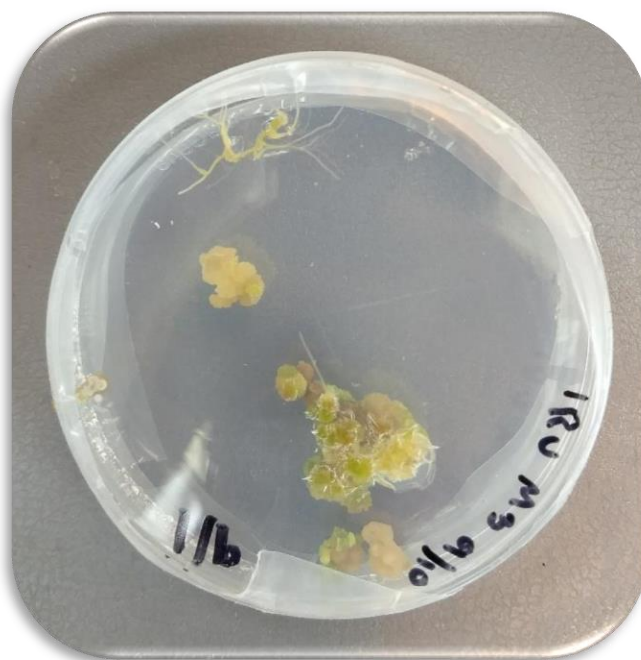


Figura 8: Callo celular inducido a proceso de rizogénesis a final del segundo lote.

De esta forma en el segundo lote logró llegar hasta el enraizamiento pero no se pudo lograr la micropropagación vegetal.

TABLA XVI: resultados lote 3.

Lote 3					
Sustrato	Medio de germinación	Tierra	Medio 1	Medio 2	Medio 3
Días	6	38	34	48	41
Semillas	60				
Plantas		56			
Placas iniciales			30	7	6
Placas finales			3	6	1
Días de ensayo:		167			

El lote 3 se inició el 06/09/2017 plaqueando 60 semillas en medio de germinación de las cuales se lograron 56 plantas que a los 6 días pasaron a mecatines con tierra. Una vez que cumplieron 38 días se obtuvieron las porciones de tejido vegetal que se dispusieron en 30 placas con medio 1. A diferencia de los lotes anteriores 5 de estas 30 placas no se las dejaron sin cubrir exponiéndolas a 16 horas de luz por día con el objetivo de probar si la luz interfiere en la formación del callo. Cuando se cumplió el tiempo de formación de callos en medio 1 los resultados no eran óptimos, la mayoría de las placas se habían contaminado. De las 5 placas que se dejaron a luz se pudo obtener solo un callo viable y de las 25 que siguieron el protocolo establecido, es decir pasaron por medio 1 en oscuridad se lograron 6 callos.

Quedaron solo 7 callos viables luego de 34 días en medio 1. Se transfirieron 4 a placas de Petri con el segundo medio y 3 a tubos de ensayo también con medio 2 para estudiar si una mayor campana de aire tenía efectos sobre el desarrollo del callo. En este tiempo el callo de uno de los tubos de ensayo perdió viabilidad por lo que fue descartado.

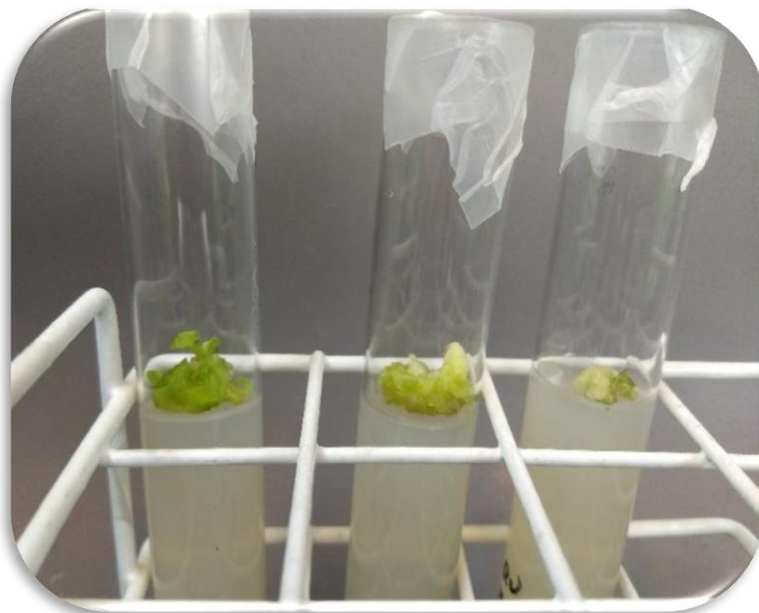


Figura 9: Callos celular en fase 2 del tercer lote en tubos de ensayo para observar el efecto de una mayor campana de aire respecto de una placa de Petri.

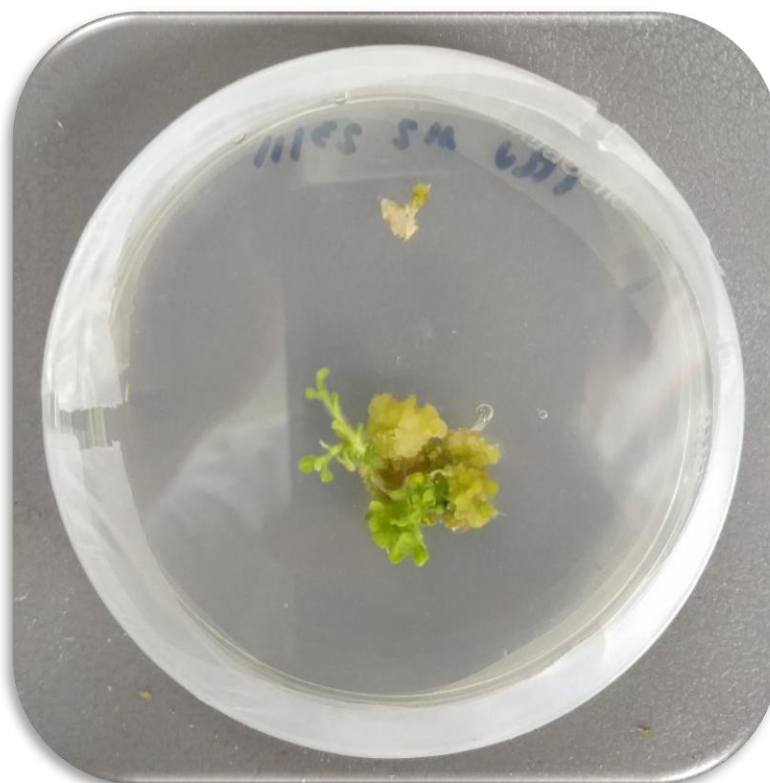


Figura 10: Callos en fase 2 del tercer lote próximo a ser inducido a rizogénesis.

Al no observarse grandes diferencias entre los que estaban en placa de Petri y los que estaban en tubos de ensayo, el 09/01/2018, 48 días después, los 6 callos con hojas visibles pasaron a Medio 3 en placas de Petri. A excepción de uno, todos los callos no lograron sobrevivir por más que hayan enraizado. El restante enraizó correctamente y a partir de él se desarrolló una nueva planta, es decir se logró micropropagar un ejemplar.



Figura 11: Ejemplar micropropagado.

Hidroponía.

El estudio del efecto de la ausencia de diferentes sales bajo el sistema de cultivo hidropónico se realizó únicamente en *Arabidopsis thaliana*. Si bien dentro de los contenedores hidropónicos se cultivaron ejemplares de *Nicotina tabacum L*, a estos no se le midieron los parámetros analizados y solo se usaron como control positivo de todo el sistema ya que es una planta mucho más robusta y resistente a factores del ambiente.

Durante todo el ensayo se midieron diferentes variables de crecimiento a fin de establecer cómo la ausencia de cada macronutriente influye en el normal desarrollo y crecimiento de la planta.

Los resultados fueron:

TABLA XVII: resultados ensayo de hidroponía.



<i>Arabidopsis thaliana.</i>						
Solución.	Comercial	Completo (ctrl+)	Sin $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	Sin KNO_3	Sin K_2HPO_4	Sin MgSO_4
Germinación.	0/12	12/12	12/12	12/12	8/12	9/12
Días en germinar.		2	2	2	2	2
Días en florecer.		31	28	25		
Forma de flor.		Normal	Normal	Normal		
Altura máxima (cm).		15	15	15	5	3
Duración ciclo de vida (días).		90	90	90	15	9
Largo raíz a final c. de vida (cm).		Inmedible	Inmedible	Inmedible	5	5

Como se puede interpretar en la anterior tabla, en este ensayo, la falta tanto de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ como de KNO_3 no tuvo efecto alguno en ninguna de las características analizadas a diferencia de K_2HPO_4 en donde hubo una merma de la tasa de germinación y las plantas en cuestión solo lograron sobrevivir 15 días alzando 5 cm de altura y desarrollando una raíz de 5 cm en promedio. La falta de MgSO_4 en la solución nutritiva también tuvo efectos adversos en el normal desarrollo de las plantas, solo lograron sobrevivir apenas 9 días de germinadas alcanzando 3 cm de altura en promedio 5 cm de raíz.

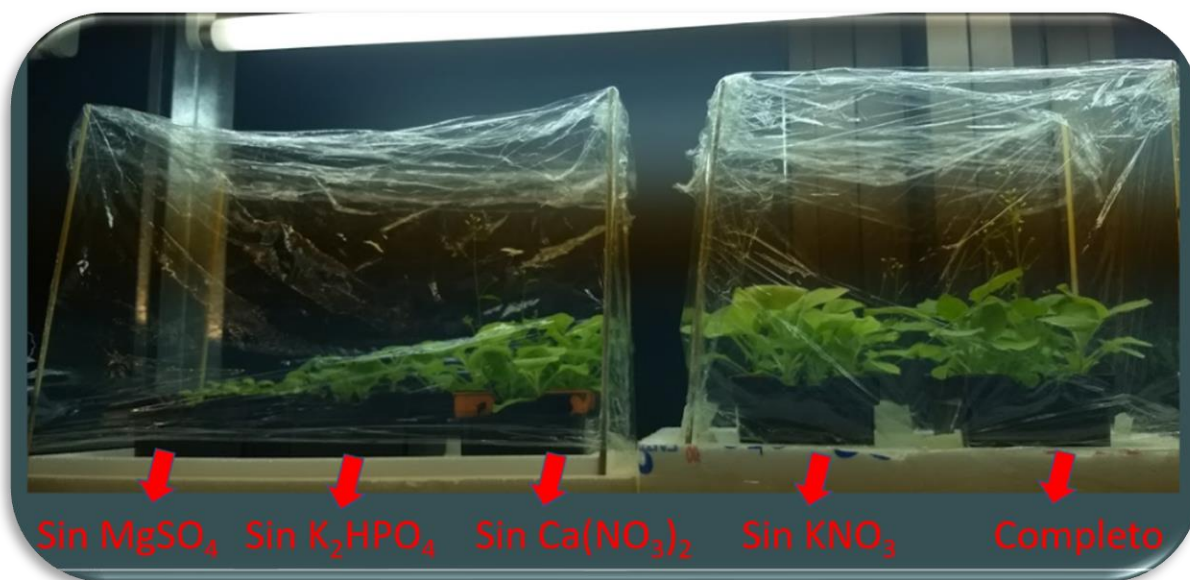


Figura 12: Ensayo de cultivos hidropónicos en donde se pueden apreciar las diferencias en el desarrollo según la ausencia de determinados macronutrientes.

Que la ausencia de KNO_3 no haya tenido efectos en el normal desarrollo se explica por el hecho de que los dos elementos que aporta a la solución son también aportados por otra sal, el suministro de potasio es cubierto por K_2HPO_4 y el de nitrógeno por $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. En cuanto al contenedor sin $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ se esperaba una necrosis temprana producto de la falta de calcio, pero esto no sucedió, posiblemente por un exceso de CaCl_2 en la preparación de las sales o bien porque está presente de alguna forma exógena no controlada. El efecto producido por la ausencia de K_2HPO_4 era esperado ya que es la única solución que aporta fósforo, las plantas de dicho contenedor presentaron síntomas de enanismo, ninguna superó los 5 cm. y finalmente murieron. El hecho de que la ausencia de MgSO_4 haya sido casi letal se debe a que es la única responsable de magnesio y azufre, dos macroelementos.



Figura 13: Desarrollo en solución completa.



Figura 14: Efecto de la ausencia de MgSO₄ en la solución nutritiva.

Conclusiones.

Como conclusiones a este trabajo se puede decir que, si bien se pudo micropropagar un ejemplar lo cual sienta evidencias de que es posible hacerlo dentro de UADE Labs con los recursos disponibles, se puede seguir perfeccionando la técnica para lograr mayor eficiencia y repetitividad de ensayos.

En lo que respecta al sistema de cultivo hidropónico se pudo comprobar que la privación de macroelementos en la nutrición de las plantas tiene repercusiones directas en su normal desarrollo. Para futuros ensayos se propone analizar la ausencia puntual de cada macroelemento y no de una sal. Para esto se debe suministrar magnesio y azufre de forma separada, así se los puede analizar individualmente. Para medir el efecto de la carencia de potasio de debe privar a la solución de KNO_3 y K_2HPO_4 teniendo en cuenta que hay q suministrar el fósforo de otra forma y para medir el impacto de la ausencia de nitrógeno se debe preparar la solución sin KNO_3 ni $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ teniendo el recaudo de no olvidarse el suministro de calcio.

Es mi deseo que futuras generaciones de estudiantes se interesen por la biotecnología vegetal, que siga habiendo tesis con modelos biológicos vegetales y que estos trabajos se consoliden dentro del laboratorio.

Referencias.

Altman, A. and Loberant, B.1998. Micropropagation: clonal plant propagation *in vitro*. En: Agricultural Biotechnology. Arie Altman Ed. Chapter 2: 19 – 40.

Barba Álvarez, A. 1978. Cultivo de callos. En: Cultivo de Tejidos vegetales, Hurtado D. Y Merino M. Ed. Trillas, Méjico: 93-100.

Barkla, BJ, Vera-Estrella, R & Pantoja, O 2014, 'Growing arabidopsis *in vitro*: cell suspensions, *in vitro* culture, and regeneration', in JJ Sanchez-Serrano & J Salinas (eds), Arabidopsis Protocols, Methods in molecular biology, vol. 1062, Humana Press, New York, NY, pp. 53-62. ISBN: 9781627035798.

Cheesman. Tripathi J, Matheka J, Merga I, Gebre E, Tripathi L. Efficient regeneration system for rapid multiplication of clean planting material of *Ensete ventricosum* (Welw.) *In Vitro Cell Dev Biol Plant*. 2017;53(6):624-630. doi: 10.1007/s11627-017-9867-9. Epub 2017 Dec 1. PMID: 29284987.

Choudhary SK, Patel AK, Harish, Shekhawat S, Shekhawat NS. An improved micropropagation system, *ex vitro* rooting and validation of genetic homogeneity in wild female *Momordica dioica*: an underutilized nutraceutical vegetable crop. *Physiol Mol Biol Plants*. 2017 Jul;23(3):713-722. doi: 10.1007/s12298-017-0441-z. Epub 2017 Apr 28. PMID: 28878509.

Debergh, P. C y Maene, L. 1981. A scheme for comercial propagation of ornamental plants by tissue culture, *Scientia Hort*. 14. Pág.335-345.

Epstein, E. (1972). Mineral nutrition of plants; principles and perspectives. New York: Miley.

Faisal M, Ahmad N, Anis M, Alatar AA, Qahtan AA. Auxin-cytokinin synergism *in vitro* for producing genetically stable plants of *Ruta graveolens* using shoot tip meristems. Saudi J Biol Sci. 2018 Feb;25(2):273-277. doi: 10.1016/j.sjbs.2017.09.009. Epub 2017 Sep 27. PMID: 29472777.

Gamborg OL, Miller RA, Ojima K. Exp Cell Res. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Apr;50(1):151-8.

Hoagland DR.. The relation of the plant to the reaction of the nutrient solution. Science. 1918 Oct 2548(1243):422-5. PMID:17830519.

Hoagland, D.R. and Arnon, D.I. (1950) The Water-Culture Method for Growing Plants without Soil. California Agricultural Experiment Station, Circular-347.

José Beltrano & Daniel O. Gimenez. Cultivo de Hidroponia. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad Nacional de La Plata.

Mayerowitz, E. M. (1989). “Arabidopsis, a useful weed” Cell56(2): 263-9.

Mroginski, L; Sansberro, P; Flaschland, E. 2004. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. En: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. (Echenique, V., Rubinstein, C., Mroginski, L .eds.). Ediciones INTA. pág. 35- 42.

Murashige, T. y Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Copenhagen. Physiologia Plantarum 15: 473-497.

Olmos, S; Luciani, G y Galdeano, E. 2004. Micropropagación. En: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. (Echenique, V., Rubinstein, C., Mroginski, L .eds.). Ediciones INTA. pág. 163-172.

Parray JA, Kamili AN, Jan S, Mir MY, Shameem N, Ganai BA, Abd Allah EF, Hashem A, Alqarawi AA. Manipulation of Plant Growth Regulators on Phytochemical Constituents and DNA Protection Potential of the Medicinal Plant *Arnebia benthamii*. *Biomed Res Int*. 2018 Jan 4;2018:6870139. doi: 10.1155/2018/6870139. eCollection 2018. PMID: 29516007.

Pence VC, Finke LR, Chaiken MF. Tools for the ex situ conservation of the threatened species, *Cycladenia humilis* var. *jonesii*. *Conserv Physiol*. 2017 Sep 23;5(1):cox053. doi: 10.1093/conphys/cox053. eCollection 2017. PMID: 28959449.

Quiroz K, Saavedra J, Vogel H, Verdugo G, Caligari PDS, García-González R. *In vitro* asymbiotic germination for micropropagation of the recalcitrant terrestrial orchid *Chloraea crispa* (Orchidaceae). *Appl Plant Sci*. 2017 Aug 29;5(8). pii: apps.1600142. doi: 10.3732/apps.1600142. eCollection 2017 Aug. PMID: 28924509.

Roca, W. M y Mroginski, L.A. 1991. Establecimiento de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. En: Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones prácticas. (Roca, W. M.; Mroginski, L. A. eds.). CIAT. Cali. pág. 19- 40.

Sharma U, Kataria V, Shekhawat NS. *In vitro* propagation, *ex vitro* rooting and leaf micromorphology of *Bauhinia racemosa* Lam.: a leguminous tree with medicinal values. *Physiol Mol Biol Plants*. 2017 Oct;23(4):969-977. doi: 10.1007/s12298-017-0459-2. Epub 2017 Aug 2. PMID: 29158643.

Skoog, F., and Miller, C.O. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symp. Soc. Exp. Biol*. 11: 118-131.

The Arabidopsis Genome Initiative. <https://www.nature.com/articles/35048692>

Villalobos, V.M y García, V.A.1982. Obtención de plantas de clavel (*Dianthus caryophyllus* L) libres de virus por cultivo *in vitro* de meristemas y ápices vegetativos. *Agrociencia* 48 pág. 107-118.

www.phytotechlab.com

www.seresmodelicos.csic.es

www.sigmaaldrich.com

www.solgenomics.net/organism/sol100/view