



			
			
	PRACTICAS DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL		

INDICE

1. MICROPROPAGACIÓN

- 1.1. Medios de cultivo.
 - 1.1.1. Medio de Cultivo de Murashige y Skoog .
 - 1.1.1.1. Elaboración de Soluciones Madre del medio de cultivo Murashige y Skoog.
 - 1.1.1.2. Preparación del medio de cultivo Murashige y Skoog.
 - 1.1.2. Otros medios de cultivo.
- 1.2. Establecimiento *in vitro*.
 - 1.2.1 Asepsia superficial de material vegetal.
- 1.3. Proliferación
 - 1.3.1. Desarrollo de material vegetal in vitro
- 1.4. Enraizamiento in vitro
- 1.5. Aclimatación

2. CULTIVO DE MERISTEMOS

- 2.1. Microinjerto

3. CULTIVO DE CALLO

4. SUSPENSIONES CELULARES

- 4.1. Viabilidad de células aisladas

5. EMBIOGÉNESIS SOMÁTICA

6. SEMILLAS ARTIFICIALES

- 6.1 Encapsulación en gel de alginato

7. MICORRIZACIÓN CONTROLADA *IN VITRO*

- 7.1. Aislamiento y cultivo de hongos micorrícicos
- 7.2. Plantas micropropagadas
- 7.3. Inoculación de plantas micropropagadas con hongos ectomicorrícicos

8. BIBLIOGRAFÍA

1.- MICROPROPAGACIÓN

El cultivo *in vitro* permite el crecimiento y desarrollo de material vegetal en recipientes que lo separan del ambiente exterior y lo mantienen en condiciones controladas y asépticas. Entre las diversas técnicas de cultivo *in vitro*, la micropropagación consiste en la producción clonal de vegetales a partir, generalmente, de ápices o explantos nodales de una planta madre. La gran producción de nuevas plantas se ve favorecida gracias al rápido crecimiento del material vegetal *in vitro* y a la proliferación de tallos durante los subcultivos.

Un programa de micropropagación puede comprender las siguientes etapas:

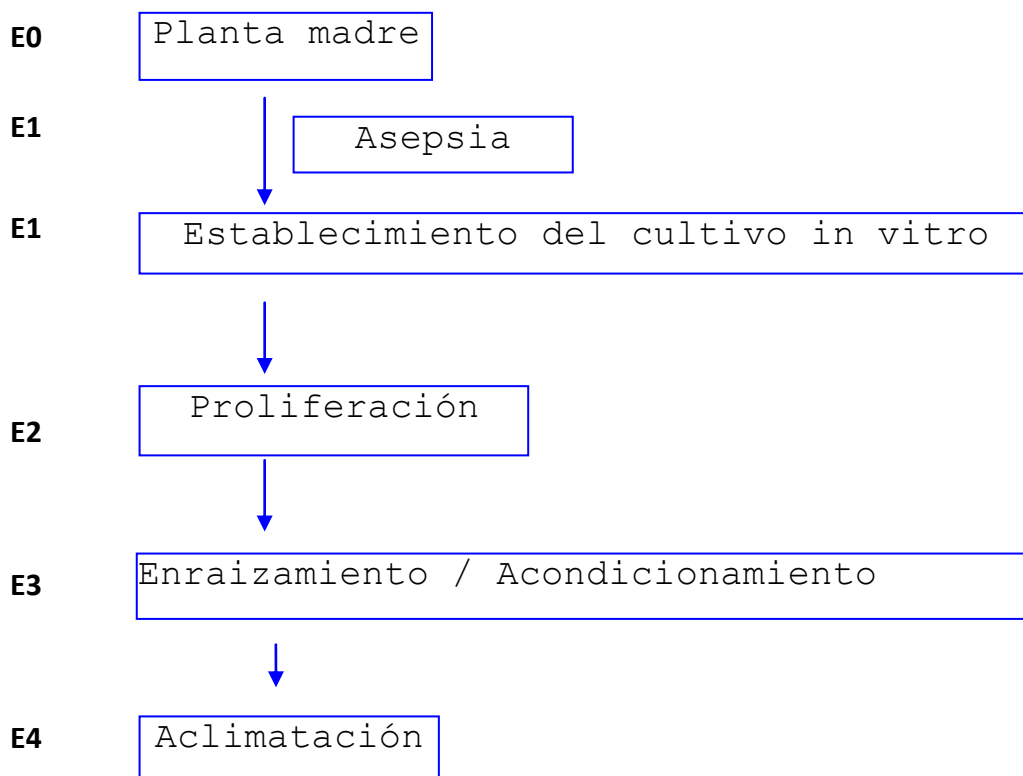
Etapla 0: Selección y acondicionamiento de la planta madre

Etapla I: tratamientos de asepsia y establecimiento del cultivo mediante

Etapla II: Desarrollo y multiplicación de los brotes

Etapla III: enraizamiento o acondicionamiento de los brotes para su aclimatación a condiciones *ex vitro*.

Etapla IV: Aclimatación a condiciones *ex vitro*.



1.1.- MEDIOS DE CULTIVO

Antes de realizar la asepsia del material vegetal que se va a introducir *in vitro*, es necesario disponer de Medios de Cultivo esterilizados y dosificados en recipientes adecuados. Una parte importante del cultivo *in vitro* son los Medios de Cultivo ya que en ellos se encuentran las sustancias necesarias para el crecimiento y desarrollo de los tejidos vegetales. Un medio de cultivo es una solución acuosa en donde se encuentran disueltas sales minerales que aportan los elementos esenciales Macronutrientes (N, P, K, S, Ca y Mg) y Micronutrientes (Fe, B, Mn, Zn, Cu, Mo, y Co). Normalmente es imprescindible una fuente de carbono, generalmente la sacarosa, debido a la escasa actividad fotosintética de los tejidos *in vitro*. Además, el medio puede ser enriquecido con Aminoácidos, Vitaminas y Reguladores del Crecimiento.

Los medios de cultivo se preparan a partir de soluciones concentradas 10 o 100 veces (Soluciones Madre o Stock). En la solución madre se pueden mezclar varias sales minerales siempre que no se produzcan problemas de precipitación. Algunos elementos, como el Fe, se utilizan en forma de quelatos para mantener su disponibilidad durante el cultivo.

Los medios de cultivo se pueden utilizar de forma líquida o con un agente gelificante como el agar.

1.1.1.-MEDIO DE CULTIVO DE MURASHIGE Y SKOOG.

El Medio de Cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) se realiza con las siguientes sustancias:

Macronutrientes	
	mg/L
(NH ₄)NO ₃	1650
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370
KNO ₃	1900
KH ₂ PO ₄	170
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440

Micronutrientes	
	mg/L
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
Na ₂ EDTA	37,3
H ₃ BO ₃	6,2
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
KI	0,83

Vitaminas	
	mg/L
<i>myo</i> - Inositol	100
Tiamina HCl	0,1
Acido nicotínico	0,5
Glicina	2, 0
Piridoxina HCl	0,5

	g/L
Sacarosa	30
Agar	7.5

1.1.1.1.- ELABORACIÓN DE SOLUCIONES MADRE DEL MEDIO DE CULTIVO MURASHIGE Y SKOOG

Para la realización del medio de cultivo MS se elaboran las siguientes soluciones Madre:

Soluciones stock de nutrientes:

- Stock de macronutrientes,
- Stock de Calcio,
- Stock de micronutrientes
- Stock de hierro y EDTA,

Soluciones Stock de vitaminas

Soluciones Stock de Reguladores

Todas las soluciones se preparan sobre un 70% de agua del volumen final deseado, y sobre ella se van añadiendo uno por uno todos los componentes hasta su completa disolución. Posteriormente se ajusta el volumen final con agua y se almacenan.

Stock de Macronutrientes MS (x 10)	
	g/L
KNO ₃	19.0
NH ₄ NO ₃	16.5
MgSO ₄ .7H ₂ O	3.7
KH ₂ PO ₄	1.7

Usar 100 ml de la solución stock de macronutrientes para preparar 1 L de medio de cultivo MS.

Usar 100 ml de la solución stock de Ca para preparar 1 L de medio de cultivo MS.

Stock de Calcio (x 10)	
CaCl ₂ .2H ₂ O	4.4

Stock de Micronutrientes (x 1000)	
	mg/100mL
H ₃ BO ₃	620
MnSO ₄ ·4H ₂ O	2230
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	860
KI	83
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	2.5
CoCl ₂ ·6H ₂ O	2.5

Usar 10 ml de la solución stock de micronutrientes para preparar 1 L de medio de cultivo MS

Stock de Fe-EDTA(x100)

El hierro se puede añadir quelado como producto comercial (por ejemplo, Secuestrene) o preparando el siguiente stock:

1. Disolver 3,72 g de EDTA disódico en 900 mL de agua destilada. Se obtendrá una solución clara a los 15 min a temperatura ambiente (25 - 27°C).
2. Añadir 2,78 g de sulfato ferroso heptahidratado. Se obtendrá inmediatamente una solución de color amarillo claro.
3. Enrasar a 1 L y almacenar la solución de hierro quelado en una botella ambar para protegerla de la exposición a la luz.
4. Usar 10 ml de la solución stock de hierro quelado para preparar 1 L de medio de cultivo MS.

Stock de Vitaminas (x 100)	
	mg/100 ml
Mioinositol	1000
Tiamina HCl	1
ácido nicotínico	5
Piridoxina HCl	5
Glicina	20

Usar 10 ml de la solución stock de vitaminas para preparar 1 L de medio de cultivo MS.

Stock de reguladores de crecimiento.

El stock de reguladores de crecimiento se puede hacer a una concentración de 1 mg/

- Soluciones de IAA de 1mg/ml
- Solución de Kn de 1 mg/ml
- Solución de GA₃ de 1 mg/l
- Solución de BAP de 1mg/l

Las auxinas se pueden disolver primeramente en una pequeña cantidad de etanol al 95%, KOH o NaOH 1 M. Una vez disueltas, se añade agua destilada suavemente, procurando que las auxinas no precipiten, hasta alcanzar el volumen deseado.

De la misma forma, el ácido abscísico se puede disolver previamente en NaOH 1 N y las giberelinas en el etanol al 95%.

Las citoquininas se disuelven previamente en una pequeña cantidad de HCl 0,5 N. Se puede calentar suavemente para favorecer la disolución y posteriormente se enrasa al volumen deseado.

1.1.1.2.- PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO DE MURASHIGE Y SKOOG

La elaboración de los medios de cultivo se realiza diluyendo las soluciones madre previamente realizadas. Además, se añade la fuente de carbono y el agente gelificante, que normalmente es agar. Se pueden hacer distintos medios de cultivo manteniendo la misma concentración de algunas sustancias, por ejemplo sales minerales y vitaminas, y modificando o eliminando otras como los reguladores de crecimiento.

Tomando como base las sales minerales, vitaminas y fuente de carbono de Murashige y Skoog se pueden realizar múltiples medios de cultivo variando los reguladores de crecimiento o su concentración. Por ejemplo, se pueden realizar los siguientes medios de cultivo:

- MS-0: medio MS sin reguladores
- MS-K: MS con 0.3 mg/L de ácido indol-acético y 1 mg/L de kinetina
- MS-R: MS con 1 mg/L de AIB

Para preparar 1L de estos medios se realiza el siguiente proceso:

Colocar en un agitador magnético una jarra de 1 L de capacidad con unos 400 ml de agua destilada y añadir los elementos minerales y las vitaminas:

- 100 ml del stock de macronutrientes.
- 100 ml del stock de Ca,
- 1 ml del stock de micronutrientes,
- 10 ml de la solución hierro EDTA (ó 0.2g/L de secuestrene)
- 10 ml del stock de vitaminas.
- Adicionar la cantidad estimada de las soluciones de fitohormonas.
- 30 g sacarosa y esperar a que se disuelva.
- Añadir agua destilada hasta un volumen de 1L
- Colocar la mezcla en una jarra y ajustar, en un pHmetro, el pH del medio (con KOH, NaOH ó HCl) hasta 5.8.
- Añadir 7,5 g de agar y disolverlo en el autoclave o en microondas.
- Agitar el medio, dosificarlo en los recipientes de cultivo y colocar las tapas.
- Esterilizar el medio en el autoclave durante 20 min a 120°C y 1 Kg/cm² de presión.
- Dejar enfriar el medio antes de su utilización

Si algún componente fuera termolábil habría que esterilizarlo por filtración con una jeringuilla y un filtro de un tamaño de poro menor de 0.22 µm. Este proceso habría que realizarlo en una cámara de flujo laminar y emplear material estéril.

1.1.2.- OTROS MEDIOS DE CULTIVO.

Medios de cultivo	1 MS	2 SH	3 B5	4 White
	CONCENTRATION			
Macronutrientes	mM	mM	mM	mM
NH ₄ NO ₃	20.6	25.0	---	---
KNO ₃	18.8	1.4	25.0	0.8
CaCl ₂ .	3.0	1.6	1.0	---
Ca(NO ₃) ₂	---	---	---	1.3
MgSO ₄	1.5	---	1.0	3.0
Na ₂ SO ₄	---	---	---	1.4
(NH ₄) ₂ SO ₄	---	---	1.0	---
KH ₂ PO ₄	1.25	1.25	---	---
NaH ₂ PO ₄ .	---	---	1.1	0.1
NH ₄ H ₂ PO ₄	---	2.6	---	---
Micronutrientes	μM	μM	μM	μM
KI	5.0	6.0	4.5	4.5
KCl	---	---	---	871.9
H ₃ BO ₃	100.0	80.0	48.5	24.3
MnSO ₄	100.0	60	59.2	22.4
ZnSO ₄	30.0	3.5	7.0	10.4
NaMoO ₄ .	1.0	0.4	1.0	---
CuSO ₄	0.1	0.8	0.1	0.0
CoCl ₂	0.1	---	0.1	---
Na ₂ EDTA	100.0	55.0	---	---
FeSO ₄ . *	100.0	55.0	---	---
Fe ₂ (SO ₄) ₃	---	---	---	6.3
Comp orgánicos	μM	μM	μM	μM
Myo-Inositol	550.0	5500.0	555.1	---
Acido Nicotínico	4.6	40.6	8.1	0.4
Piridoxina HCl	2.4	2.4	4.9	0.0
Tiamina HCl	0.3	14.8	29.6	0.0
Glicina	26.6	---	---	40.0

- 1.- Murashige y Skoog 1962
- 2.- Shenk y Hildebrandt 1972;
- 3.- Gamborg, Miller y Ojima 1968;
- 4.- White 1963.

* El hierro se puede suministrar en forma de quelato: 0.2 g/L de Sequestrene (Ciba –Geigy)

1.2.- ESTABLECIMIENTO IN VITRO

Para introducir in vitro un material vegetal que se ha desarrollado en el exterior es imprescindible tomar una serie de medidas encaminadas a eliminar los posibles microorganismos que puedan estar establecidos sobre él. En primer lugar hay que seleccionar material vegetal en un adecuado estado de nutrición y libre de enfermedades y

plagas. Si el material presentase algún problema habría que descartarlo o realizar los tratamientos adecuados.

Una vez seleccionado el material vegetal, y previamente a la introducción in vitro, es conveniente someterle a una serie de tratamientos para reducir al máximo los microorganismos superficiales. Por ejemplo se pueden realizar aplicaciones periódicas de fungicidas y bactericidas sistémicos. Algunos microorganismos pueden tener una alta capacidad saprofítica que les permite colonizar rápidamente el medio de cultivo e imposibilitar el desarrollo del material vegetal.

El paso previo a la instalación in vitro de un material vegetal es la asepsia superficial. El protocolo de este proceso dependerá de las características del tejido empleado. Para trabajar en condiciones asépticas, es recomendable realizar este proceso en una cámara de flujo laminar y emplear material estéril. El ambiente debe mantenerse limpio con la superficie de trabajo desinfectada con etanol al 70% antes y después de usarla. Se debe usar bata de laboratorio y lavarse bien las manos.

1.2.1.- ASEPSIA SUPERFICIAL DE MATERIAL VEGETAL

Se pueden considerar dos situaciones dependiendo que el explanto que se va a emplear esté protegido en el interior de un órgano, como el embrión, o esté en contacto con el exterior, como brotes y yemas.

Para los explantos en el interior de órganos hay que realizar los siguientes pasos:

- Realizar una asepsia superficial del órgano con etanol al 70 %.
- Eliminar el tejido del órgano hasta alcanzar el explanto.
- Colocar el explanto en el medio de cultivo MS-O

Dentro de este grupo de explantos podemos considerar a numerosas semillas y a los embriones.

Como se citó anteriormente, los explantos en contacto con el ambiente exterior han de estar en óptimas condiciones sanitarias gracias a la aplicación regular de productos fitosanitarios. Por ejemplo, para introducir in vitro plantas de patata se colocan tubérculos en una bandeja con papel de filtro humedecido con acaricida, fungicida y bactericida, hasta que se desarrollen pequeños brotes.

Con un material vegetal saneado se puede seguir el siguiente protocolo:

- *Cortar* segmentos nodales o apicales de crecimiento activo y de un tamaño ligeramente superior al deseado. Eliminar las hojas, si las hay, y colocarlos en un recipiente con agua destilada.
- Esterilización de los explantos en un recipiente estéril con lejía comercial al 20%, durante 15 minutos.
- Lavar los explantos con abundante agua estéril y depositarlos sobre papel de filtro para eliminar el exceso de agua.
- Cortar una pequeña porción del extremo del explanto (por donde se cortó inicialmente) y clavar verticalmente la parte basal (inferior) en el medio de cultivo.
- Etiquetar los recipientes con un código adecuado que identifique el medio de cultivo, el vegetal y la fecha
- Colocar los explantos en una cámara de crecimiento en oscuridad o a 25 °C y 16 h de fotoperiodo.



Una vez establecido in vitro, es necesario hacer un seguimiento del material vegetal para detectar las posibles contaminaciones y sacar de la cámara de cultivo los recipientes contaminados.

En la siguiente tabla se puede cuantificar el resultado de la asepsia realizada

Fecha:	Nº explantos cultivados	Nº explantos contaminados	Tipo de contaminación	% de contaminación
Material vegetal				

1.3.- DESARROLLO DEL MATERIAL VEGETAL IN VITRO

Los explantos establecidos en el medio de cultivo que no presentaban síntomas de contaminación se subcultivan posteriormente en el mismo medio o en otro diferente. En algunas ocasiones, el primer medio de cultivo que se emplea es el MS-O (medio sin reguladores del crecimiento) y posteriormente, los que no estén contaminados, se subcultivan a otros medios más específicos, con diversas combinaciones hormonales que desentenderán del tipo de material vegetal y del fin que se pretenda.

En la siguiente tabla se puede cuantificar los resultados de la proliferación

Fecha:					
Medio	Nº explantos Cultivados	Nº explantos que reaccionan	Nº de tallos/ explanto	Nº yemas/ tallos	Nº total yemas

Ejemplos de algunos materiales vegetales establecidos in vitro

Material vegetal					
Vegetal	origen				
Naranja (<i>Citrus sinensis</i>)	semillas				
Laurel (<i>Laurus. Nobilis</i>)					
Nogal (<i>Juglans regia</i>)	Embrión				
Patata (<i>Solanum tuberosum</i>)	Brotes				

1.4.- ENRAIZAMIENTO IN VITRO

La siguiente fase de un proceso de Micropropagación (etapa III) consiste en inducir el enraizamiento de microtallos obtenidos en el apartado 1.3.

Para inducir el enraizamiento se suele emplear el medio de cultivo MS sin citoquininas y con auxinas. Por ejemplo un medio MS con 1 mg/L de AIB



Abedul



Begonia

1.5.- ACLIMATACIÓN

La última fase de una cadena de Micropropagación consiste en la aclimatación a condiciones ambientales de las plantas obtenidas in vitro.

Las microplantas enraizadas in vitro se siembran en un sustrato humedecido de turba/vermiculita (1:1) y se colocan en una cámara de aclimatación con una humedad relativa del 90 %. Durante dos semanas la humedad relativa va disminuyendo hasta alcanzar los valores del ambiente exterior.

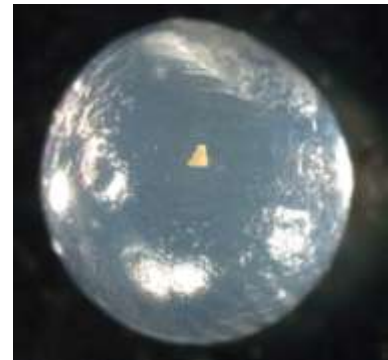


2.- CULTIVO DE MERISTEMOS

El cultivo del meristemo apical de un tallo se emplea para la obtención de plantas libres de virus ya que estos patógenos tienen dificultades para alcanzar esta zona cuando la planta está creciendo activamente

Para obtener un meristemo apical es necesario tomar segmentos apicales de tallos obtenidos in vitro o procedentes de plantas crecidas en condiciones en el exterior. Si se utiliza la segunda posibilidad será necesario realizar una afección previa del tejido. Posteriormente se eliminan los primordios foliares que rodean al meristemo hasta dejar al descubierto el domo meristemático. Finalmente con un bisturí se realiza un corte transversal, de 0.2 a 1.0 mm, debajo del meristemo, con uno o dos pares de primordios foliares y se coloca sobre un medio de cultivo adecuado, procurando colocar la zona de corte hacia abajo.

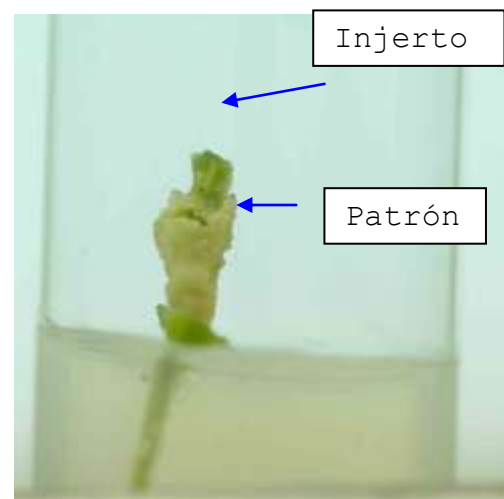
Una vez que empieza a desarrollarse el meristemo en el medio de cultivo se actúa como en una cadena multiplicativa en un proceso de micropropagación. Con los meristemos escindidos también se pueden realizar microinjertos y encapsulaciones en gel de alginato.



2.1.- MICROINJERTO

El microinjerto es una variante del cultivo de meristemos que consiste en colocar el ápice caulinar sobre una microplanta in vitro. El meristemo sería el injerto y la microplanta el patrón. En los cítricos se pueden obtener microplantas libres de virus a partir de los embriones nucelares presentes en las semillas. Teniendo en cuenta que los embriones nucelares están libres de virus y los meristemos también, las plantas que se desarrollen del microinjerto también lo estarán.

Esta técnica se puede ensayar con microplantas de naranjo establecidas in vitro a partir de embriones nucelares (Apartado 1.3.2) y meristemos de plantas adultas. .



3.- CULTIVO DE CALLO

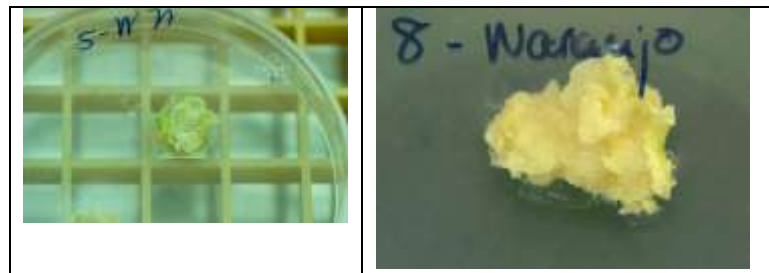
El callo es una masa de células indiferenciadas, coherente y amorfa que se multiplica de una manera desorganizada. Se puede inducir in vitro mediante la transferencia de órganos vegetales establecidos in vitro a medios de cultivo adecuados, que frecuentemente poseen la auxina 2,4 D.

En el medio de cultivo UM5 realizado con las sales minerales del MS, 5 mg/l de 2,4-D y 0,25 mg/l de Kinetina se pueden inducir callos en numerosas especies.

El procedimiento de la inducción de callo es el siguiente:

- Tomar las hojas establecidas in vitro y realizar cortes tangenciales al nervio central.
- Colocarlas en una placa Petri con medio de cultivo UM5.
- Mantener el cultivo durante 30 días en oscuridad a 25 °C.
- Una vez formado el callo, retirar una pequeña porción y subcultivar en medio UM5 nuevo.

Proceso de inducción de callo a partir de hojas cotiledonares obtenidas en semillas de naranjo



4.- SUSPENSIONES CELULARES

Los cultivos o suspensiones celulares suelen iniciarse colocando un callo friable en un medio de cultivo líquido y en agitación.

Para obtener una suspensión celular se introduce un callo en un matraz con medio de cultivo UM5 líquido y se coloca en un agitador orbital a 150 rpm durante varios días a 25 °C. hasta que se obtengan células libres. La suspensión celular obtenida se pasa a través de un filtro de 250 µm y se añade nuevamente a un matraz con nuevo medio de cultivo. Se vuelve a dejar en agitación a 120 r.p.m. y 25 °C. durante varios días. La suspensión resultante se puede filtrar y dividir en varias partes para iniciar nuevos cultivos celulares siguiendo los

pasos anteriores. Normalmente las suspensiones celulares se pueden subcultivar cada 10 días.



Células de naranjo obtenidas a partir de callo procedente de cotiledones

4.1.-VIABILIDAD DE CELULAS AISLADAS

La viabilidad de las células obtenidas se determina tratando las células con diacetato de fluoresceína (FDA) según el método de Widholm (1972):

- En frasco se prepara una solución diluida de FDA añadiendo 10 ml medio de cultivo líquido y 1 ó 2 gotas de FDA al 0,1% (p/v) en acetona. Esta solución de FDA se ha mantenido almacenada a 4 °C hasta su uso.
- En un portaobjetos se coloca una gota de la solución de FDA diluida y otra gota de una suspensión celular.
- Se deja 3 minutos en oscuridad y se mira la preparación en un microscopio con equipo de fluorescencia. Las células vivas presentan un color amarillo verdoso intenso.
- Observando y contando las células con luz ultravioleta y con luz visible se puede calcular el porcentaje de células viables. Para este cálculo se recomienda contar unas 200 células.



5.- EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

La embriogénesis somática consiste en la formación de embriones a partir de estructuras de origen somático.

En los cítricos es fácil inducir embriogénesis somática in vitro a partir de callos embriogénicos procedentes de tejidos nucelares presentes en la semilla.

Para la obtención de los callos embriogénicos se emplearon cotiledones presentes en plántulas procedentes de semillas germinadas in vitro (Apartado, 1.3.2) y se ensayaron los siguientes medios de cultivo:

- UM5: MS con 5 mg/l de 2,4-D y 0,25 mg/l de Kinetina
- ½ MS-N: MS diluido a la mitad y 50 g/L de sacarosa; 0.250 g/L de Extracto de malta y Agar al 0.6%.

6.- SEMILLAS ARTIFICIALES.

A partir de los embriones somáticos se pueden crear semillas artificiales mediante su encapsulación en gel de alginato. Una semilla sintética se diferencia de una verdadera en que el embrión que posee se ha producido mediante una embriogénesis somática y no mediante una fecundación. Una semilla sintética puesta en condiciones adecuadas puede germinar y dar lugar a una planta normal.

Los alginatos son productos obtenidos a partir de algas pardas de la clase Phaeophyceae. Son macromoléculas lineares constituidas por dos tipos de monómero, el ácido β -D manurómico y el ácido α -L gulurónico. Los alginatos pueden formar geles de distinta dureza al ponerse en contacto con la mayoría de cationes divalentes o multivalentes. Para usar el alginato como agente inmovilizador se emplea principalmente el ión calcio.

6.1.- ENCAPSULACIÓN EN GEL DE ALGINATO

Para inmovilizar un material vegetal en gel de alginato es necesario hacer una solución de este producto al 3 % en un medio de cultivo sin calcio y esterilizarlo en autoclave. Además es necesario preparar una solución de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 100 mM.

Los embriones somáticos que se van a emplear procederán de masas de callo embriogénicas obtenidas a partir de cotiledones de naranjo (apartado 5).

Para la obtención de los embriones encapsulados en el gel de alginato se emplea el siguiente método:

- En condiciones estériles, añadir en un tubo de ensayo 1 ml de la solución de alginato.
- Retirar los embriones de la masa de callo embriogénico y añadirlos al tubo con el alginato. Girar

suavemente el tubo para que el alginato impregne completamente los embriones.

- Con una pipeta Pasteur de 2 ml estéril se aspira la solución de alginato conteniendo los embriones y se deja caer gota a gota dentro de la solución de calcio 100 mM. Procurar que la pipeta no toque la solución de calcio
- Las bolas de alginato cálcico que se han formado se dejan en la solución de calcio durante 45 min para completar el proceso de gelificación.
- Escoger las bolas con los embriones y secarlas posándolas sobre un papel de filtro estéril.

Los embriones encapsulados se pueden emplear directamente o almacenarlos a bajas temperaturas o incluso crioconservar.

7. MICORRIZACIÓN CONTROLADA IN VITRO

El cultivo in vitro también es una importante herramienta para el estudio de la relación que se establece entre las plantas y los microorganismos ya que permite un mayor control de diversos factores que pueden afectar a esa interacción. Entre las distintas relaciones planta-microorganismo podemos destacar la que se establece entre las raíces de los vegetales y los hongos micorrícicos.

Se entiende por micorrización controlada la puesta en contacto de un determinado hongo micorrícico con las raíces de una planta concreta, sin la presencia de otros organismos puedan interferir la interacción. Esta micorrización controlada in vitro sería un “cultivo dual”, por existir dos organismos en el mismo recipiente o “cultivo monoxénico” por existir un organismo en contacto con otro.

Para poder realizar una micorrización controlada in vitro es necesario disponer de plantas enraizadas in vitro procedentes normalmente de una cadena proliferativa (y aislamientos puros del hongo micorrícico.

7.1. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE HONGOS MICORRÍCICOS.

La forma más fácil de realizar un aislamiento es retirar, en condiciones asépticas, una pequeña porción del interior de una seta en buen estado y colocarlo en un medio de cultivo adecuado como el Medio Melin Norkans Modificado (MMN). Este medio está compuesto por los siguientes ingredientes:

Nutrientes Minerales (mg/L)	
CaCl ₂ 2H ₂ O	50
KH ₂ PO ₄	500
NaCl	25
(NH ₄) ₂ HPO ₄	250
MgSO ₄ 7H ₂ O	150
Fetrilon 13 *	100
Vitaminas (µg/l)	
Tiamina (HCl)	0,5
Fuente de Carbohidratos (g/L)	
Glucosa	10
Agar	15 g/L
p 5,5	

7.2.- PLANTAS MICROPROPAGADAS

Para este ensayo se emplean microplantas establecidas y enraizadas in vitro en el medio MS-O (Apartado 1.4). Hay que procurar que un porcentaje de raíces no esté sumergido en el medio de cultivo.

7.3.- INOCULACIÓN CON HONGO ECTOMICORRÍCICO

En condiciones asepticas se pone en contacto una pequeña porción del micelio del hongo en crecimiento activo con las raíces de La planta dentro del recipiente de cultivo. El cultivo dual se mantiene en la cámara de cultivo hasta que se observe la formación de micorrizas. Transcurrido este tiempo las plantas micorrizadas se extraen del recipiente, manteniendo intactos los sistemas radicales, y se eliminan con cuidado los restos del medio adheridos. A la lupa se observan las características de las micorrizas formadas.



Plantas de Abedul inoculadas con el hongo ectomicorrícico *Paxillus filamentosus*

8.- BIBLIOGRAFÍA:

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

NAVARRO, L. 1979. Microinjerto de ápices caulinares in vitro para la obtención de plantas de ágrios libres de virus. *Bol Serv.Plagas* 5: 127-148.

REY, H.Y.; MROGINSKI, L. A.; SCOCCHI, A.M. 1995. Embriogénesis somática en especies cítricas por cultivo de nucelas. *Hort. Arg.*, 14 (36): 54-64.

WIDHOLM, J.M. 1972. The use of fluorescei diacetate and phoe safranine for determining viability of cultured plant cells. *Stain Technol* 47: 189-194