

# Parte A

## **Principios Básicos, Metodologías y Técnicas del Cultivo de Tejidos Vegetales**

# Capítulo 1

## **Establecimiento de un laboratorio para el cultivo de tejidos vegetales**

W. M. Roca\*

L. A. Mroginski\*\*

---

\* Unidad de Investigación en Biotecnología (UIB), Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia.

\*\* Facultad de Ciencias Agrarias, Instituto de Botánica del Nordeste, Corrientes, Argentina.

## **Introducción**

El cultivo de tejidos, como técnica, consiste esencialmente en aislar una porción de la planta (explante) y proporcionarle artificialmente las condiciones físicas y químicas apropiadas para que las células expresen su potencial intrínseco o inducido. Es necesario además adoptar procedimientos de asepsia para mantener los cultivos libres de contaminación microbiana.

Aunque estos principios son básicamente invariables en todos los laboratorios de cultivo de tejidos vegetales, su aplicación puede presentar variaciones en magnitud y complejidad, dependiendo de los objetivos del laboratorio; así, mientras que un laboratorio de investigación puede ser pequeño en tamaño pero muy especializado en equipos e instalaciones, uno de producción comercial tiende a ser más grande y simple. Un laboratorio de investigación puede también tener un rol de enseñanza y, en este caso, es frecuente que se asignen en él áreas especiales para la enseñanza y la demostración.

Por otra parte, la investigación en cultivo de tejidos puede cubrir un rango amplio de actividades; por ejemplo, desde la investigación básica sobre los procesos bioquímicos y morfológicos de la diferenciación celular, hasta la que realizan aquellos laboratorios que se dedican a la investigación aplicada y al desarrollo de tecnologías para utilizar esta investigación en la propagación clonal, o en el mejoramiento genético de las plantas. En estos últimos laboratorios las instalaciones físicas, los equipos y otros suministros para el cultivo de tejidos serán de una magnitud intermedia entre el laboratorio de investigación básica y el de producción comercial.

El laboratorio de cultivo de tejidos debe disponer de un área destinada al establecimiento, crecimiento y multiplicación de las plantas producidas; esta área es especialmente necesaria en los laboratorios de investigación y desarrollo y en los de producción comercial. Aquellos laboratorios que se dedican a la producción y distribución de materiales de sanidad certificada, por ejemplo, deben incluir además facilidades para la cuarentena y para la evaluación fitosanitaria.

Finalmente, la decisión de establecer un laboratorio de cultivo de tejidos requiere de un estudio y análisis crítico acerca de la necesidad de hacerlo, dentro de un contexto integral del desarrollo de la investigación y la producción agrícola o forestal de una región o país. Por lo tanto, el establecimiento y funcionamiento del laboratorio debe ser, idealmente, el producto de esfuerzos multidisciplinarios.

Teniendo en cuenta estos conceptos y la relatividad de cualquier diseño o recomendación para el establecimiento de un laboratorio de cultivo de tejidos, a continuación se presenta una descripción general de lo que puede ser dicho laboratorio y de las necesidades de equipos y otros suministros de carácter estándar; por último, se presenta una breve discusión sobre diferentes métodos para prevenir la contaminación microbiana de los cultivos.

Existen recomendaciones para la planificación de ciertos tipos de laboratorio; como ejemplos se pueden mencionar las relacionadas con la propagación masiva de fresas (Boxus et al., 1984), con la producción de semilla básica de papa (Van Uyen et al., 1983), con los estudios de fijación de nitrógeno in vitro (Rupela et al., 1984), y con otros aspectos relacionados con el establecimiento del laboratorio (Biondi et al., 1981; Bonga, 1982).

## **Organización del Laboratorio**

Un laboratorio de cultivo de tejidos se puede dividir esquemáticamente en áreas separadas para las diferentes funciones que se desarrollan en él (Figura 1.1); en la práctica, sin embargo, algunas de las funciones pueden desarrollarse en un mismo ambiente. Las áreas o secciones principales son:

1. **Area de preparación.** Se utiliza principalmente para preparar los medios de cultivo, pero debe proveer también un espacio para almacenar los materiales de vidrio y de plástico, y los reactivos químicos. Este ambiente debe contar con mesas de trabajo para la preparación de los medios y para colocar las balanzas, el medidor de pH, los platos calientes con agitación, y otros elementos; también debe incluir vitrinas, estanterías y espacio para el equipo de refrigeración, y para la incubadora o la cámara de crecimiento (o para ambas).
2. **Area de lavado y de esterilización.** Puede estar constituida por dos áreas conectadas entre sí, o por un solo ambiente, y puede estar localizada dentro del área general de preparación.

El área de lavado debe incluir por lo menos un lavadero grande con agua caliente y agua fría y una fuente de agua de alto grado de pureza, preferiblemente agua doblemente destilada; para el efecto se debe usar un destilador de vidrio o de material no tóxico y un desionizador de

agua colocado entre el destilador y el lavadero. Esta área debe disponer de un espacio para almacenar agua destilada en botellas de plástico; también debe proveer basureros adecuados para el material vegetal, inorgánico y de vidrio que se deseche.

El área de esterilización debe tener espacio para el autoclave vertical u horizontal, el cual puede ser pequeño (olla de presión) o grande (de carga frontal y de enfriamiento lento y rápido), según sea el volumen del material que se procese. Esta área también puede incluir espacio para estufas, secadores y un lavadero con agua caliente y fría.

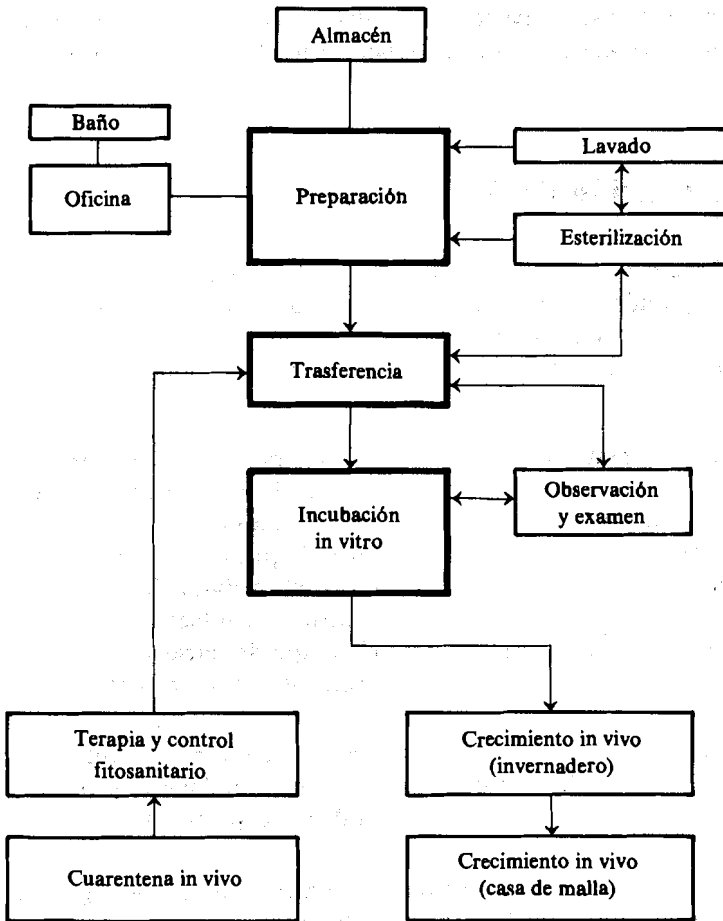


Figura 1.1. Diferentes áreas de un laboratorio de cultivo de tejidos.

3. **Área de transferencia.** En esta área del laboratorio se realiza el trabajo de excisión, inoculación y transferencia de los explantes a los medios de cultivo. Dado que este trabajo demanda los más altos niveles de limpieza ambiental, se recomienda la instalación de gabinetes de flujo horizontal o vertical de aire filtrado bajo presión, o la construcción de cuartos de transferencia. Sin embargo, ciertas operaciones de inoculación, como la excisión y el cultivo de ápices y meristemas en tubos de ensayo de boca angosta, se pueden realizar sobre una mesa limpia, ubicada en un lugar del laboratorio libre de corrientes de aire y polvo.

Los gabinetes de flujo laminar deben ubicarse, en lo posible, en un lugar alejado de las puertas y con un mínimo de corriente de aire, con el fin de prolongar la vida útil de los filtros.

4. **Área de incubación.** Los cultivos se incuban en un cuarto apropiado o en gabinetes o cámaras de crecimiento; éstas pueden ser más eficientes en cuanto al control ambiental, pero son más costosas. El área de incubación o crecimiento *in vitro* debe proporcionar un buen control de la temperatura (20-28 °C), de la iluminación (variable, según las necesidades: 1000 a 5000 lux) y de la humedad relativa (70%-80%).

En el cuarto de incubación se instalan estanterías metálicas o de madera para colocar los cultivos. Estas estanterías pueden tener dimensiones variables: el ancho entre 0.30 m y 1.00 m, el largo de acuerdo con el tamaño del cuarto, y la altura total de 1.80 a 2.20 m; la distancia entre entrepaños es de 0.20 a 0.50 m.

Esta área debe incluir, además, un espacio para cultivos en agitación y para cultivos estáticos en oscuridad.

Es necesario propiciar una buena distribución del aire en este cuarto para evitar zonas de recalentamiento por efecto de las luces. Cuando se utilizan tubos fluorescentes, es conveniente sacar los balastros fuera de este cuarto.

La regulación de la temperatura se puede lograr por medio de aparatos de aire acondicionado de pared o de un sistema central. En cualquier caso, es necesario tomar precauciones para evitar el calentamiento excesivo, instalando alarmas y controles para cortar la iluminación cuando falle el aire acondicionado.

5. **Área de observación y examen.** Generalmente los microscopios (estéreo, compuesto, invertido y otros) se localizan tanto en el área de incubación como en la de transferencia, pero opcionalmente pueden

estar en un área separada. El objetivo de esta área es realizar observaciones periódicas de los cultivos, tanto en medios semisólidos como en líquidos.

Las áreas arriba descritas se pueden considerar como el núcleo del laboratorio de cultivo de tejidos. Los laboratorios de investigación y desarrollo y los de producción comercial deben contar, además, con las siguientes instalaciones:

6. **Area de crecimiento.** Las plantas que se regeneran en el área de incubación se pueden acondicionar o aclimatar y luego trasplantar en macetas, bandejas o camas apropiadas. Estas operaciones se pueden llevar a cabo en tinglados, casas de malla o invernaderos, dependiendo de las condiciones climáticas del lugar donde está ubicado el laboratorio y de los requerimientos de aislamiento de los materiales por razones fitosanitarias.

Después del trasplante, las plantas generalmente necesitan un acondicionamiento gradual a las condiciones de campo, lo cual se puede lograr usando nebulización, cámaras húmedas de plástico, etc.

7. **Areas de cuarentena y de control fitosanitario.** Cuando la función del laboratorio es la producción de materiales elites de sanidad certificada, se hace necesario contar con un área para la recepción de las muestras o plantas destinadas a la limpieza clonal, generalmente protegida contra insectos. Esta área de cuarentena debe estar separada del resto del laboratorio pero cercana al área de control fitosanitario.

En el área de control sanitario se realizan las pruebas necesarias para comprobar la sanidad del material vegetal, especialmente de enfermedades causadas por virus, bacterias y hongos. La mayor o menor complejidad del equipo usado para realizar estas pruebas depende del conocimiento de la patología de la especie y del grado de garantía fitosanitaria que se demanda o se desea ofrecer con el material vegetal.

8. **Area de oficina.** En ésta se deben ubicar el mobiliario de oficina como escritorios, archivos y almacenamiento de datos, los libros de referencia y de control del laboratorio, los catálogos y otros documentos. También se coloca en ella el equipo de cálculo o computación.

La seguridad física del personal del laboratorio es importante; por esta razón se deben tomar precauciones para ubicar estratégicamente en el laboratorio equipos de primeros auxilios, extintores de incendios y frazadas contra fuego, así como duchas para baños del cuerpo entero y de los ojos. Lo más indicado es prevenir los accidentes con medidas de seguridad

como el uso de compartimientos especiales para almacenar reactivos peligrosos (solventes orgánicos, ácidos, alcohol, nitrógeno líquido) ubicados en el área general de preparación y en otras áreas del laboratorio; la capacitación del personal en las técnicas de manipulación y uso apropiado del equipo, material de vidrio, reactivos, y otros elementos es la mejor forma de prevenir accidentes en el laboratorio.

Para la construcción del laboratorio de cultivo de tejidos se pueden utilizar estructuras (muros, paredes, pisos, puertas, servicios, etc.) ya existentes. Sin embargo, puede ser necesario levantar dichas estructuras, y en este caso se recomienda hacer una grande, dentro de la cual se puedan instalar divisiones o paredes con material liviano prefabricado como planchas de triplex o de cartón piedra; así se facilita el diseño de las áreas 1 a 4 y el de la oficina, ajustándola en espacio a los requerimientos inmediatos del laboratorio. Esta estrategia de construcción también facilita futuros cambios en el tamaño de los espacios.

## **Equipo para el Laboratorio**

Suponiendo que se establecerá un laboratorio de cultivo de tejidos de tamaño medio, se requieren, para ponerlo en funcionamiento, las siguientes piezas de equipo estándar:

1. En el área de preparación: Refrigerador, balanzas (una macrobalanza y una de precisión), potenciómetro, plancha eléctrica con agitador magnético, frascos Erlenmeyer (125, 250 y 500 ml), botellas y material de vidrio o plástico (Figura 1.2, A).
2. En el área de lavado y esterilización: Autoclave manual o automático (grande o de mesa, Figuras 1.2, B y 1.2, C), destilador de vidrio, gradillas para secado, bandejas de aluminio y de plástico de varios tamaños, recipientes de plástico grandes, estufas para esterilización y secado.
3. En el área de transferencia: Gabinete de flujo laminar (Figura 1.2, E); microscopio de disección con luz incidente, e instrumentos de disección: cuchillas no. 10 y no. 11, mangos para cuchillas, agujas de disección, pinzas, tijeras, navaja de afeitar (Figura 1.2, D). También se necesitan frascos con alcohol, mechero de alcohol, máscaras, guantes, marcadores a prueba de agua, bandejas, y tacho para basuras.
4. En el área de incubación: Un cuarto con temperatura, iluminación y humedad relativa controladas; estanterías con iluminación para los



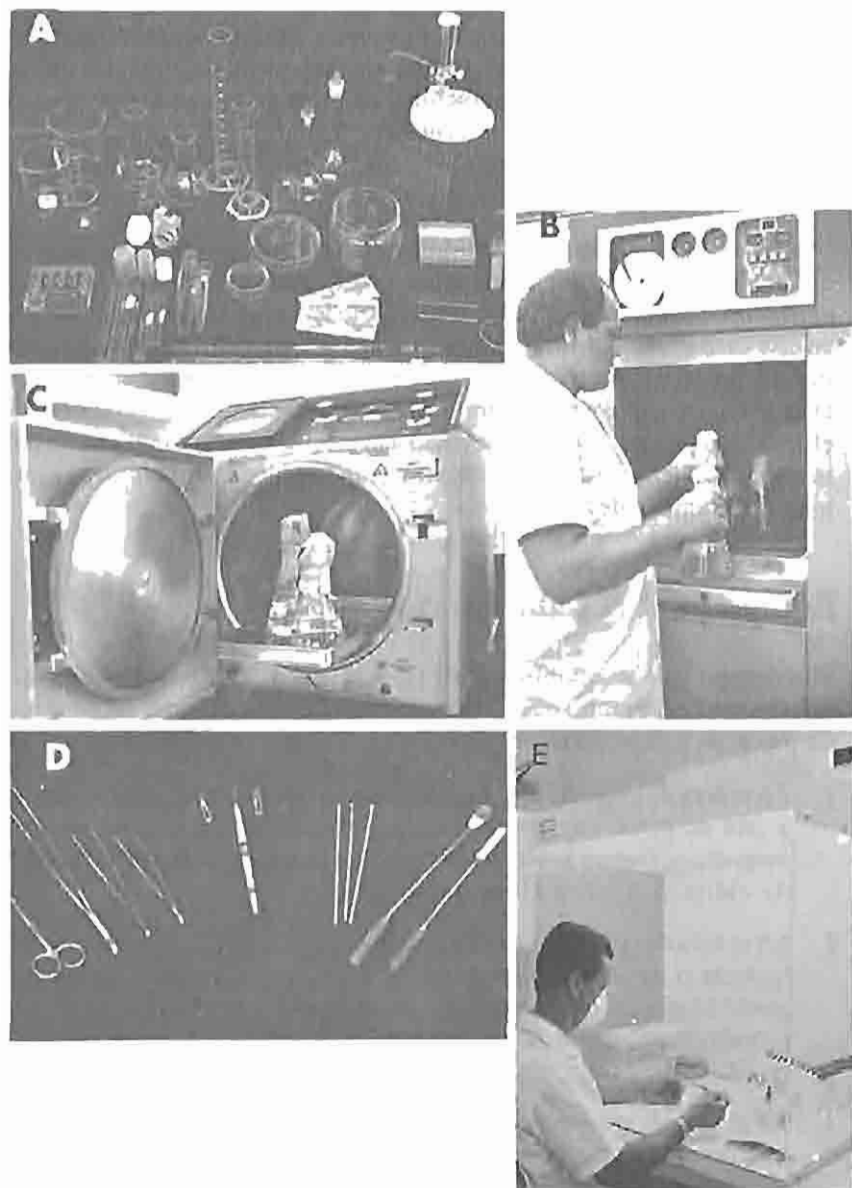


Figura 1.2. Equipo básico, y componentes opcionales, para un laboratorio de cultivo de tejidos: A. piezas de vidriería, distribuidor automático (manual) de medios, tapones, homogeneizadores, y papel parafinado; B. un autoclave (esterilizador) grande de control automático; C. un autoclave de mesa de control automático; D. instrumentos de disección; E. un gabinete de flujo laminar horizontal en funcionamiento.

- cultivos (Figura 1.3, A), bandejas, termómetros de máxima y mínima, y gradillas para tubos de varios tamaños.
5. En el área de examinación: Microscopio estereoscópico (Figura 1.3, B), microscopio compuesto, lentes de aumento, y elementos ópticos complementarios.
  6. En el área de crecimiento in vivo: Macetas, suelo, bandejas, cámaras de alta humedad (Figura 1.3, C).

Aunque no es esencial, otro equipo útil para algunas tareas del laboratorio o para trabajos de investigación y desarrollo incluye: microscopio invertido (Figura 1.3, D), microscopio compuesto con objetivo de inmersión, agitador (horizontal y el auxiliar de Steward) para cultivos en suspensión (Figuras 1.3, E y 1.3, F), centrífuga de mesa, sistema de filtración para producir agua tipo reactivo, filtros para la esterilización de medios de cultivo, gabinete para el secado por aire caliente, lavadora de pipetas, desionizador de agua, gabinete para guardar solventes, y congeladora. También se deben considerar las jeringas, pipetas y cajas Petri desechables, las pipetas Pasteur y automáticas, y los distribuidores automáticos. Son útiles además el horno de microondas, el extractor de vapores, las cámaras de crecimiento controladas, y el propagador de nebulización. La instalación de una fuente de energía de emergencia, bien sea de electricidad, de gas o de aire a presión, complementan el equipo adicional del laboratorio.

## **Control Preventivo de la Contaminación Microbiana**

Uno de los requisitos básicos para el éxito de la técnica de cultivo de tejidos es mantener los cultivos libres de microorganismos contaminadores.

Las siguientes son las fuentes de donde proceden los contaminadores; cada una requiere diversas medidas de prevención:

**Los tejidos.** Pueden llevar contaminadores en su superficie o en su interior, o en ambas partes. Los que lleva el explante sobre su superficie se pueden eliminar mediante la desinfección, pero los que se encuentran dentro del tejido son difíciles de eliminar. En este último caso puede ser útil la inclusión de fungistáticos o bacteriostáticos en el medio de cultivo; el sulfato de gentamicina, la penicilina y el sulfato de estreptomycinina (10 a 50 mg/litro), son algunos de los productos de amplio espectro que se pueden usar. El tratamiento de las plantas donantes del explante por medio de altas temperaturas (35 a 40 °C) también es

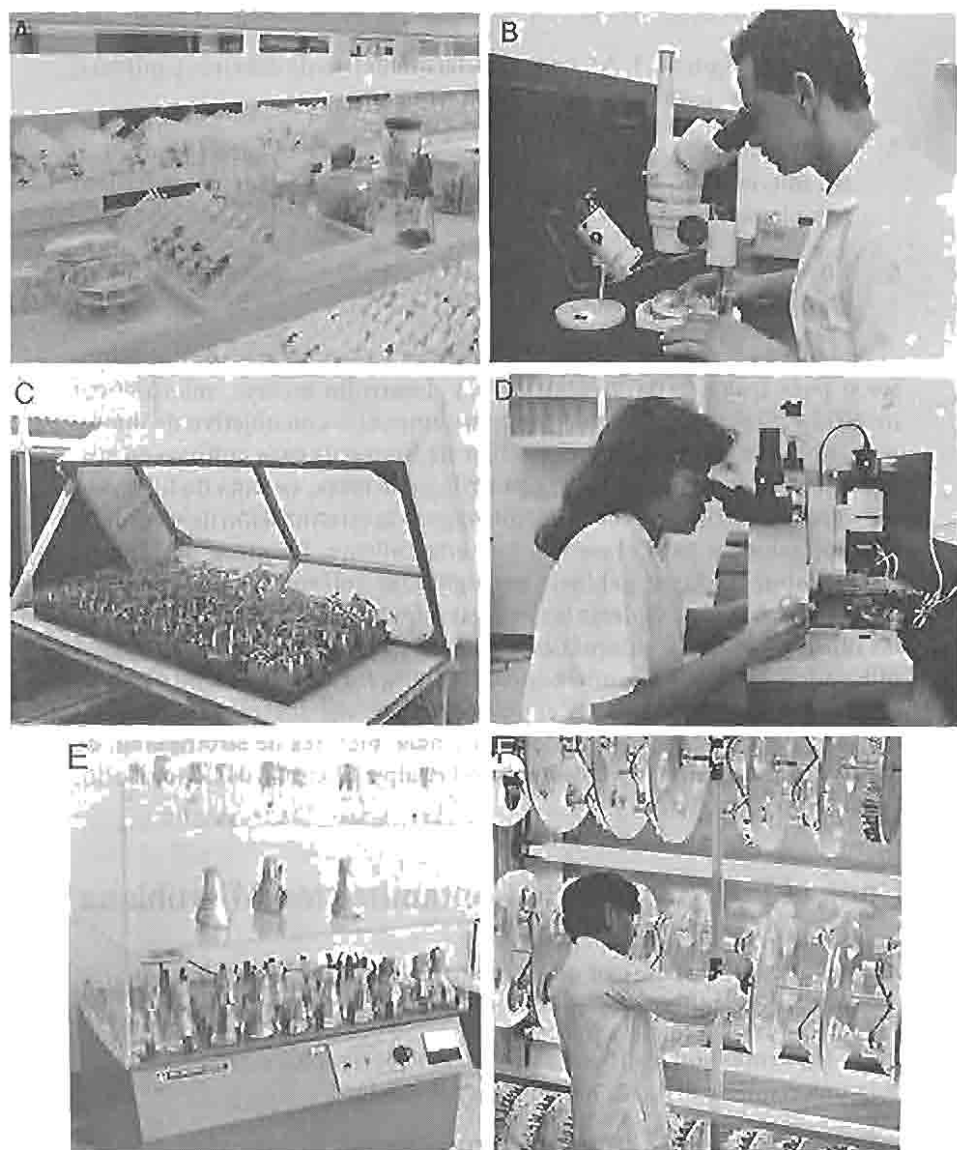


Figura 1.3. Equipamiento básico, y componentes opcionales, para un laboratorio de cultivo de tejidos (cont.): A. estantería iluminada que contiene varias clases de frascos de vidrio y plástico para la incubación de los cultivos; B. un estereoscopio para excisión de explantes (embriones, meristemas) y observación de los cultivos; C. una cámara plástica para mantener las plantas en alta humedad después del trasplante; D. un microscopio invertido para observación de cultivos en suspensión (células, protoplastos, embriones); E. un agitador rotatorio horizontal de tres pisos para cultivos en suspensión; F. 'Auxofitón' de Steward para rotación vertical de cultivos en suspensión en frascos especiales.

efectivo para la obtención de segmentos de tejido libres de bacterias y hongos sistémicos.

**El área de trabajo.** Los contaminadores más comunes son aquí las bacterias y las esporas de hongos que habitan en el ambiente. La utilización de cabinas o cuartos adaptados con un sistema de flujo laminar de aire, el cual penetra a través de filtros a prueba de microbios, permite mantener la asepsia durante el trabajo. Si el área de trabajo carece de estas instalaciones, se hace necesario limpiar las paredes y las mesas con desinfectantes y trabajar en lo posible durante cortos períodos de tiempo.

**Los instrumentos.** Los instrumentos de trabajo se deben esterilizar antes de usarlos. Se debe tener en cuenta, sin embargo, que los instrumentos inicialmente estériles pueden contaminarse con microbios del aire, de superficies vegetales mal desinfectadas, de las manos o de la exhalación del investigador.

Lo más aconsejable es trabajar con varios juegos de las mismas herramientas y mantener la asepsia de las que se han usado, colocando los instrumentos en alcohol etílico al 70% de 2 a 3 minutos, y 'flameándolos' luego cuidadosamente. La exposición excesiva a la llama (flameo) hace que el metal pierda temple y se oxide; además, se propicia la acumulación en el metal de materia orgánica carbonizada difícil de remover. Por lo tanto, se debe alternar el flameo hecho después de la inmersión de los instrumentos en alcohol, con la colocación de los mismos contra la corriente de aire de la cabina de trabajo para mantener su esterilidad mientras que el alcohol residual se evapora.

**El exterior de los recipientes de cultivo.** Existe la posibilidad de que, durante el tiempo transcurrido entre la esterilización de los recipientes con los medios de cultivo y el momento de usarlos, se localicen en su exterior ciertos contaminadores, de tal manera que se mantenga estéril sólo el interior de los tubos; por lo tanto, se debe flamear obligatoriamente la boca de cada tubo antes y después de sembrar el explante.

**El investigador.** El investigador es una fuente primaria de contaminadores. El uso de batas de laboratorio y de guantes limpios y la protección del cabello, la boca y la nariz reducen la contaminación. Las batas limpias y las máscaras son necesarias sobre todo cuando se trabaja en un laboratorio sin flujo laminar de aire. Es esencial que el investigador se limpie bien las manos y los brazos (lavándolos con jabón y agua y enjuagándolos con alcohol al 70%) antes de iniciar una sesión de trabajo.

## Esterilización

La esterilización es el proceso mediante el cual cualquier material, sitio o superficie se libera completamente de cualquier microorganismo vivo o espora. Se dice que tales materiales o sitios son estériles o se han esterilizado. En la terminología médica se utiliza generalmente la palabra *asepsia* para designar la condición en la que están ausentes los microorganismos patógenos; quienes trabajan en el cultivo de tejidos de plantas utilizan la palabra *aséptico* como sinónimo de estéril.

La desinfección se limita generalmente al proceso de destrucción de los microorganismos mediante métodos químicos; la esterilización se refiere a menudo al método físico para la destrucción de los microorganismos. Se utiliza la palabra *axénico* para las preparaciones que están libres de virus, viroides o micoplasmas.

### Preparación del explante

Generalmente se considera que los tejidos de las plantas intactas y sanas son asépticos internamente y que la principal tarea de limpieza del material para explantes está limitada a la esterilización superficial. Si esta generalización se justifica o no, es debatible, pero en esta breve discusión se supone que tal es el caso. Por tanto, no trataremos de discutir los medios utilizados para la eliminación de virus, viroides, micoplasmas o, incluso, de microorganismos endógenos.

La solución de hipoclorito de sodio ( $\text{NaOCl}$ ), en concentraciones de 1% a 3%, es una de las preparaciones más útiles como germicida y agente oxidante. Sirve para la esterilización superficial de materiales de todo tipo, siempre y cuando no se produzcan lesiones debido a su acción blanqueadora. Durante muchos años se ha utilizado el  $\text{NaOCl}$  como un esterilizante superficial en los tejidos de las plantas (Wilson, 1915). Se supone que tiene la ventaja de que se enjuaga más fácilmente de las superficies después de la esterilización y así se eliminan los residuos oxidantes indeseables. A causa de la indeseable alcalinidad de cualquier hipoclorito residual, en algunas situaciones podría ser útil un enjuague rápido con agua acidulada ( $\text{HCl}$  en una solución muy diluida y en cantidad suficiente para neutralizar cualquier exceso de bases).

Como esterilizante superficial también se utiliza la solución de bicloruro de mercurio ( $\text{HgCl}_2$ ). Sin embargo, este producto es altamente tóxico y se debe utilizar con mucha cautela; generalmente, basta con una solución acuosa entre 0.1% a 1.5% (p/v) y una exposición de 3 a 10 minutos para

que la esterilización tenga efecto. El problema principal del bicloruro de mercurio no sólo es su naturaleza altamente venenosa y corrosiva, sino la dificultad para removerlo mediante el enjuague; a pesar de esto, tiene su valor en la esterilización (Yao et al., 1981). Para más detalles, véase el Capítulo 2.

## **Procedimiento de esterilización**

El calor es uno de los agentes que se utiliza con más frecuencia en la esterilización. Se puede usar en forma de llama directa, de calor húmedo (vapor) o de calor seco (aire caliente); cuando se utiliza el calor húmedo, puede ser en forma de vapor abierto o de vapor bajo presión. Ocasionalmente se puede usar agua caliente pero no hirviendo.

Como es bien conocido, el éxito en el logro de esterilidad en cualquier preparación depende de muchos factores, como son la naturaleza de la sustancia que se esteriliza, el volumen contenido en cada unidad, el tamaño del recipiente y el número de unidades que se pueden manejar en una sola operación. Por consiguiente, no se pueden dar instrucciones específicas relacionadas con el método de esterilización que se utiliza para una preparación individual; en contraposición, se presentan sugerencias generales relacionadas con los procedimientos de esterilización.

**Calor seco.** Los recipientes de vidrio secos que se utilizan para operaciones estériles se pueden esterilizar por medio de aire caliente; para el efecto se colocan en una estufa de aire caliente a una temperatura mínima de 170 °C, preferiblemente durante dos horas, pero nunca menos de una hora. El algodón (debidamente envasado) a menudo se esteriliza por intervalos más largos, ya que tiende a contener esporas altamente resistentes; puesto que tanto el algodón como el papel toman un color marrón a temperaturas de 190 °C o superiores, para estos materiales se debe usar una temperatura menor de 170 °C, manteniéndolos bajo ella por lo menos durante una hora.

Es obvio que todos los materiales esterilizados mediante calor seco deberán estar limpios, e incluso libres de trazas de materia orgánica.

**Vapor bajo presión (autoclave).** El vapor bajo presión es muy eficiente para destruir todas las formas de bacterias y hongos y sus esporas, y es el método más utilizado para esterilizar diferentes materiales incluyendo los medios de cultivo (siempre y cuando no contengan componentes termolábiles).

El autoclave más utilizado actualmente en el laboratorio es la contraparte de mayor tamaño de la olla de presión común. Al utilizarlo, es

necesario extraer todo el aire antes de empezar el proceso de esterilización ya que, a presiones iguales, la temperatura de una mezcla de aire y vapor no es tan alta como la del vapor puro; la extracción del aire se logra automáticamente al permitir que el vapor expulse el aire del aparato, antes de cerrar la válvula correspondiente. La temperatura dentro del autoclave se regula mediante la presión y es directamente proporcional a ésta; la presión se lee en un manómetro que forma parte del autoclave.

Para esterilizar los materiales relacionados con el cultivo de tejidos se acostumbra usar una presión de 15 lb durante 20 minutos; a esta presión la temperatura del vapor es aproximadamente 121 °C, suficiente para matar virtualmente todas las formas de vida en cinco minutos. Sin embargo, se debe recalcar que el tiempo de exposición requerido dependerá tanto del tipo del material que se va a esterilizar como de su cantidad. Si se desea que la esterilización sea completa, el calor debe penetrar en cada porción del material; ninguna sustancia es estéril si queda en ella un organismo viable o espora. La siguiente es una guía para presiones variables:

- 10 lb de presión (115.5 °C) durante 30 minutos
- 15 lb de presión (121.5 °C) durante 20 minutos
- 20 lb de presión (126.5 °C) durante 15 minutos

Para las operaciones mayores se recomienda colocar detectores de esterilización en diferentes puntos dentro del autoclave o dentro de la masa de material que se trata, para asegurarse de que todas las partes han alcanzado la temperatura deseada.

**Calor húmedo a 100 °C.** Con este método probablemente sea suficiente una sola exposición de 15 minutos al calor vivo (100 °C) para matar todas las formas vegetativas microbianas. Sin embargo, así no se matan necesariamente todas las formas de esporas y puede ser práctico, por consiguiente, efectuar la esterilización intermitente, siempre y cuando se disponga de cierto equipo. En este caso, la exposición puede ser de 30 a 60 minutos y se repite diariamente durante tres días consecutivos, conservando el material a la temperatura del cuarto o en una incubadora entre una exposición y otra. Teóricamente la primera exposición destruye todas las formas microbianas; durante las próximas 24 horas, generalmente germinan las esporas convirtiéndose en formas vegetativas que mueren en la segunda exposición; la tercera exposición es simplemente un medio de prevención para destruir las esporas vivas que hayan podido tener una germinación lenta.

A veces el procedimiento se modifica utilizando temperaturas inferiores a la del agua hirviendo y aumentando el número de las exposiciones hasta

cuando haya una seguridad razonable de esterilidad. Se utilizan temperaturas de 60 a 80 °C y se repiten sucesivamente las exposiciones durante 4 a 7 días.

Este método del calor húmedo a 100 °C, conocido como 'método de Koch' se utiliza en la esterilización de medios que contienen componentes capaces de soportar la exposición a temperaturas de vapor vivo, pero no a las temperaturas mayores que tiene el vapor bajo presión. No obstante, este método no está exento de problemas; las esporas pueden no desarrollarse en las soluciones no nutritivas como el agua corriente, por lo cual se recomienda reemplazarlo, cuando sea posible, por el método de filtración; sin embargo se menciona, incluso en este caso, como una alternativa cuando no se dispone de las instalaciones o medios para esterilizar por filtración.

En términos generales, los medios para el cultivo de tejidos de plantas son bastante ricos en componentes que pueden servir de sustento a los microorganismos y existe la posibilidad de que los contaminantes aparezcan durante los intervalos sucesivos.

**Filtración.** La esterilización de líquidos va acompañada rutinariamente de la filtración a través de filtros especiales a prueba de hongos y bacterias. Es claro que los filtros y otros aparatos se deben esterilizar antes de tratar de utilizarlos para remover los contaminantes de un líquido.

Obviamente el tamaño del poro es el principal factor en la capacidad de retención de bacterias de estos filtros; otros factores que afectan la penetrabilidad del filtro por los microorganismos son el pH, la carga eléctrica del material filtrado, la temperatura, la presión y la duración del procedimiento de filtración así como el efecto de la absorción de proteínas y otras sustancias en el filtro; también puede haber contaminación en el filtrado a causa de una presión excesiva en el filtro o de fugas de las líneas al vacío cuando se utiliza presión negativa.

En el mercado se encuentra una amplia gama de aparatos de filtración entre los cuales está el 'Millipore'. Se encuentran disponibles además los filtros desechables que, aunque costosos, pueden ahorrar tiempo y son pre-esterilizados.

## **Limpieza de los Recipientes de Vidrio**

La limpieza de los recipientes de vidrio y otros utensilios es de importancia vital en el trabajo de cultivo de tejidos vegetales. Nunca se debe utilizar



jabón; cuando sea posible, se deben adoptar detergentes que se laven y enjuaguen fácilmente. Se debe utilizar agua caliente con el detergente, enjuagar luego con agua caliente sola, hacerlo después con agua desionizada y finalmente con agua destilada.

Bajo circunstancias especiales puede ser necesario exponer los recipientes de vidrio a soluciones limpiadoras de ácido crómico, durante varias horas. Pero es necesario reconocer que sería imposible remover los iones de cromo residuales y que éstos a su vez serían dañinos o tóxicos para las células y tejidos de las plantas (Richards, 1936; Henry et al., 1946; Butler et al., 1954). Adicionalmente, las soluciones limpiadoras son peligrosas y se deben utilizar con cautela para evitar quemaduras y problemas de contaminación ambiental. Los residuos de iones de cromo se podrían remover lavando con detergente, pero el proceso de limpieza se volvería más intensivo en el uso de recursos humanos.

También existen soluciones inorgánicas para el lavado, las cuales son tan efectivas como las soluciones de ácido crómico y, a diferencia de ellas, se dice que son inocuas para el medio ambiente. El Nochromix se encuentra disponible en los Laboratorios Godax, 6 Varick Street, New York, New York, 10013; es una fórmula preempacada de propiedad de estos laboratorios. Simplemente se añade ácido sulfúrico concentrado, generalmente 1 ó 2 paquetes para una botella de ácido de 9 lb (Goda, 1970).

## Referencias

- Biondi, S. y Thorpe, T. A. 1981. Requirements for a tissue culture facility. En: Thorpe, T. A. (ed.). *Plant tissue culture: Methods and applications in agriculture*. Academic Press, Nueva York. p. 1-20.
- Bonga, J. M. 1982. Tissue culture techniques. En: Bonga, J. M. y Durzan, D. J. (eds.). *Tissue culture in forestry*. Martinus Nijhoff and W. Junk Publishers, Boston. p. 4-35.
- Boxus, P.; Damiano, C. y Brasser, E. 1984. Strawberry. En: Ammirato, P. V.; Evans, D. A.; Sharp, W. R. y Yamada, Y. (eds.). *Handbook of plant cell culture; 3: Crop species*. MacMillan Publishing, Nueva York. p. 453-486.
- Butler, E. B. y Johnston, W. H. 1954. Retention of chromium by glass following treatment with cleaning solution. *Science* 120:543-544.
- Goda, G. 1970. A new glass-cleaning solution. *American Laboratory* (agosto 1970), p. 69.

- Henry, R. J. y Smith, E. C. 1946. Use of sulfuric acid-dichromate mixture in cleaning glassware. *Science* 104:426-427.
- Richards, O. W. 1936. Killing organisms with chromium as from incompletely washed bichromate-sulfuric acid-cleaned glassware. *Physiological Zoology* 9:246-253.
- Rupela, D. P.; Dart, P. J.; Toomsan, B.; Singh, D. V.; Subramaniam, D. y Sharma, B. K. 1984. Facility for growing plants in tubes at ICRISAT (International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics). Information bulletin no. 18. ICRISAT, Patancheru, India.
- Van Uyen, N. y Van der Zaag, P. 1983. Vietnamese farmers use tissue culture for commercial potato production. *Am. Potato. J.* 66:873-879.
- Wilson, J. K. 1915. Calcium hypochlorite as a seed sterilizer. *Amer. J. Bot.* 2:420-427.
- Yao, D. y Krikorian, A. D. 1981. Multiplication of rice (*Oryza sativa* L.) from aseptically cultured nodes. *Ann. Bot.* 48:255-259.