

PROYECTO: VAMOS A CLONAR PLANTAS DE VIOLETA AFRICANA

Etapas: 4º de la ESO y 1º y 2º de Bachillerato

VAMOS A CLONAR PLANTAS DE VIOLETA AFRICANA

¿Seremos capaces de obtener plantas clónicas, plantas que son genotípicamente idénticas entre sí e idénticas a la planta de la que proceden?

¿Qué necesitamos?

CULTIVO IN VITRO DE TEJIDOS VEGETALES

Durante el desarrollo de cualquier ser vivo el material hereditario se conserva, no habiendo ni pérdidas ni ganancias del mismo, por lo que si analizáramos el contenido de ADN de una de las células de un organismo adulto sería el mismo que el del cigoto, la célula a partir de la cual se inicia el desarrollo embrionario. Este hecho hace que nos hagamos la siguiente pregunta, ¿sería posible, mediante la manipulación adecuada, regenerar un organismo en su totalidad a partir de una célula del mismo? La capacidad de cualquier célula de generar distintos tipos de tejidos se denomina potencia celular. Dicha potencia abarca cuatro niveles: Totipotencia, cuando dicha célula puede generar un individuo completo (sería el caso del cigoto y, en el caso de los animales, las primeras células obtenidas por división del cigoto mantendrían la totipotencia); pluripotencia, las células pluripotentes pueden generar cualquier tejido del individuo adulto, pero no un individuo completo ya que son incapaces de dar lugar a los anejos extraembrionarios, es decir tejidos que no forman parte del embrión pero que son necesarios para que el desarrollo tenga lugar; unipotencia, las células con dicha capacidad sólo generan un tipo de tejido; por último, células diferenciadas, han perdido la potencialidad de originar nuevas células.

La potencia celular, concretamente totipotencia y pluripotencia, se mantiene en las células vegetales, algo que a finales del siglo XIX se intuía dada la enorme plasticidad que presentan los componentes del Reino Vegetal. Podemos afirmar que es en ese momento cuando se inicia el cultivo in vitro de tejidos vegetales, con el fin de regenerar plantas completas a partir de fragmentos de tejido, lo que denominamos explantes. El punto de inflexión en el mundo del cultivo in vitro es 1962, cuando dos científicos, Toshio Murashige y Folke K. Skoog, publican en "Physiolgia Plantarum" su trabajo en el que presentan un medio de cultivo que se hizo indispensable, el medio MS.

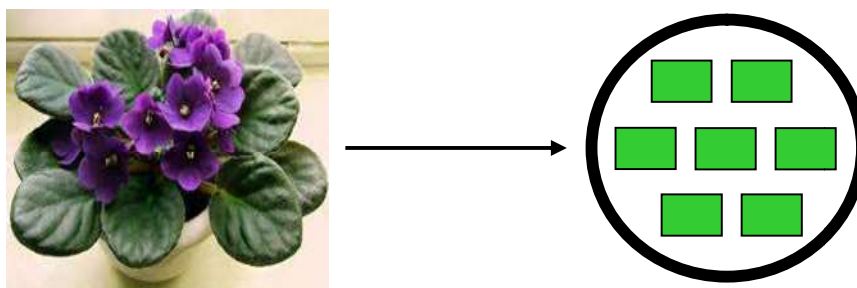
A día de hoy podemos encontrarnos, además del MS, con otros medios ligeramente diferentes. Todos ellos van a proporcionar los nutrientes necesarios para que las células sembradas puedan sobrevivir, pero no van a recuperar la pluripotencia o totipotencia, para eso se necesita algo más, las hormonas vegetales o fitohormonas.

Hay distintos tipos de fitohormonas, nosotros vamos a centrarnos en dos, las auxinas y las citoquininas; a su vez dentro de cada grupo hay hormonas naturales y algunas sintéticas.

La auxina natural mayoritaria es el ácido indolacético (IAA). Las auxinas sintéticas son el ácido naftalenacético (NAA) y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4D).

Las citoquininas naturales son hormonas derivadas de la adenina, como la benziladenina (BA) y la Kinetina (K).

CULTIVO IN VITRO DE VIOLETA AFRICANA, *Saintpaulia ionantha*



PROYECTO: VAMOS A CLONAR PLANTAS DE VIOLETA AFRICANA

Etapas: 4º de la ESO y 1º y 2º de Bachillerato

Para conseguir el objetivo que nos proponemos vamos a utilizar el cultivo in vitro usando tres medios diferentes, denominados MS+2, VT4 y VS1. ¿Qué resultados nos vamos a encontrar?

Figura 1



En primer lugar tenemos que cortar hojas de un tamaño mediano o grande, cortando los correspondientes peciolo.

Vamos a utilizar unas pinzas y un bisturí.

Una vez cortadas frotamos entre sí las hojas para limpiar su superficie.

A continuación, hay que seguir los siguientes pasos:

1.- Esterilizar las hojas. Emplearemos hipoclorito sódico al 2,5%, o sea, lejía alimentaria diluida un poco o nada, en función de la concentración de hipoclorito sódico que contenga dicha lejía. Por poner un ejemplo, la lejía "Conejo" tiene un 3,5%. Podemos diluirla $\frac{1}{3}$, es decir, dos partes de lejía y una de agua.

Hay que sumergir las hojas en el hipoclorito y mover el frasco de vez en cuando para asegurar que toda la superficie de las mismas queda mojada. Así durante 20 minutos.

A partir de este punto tanto las pinzas como el bisturí se mantienen en alcohol y se flamean para esterilizarlos utilizando un mechero de alcohol.

2.- Se sacan las hojas de la lejía, utilizando las pinzas previamente flameadas y enfriadas, y se introducen en otros frascos con agua estéril, agitando. Este proceso se repite dos veces más, pasando en cada lavado las hojas de un tarro con agua a otro y agitando vigorosamente en cada lavado para asegurar que se elimina bien el hipoclorito. Al final se elimina totalmente el agua del último lavado y mantenemos las hojas en el último frasco, en un ambiente estéril.

3.- Se coloca una hoja sobre un baldosín estéril y se corta en trozos con el bisturí. Realizar cortes limpios, evitando aplastar la hoja o pincharla con las pinzas (Figura 2).



Figura 2

PROYECTO: VAMOS A CLONAR PLANTAS DE VIOLETA AFRICANA

Etapas: 4º de la ESO y 1º y 2º de Bachillerato

4.- Se colocan los fragmentos en una placa petri con medio de cultivo, con el haz tocando la superficie del medio y presionando un poco para asegurar que la máxima superficie de la hoja entre en contacto con el medio.

Una vez sembradas, las placas petri se cierran con Parafilm (Figura 3).

Los cultivos se mantienen a $23 \pm 1^\circ\text{C}$ en luz, con un fotoperiodo de 16 h.



Figura 3

MEDIOS DE CULTIVO: COMPOSICIÓN Y PREPARACIÓN

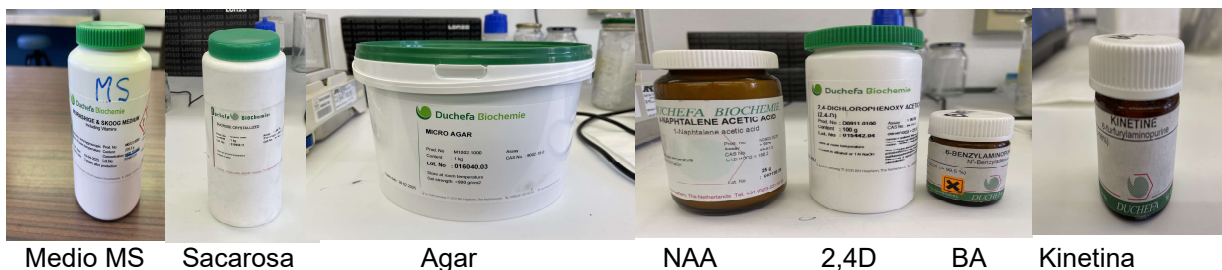
Medio	sales y vitaminas	auxinas mg/l	citoquininas mg/l	azúcar g/l	pH	agar g/l
MS+2	medio MS	2,4-D 2	-	sacarosa 30	5.7	8
VT4	medio MS	NAA 1	BA 1	sacarosa 30	5.6	8
VS1	medio MS	NAA 0.5	Kinetina 1	sacarosa 30	5.6	8

2,4-D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético; **NAA:** ácido 1-naftalenacético; **BA:** 6-benciladenina (= BAP: 6-bencilaminopurina); **MS:** Murashige & Skoog (1962) PhysiolPlant 15: 473-497

1.- Las hormonas se dan preparadas en solución a una concentración de 1 mg/ml en agua destilada y desionizada.

Las hormonas se tienen que conservar a 4°C .

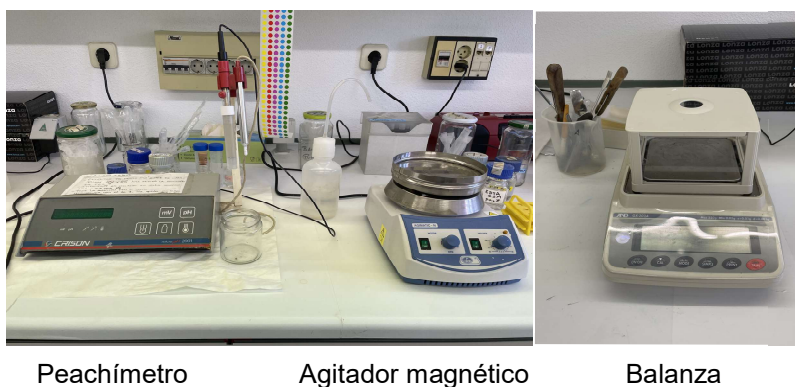
Figura 4. Componentes de los medios de cultivo



2.- Para hacer los medios de cultivo:

- Mezclar y disolver todos los componentes, excepto el agar, en unos $\frac{3}{4}$ del volumen final requerido de agua destilada y desionizada en una probeta.
 - Enrasar con agua destilada y desionizada hasta casi el volumen final en la probeta.
- Ajustar el pH (con NaOH 1N o con ClH 1N) en la probeta, agitando simultáneamente con una varilla magnética en una placa giratoria. Una vez ajustado el pH, enrasar hasta el volumen final.

Figura 5



Peachímetro

Agitador magnético

Balanza

PROYECTO: VAMOS A CLONAR PLANTAS DE VIOLETA AFRICANA

Etapas: 4º de la ESO y 1º y 2º de Bachillerato

- Pesar el agar correspondiente al volumen del medio y echarlo en el Erlenmeyer en el que se vaya a autoclavar. Añadir el medio de cultivo, que se ha preparado en la probeta, al Erlenmeyer, y dejar dentro del Erlenmeyer una varilla de agitación. Tapar la boca del Erlenmeyer con papel de aluminio doble.
- Autoclavar el medio. Al sacar del autoclave, los medios con agar se agitan para que el agar se distribuya de forma homogénea.
- Dispensar en placas Petri, en una cabina de flujo laminar.

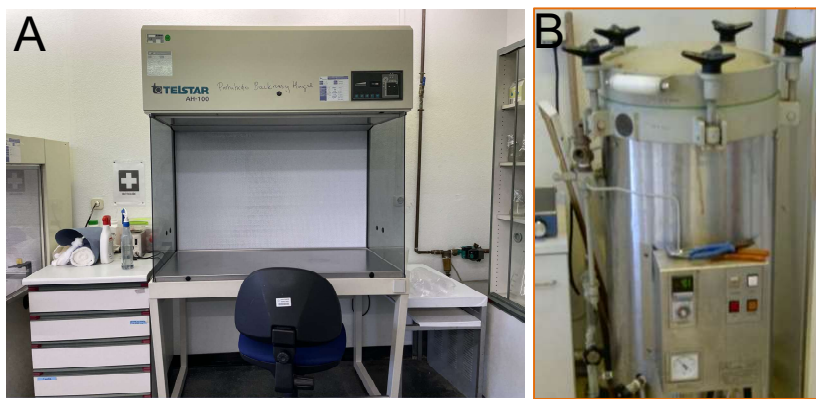


Figura 6. (A) Cabina de flujo laminar. (B) Autoclave

Tras comprobar todo lo que se requiere para hacer medios de cultivos estériles y trabajar en un ambiente también estéril, parece complicado llevarlo a cabo en un pequeño laboratorio, en el que no hay cabinas ni autoclaves.

Vamos a intentar lograrlo.

-En primer lugar, necesitamos agua destilada y desionizada, pero no tenemos un desionizador para ello. Entonces ¿qué hacemos?, la compramos.

Hay botellas de 5 litros que pueden costar unos 6 euros.

-En segundo lugar, todos los componentes de cualquier medio de cultivo se pueden comprar sin mayor problema.

-Las placas petri se compran embolsadas y estériles.

-¿Cómo podemos esterilizar el medio de cultivo sin autoclave? La clave está en utilizar un antifúngico y antibacteriano que ha desarrollado la empresa Plant Cell Technology. Es el Plant Preservative Mixture (PPM), que es estable a altas temperaturas (Figura 7). (Véase vídeo incluido en la bibliografía).



Figura 7: PPM

Hay que añadir entre 1 y 2 ml por cada litro de medio de cultivo

-Todos los ingredientes, incluido el PPM, los tenemos en un vaso en el que quepa todo el volumen que queremos preparar. Hay que mezclar bien todos los componentes. Si no se dispone de un agitador magnético, utilizaremos una cuchara o similar.

Lo tapamos con un film transparente doble y lo metemos en un microondas. No lo ponemos a la máxima potencia, tal vez algo menos del 50%, y mantenemos el medio entre 10 y 15 minutos. Así se fundirá el agar.

PROYECTO: VAMOS A CLONAR PLANTAS DE VIOLETA AFRICANA

Etapas: 4º de la ESO y 1º y 2º de Bachillerato

Hay que estar vigilando el microondas para que el medio no entre en ebullición. Lo sacamos del microondas y lo agitamos para que se distribuya homogéneamente el agar.

- Cuando el medio no esté ardiendo, pero no frío, lo añadimos con cuidado en las placas petri, para lo cual con una mano levantamos ligeramente la tapa y añadimos el medio fundido al lado de un mechero de alcohol encendido. Se tapa inmediatamente y lo dejamos reposar hasta que solidifique.

Hay que tener cuidado de no pasar nada sobre la placa abierta para evitar futuras contaminaciones.

- También tenemos que esterilizar el agua para lavar las hojas, los frascos en donde se lavarán y los baldosines en donde se cortarán.

Para esterilizar el agua añadiremos dos gotas de lejía alimentaria por cada litro. Mezclamos bien y dejamos que repose durante unos 30 minutos.

Otra posibilidad es hervir el agua durante 1 minuto, pero también podemos utilizar el PPM para la esterilización usando 1 ml/litro de agua.

Los frascos los lavamos y posteriormente los desinfectamos con alcohol.

Los baldosines hay que limpiarlos bien y posteriormente lavarlos con alcohol y utilizarlos en el momento.

Hay que recordar que no podemos pasar nada por encima del baldosín y nuestras manos tienen que estar limpias. Habrá que lavarlas previamente.

SI TODO HA IDO BIEN, QUÉ POSIBLES RESULTADOS ESPERAMOS

Dependiendo de los medios de cultivo y de los explantes utilizados podemos obtener tres tipos de resultados:

1.- Un crecimiento indefinido del explante

2.- Morfogénesis

3.- Formación de callos

A su vez, la morfogénesis podemos desdoblarla en dos categorías:

- Organogénesis: formación de brotes y raíces.

- Embriogénesis: desarrollo de embriones a partir de células somáticas, de ahí que hablemos de embriones somáticos y embriogénesis somática.

Los callos son masas irregulares de células indiferenciadas (parecen tumores) que se forman como consecuencia de una proliferación desordenada.

Si los callos se cultivan en los medios adecuados se pueden inducir procesos de organogénesis y embriogénesis.



Figura 8. Regeneración de brotes a partir de explantes de hojas e inducción de raíces

PROYECTO: VAMOS A CLONAR PLANTAS DE VIOLETA AFRICANA

Etapas: 4º de la ESO y 1º y 2º de Bachillerato



Figura 9: Callos



Callos regenerando brotes



Figura 10: En la figura de la izquierda se puede apreciar el inicio de la formación de callos a partir de embriones de trigo. En la figura de la derecha tenemos callos bien desarrollados. Esos callos, con el tiempo, pueden convertirse en callos embriogénicos



Figura 11. (A) Callos de embriones de arroz, todos son embriogénicos. (B) Algunos embriones somáticos han germinado dando lugar a plantas.

PROYECTO: VAMOS A CLONAR PLANTAS DE VIOLETA AFRICANA

Etapas: 4º de la ESO y 1º y 2º de Bachillerato

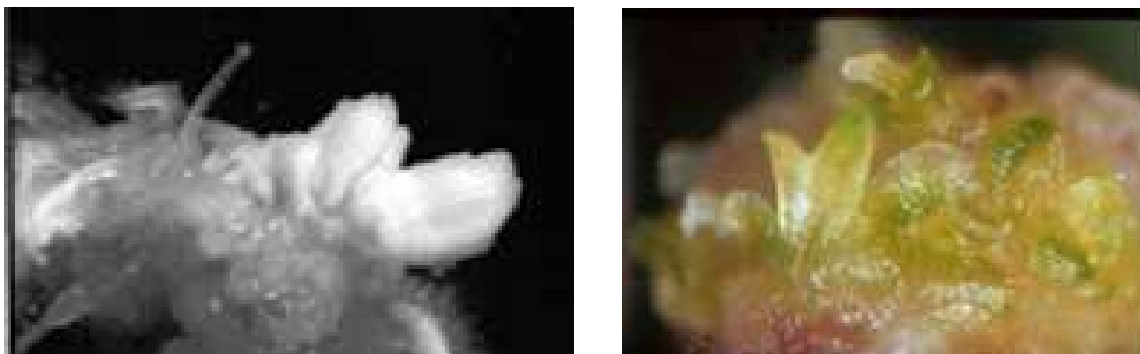


Figura 12. Detalle de embriones somáticos procedentes de callos de centeno.

¿Es fácil conseguir cualquiera de esos resultados? La respuesta es no. Depende de distintos factores que se indican a continuación:

- 1.- El entorno en el que se van a encontrar los explantes, es decir, los medios de cultivo, fundamentalmente qué tipos de fitohormonas se van a utilizar y cómo se combinan.
- 2.- El estado de la planta de la que proceden los explantes. El envejecimiento disminuye la capacidad de regeneración de las células.
- 3.- No todos los tejidos de una planta tienen la misma capacidad de regenerar brotes o formar embriones.
- 4.- El genotipo. En una especie nos podemos encontrar con distintas variedades, las cuales tienen genotipos distintos, por lo que no todas responderán de la misma manera al cultivo in vitro.
- 5.- Hay grandes diferencias entre especies.

OBJETIVOS

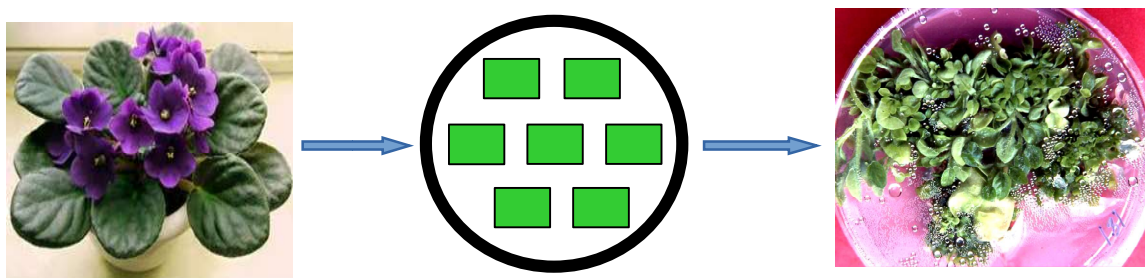


Figura 13

En la figura 13 se resume el objetivo principal, obtener plantas clónicas de violeta africana.

En principio no sabemos cómo van a funcionar los tres medios. ¿Servirán los tres para obtener plantas a partir de los explantes sembrados o sólo uno de ellos?

Se van a dividir en tres grupos los participantes en este proyecto.

- Grupo 1. Se encargará del medio MS+2
- Grupo 2. Medio VS1
- Grupo 3. Medio VT4

PROYECTO: VAMOS A CLONAR PLANTAS DE VIOLETA AFRICANA

Etapas: 4º de la ESO y 1º y 2º de Bachillerato

Una vez realizados los cultivos, se pueden mantener la mitad en oscuridad y la otra mitad en luz (como se ha indicado anteriormente).

De esta manera podremos comprobar el efecto de la luz en la respuesta.

En el caso de los cultivos mantenidos en luz, como no se dispondrá de una cámara que controle el fotoperíodo y la temperatura, se dejarán en alguna estancia que sea relativamente cálida, con una temperatura no inferior a 22 °C y que tenga luz la mayor parte del día.

Hay que ir revisando los cultivos con cierta frecuencia, descartando las placas contaminadas (Figura 14) y observando el posible inicio de procesos morfogénéticos.



Figure 14

Para resumir los resultados que se obtengan, rellenad la siguiente tabla con un + o un –

	LUZ					OSCURIDAD				
	Callos	Embriones	Brotes	Raíces	Nada	Callos	Embriones	Brotes	Raíces	Nada
MS+2										
VS1										
VT4										

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos:

1.- ¿Cuál de los tres medios de cultivo utilizados es el que recomendaríais para micropropagar plantas de violeta africana?

2.- De las distintas fitohormonas utilizadas, ¿cuales recomendaríais para inducir brotes a partir de explantes de hojas? ¿Funcionarían igual en otras especies, por ejemplo en Begonias?

3.- Las fitohormonas descartadas, ¿qué función creéis que tienen a la vista de los resultados obtenidos?

4.- Los medios que habéis desechado, ¿podrían tener otras finalidades? Poned algún ejemplo. Tened en cuenta que el 2,4D es una hormona muy importante en el mundo del cultivo in vitro.

Es importante que trabajéis en equipo y que las conclusiones a las que lleguéis sean consensuadas por todos los integrantes del mismo.

PROYECTO: VAMOS A CLONAR PLANTAS DE VIOLETA AFRICANA

Etapas: 4º de la ESO y 1º y 2º de Bachillerato

Si todas las cuestiones se han comprendido y respondido razonadamente, propongo que los estudiantes participantes se dividan en dos grupos y que cada uno de ellos elabore un proyecto distinto:

Proyecto 1. Aplicación del cultivo in vitro para la micropropagación de una especie vegetal de interés.

La especie será elegida entre los componentes del grupo.

Proyecto 2. Inducción de embriogénesis somática mediante el cultivo in vitro en una especie vegetal.

La especie será elegirá entre los componentes del grupo.

INDICACIONES PARA ELABORAR UN PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

En primer lugar, debe de haber una introducción en la que se indiquen los datos previos de que se dispone y, en función de ellos, proponer los objetivos que se quieren obtener.

Hay que indicar el material que se va a utilizar, es decir, qué especies y tejidos se van a utilizar y por qué.

Habrà que indicar también los medios de cultivo y las fitohormonas (tipo y concentraciones) que se emplearán.

Por último, la bibliografía utilizada.

PROYECTO: VAMOS A CLONAR PLANTAS DE VIOLETA AFRICANA

Etapas: 4º de la ESO y 1º y 2º de Bachillerato

COMPOSICIÓN DEL MEDIO MS DE DUCHEFA BIOCHEMIE

Micro Elementos	mg/l	µM
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	0.11
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	0.10
FeNaEDTA	36.70	100.00
H ₃ BO ₃	6.20	100.27
KI	0.83	5.00
MnSO ₄ ·H ₂ O	16.90	100.00
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	1.03
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.60	29.91
Macro Elementos	mg/l	mM
CaCl ₂	332.02	2.99
KH ₂ PO ₄	170.00	1.25
KNO ₃	1900.00	18.79
MgSO ₄	180.54	1.50
NH ₄ NO ₃	1650.00	20.61
Vitaminas	mg/l	µM
Glycine	2.00	26.64
myo-Inositol	100.00	554.94
Nicotinicacid	0.50	4.06
Pyridoxine HCl	0.50	2.43
Thiamine HCl	0.10	0.30

Concentración total de Micro y Macro elementos y vitaminas: 4.405,19 mg/l

Para preparar un litro de medio MS habrá que pesar 4,40 gramos.

PROYECTO: VAMOS A CLONAR PLANTAS DE VIOLETA AFRICANA

Etapas: 4º de la ESO y 1º y 2º de Bachillerato

PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES DE FITOHORMONAS

Las soluciones tienen que estar a una concentración de 1 mg/ml.

Si queremos preparar volúmenes de 10 ml, habrá que pesar 10 mg de cada fitohormona.

NAA (ácido naftalenacético), BA (benciladenina) y K (kinetina): Disolver 10 mg en 1 ml de sosa 0,1N y añadir posteriormente 9 ml de agua.

2,4D (2,4 dicloro fenoxiacético): disolver 10 mg en 5 ml de etanol absoluto al 50% y añadir posteriormente 5 ml de agua.

Las fitohormonas, estén en solución o no, hay que mantenerlas a 4 °C.

Para añadir a los medios las hormonas se tendrán que utilizar micropipetas, ya que las cantidades oscilan entre 500 microlitros y 2 mililitros.

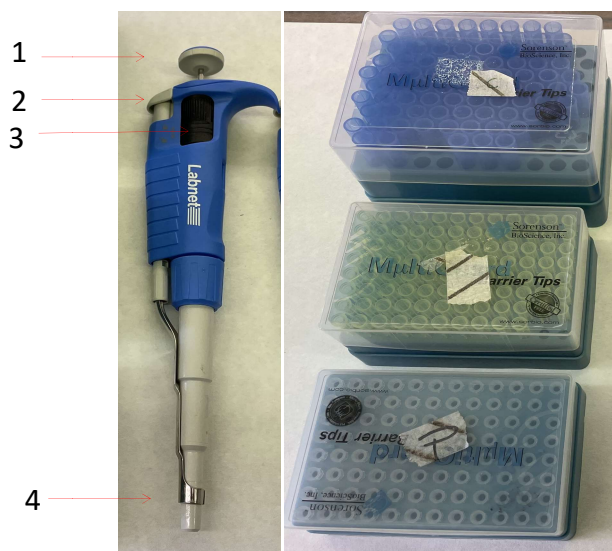


Figura 15. Partes de la micropipeta. 1) Émbolo, en este caso de doble función, regula la cantidad de volumen girándolo y al pulsarlo se toma el volumen adecuado y posteriormente se expulsa (Véase figura 17). 2) Botón de eyección de la punta. Presionándolo se expulsa la punta. 3) También se puede regular el volumen mediante esa rueda. 4) Cono de inserción de la punta. Tres cajas de puntas: Azules para la micropipeta de volumen de 100 a 1000 microlitros,

PROYECTO: VAMOS A CLONAR PLANTAS DE VIOLETA AFRICANA

Etapas: 4º de la ESO y 1º y 2º de Bachillerato

amarillas para micropipetas de 20 a 200 microlitros y blancas para micropipetas de 0,5 a 10 microlitros.

MANEJO DE MICROPIPETAS

Cada micropipeta tiene un émbolo y una rueda para regular el volumen que se quiere tomar. Una vez regulado el volumen abrimos una caja de puntas e insertamos una en el cono de la micropipeta. (Figura 16)

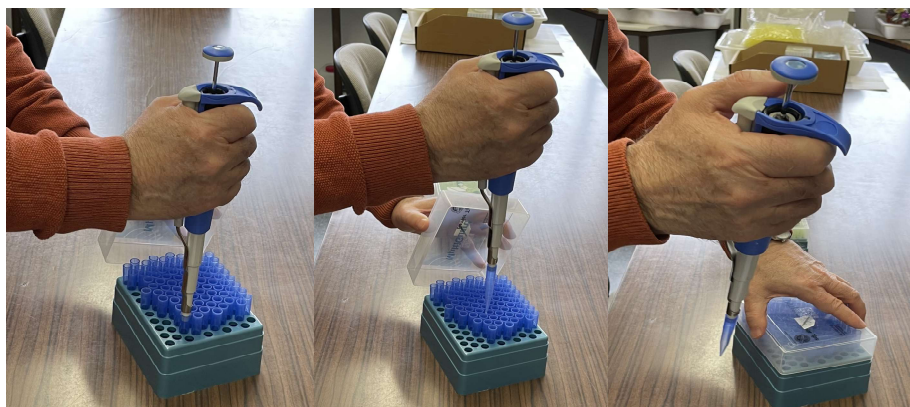


Figura 16

Presionamos el émbolo con el pulgar hasta el primer tope; manteniéndolo así, introducimos la punta en el recipiente correspondiente y soltamos el émbolo. Así se succiona la cantidad adecuada. Para soltar lo succionado basta con pulsar nuevamente el émbolo hasta el segundo tope (Figura 17)

Figura 17



PROYECTO: VAMOS A CLONAR PLANTAS DE VIOLETA AFRICANA

Etapas: 4º de la ESO y 1º y 2º de Bachillerato

BIBLIOGRAFÍA

- CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS CSIC. TÉCNICAS DE CULTIVO IN VITRO

<https://www.youtube.com/watch?v=ewMrWdJeD4k>

- SOCIEDAD ESPAÑOLA DE CULTIVO IN VITRO DE TEJIDOS VEGETALES

SECIVTV – Sociedad Española de Cultivo in Vitro de Tejidos Vegetales

- Cómo hacer un medio de cultivo sin autoclave. Plant Cell Technology. Bing Vídeos

- Julia Rueda, M.^a Rosario Linacero y Miguel Ángel Toro. (2021) Genética y biotecnología de plantas y animales. Editorial Síntesis. Capítulos 1 y 2. Libro

- F. J. Espino, M. R. Linacero, J. Rueda, A. M. Vázquez. (2004) Shoot regeneration in four Begonia genotypes. *Biologia Plantarum*. 48, 101 – 104.

- M. Freire Seijo (2003). Aspectos básicos de la embriogénesis somática. *Biotecnología Vegetal* Vol. 3, No. 4: 195 – 209.

- A.M. Vázquez, F J. Espino, J. Rueda, M. Candela, and A. M. Sendino. (1991) A comparative study of somatic embryogenesis in *Secale vavilovii*. *Plant Cell Reports* 10: 265 – 268.

- F.J. Espino, A.M. Vázquez. (1981) Chromosome numbers of *Saintpaulia ionantha* plantlets regenerated from leaves cultured in vitro with caffeine and colchicine. *Euphytica*. 30, 847 - 853.
1981

Todas las imágenes que aparecen en el proyecto son del Grupo de Cultivo in Vitro de la Unidad de Genética, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid.

PROYECTO: VAMOS A CLONAR PLANTAS DE VIOLETA AFRICANA

Etapas: 4º de la ESO y 1º y 2º de Bachillerato

EVALUACIÓN DEL PROYECTO

Te interesa la ciencia	
El trabajo de los investigadores es importante	
Interés de la actividad realizada	
El diseño y la organización de la actividad me ha parecido apropiado	
El trabajo de laboratorio me ha parecido interesante	
He aprendido técnicas que no conocía	
El trabajo en equipo es importante	
Los profesores han resuelto las dudas y preguntas	
La actividad realizada ha cubierto mis expectativas	
Valoración global de la actividad realizada	

Las distintas cuestiones se valorarán de 1 a 6 puntos, siendo 1 *“en desacuerdo”* y 6 *“totalmente de acuerdo”*

PROYECTO: VAMOS A CLONAR PLANTAS DE VIOLETA AFRICANA

Etapas: 4º de la ESO y 1º y 2º de Bachillerato

BIOLOGIA PLANTARUM 48 (1): 101-104, 2004

BRIEF COMMUNICATION

Shoot regeneration in four *Begonia* genotypes

F.J. ESPINO, R. LINACERO, J. RUEDA and A.M. VÁZQUEZ*

*Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid,
E-28040 Madrid, Spain*

Abstract

In vitro regeneration of four *Begonia* genotypes, *B. semperflorens*, *B. rex*, *B. · elatior*, and hybrid of *Begonia* with unknown parents 'Tiger' was carried out starting from leaf and petiole segments as explants. Five Murashige and Skoog's derived media were tested, three of them supplemented with □-naphthaleneacetic acid (NAA) and 6-benzyladenine (BA), and the other two with NAA and kinetin (KIN) in different concentrations. Shoot regeneration was preferentially induced on the BA containing media, quantitative differences being observed among explants and genotypes.

Additional key words: explant type, genotype effect, growth regulators, *in vitro* culture, organogenic response.

□ □ □ □

Begonia genus contains around 2000 species, of which over 200 have been introduced into the market by commercial growers. Some species such as *Begonia semperflorens* and *B. rex*, and hybrids such as 'Tiger' with unknown parents, *B. tuberhybrida*, *B. · elatior* (= *B. · hiemalis*) and *B. · erythrophylla* are among the most important ornamental plants. These plants are usually propagated by conventional vegetative methods, such as stem and leaf cuttings, although some of them can also be reproduced by seeds, as in the case of *B. semperflorens*. The vegetative propagation of begonias has been improved by the application of plant tissue culture techniques (Takayama 1990). Although the tissue culture methods and conditions are similar for different begonias, their requirements of growth regulators in the culture media are different. The results obtained by several authors (Chlyah and Tran Thanh Van 1975, Khoder *et al.* 1981, Simmonds 1984, Cassells and Morrish 1987, Burrit and Leung 1996, Kiyokawa *et al.* 1996) show that diverse auxin and cytokinin concentrations and/or their combinations are required in different species. So, the development of a good regenerative system for each genotype is important, mainly if genetic transformation experiments are to be

applied. In this respect, Kiyokawa *et al.* (1996) reported the first results on *Begonia tuberhybrida* transformation, based on a comparative organogenetic study among three *Begonia* species.

In the present work, four begonias, three types of explants and five culture media have been tested in order to ascertain the morphogenetic response of these genotypes under the same *in vitro* conditions and to verify if those protocols could be useful to establish an efficient regeneration method to be applied in further transformation experiments.

The four *Begonia* genotypes were *B. semperflorens* cv. Thousand Wonders, *B. rex* Putz. cv. Lucille Closon, *B. cv. Tiger* and *B. · elatior* cv. Schwabenland orange. The *B. semperflorens* donor plants were obtained from *in vitro* germinated seeds and in the other cases the donor plants were obtained from a local grower.

The *B. semperflorens* seeds were surface sterilised (1 min in 70 % ethanol and then 20 min in 1.5 % m/v sodium hypochlorite solution), rinsed three times in sterile distilled water and placed on MS medium (Murashige and Skoog 1962) supplemented with 3 % sucrose and 0.8 % agar. The pH was adjusted to 5.8 before autoclaving. The cultures were maintained in a

□ □ □ □

Received 17 December 2001, accepted 20 November 2003.

Abbreviations: BA - 6-benzyladenine, KIN - kinetin, MS - Murashige and Skoog; NAA - □-naphthaleneacetic acid.

Acknowledgements: This work was supported by a grant from the Comunidad Autónoma de Madrid (07B/0018/1997).

* Author to whom correspondence should be addressed; fax: (+34) 913 944 844, e-mail: anavaz@bio.ucm.es

PROYECTO: VAMOS A CLONAR PLANTAS DE VIOLETA AFRICANA

Etapas: 4º de la ESO y 1º y 2º de Bachillerato

Reseña Bibliográfica

Biotecnología Vegetal Vol. 3, No. 4: 195 - 209, octubre - diciembre, 2003

Aspectos básicos de la embriogénesis somática

Marisol Freire Seijo

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuani km 5,5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba CP 54 830. e-mail: mfreire@ibp.co.cu; marisol_freire@yahoo.es

RESUMEN

En el presente trabajo de una manera clara y asequible para el lector se describen conceptualmente una serie de reconocidos eventos que ocurren durante el desarrollo del proceso de embriogénesis somática. Una de las características sobresalientes de los embriones somáticos es que surgen de células somáticas y por lo tanto presentan la potencialidad de producir duplicados de un genotipo específico. Esta característica no solo permite la propagación clonal, tanto en especies propagadas vegetativamente como por semillas; sino también la multiplicación de células somáticas a las cuales se les han introducido genes específicos por ingeniería genética. Los individuos genéticamente modificados pueden ser multiplicados en forma segura y eficiente, evitando los riesgos de la incorporación de genes extraños meióticamente inestables en el resto del germoplasma. La propagación de plantas, a través de la embriogénesis somática, representa el método más eficiente de multiplicación clonal de plantas que se ha desarrollado hasta la fecha. La embriogénesis somática como sistema de regeneración de plantas ha sido empleada para la propagación de plantas y como herramienta para la conservación, y el mejoramiento genético de germoplasmas. No obstante, su empleo para la propagación comercial aún es escaso. Una posible explicación de este fenómeno a nivel mundial está relacionada, en primer lugar, con el desconocimiento que aún existe sobre la biología del proceso de embriogénesis somática, aunado a la no disponibilidad de sistemas eficientes y repetibles de regeneración.

Palabras claves: maduración, germinación, conversión, variación somaclonal

INTRODUCCIÓN

La embriogénesis somática *in vitro* es posible ya que virtualmente cualquier tejido somático vegetal tiene la capacidad de desarrollarse en un embrión (totipotencia) a través de la manipulación de las condiciones de cultivo y la aplicación de reguladores del crecimiento. La primera demostración de que las plantas podían producir embriones somáticos *in vitro* fue publicada en 1958 (Reinert, 1958 y Steward *et al.*, 1958). Este es un hecho bien establecido en más de 200 especies de importancia agronómica. Los embriones somáticos se pueden obtener de células vegetativas, de tejidos reproductivos, de embriones cigóticos o de callos producidos de cualquiera de las partes de las plantas (Copeland y McDonald, 1995).

La embriogénesis somática ha surgido como una nueva vía de propagación y constituye una herramienta de trabajo para la conservación *in vitro* de germoplasma (Griga, 2000) y el mejoramiento genético (Das *et al.*, 2002). Esta técnica permite incrementar los coeficientes de multiplicación, disminuir los costos de producción y da la posibilidad de automatizar el proceso productivo con el uso de biorreactores (de Fera, 2000). Este trabajo aborda de manera general las principales definiciones y consideraciones relacionadas con la embriogénesis somática, y más específicamente, en las Poaceas. Se reflejan, además, algunas experiencias del

colectivo de investigadores del Instituto de Biotecnología de las Plantas lo que da un complemento práctico a la reseña.

Embriogénesis somática

La embriogénesis somática es la formación de un embrión a partir de una célula, sin la necesidad de la fusión de gametos (Tisserat *et al.*, 1979). Esto no es un fenómeno artificial y es conocido en la naturaleza como una forma de apomixis llamada embriónia adventicia, descrita por primera vez por Strasburgers en 1878 aunque fueron Reinert (1958) y Steward *et al.* (1958) quienes dieron crédito por primera vez a la descripción de la embriogénesis somática en el año 1958.

Este método, teóricamente, es el más eficiente para la producción masiva de plantas *in vitro* debido a la naturaleza bipolar del embrión, la posibilidad de ser automatizado todo el proceso productivo, los altos coeficientes de multiplicación en cortos periodos de tiempo, al poder aplicarse los principios de la cinética microbiana y la posibilidad de encapsular estas estructuras y obtener semillas artificiales. Sus desventajas radican en el desconocimiento que existe sobre los parámetros que regulan este proceso, siendo aún limitado el número de especies en las cuales se describe una embriogénesis somática eficiente que permita un uso productivo del método (Yeung *et al.*, 1996).

PROYECTO: VAMOS A CLONAR PLANTAS DE VIOLETA AFRICANA

Etapas: 4º de la ESO y 1º y 2º de Bachillerato

Plant Cell Reports (1991) 10:265–268

Plant Cell
Reports

© Springer-Verlag 1991

A comparative study of somatic embryogenesis in *Secale vavilovii*

A. M. Vázquez, F. J. Espino, J. Rueda, M. Candela, and A. M. Sendino

Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid, 28040-Madrid, Spain

Received September 8, 1990/Revised version received January 23, 1991 – Communicated by I. K. Vasil

Summary. The ability of immature embryos, inflorescences and leaves of *Secale vavilovii* to form embryogenic callus was tested on Murashige and Skoog (1962) medium supplemented with different concentrations of 2,4-D. All cultured immature embryos formed calluses. The highest percentage of embryogenic callus production was from 1–2 mm embryos. Young leaves also formed calluses, mainly from the 10–15 mm basal segment, the percentages of embryogenic calluses being higher when cultures were maintained in darkness. Embryogenic calluses were obtained also from all the cultured immature inflorescences, in the three cases, rooted green plants were obtained and grown in soil. Comparison of the responses of the three explants used indicates that immature inflorescence is the most useful explant for obtaining regenerated plants in *Secale vavilovii*.

Key words: Gramineae-*Secale vavilovii*-Somatic embryogenesis

Introduction

Plant regeneration has been described, through somatic embryogenesis, from tissue cultures of several species of *Secale* (Lu et al. 1984, Krumbiegel-Schroeren et al. 1984, Linacero and Vázquez 1986, Rybczynski and Zdunczyk 1986). These studies have demonstrated the differences in response between species, and particularly between the types of explants used.

In the present work we have used an autogamous species, *Secale vavilovii*, in order to ascertain which explant -immature embryo, immature inflorescence or young leaves- could be used to obtain high frequency plant regeneration.

Offprint requests to: A. M. Vázquez

Material and methods

Immature inflorescences and immature embryos of *Secale vavilovii* were obtained from plants growing in the field. Immature kernels were surface sterilised by rapid immersion in 70% ethanol followed by 5% sodium hypochlorite for 20 minutes, and three rinses with sterile water. Immature embryos from 0.5 mm to 2.5 mm were aseptically excised under a stereomicroscope and cultured on the Murashige and Skoog (1962) medium (MS) supplemented with 1 or 2 mg/l 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). The embryos were placed on the media with the scutellar side facing up. The cultures were maintained in the dark. Afterwards the embryogenic calluses were transferred to the MS medium without hormones and cultured under a light regime of 16 hours (12 w/m², provided by fluorescent lamps).

Shoots containing young unemerged inflorescences were excised from the plants and surface sterilised following the same procedure described for the kernels. Inflorescences from 5–45 mm long were aseptically removed and cut into 2–3 mm segments and placed on the media in the same position that they had in the intact inflorescence. All the segments belonging to one inflorescence were considered as one explant. The media used were the basic MS supplemented with 0.5 or 2 mg/l 2,4-D. The cultures were maintained in diffuse light with a photoperiod of 16 hours (4.5 w/m² provided by fluorescent lamps).

Young leaves were taken from one month old plantlets, developed from seeds and growing on a basic MS medium. The basal part of the leaves, approximately 30 mm, were cut into 1–2 mm segments, and placed on the media maintaining the position they occupied in the plantlet (Linacero and Vázquez 1986). All segments from one plantlet were considered as one explant. MS medium supplemented with 1, 2 or 5 mg/l 2,4-D was used. Some of the cultures were maintained in the dark and others under a light regime of 16 hours (12 w/m² provided by fluorescent lamps).

All cultures were maintained at 25 ± 1°C. The response was evaluated two months after the starting of the cultures.

Results and Discussion

Immature embryos

The cultured embryos formed calluses independently of their size or the media used. Germination was also observed in the case of the larger embryos (>1 mm long). In all cases, the calluses were derived from the

PROYECTO: VAMOS A CLONAR PLANTAS DE VIOLETA AFRICANA

Etapas: 4º de la ESO y 1º y 2º de Bachillerato

Euphytica 30 (1981) 847-853

CHROMOSOME NUMBERS OF *SAINTPAULIA IONANTHA* PLANTLETS REGENERATED FROM LEAVES CULTURED IN VITRO WITH CAFFEINE AND COLCHICINE

F. J. ESPINO and A. M. VAZQUEZ

Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid, Spain

Received 7 August 1979

INDEX WORDS

Saintpaulia ionantha, colchicine, caffeine, cytochimeras, polyploids, in vitro.

SUMMARY

Parts of *Saintpaulia ionantha* leaves were cultured on a medium supplemented with different concentrations of colchicine or caffeine. The explants were transferred to a control medium without these chemicals after different periods of time. The chromosome number of the regenerated plantlets was counted. In all the experiments, polyploid plantlets were found, but the percentage of them was higher with colchicine. There were no differences in frequency of polyploid plantlets among treatments with the same chemical. In both cases a high percentage of cytochimeric plantlets was observed and possible explanations of their occurrence are given.

INTRODUCTION

Although there are not many references in literature, it is known that the addition of colchicine to tissue or cell culture media has a polyploidizing effect. This is reflected in the duplication of the number of chromosomes in the culture (HEINZ & MEI, 1970; NITSCH, 1975; BAYLISS, 1976). The same is found to occur with caffeine. Although the primary action of caffeine is the formation of polynucleate cells, the fusion of the nuclei in it leads to the formation of polyploid nuclei.

It is also known that plants can be formed directly from various explants when the latter have been cultured in media adequate to morphogenesis. This technique is at present being applied to produce plants rapidly and information on it is very extensive.

The African violet, *Saintpaulia ionantha*, has been the subject of the above propagation studies and an exact knowledge of the media for the production of plantlets has resulted in a greater success with multiplication (KUKULCZANKA & SUSZYNSKA, 1972; VAZQUEZ & SHORT, 1978).

This paper reports on a study of the effects of colchicine and caffeine on the plantlets obtained in media to which these chemicals are added.

MATERIALS AND METHODS

Young fully expanded leaves of *Saintpaulia ionantha* were surface sterilised by immersing them for 30 seconds in 70% ethanol and after that for 20 minutes in 5% sodium