

# LA SEMANA DE LA CIENCIA EN CHIAPAS

CURSO DE BIOLOGÍA  
Manual de laboratorio

San Cristóbal de las Casas  
26-30 junio, 2006  
TALLER DE CIENCIA PARA JOVENES

# LA SEMANA DE LA CIENCIA EN CHIAPAS

San Cristóbal de las Casas  
26-30 junio, 2006

## CURSO DE BIOLOGÍA

Elaboró  
Dr. Yuri Jorge Peña Ramírez

Centro de Bachillerato Tecnológico Industrial y de Servicios número 92  
Centro de Investigación en Matemáticas A. C.  
Instituto Tecnológico Superior de Acayucan  
Unidad de Investigación en Biotecnología Vegetal



# I

## Marco teórico

### LA TÉCNICA DE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES *IN VITRO*

El cultivo de tejidos vegetales es una técnica de la Biotecnología que comprende al conjunto de técnicas que permiten la manipulación biológica de células u órganos vivos, con fines de mejoramiento genético, desarrollo de productos medicinales, investigación científica entre otros. La Biotecnología Vegetal emplea tres herramientas principales: 1) La bioquímica, 2) La **biología molecular** y 3) El cultivos de tejidos *in vitro*.

Las aplicaciones más importantes del cultivo de tejidos vegetales *in vitro* en el campo de aplicación de la agricultura, se orientan a la **propagación vegetativa**, a la detección y eliminación de fitopatógenos y a la mejora genética. La aplicación de técnicas de cultivo *in vitro*; además, es indispensable para la transferencia de genes foráneos a las células y órganos en cultivo, denominada ingeniería genética.

La técnica de cultivo de tejidos vegetales se originó en el siglo pasado con el reporte del **cultivo indefinido** de tejidos vegetales de zanahoria (*Daucus carota* L.) y tabaco (*Nicotiana glauca* x *Nicotiana langsdorffii* L.) ambos se lograron simultáneamente, por primera vez, en 1939 en Francia por Gautheret y Nobecourt y en EE UU por White. Ambos grupos de investigación describieron por primera vez la inducción de tejido **desdiferenciado** (tumores y **callos**) en estos cultivos y su subsecuente diferenciación en nuevas plantas. Con ello se tuvo por primera vez la capacidad para manipular y potenciar o exacerbar la capacidad multiplicativa de los vegetales bajo condiciones de laboratorio y sin pasar por procesos sexuales, proceso al que se le denominó multiplicación *in vitro*.



Una plántula del árbol de hule (*Hevea brasiliensis* Müll.) desarrollándose en un cultivo *in vitro*. (Foto CIRAD Francia)



El berro de agua, *Nasturtium* o *Tropaeolum majus*, fue la primera especie vegetal en ser micro-propagada con fines comerciales en 1946. (Foto Fac. de Biología Universidad de Hamburgo)

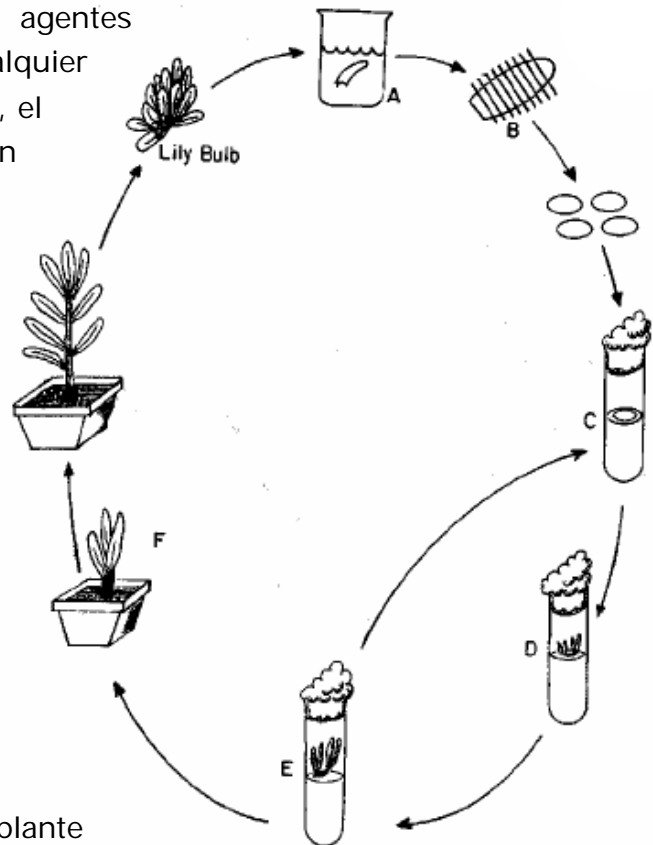
Por otra parte, Ball fue el pionero de la multiplicación vegetativa *in vitro* o **micro-propagación** (Propagación vegetativa de plantas mediante el cultivo *in vitro* de **meristemos**, yemas, cualquier tejido u órgano de una planta, también denominado explante), ya que en 1946, obtuvo el desarrollo *in vitro* de plantas enteras a partir de meristemos apicales de **vástagos** de *Tropaeolum majus* L.

La técnica de cultivo de tejidos *in vitro*, ha sido empleada desde entonces para una gran variedad de especies vegetales, en el esquema de esta página; abajo a la derecha, se puede apreciar el proceso de multiplicación por cultivo de tejidos aplicado a azucena, una especie ornamental que será empleada en este taller.

El proceso de cultivo inicia con un bulbo de azucena (Lily bulb), a partir de éste, se selecciona un **explante**, el cual debe ser **desinfectado** superficialmente empleando distintos agentes desinfectantes con el objeto de eliminar cualquier agente contaminante (A). Una vez desinfectado, el explante es **seccionado** en varios segmentos, en este caso llamados discos de bulbo (B).

Estos segmentos de explante son inoculados o sembrados en tubos o frascos que contienen un medio de cultivo que contiene los nutrientes y los reguladores de crecimiento vegetal necesarios para que se desarrollen nuevos tejidos o nuevas células a partir del **explante** (C). Pasado un corto periodo de tiempo se comienzan a observar nuevas plántulas brotando del explante (D).

Una vez que las plantas derivadas del explante han alcanzado un tamaño aceptable, pueden ser



empleadas nuevamente ahora como una nueva fuente de explante (E) lo que permite reiniciar el proceso de multiplicación. Finalmente, una vez que el número de explantes final ha sido alcanzado, comienza el proceso de Enraizamiento, en el cual se permite el desarrollo de raíces en la plántula *in vitro*, proceso que es requerido para el pase a suelo (F).



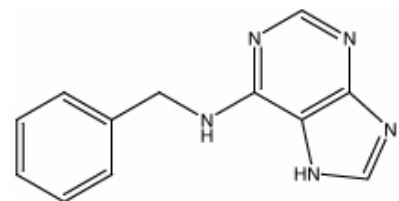
La formulación del medio de cultivo es la parte medular que garantiza el éxito o provoca el fracaso de un sistema de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales. Los medios de cultivo son usualmente de tipo semisólido (gelatina) cuando se está experimentando con un nuevo sistema vegetal. (Foto IINIRV/F)

minerales de **macronutrientes** y **micronutrientes**, vitaminas, azúcar (**sacarosa**) y **reguladores de crecimiento vegetal** (**citoquininas** y/o **auxinas** principalmente). El tipo y la cantidad de estos reguladores de crecimiento vegetal permiten modular el tipo de respuesta que se desea obtener de una planta en cultivo. Para el presente taller será empleada una **citocinina** llamada Bencil Adenina.

Otro componente del medio de cultivo es el agar. Los medios nutritivos pueden permanecer en estado líquido o bien solidificarse con **agar** en base al tipo de cultivos *in vitro* que se desea obtener (**callos**, cultivos de células, **meristemos**, **embriones somáticos**, etc.). Nosotros, en este caso emplearemos agar para obtener un medio de cultivo semisólido para obtener brotes a partir de los explantes que sembramos.

Este proceso de adaptación a tierra debe hacerse gradualmente ya que la planta proveniente de cultivo *in vitro* tiende a deshidratarse. Se recomienda por tanto disminuir lentamente la humedad ambiental. Ya adaptada a tierra la planta puede ser desarrollada normalmente hasta su estado adulto.

Una parte medular de este sistema de multiplicación lo consiste el medio de cultivo en el que serán sembrados nuestros explantes. El medio de cultivo está constituido principalmente por sales



El regulador de crecimiento vegetal Bencil adenina es una citocinina que permite el desarrollo de brotes a partir de explantes de varios tipos. (Esquema DAVOS Chemistry)

Finalmente, el valor de pH del medio de cultivo debe ser monitoreado. Las plantas prefieren un medio ligeramente ácido ( $\text{pH} = 5.7$ ) ya que a este valor, la mayoría de los componentes tiene una solubilidad ideal. El medio debe ser posteriormente **esterilizado** y vaciado en frascos o tubos que también han sido previamente **esterilizados**.

El paso de siembra del explante debe llevarse a cabo de forma aséptica, es decir, cuidando que no penetren en nuestros cultivos componentes externos como bacterias y hongos transportados por partículas de polvo o microgotas de saliva. Idealmente esta transferencia debe ser llevada a cabo en una campana de flujo laminar, sin embargo un buen mechero de alcohol puede funcionar bien en nuestro caso.

Las técnicas asépticas también serán comentadas directamente en el taller y deben ser observadas estrictamente ya que de esto depende el éxito de los experimentos. Observa en la ilustración cómo la operaria usa bata limpia, guantes de látex y cofia (gorra) para recoger su cabello. Para garantizar el buen desarrollo de nuestra práctica extrema precauciones de limpieza el día en el que se realizará la siembra de los explantes en el medio de cultivo.



El papel pH es una manera fácil y rápida de conocer el valor del pH en una solución, basta sumergir la tira para que la solución problema moje los cuadros de color. Posteriormente solo se comparan los colores de la tira con la referencia de color. (Foto MiniScience)



La campana de flujo laminar es un aparato que crea un ambiente aséptico de trabajo mediante la ultra filtración del aire ambiental. Como se observa en la imagen, al fondo del área de trabajo se ubican unos filtros de aire que expulsan un flujo constante de aire libre de bacterias, hongos y cualquier partícula contaminante. (Foto Internacional Atomic Energy Agency)



La campana de flujo laminar es un aparato que crea un ambiente aséptico de trabajo mediante la ultra filtración del aire ambiental. Como se observa en la imagen, al fondo del área de trabajo se ubican unos filtros de aire que expulsan un flujo constante de aire libre de bacterias, hongos y cualquier partícula contaminante. (Foto Clonaflor Biotecnología Vegetal S.A)

Una vez sembrado el explante en el frasco con medio de cultivo, se incuba en una cámara o cuarto equipado de factores ambientales controlados (iluminación, temperatura, humedad relativa) y que están optimizados para cada tipo de cultivo a realizar.

Siguiendo estas metodologías, es posible obtener, a partir de casi cualquier planta, grandes cantidades de individuos sanos, de rápido crecimiento y homogéneos genéticamente. La propagación vegetativa *in vitro* o micropropagación puede ser una alternativa económicamente rentable, frente a los métodos de multiplicación clásicos.



El producto final de los procesos de multiplicación *in vitro* son plántulas adaptadas a suelo en charolas para almácigo. Estas plántulas pueden pasar directamente a suelo o bien pasar primero por una ronda de desarrollo en vivero. En esta imagen se muestran plántulas de primavera (*Cibistax donell-smithii*) (Foto UNIVE)

# II

## Notas.

Lleva tus anotaciones de la parte teórica, es muy importante que añadas la información que te parezca crítica



# III

## Preparación del medio de cultivo parte 1

Lunes 26 de junio

### MATERIAL

1. Identifica el área de trabajo que te fue asignada, verifica que esté limpia y que todo el material siguiente esté completo.

- |   |   |       |
|---|---|-------|
| • Cuadrado de 10 x 10 cm de papel aluminio    | 1 | pieza |
| • Cinta de masking tape                       | 1 | pieza |
| • Plumón de tinta indeleble (Sharpie o Zebra) | 1 | pieza |
| • Toalla Magitel o franela                    | 1 | pieza |
| • Rollo de papel higiénico                    | 1 | pieza |
| • Matraz de 500 ml                            | 1 | pieza |

### PRECAUCIONES



- **LOS QUÍMICOS SON PELIGROSOS. EVITA TOCARLOS CON LAS MANOS DESNUDAS**
- **EVITA OLERLOS O INGERIRLOS INVOLUNTARIAMENTE**
- **MANTENTE ALERTA DE LO QUE PASA A TU ALREDEDOR**
- **IDENTIFICA SALIDA DE EMERGENCIA**

### PESADO DE LOS COMPONENTES PARA PREPARAR EL MEDIO DE CULTIVO

2. Designa de entre tu equipo a las personas encargadas de pesar los componentes del medio de cultivo (3 personas)
3. El encargado de pesar se dirigirá al área de pesado para realizar las siguientes actividades.

- a. Toma un capacillo y ponlo sobre la balanza
  - b. Tara la balanza (el indicador debe mostrar 0.00 gramos)
  - c. Empleando una cucharilla de plástico limpia pesa **1.13 gramos** del polvo de **macronutrientes**
  - d. Retira el capacillo con los macronutrientes
  - e. Pon en la balanza un nuevo capacillo y tara de nuevo la balanza
  - f. Empleando una cucharilla de plástico limpia pesa **0.05 gramos** del polvo de **micronutrientes y vitaminas**
  - g. Retira el capacillo con los micronutrientes y vitaminas
  - h. Pon en la balanza un nuevo capacillo y tara de nuevo la balanza
  - i. Empleando una cucharilla de plástico limpia pesa **1.25 gramos** de **agar**
  - j. Retira el capacillo con los micronutrientes y vitaminas
  - k. Pon en la balanza un nuevo capacillo y tara de nuevo la balanza
  - l. Empleando una cucharilla de plástico limpia pesa **7.5 gramos** de **azúcar glass** o **azúcar refinada**
  - m. Retira el capacillo con azúcar
  - n. Una vez pesados todos los componentes, toma los capacillos y regresa a la mesa de trabajo.
4. Tomen el matraz de 500 ml y en el vacíen dentro de él todo lo pesado
  5. Cubran el matraz con el papel aluminio, etiquétenlo con el nombre del equipo y déjenlo en la mesa
  6. Limpiar la mesa y dejar ordenado el material, recoger la basura

### **ENTRENAMIENTO DE MICROPIPETAS (OPCIONAL)**

7. Mientras transcurre la práctica puede hacerse una práctica en el manejo de las micropipetas

# IV

## Preparación del medio de cultivo parte 2

Martes 27 de junio

### MATERIAL

1. Identifica el área de trabajo que te fue asignada, verifica que esté limpia y que todo el material siguiente esté completo.

• Botella con agua estéril (250 ml)	1	pieza
• Gotero con solución de NaOH 1N	1	pieza
• Gotero con solución de HCl 1N	1	pieza
• Tiras de papel para medir pH	5	piezas
• Referencia de color para tiras de pH	1	pieza
• Probeta de 250 ml	1	pieza
• Agitador de cristal	1	pieza
• Pieza de papel aluminio de 10 x 10 cm	3	piezas
• Cinta de masking tape	1	pieza
• Tiras de cinta testigo	10	tiras
• Plumón de tinta indeleble (Sharpie o Zebra)	1	pieza
• Cajas petri desechables estériles	6	piezas
• Rollo de plástico para envolver	1	pieza
• Toalla Magitel o franela	1	pieza
• Tubo de solución de Bencil Adenina	1	pieza
• Micropipetas	1	juego
• Tubos Falcon estériles (Con su base de unicel)	6	piezas
• Rollo de papel higiénico	1	pieza
• Aspersor con alcohol	1	pieza
• Frasco gerber con puntas para micropipeta de 200 µl	1	pieza
• Cubrebocas	3	piezas

## PRECAUCIONES



- **LOS QUÍMICOS SON PELIGROSOS Y CORROSIVOS. EVITA TOCARLOS CON LAS MANOS DESNUDAS**
- **EVITA OLERLOS O INGERIRLOS INVOLUNTARIAMENTE**
- **LA OLLA DE PRESIÓN PUEDE PROVOCAR SERIAS QUEMADURAS, USALA CON PRECAUCIÓN**
- **EL MEDIO QUE SALE DE LA OLLA ESTÁ MUY CALIENTE**
- **MANTENTE ALERTA DE LO QUE PASA A TU ALREDEDOR**
- **IDENTIFICA SALIDA DE EMERGENCIA**

## DISOLVER LAS SALES PESADAS EL DIA PREVIO

2. Toma la probeta y mide 250 ml de agua estéril
3. Añádele los 250 ml de agua al matraz que contiene las sales que se pesaron ayer
4. Toma la micropipeta y ponle una puntilla.
5. Empleando la micropipeta añade 75 microlitros de Bencil Adenina
6. Agita el matraz empleando la varilla de cristal hasta que se disuelvan los componentes (sales) el agar no se va a disolver y va a quedar formando unos grumos minúsculos

## AJUSTAR EL pH DEL MEDIO DE CULTIVO

7. Toma una tira de papel pH, sumérgela en el medio y checa qué valor tiene
8. Empleando la solución de NaOH o la de HCl (según sea conveniente) añade unas cuantas gotas para ajustar el pH
9. Agita el medio después de haber añadido el NaOH o el HCl y vuelve a medir el pH con el papel indicador
10. Repite estos pasos hasta que el valor del pH se sitúe entre 5 y 6

11. Una vez ajustado el pH en el valor correcto pasa al siguiente paso

## **ESTERILIZAR EL MEDIO**

12. Cubre perfectamente la boca del matraz con tres capas de papel aluminio, fija el papel aluminio al matraz empleando unas tiras de cinta testigo (parecido al masking tape pero con franjas diagonales)

13. Mete el matraz a la olla de presión y procede a esterilizar el medio durante 15 minutos

## **VACIAR EL MEDIO DE CULTIVO**

14. Mientras se esteriliza el medio y empleando el papel de baño limpia perfectamente la mesa de trabajo con cloro

15. Designa a tres personas del equipo para que vacíen el medio de cultivo y detengan las cajas petri y los tubos falcon. Los tres deberán recogerse perfectamente el cabello, ponerse el cubre bocas y la cofia y lavarse perfectamente las manos y los antebrazos hasta el codo

16. Una vez que ha salido de esterilizarse el medio enciende el mechero de alcohol y empleando la franela transporta a tu mesa el matraz y déjalo cerca del mechero

17. En un radio de 15 cm alrededor del mechero se tiene un área de confianza, así que esa será tu área de trabajo, si es posible píntala en la mesa

18. Dentro del radio además del matraz pon las cajas petri

19. Trabajando rápidamente destapa el matraz manteniendo la boca muy cerca de la flama y vacía medio en cada caja petri hasta que se llene todo el fondo. Las cajas petri las debe abrir levemente un ayudante y una vez vaciado el medio debe cerrarse lo más pronto posible

20. Vacía alrededor de 10 ml de medio de cultivo en cada tubo falcon. Igualmente un ayudante debe abrir el tubo y cerrarlo rápidamente

21. Mantén verticales los tubos falcon hasta que el medio solidifique

22. Empleando el rollo de plástico para envolver sella perfectamente las cajas petri y los tubos, márcalos con el plumón indeleble y déjalos sobre la mesa

23. Apagar el mechero, limpiar la mesa y dejar ordenado el material, recoger la basura.

# V

## Selección y limpieza del explante parte 1

Miércoles 28 de junio

### MATERIAL

1. Identifica el área de trabajo que te fue asignada, verifica que esté limpia y que todo el material siguiente esté completo.

• Guantes de látex	3	pares
• Matraz de 500 ml	1	pieza
• Pieza de papel aluminio de 10 x 10 cm	3	piezas
• Cinta de masking tape	1	pieza
• Plumón de tinta indeleble (Sharpie o Zebra)	1	pieza
• Botella con agua estéril (250 ml)	1	pieza
• Probeta de 250 ml	1	pieza
• Bisturí con navaja	1	pieza
• Caja petri vacía	1	pieza

### PRECAUCIONES



- **LOS QUÍMICOS SON PELIGROSOS. PROHIBIDO TOCARLOS CON LAS MANOS DESNUDAS**
- **SI TE CAEN ANTIFUNGICOS EN LAS MANOS ENJUAGALAS INMEDIATAMENTE**
- **EVITA OLERLOS O INGERIRLOS INVOLUNTARIAMENTE**
- **EXTREMA CUIDADOS AL TRABAJAR CON EL MECHERO DE ALCOHOL, LA FLAMA PUEDE SER INVISIBLE**
- **MANTENTE ALERTA DE LO QUE PASA A TU ALREDEDOR**
- **IDENTIFICA SALIDA DE EMERGENCIA**

## **SELECCIÓN Y LIMPIEZA DEL EXPLANTE**

2. De las plantas que se colectaron en campo, selecciona un tejido sano, limpio y que contenga un buen número de meristemos.
3. Lava el explante con agua y detergente, enjuaga con abundante agua. Sé gentil con el explante, no queremos dañarlo
4. Empleando la caja petri vacía y el bisturí, corta alrededor de 20 gramos de tejido
5. Deposita los explantes en el matraz de 500 ml

## **TRATAMIENTO CON ANTIFÚNGICOS**

6. Designa a dos personas para que pesen los Antifúngicos. Ambas personas deben ponerse guantes de latex y cubrebocas.
7. Anade los Antifúngicos que pesaste en el matraz con el explante
8. Mide 250 ml de agua estéril en una probeta y añádeselos al matraz con el explante y los Antifúngicos.
9. Cubre el matraz con papel aluminio, sállalo empleando el plástico en rollo para envolver
10. Agita vigorosamente el matraz (lo debe hacer una persona que traiga guantes de látex)
11. Etiqueta el matraz con el nombre del equipo y deja toda la noche en un lugar fresco
12. Limpiar la mesa y dejar ordenado el material, recoger la basura.



# VI

## Limpieza del explante parte 2 e inoculación

Jueves 29 de junio

### MATERIAL

1. Identifica el área de trabajo que te fue asignada, verifica que esté limpia y que todo el material siguiente esté completo.

• Guantes de látex	3	pares
• Matraz de 500 ml con los explantes	1	pieza
• Botella con agua estéril (250 ml)	4	piezas
• Encendedor o caja de cerillos	5	piezas
• Probeta de 250 ml	1	pieza
• Frasco Gerber con 100 ml de cloro	1	pieza
• Frasco Gerber grande lleno de alcohol	1	pieza
• Caja petri vacía estéril	1	pieza
• Cubeta o recipiente de plástico de 2 litros NUEVA	5	piezas
• Cajas petri y tubos falcon con medio de cada equipo	12	piezas
• Bisturí con navaja	1	pieza
• Pinzas tipo fórceps	1	pieza
• Aspersor con alcohol	1	pieza
• Rollo de plástico para envolver	1	pieza
• Cinta de masking tape	1	pieza
• Plumón de tinta indeleble (Sharpie o Zebra)	1	pieza

### PRECAUCIONES



- **LOS QUÍMICOS SON PELIGROSOS. PROHIBIDO TOCARLOS CON LAS MANOS DESNUDAS**
- **SI TE CAEN ANTIFUNGICOS EN LAS MANOS ENJUAGALAS INMEDIATAMENTE**
- **EVITA OLERLOS O INGERIRLOS INVOLUNTARIAMENTE**
- **EXTREMA CUIDADOS AL TRABAJAR CON EL MECHERO DE ALCOHOL, LA FLAMA PUEDE SER INVISIBLE**
- **MANTENTE ALERTA DE LO QUE PASA A TU ALREDEDOR**
- **IDENTIFICA SALIDA DE EMERGENCIA**

## **DESINFECCIÓN DEL EXPLANTE**

2. Enciende nuevamente el mechero y traza de nuevo tu círculo de trabajo Todo el trabajo que hagas hoy debe hacerse dentro del círculo, lo más cercano al mechero como sea posible.
3. Designa a los encargados de sembrar (3 personas), se deben lavar perfectamente las manos, recogerse el pelo y ponerse guantes de látex, cubre bocas y cofia.
4. Recoge tu matraz con tus explantes, agítalo vigorosamente de nuevo para resuspender perfectamente los Antifúngicos y déjalo dentro del círculo
5. Vacía el contenido del matraz en la cubeta descartando los Antifúngicos.
6. Añade agua estéril hasta que cubra perfectamente el explante
7. Agita el matraz y desecha el agua
8. Mide en la probeta 50 ml de cloro y 200 ml de agua
9. Añade la mezcla al matraz con tus explantes, agita vigorosamente
10. Incuba exactamente 20 minutos
11. Tira el cloro y enjuaga tres veces con agua estéril

## **SIEMBRA DE LOS EXPLANTES**

12. Sumerge el bisturí y las pinzas en alcohol y flaméallos. Fíjate en como lo hace el instructor, una iniciativa sin experiencia puede resultar en quemaduras.
13. Con las pinzas ya flameadas saca el explante del matraz y ponlo en una caja petri
14. Haz cortes que dejen fragmentos de alrededor de 1 cm por lado
15. Con ayuda de un compañero destapa las cajas petri y los tubos falcon y en ellos deposita los explantes. Prueba distintas orientaciones y distintas partes del tejido.

16. Sella tus tubos, tus cajas petri, etiquétalas y déjalos en un lugar donde reciban abundante luz.

17. Apagar el mechero, limpiar la mesa y dejar ordenado el material, recoger la basura

# VII

## Revisión de los cultivos

Viernes 30 de junio

### **MATERIAL**

1. Identifica el área de trabajo que te fue asignada, verifica que esté limpia y que se encuentre en ella tus cajas petri y tus tubos con tus cultivos

### **REVISIÓN DE CULTIVOS**

2. Revisa la superficie del material, la presencia de algodoncitos son micelios de hongos y la presencia de manchas gelatinosas blancas o de color son bacterias.
3. Se tiene que hacer la revisión periódicamente
4. Una vez que hayan aparecido las raíces (en unas 4 semanas) puedes sacar tu planta, quitarle el medio con agua tibia y sembrarla en tierra de hojas. Para evitar la pérdida de agua tendrás que tapar la maceta con una bolsa y gradualmente hacerle hoyos a la bolsa hasta que se la quites toda y desarrolles una planta adulta

# VIII

## Glosario

### TÉRMINOS COMUNMENTE EMPLEADOS EN CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

1. **Adventicio**. Desarrollo de una estructura desde un punto inusual de origen; por ejemplo, brotes o raíces a partir de **callos** o **embriones somáticos** o cualquier otra fuente que no sean **embriones cigóticos**.
2. **Agar**. Carbohidratos complejos que son obtenidos de ciertas especies de algas, se utiliza para gelificar los medios nutritivos.
3. **Auxinas**. Moléculas que en pequeñas cantidades promueven la **desdiferenciación** celular y la formación de raíces.
4. **Axénico**. Cultivo puro de un organismo.
5. **Biología Molecular**. Conjunto de técnicas de detección, manipulación y modificación de moléculas biológicas o biomoléculas: Proteínas ácidos nucleicos, lípidos y carbohidratos.
6. **Callo**. Tejido desorganizado formado por una masa de células vegetales desdiferenciadas que crecen de manera descontrolada.
7. **Citocininas**. Moléculas que en pequeñas cantidades promueven la diferenciación celular con la consecuente formación de brotes **adventicios**.
8. **Clonación**. Este término puede definirse como el uso de métodos asexuales para producir copias genéticamente exactas de un individuo vegetal o animal. Para ello se precisa de que las células a cultivar -aisladas o integrantes de tejidos u órganos- sean **totipotentes** (pluripotentes) y que las mismas procedan de un organismo; el cual, generalmente posee características deseables, para que posteriormente se multipliquen y formen nuevos individuos idénticos genéticamente al primero.
9. **Cultivo indefinido**. Cultivo en el que se emplean ingredientes cuya formulación no se conoce exactamente, por ejemplo en medios que emplean endospermo líquido (agua) de coco, polvo de jitomate, polvo de plátano o polvo de papa.
10. **Cultivos asépticos**. Cultivos **axénicos** (puros) libres de agentes contaminantes como microorganismos: hongos, bacterias, levaduras, virus, etc.
11. **Desdiferenciación**. Célula o conjunto de células que han alterado su estructura original que les daba una función específica en un tejido, las células desdiferenciadas han perdido su función, su estructura y su organización tisular.
12. **Diferenciación**. Proceso por el cual una célula no diferenciada o desdiferenciada pasa a formar un tejido o un órgano adquiriendo una forma y función específica.
13. **Embrión cigótico**. Estructura embrionaria que se desarrolla en la semilla de los frutos y que es producto de la unión de los **gametos** masculino y femenino.

14. **Embrión somático.** Estructura embrionaria que se desarrolla mediante el cultivo *in vitro* de células somáticas. Término también válido para los embriones adventicios que se desarrollan mediante las técnicas *in vitro* pero de forma vegetativa.
15. **Esterilizar.** Eliminar por completo todo organismo vivo de un objeto o área. Existen métodos físicos y químicos de esterilización como: Calor y radiaciones (métodos físicos) y el uso de hipoclorito de sodio, ácidos y bases fuertes etc. (métodos químicos)
16. **Explante.** Sección de una planta, órgano o tejido que se emplea como inóculo o segmento iniciador del cultivo.
17. **In vitro.** Técnicas que se llevan a cabo en recipientes translúcidos, generalmente de cristal (de ahí su nombre) bajo condiciones asépticas que permiten mantener cultivos axénicos.
18. **Indiferenciada.** Células **generatrices** o células madre **totipotentes** de origen cigótico capaces de multiplicarse activamente y que dan origen a las células que han de convertirse en tejidos y órganos. Los **Meristemos** son el principal tejido que contiene estas células.
19. **Macronutrientes.** Conjunto de sales minerales que las plantas emplean en grandes cantidades para sus procesos nutritivos, las constituyen principalmente sales de nitrógeno, potasio, fósforo calcio y magnesio.
20. **Meristemo.** Conjunto de células **indiferenciadas** que se encuentran en el ápice de las plantas, las bases de las hojas, las puntas de las raíces, los bordes del tallo, etc. Es a partir de estas células de las cuales se originan los nuevos tejidos de una planta en desarrollo, pero que para el cultivo de tejidos vegetales, pueden ser empleados como **explante** para obtener nuevas células y/o estructuras **adventicias**.
21. **Micronutrientes.** Conjunto de sales minerales que las plantas emplean en pequeñas cantidades para sus procesos nutritivos, las constituyen principalmente sales de manganeso, zinc, boro, cobre, molibdeno, yodo, cobalto, azufre, sodio, hierro y cloro. Estos componentes también se les conoce como **elementos traza**.
22. **Micropropagación.** Propagación vegetativa de plantas mediante el cultivo *in vitro* de meristemos, yemas, cualquier tejido u órgano de una planta.
23. **Propagación Vegetativa.** Es la reproducción de un vegetal sin pasar por un proceso sexual, derivando de este proceso individuos genéticamente idénticos genéticamente a la planta madre, es decir son clones de la planta madre. Ejemplos de esta técnica son: Hijuelos, acodos, vástagos, guías, varetas, etc.
24. **Reguladores de crecimiento vegetal.** Son componentes del medio de cultivo que se agregan en pequeñas cantidades (partes por millón) pero que ejercen un poderoso efecto en el crecimiento celular promoviendo la **diferenciación** celular (**citocininas**) o la **desdiferenciación** celular (**auxinas**).
25. **Totipotente.** Tipo celular integrado por las **células madre** o **células generatrices**, son células que capaces de multiplicarse activamente y que dan origen a las células que

han de convertirse en tejidos y órganos. Los **Meristemos** son el principal tejido que contiene estas células.

26. **Vástago.** Para este caso concreto, brote o rama que se desarrolla en el tallo de una planta, a partir de un tejido meristemático o yema, ubicados en el ápice y/o en las zonas axilares del tallo.