

## **ANEXO A. Laboratorios de biotecnología y cultivos in Vitro**

En el avance logrado por las ciencias biológicas en las dos últimas décadas se han desarrollado técnicas que posibilitan el estudio de las plantas a nivel celular y molecular. Estos nuevos enfoques conocidos colectivamente como biotecnología, se están convirtiendo en herramientas poderosas para el mejoramiento de las plantas y el progreso de la agricultura.

La biotecnología vegetal, experimenta una evolución rápida que ha suscitado gran interés en la mayor parte de las naciones del mundo. El impacto de la biotecnología afectará a todas las especies cultivadas, y su mayor potencial, en términos de desarrollo tecnológico, se concentrará en los trópicos. Sin embargo, la brecha entre la investigación básica en biología celular y molecular y sus aplicaciones tecnológicas es generalmente grande en los países tropicales; en éstos, el difícil acceso a la información científica y tecnológica es una causa importante de esa situación.

El cultivo de tejidos es importante no sólo porque es el área de la biotecnología que tiene actualmente mayor aplicación práctica en la agricultura, sino por ser una herramienta versátil para el estudio de los problemas básicos y aplicados de la biología de las plantas; constituye, en efecto, el puente necesario para llevar las manipulaciones genéticas desde el laboratorio hasta el campo.

La amplitud de la definición de “cultivos de tejidos” y los numerosos objetivos que estos persiguen constituyen serios escollos en cualquier intento de generalización

sobre factores que afectan el establecimiento de tales cultivos in Vitro, y obligan a consideraciones previas para delimitar los alcances de los mismos.

En primer término, el cultivo de tejidos in Vitro comprende, en su acepción amplia, un heterogéneo grupo de técnicas mediante las cuales un explante (parte separada de un vegetal, por ejemplo: protoplasto, célula, tejido, órgano) se cultiva asépticamente en un medio de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas. Esta acepción amplia, si bien imprecisa, es actualmente aceptada; sin embargo, existen sugerencias de algunos autores (Street, 1977a; Steward, 1983 ) para restringir su empleo.

En segundo término, los objetivos perseguidos con la utilización del cultivo in Vitro de tejidos vegetales son numerosos y diferentes. Brevemente las posibilidades de aplicación de tales cultivos se pueden resumir así: a) estudios básicos de fisiología, genética, bioquímica, y ciencias afines; b) bioconversión y producción de compuestos útiles; c) incremento de la variabilidad genética; d) obtención de plantas libres de patógenos; e) propagación de plantas; y f) conservación e intercambio de germoplasma.

De estas consideraciones surge que el establecimiento de los cultivos de tejidos, es decir la separación del explante y las operaciones relacionadas con su incubación in Vitro, dependerá en gran medida del tipo de explante y del sistema de cultivo que se emplee, los que a su vez dependerán del objetivo perseguido. En otras palabras, las técnicas que se empleen para cultivar protoplastos no son exactamente las mismas que se usan para cultivar meristemas; del mismo modo, un determinado sistema de cultivo puede ser de gran utilidad para el logro de un objetivo pero no puede ser útil para otro.

A continuación, se discuten los aspectos comunes al establecimiento de los cultivos. De manera especial se harán consideraciones especiales sobre, las normas de asepsia y las condiciones ambientales de incubación, la interacción de estos factores determinará las respuestas que se obtengan in Vitro. La respuesta obtenida con el cultivo in Vitro de un determinado explante decidirá sobre su utilidad para el logro de un objetivo propuesto. Es importante recalcar que, para su aplicación en la agricultura, cualquier sistema de cultivo in Vitro debe lograr como producto final la regeneración de plantas enteras.

**Explante.** La elección de un explante apropiado constituye el primer paso para el establecimiento de los cultivos; en primera instancia, dicha elección está determinada por el objetivo perseguido y la especie vegetal utilizada.

**Medios de cultivo.** Una vez definido el objetivo perseguido con el cultivo in Vitro de un determinado explante, es necesario elegir un medio apropiado de cultivo, en el cual hay que considerar no sólo sus componentes sino su preparación. En la actualidad existen innumerables formulaciones cada una de las cuales contiene entre 15 y 35 compuestos químicos.

**Asepsia.** La asociación explante – medio y las condiciones físicas en que normalmente se incuban los cultivos conforman un ambiente propicio para la proliferación de microorganismos (bacterias, hongos), los cuales pueden destruir tales cultivos, competir con el explante por el medio de cultivo o modificarlo. Evitar las contaminaciones con microorganismos es un aspecto básico que se debe tener en cuenta para el éxito, no solamente en el establecimiento de los cultivos sino en su ulterior incubación y manipulación.

Es difícil lograr cultivos completamente estériles en el estricto sentido de la palabra; por ejemplo, es probable que los virus presentes en el explante persistan en el cultivo. Hecha esta salvedad, para establecer cultivos asépticos es conveniente o necesario: a) trabajar en ambientes adecuados; b) esterilizar los medios de cultivo; c) desinfectar superficialmente los explantes, liberándolos de bacterias y hongos exógenos; y d) realizar los cultivos respetando las normas de asepsia establecidas.

**Condiciones ambientales para la incubación.** Es conveniente que los cultivos sean incubados en ambientes controlados, por lo menos en lo que se refiere a la luz y a la temperatura; estos dos factores están relativamente poco estudiados, y la información existente sobre ellos suele ser fragmentaria y a menudo contradictoria.

Las respuestas morfogénicas pueden ser alteradas por la temperatura de incubación (Martín, 1980; Hughes, 1981), así como por la calidad, intensidad y duración de la luz (Seibert et al., 1980; Hughes, 1981).

Para propósitos generales se sugiere utilizar, en el establecimiento de los cultivos, una fuente luminosa del tipo “luz día” que brinden entre 1000 y 5000 lux de iluminación. Comúnmente se utiliza un ciclo fotoperíodo / escotoperíodo de 16/8 horas. En general, temperaturas entre 20 y 28°C son adecuadas para el establecimiento de cultivos.

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

**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; en la práctica, sin embargo, algunas de las funciones pueden desarrollarse en un mismo ambiente. Las áreas o secciones principales son:

**1. Área 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, 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. Área 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.

**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 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. La regulación de la temperatura se puede lograr por medio de aparatos de aire acondicionado de pared o de un sistema central.

**5. Área de Observación y Examen.** Generalmente los microscopios 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 anteriormente 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. Área 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

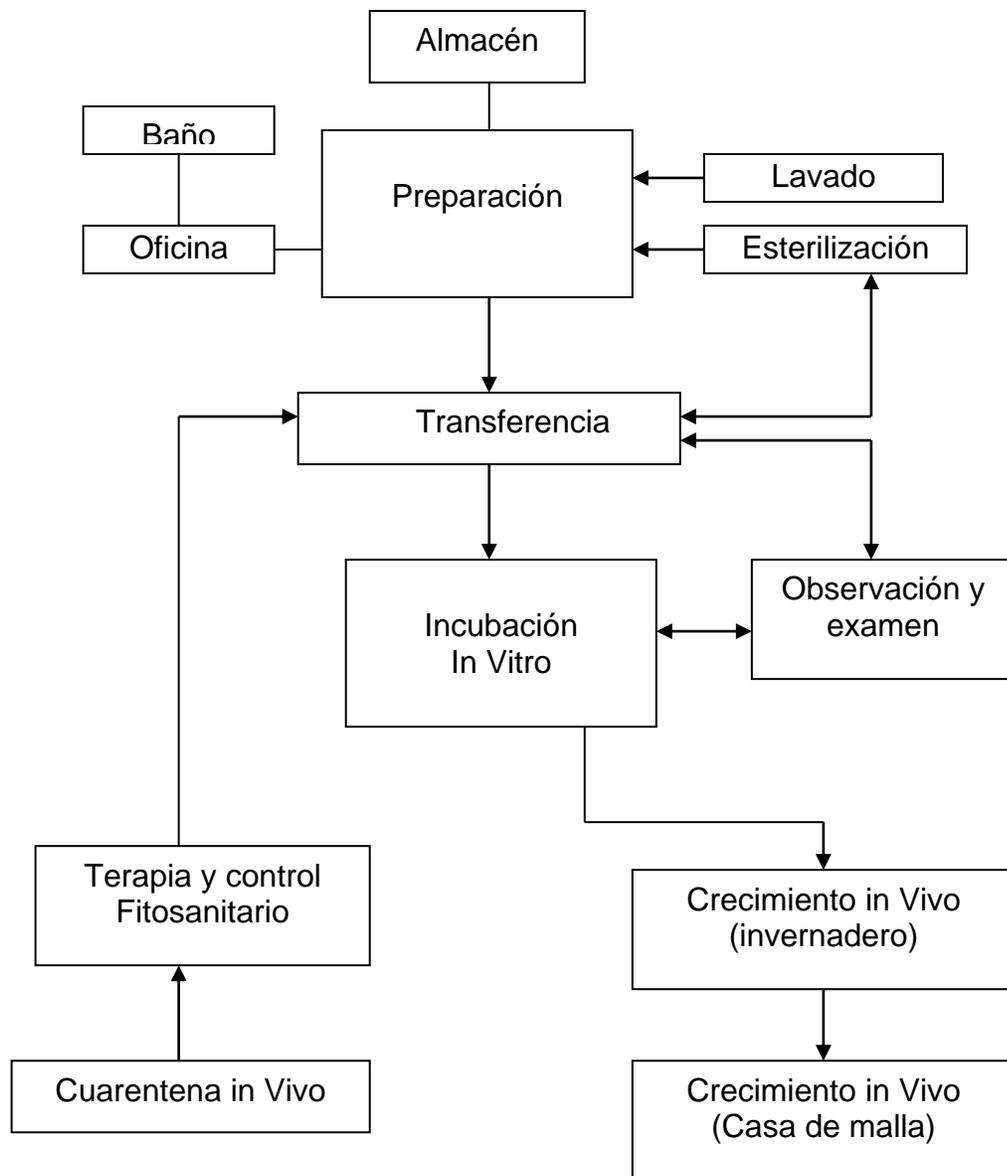
climáticas del lugar donde está ubicado el laboratorio y de los requerimientos de aislamiento de los materiales por razones fitosanitarias. Después del trasplante, las plantas generalmente necesitan un acondicionamiento gradual a las condiciones de campo, lo cual se puede lograr usando nebulización, cámaras húmedas de plástico, etc.

**7. Áreas de cuarentena y 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 esta área 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 grado de garantía fitosanitaria que se demanda o se desea ofrecer con el material vegetal.

**8. Área de Oficina.** En ésta se debe 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.

**Figura A.1** Diferentes áreas de un laboratorio de cultivo de tejidos



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, pisos, paredes, 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 triples 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 en el tamaño de los espacios.

**Otras consideraciones.** Como cualquier lugar de trabajo, los laboratorios de biotecnología y de tipo biológico deben reunir unas condiciones, que si bien pueden variar notablemente en función de su finalidad (un laboratorio dedicado a la mejora genética de vegetales, es muy distinto de otro en el que se realizan investigaciones microbiológicas), deben estar acordes sobre las disposiciones mínimas de seguridad y salud en los lugares de trabajo.

La exposición de los trabajadores a las condiciones ambientales de los laboratorios en general no debe suponer un riesgo para su seguridad y salud, ni debe ser una fuente de incomodidad o molestia. Deben evitarse: humedad y temperaturas extremas, cambios bruscos de temperatura, corrientes de aire

molestas, olores desagradables. Por las características propias del trabajo no es habitual que los trabajadores permanezcan en su interior durante espacios de tiempo prolongados y es preciso tomar precauciones considerando las diferencias de temperatura con el exterior, así, las personas que deban acceder al interior de las secciones controladas accedan provistas de ropa adecuada, especialmente en aquellas cuya temperatura es inferior.

En cuanto a orden y limpieza, estos factores deben ser consustanciales con el trabajo, porque un laboratorio limpio y ordenado significa disponer de lo necesario y en condiciones óptimas para desarrollar cualquier actividad en todo momento. Para que puedan darse unas buenas condiciones de orden y limpieza es necesario respetar las dimensiones mínimas de los espacios de trabajo, permitiendo a trabajadores realizar sus actividades sin riesgos para su seguridad y salud y en condiciones ergonómicas aceptables. La separación entre los elementos materiales existentes en el laboratorio deberá ser suficiente para que los trabajadores puedan realizar su labor en condiciones de seguridad, salud y bienestar.