UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA ORIENTAL DEL URUGUAY

ANALES

DE LA

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

VOL. 4

1955

HERALDO J. BIANCHI
Ingeniero Químico

CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

JOSEFINA C. DE ARAGUNDE
Departamento de Genética e Inseminación Artificial (Facultad de Veterinaria);
Laboratorio H. Natural (Facultad de Química y Farmacia), Montevideo

RESUMEN

Se hace cultivo de tejido vegetal, tomando como material rodajas de Daucus Carota, que se siembra en tubos de ensayo, Erlenmeyer y cajas de Petri, utilizando técnicas y medios de cultivo aconsejados por Gautheret, con el propósito de hacer fisiología y genética vegetal con orientación bioquímica.

Dada la contaminación ambiental de nuestro medio partiendo de implementos y medios de cultivo esterilizados por autoclave las manipulaciones de siembra, repicados y cierre de los recipientes, se hace dentro de cámara provista de dos tubos estéril lamp. Westinghouse, habiéndose determinado que para su esterilización es suficiente la irradiación de ultravioleta durante 15 minutos.

Se hacen cinco series de cultivos que son repicados a los sesenta y nueve y ochenta y un día de siembra.

Macroscópicamente de siete a nueve días se observa el crecimiento de la zona de tejido cambial en brotes color blanquecino que pasan al verde por acción de la luz.

Se hace histología en cortes sin colorear, reacciones microquímicas y tinción con técnica Carmín-Verde iodo, modificada diluyendo al tercio la mezcla colorante y reduciendo a un minuto el tiempo de coloración.

Las observaciones revelan similitud morfológica y química del tejido neoformado con el originario y se superponen a la descripción citológica de Gautheret (6) 1938.

La diferenciación está representada por la anarquía del ordenamiento celular, que en algunos aspectos objetivamente modifica la representación química de sus constituyentes, aunque no afecta las etapas evolutivas del crecimiento tisular presentes en el tejido normal originario.

El cultivo de tejido es una técnica que permite el estudio citogético y bioquímico de la célula vegetal en función de factores modificables y significa un método de interés a desarrollar.

Como antecedente de la técnica White P. R. (10) 1954, en su libro cita a Haberlandt (1902) como precursor de la cultura de células de plantas in vitro, Kotte y Roblins en raíces 1923, Molliard 1923, en embriones y en una etapa moderna que sitúa desde 1934 a la fecha, se destacan las contribuciones de White sobre medios sintéticos de cultivo, estudios de tumores, raíces, etc., en más de treinta años de experimentación a travez de veintisiete trabajos personales y otros en colaboración.

Alexis Carrel (2) 1924, expresa que para estudiar simultáneamente estructuras, función y medio, es necesario técnicas que permiten el estudio de tejidos y órganos fuera del organismo.

Gautheret R. J. (3) 1942, expresa que la cultura de tejidos no es una finalidad sino un medio para estudiar la naturaleza de las células y permite precisar en que medida la diferenciación es compatible con la vida y multiplicación celular. Se debe a este investigador el perfeccionamiento de la técnica que permite cultivar parénquimas, o tejidos meristemáticos en forma indefinida, obteniendo con repicados importantes cantidades de tejidos neoformados. El mismo autor en numerosos trabajos (4, 5, 6, 7 y 8) determina orientaciones de la técnica con distintos materiales y finalidades.

Bonner J. (1) 1937, hace valiosos aportes al método, inclusive técnicas originales. En nuestro medio, en la bibliografía consultada no aparecen citas de trabajos sobre cultivos vegetales y no tenemos referencias que en laboratorios dedicados a estas disciplinas se realizan investigaciones. El cultivo de tejidos permite abordar todas las orientaciones del estudio vegetal, desde morfología a fitopatología; nues-

tro propósito al desarrollar el método ajustándonos a las técnicas de White y Gautheret es hacer estudio de fisiología vegetal con fundamento de bioquímica y encarar problemas de genética.

Al iniciar las primeras siembras con carácter experimental, los cultivos obtenidos se contaminan y llegamos a la comprobación que en nuestro medio es muy difícil, dada la pululación ambiental preferentemente por hongos, hacer cultivos con las técnicas descriptas por los autores citados.

Esta opinión la confirma el Dr. H. Trenchi, de que los ensayos de inoculación de virus en embriones de pollos, sufrían generalmente contaminación, de aplicarse las técnicas corrientes que en Estados Unidos de Norte América, daban buen resultado.

En esta primera etapa, desarrollamos el método con modificaciones que permiten realizar cultivos en nuestro medio.

Material y método.

En líneas generales seguimos el método de Gautheret, que describimos sintéticamente con las modificaciones realizadas:

Como material de siembra utilizamos tubérculos de Daucus Carota, sanos que se lavan con agua corriente y finalmente con agua hervida.

1) Eliminar fina capa externa.

2) Inmersión durante 30' en solución de hipoclorito de calcio al 6 %.

3) Lavado diez veces en agua destilada esterilizada para eliminar el hipoclorito.

4) Dentro de la cámara estéril, efectuar cortes en forma de rodajas de 8 milímetros de espesor, para cajas Petri y divididas en trozos para Erlenmeyer y tubos de ensayo.

5) Depositar trozos en la superficie de los medios de cultivo, figuras 1 y 2.

6) Cierre de los recipientes y cultivar en estufa entre 14 y 20 grados centigrados.

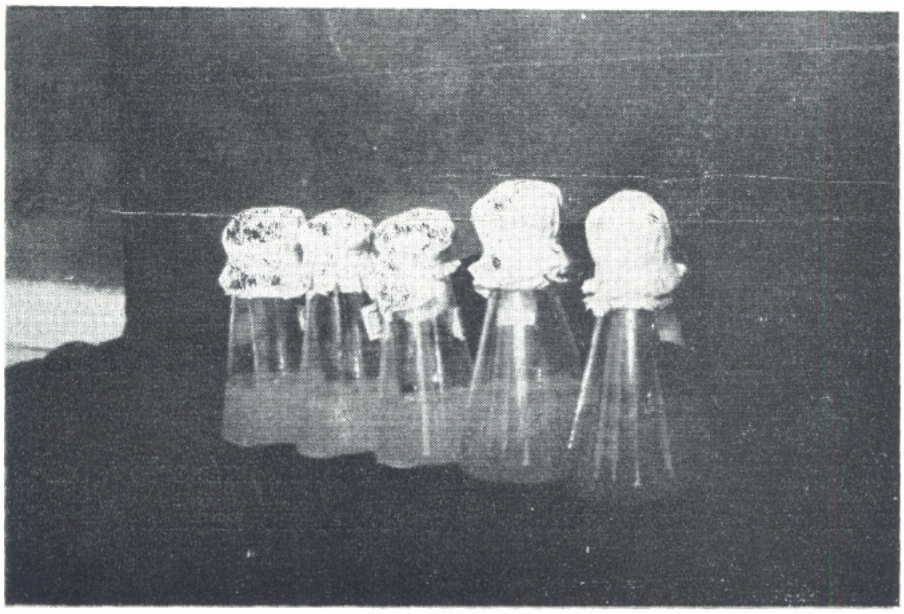

Fig. 1.

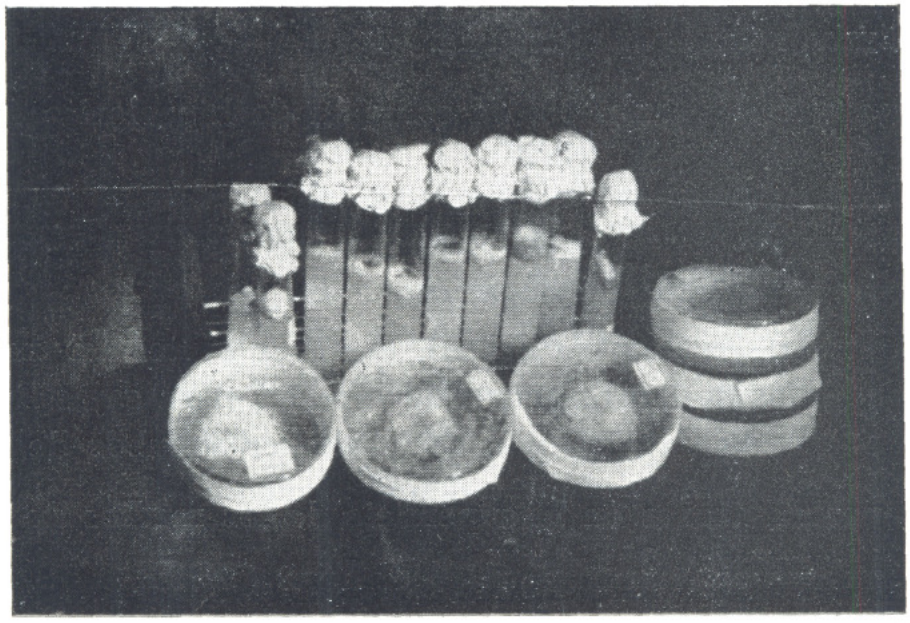

Fig. 2.

Los medios de cultivo empleados son los aconsejados por Gautheret:

Medio cultivo:

Solución Knop diluída al ½	1.000 c.c.
Gelosa	13 gr.
Sacarosa	30 gr.

Medio de cultivo para repicados:

Solución Knop sin hierro	1.000 c.c.
Solución Berthelot	10 gotas
Gelosa	13 gr.
Sacarosa	30 gr.
Cisteína	0,01
Aneurina clorhidrato	0,001
Acido Indol B. acético	0,0001

En las soluciones precedentes, se emplea agua destilada al Pirex y los medios de cultivo, vidriería y demás implementos son esterilizados al autoclave con las temperaturas y tiempos ligadas a sus características de impedir su alteración por el calor.

White emplea con éxito como lugar de siembra, cámara de cristal aconsejando su uso para trabajos que insumen mucho tiempo.

En la técnica de Gautheret, las operaciones se hacen en base a manipulación instrumental con precauciones de asepsia. Los métodos citados hacen difícil en nuestro medio obtener cultivos sin contaminación, lo que nos decide a realizar las operaciones de siembra y repicado dentro de cámara esterilizada por radiaciones ultravioletas.

La cámara empleada por nosotros (fig. 3) mide 1,30 × 0,50 y 0,60 centímetros de altura, está provista de dos tubos estéril lamp. Westinghouse W1-782-H30, que determina la esterilización a los 15 minutos de radiación. Para iluminación dispone de dos tubos de luz fluorescente de 40 watt, ubicados en la parte superior y otro frontal que impide la proyección de sombra sobre las manos del operador.

Las pruebas de tiempo necesarias para esterilizar la cámara, son obtenidas por exposición de material contaminado de B. Coli, durante 10', 15', 20' y 30' de exposición y los testigos correspondientes no irradiados que se siembran sobre gelosa inclinada son llevados a la estufa

a 37 grados centigrados durante 48 horas. De este control surge el tiempo de 15' de irradiación como suficiente para esterilización de la cámara.

Dado que todo el material debe de estar dentro de la cámara antes de iniciar la irradiación a efectos de impedir la oxidación por el ozono, el instrumental metálico se coloca en frasco que contiene alcohol otílico a 70 grados.

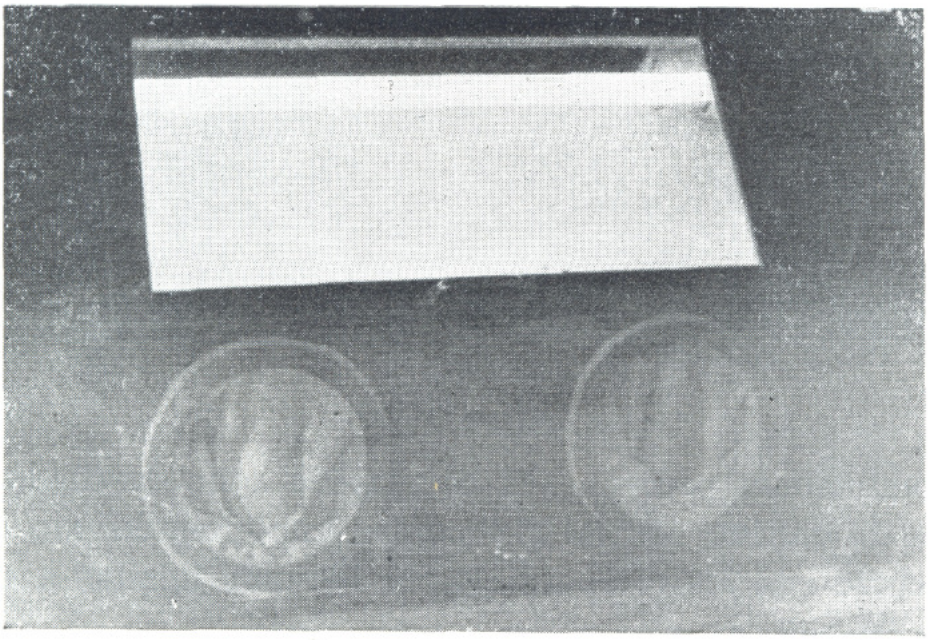

Fig. 3.

Operando en las condiciones descriptas, la infestación accidental de los cultivos no tiene entidad y aquellos que presentan contaminación (M. Prodigiosus, Niger, etc.), los utilizamos para estudio histológico.

Empleando la cámara estéril, se hacen cinco series:

1ª	serie:	27/4/54	(9	tubos	de	ensayo,	1	Erlenmeyer).				
2ª	"	6/5/54	(3	"	"	"	2	"	y	4	cajas	Petri).
3ª	"	14/5/54	(4	"	"	"	2	"	"	4	"	").
4ª	"	15/7/54	(2	"	"	"	2	"	).			
5ª	"	16/8/54	(2	"	"	"	2	"	).			

En la cuarta y quinta serie, el material se obtiene por el método descripto por White P. R. (10) 1954, empleando sacabocado que abarca

la región de tejido cambial del tubérculo y cortes en discos, empleando como medio de cultivo el aconsejado para repicado.

Las oscilaciones de la temperatura del laboratorio en el momento actual están comprendidas entre límites compatibles con el cultivo y por esta razón se colocan en bocales de vidrio sin emplear estufa.

Los cultivos de la primera serie fueron repicados por primera vez, a los setenta y nueve días en dos Erlenmeyer y dos tubos y a los ochenta y tres días en dos Erlenmeyer y dos tubos de ensayo.

Los cultivos originales aun cuando presentan la parte en contacto con el medio totalmente lignificada que describe Gautheret como causal que limita el crecimiento a partir de cierto tiempo y no por agotamiento del medio como podría suponerse, no acusan signos de alteración que hace dejarlos para ensayos microquímicos.

Se hace estudio histológico y reacciones microquímicas del tejido original y células cultivadas, haciéndose dos series de preparaciones.

Las tinciones empleadas son las corrientes en histología vegetal, empleando una modificación personal de la técnica clásica de Carmín y Verde iodo que describimos por considerarla de interés práctico.

Langerón M. (9) 1949, establece tinción con carmín alumbre de Grenacher durante una hora o menos y el tiempo siguiente de algunos segundos, con verde de iodo. Modificaciones posteriores actualmente de uso corriente indican como fórmula del colorante para 1000 c.c.:

Carmín de cochinilla Nº 40	40 gr.
Alumbre de potasio	60 "
Agua destilada	200 c.c.

Agregar:

Verde iodo	1 gr.
Acido fénico	10 "
H_2O destilada	1.000 c.c.

Con esta fórmula los tiempos aconsejados de tinción serían:

1º) Hipoclorito.
2º) Lavado en agua varias veces, completando con ácido acético, 10 minutos.
3º) Carmín verde iodo, 2 minutos.
4º) H_2O. Alcoholes y montaje.

La modificación propuesta consiste en reducir el tiempo de coloración y diluir el colorante (1 parte mezcla-colorante y 2 partes agua), cumpliendo los tiempos siguientes:

1º) Hipoclorito.
2º) Lavado con agua, 5 minutos.
3º) Solución acética (A. acético 1, agua 2) 5 minutos.

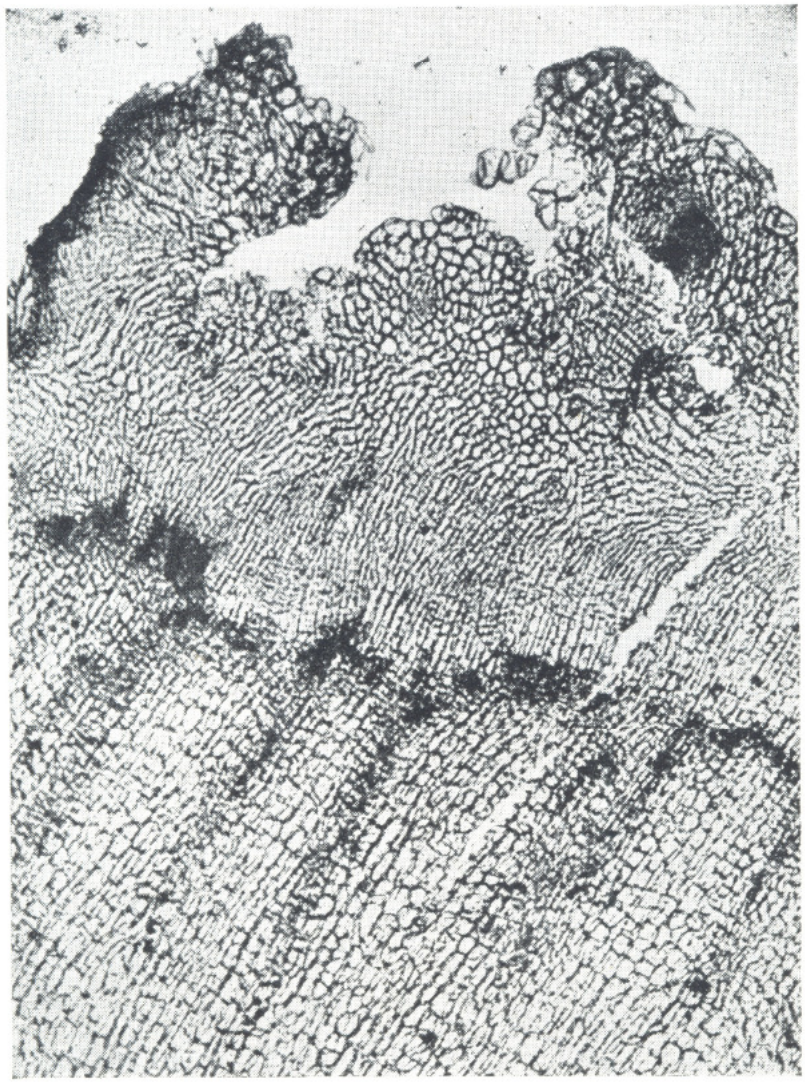

Fig. 4.

4º) Mezcla carmín verde iodo, 1 minuto.
5º) Deshidratación alcohol, diferenciación Xilol y montaje bálsamo.

Se obtienen cortes bien coloreados que permiten visión clara de los elementos.

Resultado.

La observación macroscópica de las rodajas de los 7 a 9 días, presenta evidente crecimiento de la zona de tejido cambial que se inicia presentando brotes, algunos de mayor volumen de color blanquecino que por exposición a la luz toman color verde claro.

El estudio histológico realizado en cortes transversales y longitudinales de tejido neoformado, permite comprobar las observaciones de

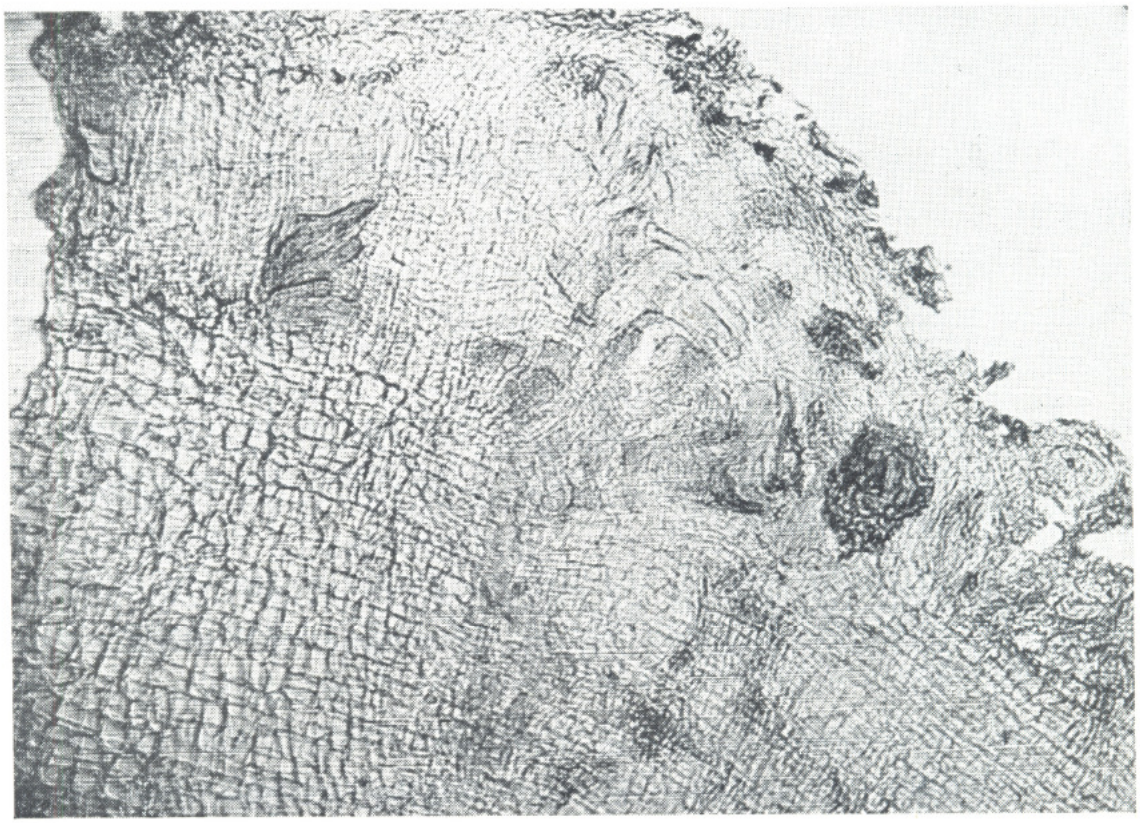

Fig. 5.

Gautheret R. J. (6) 1938. "Células parenquimáticas isodiamétricas, con cloroplastos esféricos o lenticulares, almidón y gotas de aceite; algunas células del parénquima presentan espesamientos de sus membranas celulósico-pécticas que se caracterizan por teñirse con Lugol en color violáceo y la tinción se extiende en forma irregular en el tejido de la pared lo que hace suponer la naturaleza amiloide" (fig. 4).

Se comprobó que los haces leñosos crecen en forma anárquica, proliferan afectando forma circular y tienen vasos que presentan la evolución normal a medida que crece. Se pueden observar vasos ani-

llados, espiralados y recticulados; estos últimos poseen mayor diámetro que longitud. En algunos cortes el conjunto de vasos forma núcleos lignificados sin interposición de fibras ni parénquima, pero las esculturas son exactamente iguales a las que aparecen en tejido normal (fig. 5).

En reacción histoquímica con floroglucina clorhídrica, la lignina presenta mismo color.

No se observa tejido conductor liberiano y comprobó formación de cristales de carotina en menor cantidad que en tejido normal, pero de mayor tamaño.

Conclusiones.

1) Se obtienen cultivos de tejido vegetal según técnicas descriptas empleando como material tubérculos de Daucus Carotta.

2) El empleo de cámara estéril por radiación ultravioleta hace posible desarrollar los cultivos en nuestro medio con riesgo mínimo de contaminación accidental.

3) La observación histológica es similar a la comprobada por otros investigadores y permite precisar las modificaciones morfológicas del tejido neoformado.

4) Se comprueba en el tejido neoformado que la anarquía de ordenamiento no afecta la constitución química revelada por las microreacciones similares a las del tejido normal de origen.

5) Recomendamos la modificación del método de tinción para el estudio histológico por considerar su empleo de realización más breve y mayor claridad de observación.

Abstract.

With the pourpose of doing vegetable genetic and phisiology with biochemical orientation, vegetable tissue is cultivated using as material small disks of Daucus Carota that are seeded in test tubes, Erlenmeyer flasks and Petri dishes in accordance with Gautheret's methods and tecniques. Taking in consideration the air pollution of the laboratory all seeding was done with sterilized material into a room previded of two Westinghouse sterilamp of W. L. 782 H-30. We determined that 15 minutes of irradiation with ultraviolet light was time enough for sterilization.

We prepared five series of cultures that were reseeded after sixtynine and eightyone days. After sevennine days it could be observed macroscopic call the growth of whitish buds in the change sone, that became green by action of light. Histological studies over cuts without staineng, microchemical reactions and staining with the modified technique of Carmin-green-Iodine (the stain is diluted to ⅓ and the staining time to one minute).

The microscopic observation shows morphological and chemical similarity of neo-formed tissue with the original one and superposed to the Gautheret's citological description (6) 1938.

The differenciation is represented by the anarchy of cells arrangement, that in some aspects modify objectively the chemical representation of its constituent, but do not affect the evolutif steps of tissular growth present in oroginarian normal tissue.

Conclusions.

1) With described techniques using as material tubercle of Daucus Carota, cultures of vegetable tissue are obtained.

2) The use of the steril room with ultraviolet radiation makes possible the growth of cultures in our laboratory with minimum of risks by accidental contamination.

3) The histological observation is similar to that described by other investigator and allows to precis the morphological modifications of the neo-formed tissue.

4) It has been preven that in the neo-formed tissue the arrangement anarchy do not affect the chemical constitution showed by micro-reactions, similar to the tissue of origin.

5) We recomend the modification of staining method for the histological study, because the shortest staining time and clearly observation.

Bibliografía

(1) **Bonner J. O.**; Vitamin B_1 a growth factor for higher plants. Sciences Revue Americaine 85-183-4-1937.

(2) **Carrel, Alexis**; Tisue culture and cell physiology (Physiol. Rev. 4-1-20-1924).

(3) **Gautheret R. J.**; Manuel Technique de culture des tissue végétaux Masson et Cía. 1942.

(4) **Gautheret R. J.**; Nouvelles Recherches sur la cultire du tissue cambial de Salix caprea. C. R. Acad. S. c. Paris. 206-125-1937.

(5) **Gautheret R. J.**; Sur le repiquaje des cultures de tissue cambial de Salix caprea. C. R. Acad. S. c. Paris. 206-125-1938.

(6) **Gautheret R. J.**; Caracteres cytológiques de tranches de tubercules de carotte cultivés in vitro. C. R. Soc. Biol. Paris, 127-609-1938.

(7) **Gautheret R. J.**; Sur la posibilité de realiser la culture indefiniédes tissue de tuberculés de carotte. C. R. Acad. S. c. Paris. 208-118-1939.

(8) **Gautheret R. J.**; Actión de l'acide indol-B. acétique sur les tissue de tubercules de carotte. C. R. Soc. Biol. Paris. 130-7-1939.

(9) **Langeron M.**; Précis Microscopie. 1949.

(10) **White Ph. R.**; The cultivation of animal and Plant Cells. Ronald Press Company New York. 1954.