

CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

JOSEFINA C. DE ARAGUNDE (1)

Trabajo realizado en el Laboratorio de Genética e Inseminación Artificial de la Facultad de Veterinaria.

El cultivo de tejido es una técnica que permite el estudio citogenético y bioquímico de la célula vegetal en función a 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 través 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 qué medida la diferenciación es compatible con la vida y multiplicación celular. Se debe a este investigador el perfeccionamiento de la técnica que permite cultivar parenquimas, 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 (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 realicen investigaciones.

(1) Prof. Agreg. Facultad Veterinaria. Ayte. Laboratorio H. Natural Facultad Química.

REPUBLICA ORIENTAL DEL URUGUAY

El cultivo de tejidos permite abordar todas las orientaciones del estudio vegetal, desde morfología a fitopatología; nuestro propósito es 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 contaminación ambiental preferentemente por hongos, hacer cultivos con las técnicas descritas por los autores citados.

Esta opinión la confirma el Dr. H. Trenchi, de que los ensayos de inoculación de virus en embriones de pollos, sufrirían 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 METODO

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.

- 1º) Eliminar fina capa externa.
- 2º) Inmersión durante 30' en solución de Hipoclorito de calcio al 6 %.
- 3º) Lavado diez veces en agua destilada esterilizada para eliminar el hipoclorito.
- 4º) 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.
- 5º) Depositar trozos en la superficie de los medios de cultivo, fotos Nº 1 y 2.
- 6º) Cierre de los recipientes y cultivar en estufa entre 14 y 20 grados centígrados.

Los medios de cultivo empleados son los aconsejados por Gautheret.

Medio Cultivo:

Solución Knop diluida a 1/2	1000 cc.
Gelosa	13 gr.
Sacarosa	30 gr.

Medio de Cultivo para repicados:

Solución Knop sin hierro	1000 cc.
" Berthelot	10 gotas
Gelosa	13 gs.
Sacarosa	30 gs.
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.

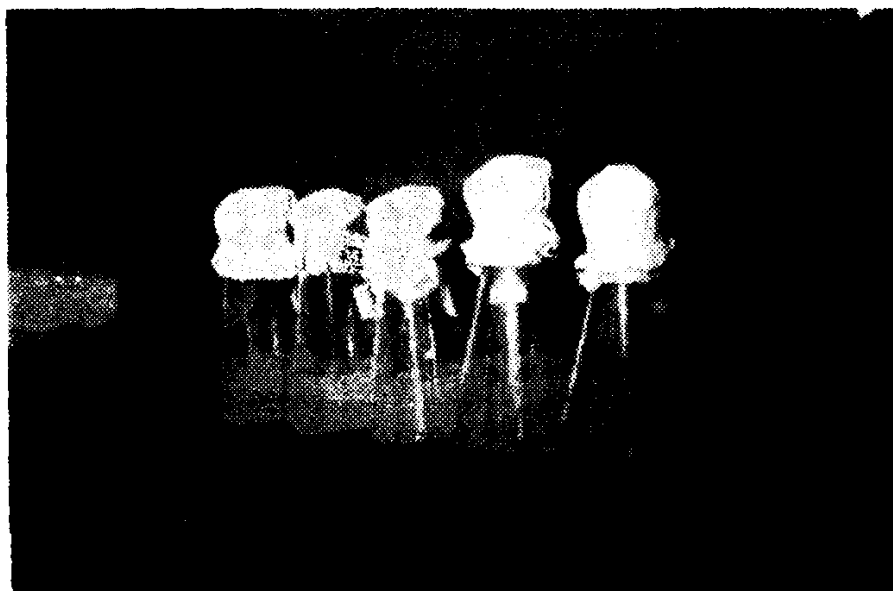


Foto Nº 1

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 nacen 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, (foto Nº 3) mide 1,30 x 0,50 y 0,60 cmts. de altura, está provista de dos tubos estéril lamp Westinghouse W1-782-H30, que determina la esterilización a los 15 minutos de radiación.

REPUBLICA ORIENTAL DEL URUGUAY

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

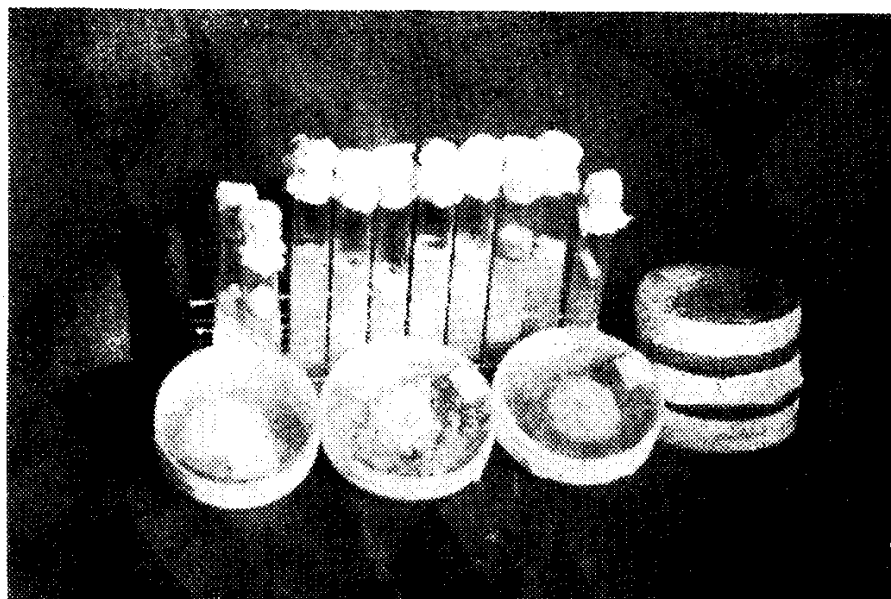


Foto N° 2

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

Operando en las condiciones descritas, 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:

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

ANALES DE LA FACULTAD DE VETERINARIA

En la 4ª y 5ª serie, el material se obtiene por el método descrito 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.

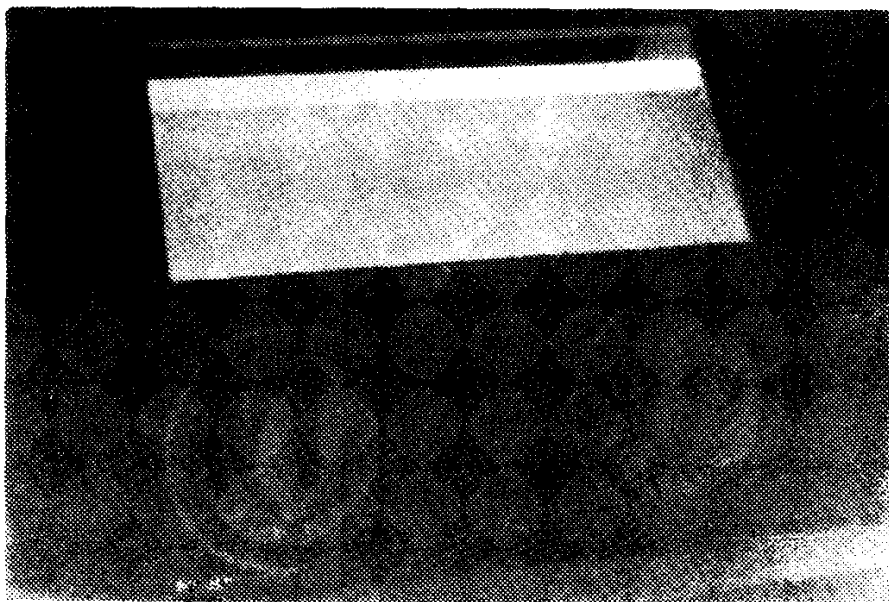


Foto Nº 3

Las exciaciones 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 aún 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 Carmin y Verde iodo que describimos por considerarla de interés práctico.

Langerón M. (9) 1949, establece tinción con carmin 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 cc:

REPUBLICA ORIENTAL DEL URUGUAY

Carmin de cochinilla N° 40	40 gr.
Alumbre de potasio	60 gr.
Agua destilada	200 cc.

Agregar:

Verde iodo	1 gr.
Acido fénico	10 gr.
H2O destilada	1000 cc.

Con esta fórmula los tiempos aconsejados de tinción serian:

- 1º) Hipoclorito.
- 2º) Lavado en agua varias veces, completando con Ac. Acético 10 minutos.
- 3º) Carmin verde iodo 2 minutos.
- 4º) H2O — Alcoholes y montaje.



Foto N° 4

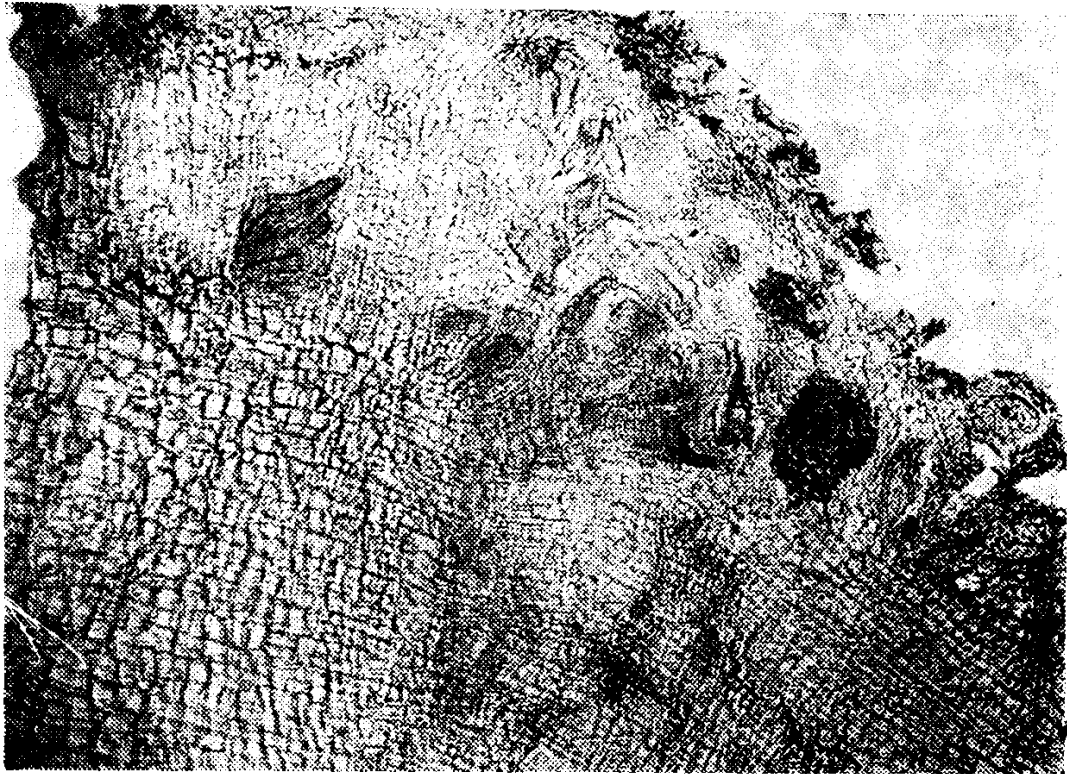


Foto N° 5

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 en agua cinco minutos.
- 3º) Solución Acética (A. Acético 1, agua 2) cinco minutos.
- 4º) Mezcla Carmín-Verde iodo, un 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 los 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 (Gautheret R. J. 1938 (6)). Células parenquimáticas isodiamétricas, con cloroplastos esféricos o lenticulares, almidón y gotas de aceite; algunas células del parenquima presentan espesamientos de sus membranas celulósico-pecticas que

es 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". — (Foto N° 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 anillados, espiralados y reticulados; 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. (Foto N° 5).

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

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

RESUMEN

Se hace cultivo de tejido vegetal, tomando como material rodajas de *Daucus Carota*, que se siembra en tubos de ensayos, 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 indo, 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, aún que no afecta las etapas evolutivas del crecimiento tisular presentes en el tejido normal originario.

CONCLUSIONES:

1º — Se obtienen cultivos de tejido vegetal según técnicas descritas empleando como material tubérculos de *Daucus Carota*.

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

3º — La observación histológica es similar a la comprobada por otros investigadores y permite precisar las modificaciones morfológicas del tejido neo-formado.

4º — Se comprueba en el tejido neo-formado que la anarquía de ordenamiento no afecta la constitución química revelada por las micro-reacciones similares a las del tejido normal de origen.

5º — 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 purpose of doing vegetable genetic and physiology 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 techniques. Taking in consideration the air pollution of the laboratory all seeding was done with sterilized material into a room provided 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 sixty-nine and eighty-one days. After seven-nine days it could be observed macroscopically the growth of whitish buds in the change sone, that became green by action of light. Histological studies over cuts without staining, microchemical reactions and staining with the modified technique of Carmin-green-Iodine (the stain is diluted to 1/3 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 biological description (6) 1938.

The differentiation 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 evolutive steps of tissular growth present in originarian normal tissue.

CONCLUSIONS

1º — With described techniques using as material tubercle of *Daucus carota*, cultures of vegetable tissue are obtained.

REPUBLICA ORIENTAL DEL URUGUAY

2° — The used 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 proven that in the neo-fermed 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 s.aining time and clearly observation.

RESUME:

On fait la culture d'un tissu végétal, en prenant comme matériel des tranches de *Daucus Carota*, qui se sèment dans des tubes d'essai, Erlenmeyer, boîtes de Petri, en employant des techniques et des milieux de culture conseillés par Gautheret, dans le but de faises Physiologie et genetique végétale avec ane orientation bio-chimique.

Pour éviter la contamination par l'air ambiant de notre milieu, nous employons des ustensils et des milieux de culture stérilisés par autoclave, les manipulations de la semence, repicages, et fermeture des récipients, se font au dedans d'une chambre qui a deux tubes steril-lamp Westighouse, ayant été déterminé que l'irradiation de rayons ultra-violets pendant 15 minutes suffisent pour sa stérilization.

On fait 5 series de cultures qui sont repiquées au bout de 69 et de 81 Jours de semailles.

Macroscopiquement des 7 à 9 jour on voit le développement de la partie du tissu cambial (change), dans des regets de couleur blanchâtre qui passent a la couleur vertepar l'action de la lumière.

On fait l'histologie dans des coupes sans colorer, dans des réactions microchimiques et coloration avec la technique Carmin-Verde Iodo, modifiée en diluant dans un troisième le mélange coloré et en réduisant à une minute le temps de coloration.

Les observations montrent une ressemblance morphologique et chimique du tissu nouveau formé avec l'originare, et elles se superposent a la description citologique de Gautheret (6) 1938.

La différenciation est représentée par l'anarchie cellulaire qui dans certains aspects objectifs modifie la représentation chimique de ses constituants qui qu'elle n'affecte pas les étapes évolutives du développement tissulaire présents dans le tissu normal originare.

CONCLUSION

1° — On obtient des cultures de tissu vegetal selon des techniques descriptes en employant comme materiel des tubercules de *Daucus Carota*.

2° — L'emploi d'une chambre stérile pour radiation (ultra-violeta), fait passible le développement des cultures dans notre moyen avec le minime risque de contamination par accident.

3° — L'observation histologique est semblable a celle prouvé par autres investigateurs et permet préciser les modifications morfologiques du tissu nouveau-formé.

4° — On vérifie dans le tissu nouveau-formé que l'anarchie d'ordre n'affecte pas la constitution chimique montré par les micro-réaction semblables a celles du tissu normal d'origine.

5° — Nous recommandons la modification du méthode de couleur pour l'étude histologique, pour considérer son emploi de réalisation plus braf et de majeur clarié d'absortion.

HAUPTINHALT:

Man kultiviert Pflanzel'gewebe, indem man sich mit Scheiben von *Daucus Carota* als Material behilft, die man in Erlenmayer-Probierröhrchen und Petridosen sät und dabei nach der von Gautheret zugeratenen Technik und Anbaumethode verfolgh. All dies mit der Absicht Physiologie und Pflanzgenetik mit Biochemischer Orientierung zu erzielen.

Unserer ambientalen Kontaminations wegen, behilft man sich von Anfang an mittels, im Autoklav sterilisierenten Kultiviermitteln un Geräten; also macht man die Saat, Verpflanzung und Verschluss der Gefsse in einer mit zwei Westinghouse-Sterilisierlampen versehenen Kammer, womit man feststellen konnte, dass es mit einer 15 minutigen Bestrahlung ultraviolettem Lichtes genügt eine richtige Keimbefreiung zu erhalten.

Man verfertigh fünf Kultievserien, die nach je neun und sechzig und ein und achzig Tagen nach der Saat wieder verpflanzt werden.

Vom siebenten bis zum neunten Tage an kann man schon makroskopisch das Wachstum in der Zone des Kambialzellgewebes durch weisse Sprösslinge feststellen, die dann durch die wirkung des Lichtes grün werden.

Man verfolgh nun Histologie in ungefärbten Schnitten, mikrochemische Reaktionen un Färbung mit der Technik Karmin-Iodo-Grün, die man verändert hat, indem man den Farbstoff auf das Dreifache verdünnt und die Färbungszeit auf eine Minute reduziert.

Die Beobachtungen offenbaren morfologische und chemische Ähnlichkeit des neuen und ursprünglichen Zellgewebes und gleichen der zitologischen Beschreibung von Gautheret (6) 1938.

Der Unterschied ist durch die Anarchie der zellulären Ordnung dar-

gestellt, die in einigen Erscheinungen die chemische Darstellung seiner Bildungen objektiv verändert, obwohl aber dies nicht die Evolutionsetappen des tissulren Wachstums affektiert, die in dem normalen Originalzellgewebe gegenwärtig sind.

FOLGERUNGEN:

1º — Man erhält Kultieve von Pflanzzellgeweben gemäss der beschriebenen Technik, indem man als Material Knollen des *Daucus Carota* verwendet.

2º — Die Anwendung sterilisierter Kammern mittels ultravioletter Bestrahlung ermöglicht den Anbau mit der mindesten Gefahr einer akzidentalen Infizierung in unserem Standort.

3º — Die histologische Anmerkung ist derjenigen von anderen Forschern festgestellten, gleich und erlaubt die morfologischen Veränderungen des neugebildeten Zellgewebes festzulegen.

4º — In dem neugebildetem Zellgewebe stellt man durch simillare Mikroreaktionen fest, dass die Anarchie der Ordnung nicht die chemische Anlage des normalen Originalzellgewebes beeinflusst.

5º — Wir empfehlen für das histologische Studium die Abänderung der Färbungsmethode, da wir diese anwendung von schnellerer Bewerkstellbarkeit und besserer Deuthichkeit der Beobachtung betrachten.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- 1) BONNER. — JO Vitamin B1 a growth factor for higher plants. *Sciences Revue Americaine* 85-183-4-1937.
- 2) CARREL, ALEXIS. — *Tissue 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 culture du tissue cambial de Salix caprea*. *C. R. Acad. S. c. Paris.* 206-125-1937.
- 5) GAUTHERET, R. J. — *Sur le repiquage des cultures de tissue cambial de Salix caprea*. *C. R. Acad. S. c. Paris.* 206-125-1938.
- 6) GAUTHERET, R. J. — *Caracteres cytologiques de tranches de tubercules de carotte cultivés in vitro*. *C. R. Soc. Biol. Paris.* 127-609-1938.
- 7) GAUTHERET, R. J. — *Sur la possibilité de realiser la culture indefinies 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 tuberculés 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 Nex York. 1954.