

## OBSERVACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS DEL CTV

### GENERAL

1. Grado de contaminación. Tipo de contaminación: % de explantos con contaminación visible.
2. Oxidación. Necrosis: % de explantos afectados
3. Desdiferenciación/callos: número de explantos que tienen desdiferenciación
4. Neoformación de órganos (brotes/raíces): número de explantos con brotes/raíces
5. Tiempos/períodos: cuando? Subcultivos
6. Observación con lupa/Análisis microscópico

### CULTIVO DE CALLOS

- Lugar del explanto donde comienza la formación de callo
- Apariencia: acuosa, compacto, seco, nodular, friable
- Color: blanco, amarillento, pardo, verde
- Tipos: morfogénico (embriogénico, organogénico), no morfogénico
- Tipos celulares (microscopio)
- Grado de diferenciación celular: elementos traqueales
- Tasa de crecimiento: Incremento de peso fresco, peso seco.
- Habitación

Friabilidad: tendencia de las células a separarse unas de otras, por lo que el callo se disgrega fácilmente (apariencia seca, compacto, coloración amarillo-blanquecina)

### SUSPENSIONES CELULARES

El crecimiento celular puede expresarse cualitativamente, pues conforme las células se multiplican se observa un aumento en la viscosidad del medio de cultivo.

También se expresa mediante determinación periódica de parámetros específicos de crecimiento como:

- Peso fresco y peso seco de células cultivadas
- El volumen del paquete de células (VPC). Es el volumen total ocupado por las células en una alícuota de cultivo
- El número de células por unidad de volumen, cuantificadas con ayuda de un hemocitómetro (cámara de conteo)
- Conductividad del medio
- Contenido de proteínas o ADN
- Vitalidad de las células: tinción con Diacetato de Fluorescencia (FDA)
- Determinación del índice mitótico (MI)
- Morfología de las células: agregados, células aisladas, tipos celulares (meristemáticas, parenquimáticas, gigantes)

## PROLIFERACIÓN DE BROTES

- ☛ Tipo de explanto. Reguladores de crecimiento. Condiciones de cultivo. Lugar del explanto y/o tejido de origen
- ☛ % de explantos que respondieron en cada medio de cultivo,
- ☛ promedio de brotes axilares por explanto,
- ☛ presencia de callo organogénico en la base de cada explanto;
- ☛ número de nudos por brote adventicio
- ☛ Determinación de la eficiencia del sistema:
  - ☛ número promedio de brotes por explanto
  - ☛ % de explantos que presentan brotes
    - ☛ CBF (Capacidad de Formación de brotes)

$CFB = \text{promedio de brotes por explanto} \times \% \text{ de explantos con brotes} / 100$

- ☛ Largo de brotes
- ☛ Grado de diferenciación de los brotes
- ☛ Fenotipo
- ☛ Vitrificación
- ☛ Nro. de brotes que forman plantas completas (conversión). % de supervivencia. fenotipo
- ☛ Análisis microscópico: organización tisular.
- ☛ TIEMPOS

## Enraizamiento

- ☛ % de enraizamiento
- ☛ tipo de raíz
- ☛ número y largo de raíces
- ☛ densidad
- ☛ tiempo de aparición de raíces
- ☛ análisis microscópico

## EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

- ☛ Estadio de desarrollo de los embriones (*dicotiledóneas*: globular, corazón, torpedo, cotiledonar; *monocotiledóneas*: globular, coleoptilar, escutelar)
- ☛ Cantidad de embriones por peso /explanto/superficie
- ☛ Microscopio: organización tisular, no conexión vacular con tejido madre, estructuras polares
- ☛ Marcadores moleculares del proceso de embriogénesis
- ☛ % de germinación
- ☛ % de conversión a planta completa
- ☛ Poliembrionía
- ☛ Embriogénesis cíclica
- ☛ Aberraciones
- ☛ TIEMPOS