

# Universidad de Guadalajara

---

FACULTAD DE AGRONOMIA



DISEÑO DE UN LABORATORIO PARA CULTIVO EN  
TEJIDOS VEGETALES IN VITRO

---

## TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
INGENIERO AGRONOMO

P R E S E N T A N

JOSE DE JESUS RAMIREZ MEDINA

---

INDALECIO RIVERA PLASCENCIA

---

GUADALAJARA, JALISCO 1991

---



**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**  
FACULTAD DE AGRONOMIA

Sección ESCOLARIDAD.....

Expediente .....

Número ...0170/91.....

19 de marzo de 1991

C. PROFESORES:

- Q.F.B. ANGEL PEREZ ZAMORA, DIRECTOR
- Q.F.B. SANDRA LUZ TOLEDO GONZALEZ, ASESOR
- M.C. SANTIAGO SANCHEZ-PRECIADO, ASESOR

Con toda atención me permito hacer de su conocimiento, que habiendo sido aprobado el Tema de Tesis:

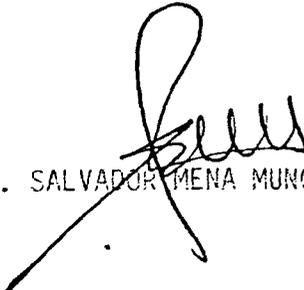
"DISEÑO DE UN LABORATORIO PARA CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES  
IN VITRO"

presentado por el (los) PASANTE (ES) JOSE DE JESUS RAMIREZ MEDINA e  
INDALECIO RIVERA PLASCENCIA

han sido ustedes designados Director y Asesores respectivamente para el desarrollo de la misma.

Ruego a ustedes se sirvan hacer del conocimiento de esta Dirección su Dictamen en la revisión de la mencionada Tesis. Entre tanto me es grato reiterarles las seguridades de mi atenta y distinguida consideración.

A T E N T A M E N T E  
"PIENSA Y TRABAJA"  
EL SECRETARIO

  
ING. SALVADOR MENA MUNGUÍA

srd'

mam

Al contestar este oficio cítese fecha y número



**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**  
FACULTAD DE AGRONOMIA

Sección ESCOLARIDAD.....

Expediente .....

Número ..0170/91.....

19 de marzo de 1991

ING. JOSE ANTONIO SANDOVAL MADRIGAL  
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE AGRONOMIA  
DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA  
PRESENTE

Habiendo sido revisada la Tesis del (los) Pasante (es)  
JOSE DE JESUS RAMIREZ MEDINA e INDALECIO RIVERA PLASCENCIA

titulada:

"DISEÑO DE UN LABORATORIO PARA CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES  
IN VITRO"

Damos nuestra Aprobación para la Impresión de la misma.

DIRECTOR

Q.F.B. ANGEL PEREZ ZAMORA

ASESOR

Q.F.B. SANDRA LUZ TOLEDO GONZALEZ

ASESOR

M.C. SANTIAGO SANCHEZ PRECIADO

srd'

mam

Al contestar este oficio citese fecha y número

## A G R A D E C I M I E N T O S

Cuando una pareja de jovenes encara el compromiso y responsabilidad de educar y guiar a una familia sin tener siquiera los primeros niveles de enseñanza, contando tan solo con su tenacidad y perseverancia, para mi es un gran orgullo hablar de esa pareja de jovenes que hace muchos años encararon la responsabilidad orientando y fortaleciendo mi superación aun a costa de su salud y descanso, un sencillo agradecimiento pero un gran y sincero apoyo para ellos, por que asi como ellos estuvieron siempre para darme apoyo, yo estare siempre para apoyarlos.

Mi respeto y admiración para ellos que ahora son grandes de edad pero jovenes de espiritu. Una sincera gratitud a mis padres.

## A G R A D E C I M I E N T O

Para mis maestros ( Que son mis mejores Amigos ):

Son hombres y Mujeres que han trabajado solos y que en algun momento han sentido en derredor un tiempo de soledad. Y en su esperanza y desesperación, confiando en su voluntad inmovible, por lo que entoces triunfaran.

Solo asi ellos han ganado el goce secreto y aislado del pensador, que sabe que. Mucho despues de que él esté olvidado, alumnos y alumnas que ni siquiera han oido su nombre, Avanzaran al ritmo de -- sus Pensamientos. Gracias por todo su tiempo, energia y paciencia.

BIBLIOTECA ESCUELA DE AGRICULTURA

Fresten atención a los benditos lugares, que se denominan con la palabra laboratorio, de tantos significados. Son los templos del futuro, del bienestar y del desarrollo. Aquí es donde la humanidad se hará mayor, mas fuerte, mejor. Aquí se aprende a leer en las obras de la naturaleza, obras del avance verdadero y de la amplia armonía, mientras que sus obras propias sólo son demasiado a menudo obras de la barbarie, del fanatismo y de la destrucción.

L. PASTEUR

1.- INTRODUCCION.....	07
1.1.- Justificación e importancia.....	08
1.2.- Objetivos.....	09
1.2.1.- Objetivos generales.....	09
1.2.2.- Objetivos específicos.....	09
2.- ANTECEDENTES.....	10
3.- CONSIDERACIONES GENERALES QUE DEBEN TOMARSE EN CUENTA AL PROYECTARSE LA PLANEACION DE UNA AREA ADECUADA PARA EL CUL- TIVO DE TEJIDOS VEGETALES IN VITRO .....	23
3.1.- Distribución y características de las principales salas de un laboratorio de cultivo de tejidos vegeta-- les in vitro .....	24
3.1.1.- Sala de lavado.....	26
3.1.2.- Sala de preparación de medios.....	26
3.1.3.- Sala de siembra y disección.....	28
3.1.4.- Sala de incubación.....	30
3.2.- Control de aire en el laboratorio.....	32
3.2.1.- Aspectos generales.....	32
3.2.2.- Flujo laminar.....	33
3.2.3.- Importancia de las unidades de flujo laminar...	33
3.2.4.- Filtración del aire.....	35
3.2.5.- Mecanismos de acción y eficiencia.....	36
3.2.6.- Características de las unidades de flujo laminar	37
3.3.- Clasificación de los niveles de riesgo al trabajar con microorganismos.....	39
3.3.1.- Medidas de seguridad.....	40
3.4.- Características de las instalaciones de un laboratorio de cultivo de tejidos vegetales in vitro.....	41
3.4.1.- Sala de siembra y de incubación.....	42
3.4.2.- Sala de lavado y preparación de medios.....	43

	Pag.
4.- PROYECTO DE DISEÑO.....	45
4.1.- Ubicación del lugar propuesto para el diseño de una área estéril para el cultivo de tejidos vegetales in vitro.....	47
4.2.- Condiciones actuales.....	48
4.3.- Área propuesta.....	50
5.- GUIA ARQUITECTONICA.....	53
5.1.- Proposición para el proyecto.....	54
5.2.- Características del área propuesta.....	55
5.2.1.- Ingreso al área.....	55
5.2.2.- Antecuarto.....	57
5.2.3.- Sala de incubación.....	61
5.2.4.- Sala de siembra y disección.....	69
5.2.5.- Instalaciones eléctricas generales en las salas.....	71
5.3.- Unidad de flujo laminar.....	77
5.3.1.- Descripción de las características del material para la construcción de una unidad de flujo laminar....	77
5.4.- Alternativas de proyecto.....	83
6.- PRESUPUESTOS.....	86
6.1.- Obra negra.....	87
6.2.- Instalaciones eléctricas.....	89
6.3.- Aire acondicionado.....	93
6.4.- Estantería.....	96
6.5.- Mobiliario.....	99
7.- BIBLIOGRAFIA.....	106
8.- APENDICE.....	100

## INDICE DE CUADROS

	Pag.
1.- CRISTALERIA.....	101
2.- INSTRUMENTAL.....	101
3.- EQUIPO Y APARATOS.....	102
4.- REACTIVOS.....	103
5.- MATERIAL NECESARIO PARA INVERNADERO.....	104

## INDICE DE FIGURAS

Nº		Pag.
01.-	Plano en planta de un laboratorio de cultivo de tejidos vegetales.....	25
02.-	Vista de los interiores de una sala de siembra y disección (en isométrico).....	29
03.-	Anaquele para sala de incubación.....	30
04.-	Esquema que muestra las características de la iluminación durante la incubación.....	31
05.-	Esquema que muestra en un corte isométrico las características de un filtro absoluto.....	35
06.-	Vista en isométrico del exterior de una unidad de flujo laminar.....	37
07.-	Plano general de los principales edificios de la Facultad de Agronomía donde posiblemente quedará ubicado el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales.....	47
08.-	Plano en planta de las condiciones actuales del área propuesta.....	49
09.-	Plano en planta que muestra las dimensiones y distribución para el área estéril.....	51
10.-	Plano del diseño propuesto con características de ubicación del mobiliario y capacidad del mismo.....	52

	Pag.
11.- Plano del diseño, características del acceso y la división de sus funciones.....	54
12.- Puerta de ingreso.....	55
13.- Vista interior y exterior de un antecuarto.....	57
14.- Diseño de una banca plegable.....	58
15.- Segunda puerta de acceso al laboratorio de cultivo in vitro	59
16.- Características del antecuarto.....	60
17.- Vista interior de la superficie de la sala de incubación...	62
18.- Vista en isométrico de la estantería en la sala de incubación.....	63
19.- Plano en planta que nos señala la ubicación y distribución de la sala de incubación.....	64
20.- Vista interior en isométrico de la división de la sala de incubación.....	62
21.- Vista interior en isométrico con las medidas de la sala de incubación.....	68
22.- Vista interior en isométrico de la posición del mobiliario dentro de la sala de incubación.....	69
23.- Plano del sistema de iluminación general.....	72
24.- Diagrama eléctrico del sistema de iluminación general.....	73
25.- Ubicación de tomas de electricidad y gas.....	74
26.- Plano del sistema de iluminación para la estantería en la sala de incubación.....	75
27.- Diagrama eléctrico del primer nivel en estanterías.....	76
28.- Dibujo en despliegue de todas las partes del diseño de una unidad de flujo laminar.....	79
29.- Despliegue del sistema eléctrico e iluminación de una unidad de flujo laminar.....	80

30.- Vista en perspectiva del frente de la estructura de una unidad de flujo laminar.....	81
31.- Vistas con medidas de todas las partes de la estructura de la unidad de flujo laminar.....	82
32.- Plano en planta de la segunda alternativa del proyecto.....	84
33.- Plano en planta de la tercera alternativa del proyecto.....	85

# INTRODUCCION

El cultivo de tejidos vegetales in vitro es un método artificial para la regeneración y propagación asexual de especies vegetales por medio del cultivo de órganos y de sus tejidos, que hoy se le puede considerar como una ciencia pura; se refiere a la estimulación del crecimiento celular en medios especiales de cultivo.

En el área científica, el cultivo de tejidos vegetales ha iniciado una nueva era en la genética moderna. La hibridación somática de distintas variedades o incluso especies, permitirá crear nuevos tipos de plantas capaces de fijar más nitrógeno y carbono atmosférico y con esto romper barreras de rendimiento. También, permitirá producir especies en grandes cantidades que son capaces de sintetizar fármacos, hormonas y productos de uso industrial de alto valor comercial.

Los programas de mejoramiento genético para producir cultivares resistentes a plagas y enfermedades, así como variedades de cultivos más resistentes a la sequía ya la salinidad, podrán llevarse a cabo con mucho más rapidez utilizando esta técnica.

#### 1.1 Justificación e Importancia

hace apenas unos años, la propagación in vitro de especies vegetales era considerada por muchos como un tema de ciencia ficción.

Hoy en día, la industria de producción de flores de ornato y la fruticultura mexicana importan de Estados Unidos material vegetativo de alta calidad genética y fitosanitaria, con un valor de cientos de millones de dólares al año.

El futuro de la micropropagación es sumamente promisorio; la producción en gran volumen de material libre de virus, de gran vigor y homogeneidad genética, ha permitido no sólo incrementar la

productividad de numerosos cultivos hortícolas sino también la calidad de muchas flores de ornato de gran valor estético y comercial, sin olvidar la prioridad que tienen los alimentos en un País en vías de desarrollo como México.

Todo lo anterior se puede lograr contando con: 1.- Las instalaciones apropiadas y 2.- La capacitación técnica profesional adecuada. En cuanto a lo primero se centrará el tema de éste trabajo; ya que la Facultad de Agronomía no cuenta con tales instalaciones, se ha optado por diseñar una área que cumpla con los requisitos básicos para el cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, tratando de que sea lo más económicamente viable.

Al concretarse lo diseñado, se contará con una área que podrá generar tecnología e información más rápida que con los métodos tradicionales podrá compartirse dentro y fuera de la facultad. Además, con este documento se ahorraran pagos a arquitectos, ingenieros y a otras personas involucrados en este diseño.

#### 1.2 Objetivos generales

- 1.- Presentar los criterios más importantes para el establecimiento y función de una área estéril, como primera etapa para el inicio de la construcción de un laboratorio de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*.
- 2.- Sentar las bases para desarrollar esta rama de la biotecnología en la Facultad de Agronomía

##### 1.2.1 Objetivos específicos

- 1.- Contar con una área apropiada para la reproducción *in vitro*.
- 2.- Interrelacionar con los educandos de la facultad con materias afines.
- 3.- Introducir a la Facultad de Agronomía a las técnicas de la biotecnología

ANTECEDENTES

Desde 1860 aproximadamente, las investigaciones de fisiología vegetal han utilizado la técnica de cultivo de tejidos vegetales, que consiste en cultivar en medios nutritivos adecuados y en forma aséptica, ápices de raíz y de tallo, primordios de hoja, primordios o partes inmaduras de flores, frutos inmaduros, órganos aislados, embriones maduros o inmaduros, segmentos de órgano de tallo y hoja, algunas veces ovarios, óvulos, anteras y polen.

Los primeros intentos en esta técnica fueron realizados por Sacks (1860) y Knops (1861). Esta y demás citas de antecedentes mencionadas por Hurtado M. Daniel V. y Merino M. María Eugenia (1987), quienes observaron que los principales nutrientes de las plantas superiores eran sustancias orgánicas. Más tarde, al publicar otro de sus trabajos señalan que los cultivos posteriores deben de encauzarse hacia el estudio de las condiciones bajo las cuales las células aisladas (sufren) división, proporcionando información sobre las interrelaciones e influencia correlativa de las células e introduciendo el concepto de "totipotencialidad celular", pues decía que si las células vegetales son totipotentes sería posible modificar su ambiente y nutrición después de aislarlas para recapitular la secuencia del desarrollo que se presenta en las plantas intactas; es decir, que si existe tal propiedad esta podría ser explotada.

En 1922, Haberlandt y Kotte cultivaron ápices radicales de chícharo y maíz en un medio enriquecido con sales orgánicas, glucosa, peptona, asparagina y varios aminoácidos, partiendo de la idea de

obtener condiciones alimenticias semejantes a los tubos del floema.

Con la misma idea, Robbins (1922) enriquece el medio de cultivo con glucosa, agar y sales orgánicas para el cultivo de ápice radicular de varias especies.

Los progresos logrados en los treinta años siguientes a los experimentos de Haberlandt fueron muy pocos, pues varios investigadores reportaron trabajos desafortunados en un cultivo de células aisladas (Schwucker, 1929; Scheutterer, 1931; Pfeiffer, 1931; La Rue, 1933; Kotte, 1922 finales del mismo año).

Sin embargo, el trabajo pionero fue el de White (1934) con cultivo de ápices de raíz de tomate Lycopersicum esculentum en un medio líquido conteniendo sales orgánicas, extracto de levaduras y sacarosa, en donde obtuvo un crecimiento activo. Posteriormente demostró que el extracto de levadura se podía sustituir por tres vitaminas del grupo B: tiamina, piridoxina y niacina.

Robbins (1936) estudió el efecto de los microelementos inorgánicos y señaló que el zinc, el manganeso y el boro son necesarios para el cultivo de ápices radicales. White (1937) descubre la importancia de la vitamina B para el crecimiento de las raíces, importancia que comparten con las auxinas: ácido indolacético (AIA), recientemente descubierta por Went y Thimann (1937). En el mismo año Gautheret estudia el efecto de los factores ambientales del desarrollo vegetal en sus medios de cultivo.

Caplin y Steward (1948) dieron a conocer el efecto tan pronunciado que ejerció el agua de coco en las células aisladas de raíz de zanahoria, donde observaron crecimiento de células diferenciadas. Años más tarde, usando el agua de coco en combinación con el ácido Diclorofenoxiacético (2,4-D), se promueve la división celular en especies cuyo desarrollo fue muy difícil. Los efectos del agua de coco condujeron a la identificación de otra clase de hormonas vegetales (las citocininas).

Morel y Martin (1952) son los primeros investigadores que lograron obtener plantas libres de virus en dalia a partir de meristemas apicales de tallo. Muir, Hildebrant y Riker (1954) transfieren segmentos de tejido de callo a medio líquido en agitación y tienen éxito al obtener cultivos en suspensión conteniendo células aisladas y pequeños terrones o agrupaciones celulares.

Skoog (1955) identifica la 6-furfurilaminopurina (cinetina) observando la tapacidad de este regulador del crecimiento vegetal para iniciar la división celular. Incluyendo citocininas en los medios de cultivo se hizo posible la proliferación de células y la formación de callos de un gran número de especies vegetales, induciendo, además, la formación de estructuras organizadas de algunas de esas especies. Skoog y Miller (1957), usando combinaciones de auxinas y cinetina, controlaron más detalladamente la formación de brotes y raíces en cultivos de callos de tabaco. Por tanto, es posible inducir la formación de raíces disminuyendo el porcentaje de cinetina en relación con la auxina, mientras que

invirtiéndolo se induce la formación de yemas que se desarrollan más tarde como brotes.

Murashige y Skoog (1962) desarrollaron un medio nutritivo con el que lograron un crecimiento rápido en tejidos de tabaco. En la actualidad, las sales orgánicas de ese medio de cultivo se usan con bastante éxito en casi todas las especies.

Los trabajos progresaron lentamente hasta 1963, cuando White organizó el primer Congreso Internacional de cultivo de tejidos en la Universidad de el estado de Pensylvania, Estados Unidos de Norteamérica.

En este congreso, investigadores en ésta nueva área de las ciencias presentaron trabajos, cuadros completos con discusiones informales y problemas definidos para ser resueltos empleando las investigaciones en cultivo de tejidos.

Las primeras plantas haploides se obtuvieron en cultivo de anteras de Datura innoxia por Guha y Maheshwari (1966), y un año más tarde Bourgin y Nitsch reportaron la producción de plantas haploides de Nicotiana tabacum y Nicotiana sylvestris.

Power y Cocking (1970) reportaron la formación de hebras finas o papilas con un aparente desarrollo en la superficie del protoplasto después de exponerlo a los efectos del nitrato de sodio por una hora. Concluyeron que el sodio es responsable de éstas formaciones que

facilitan la fusión, pues el ion nitrato, como nitrato de potasio no la provoca.

Zentler y Guzowska (1970) cultivaron gametofitos femeninos de *Taxus baccata*, los cuales indujeron a la formación de callosidades utilizando el medio de White modificado, suplementado con 2% de sacarosa, 0.8% de agar, 500 ppm. de caseína hidrolizada y 5 ppm. de 2,4-D. observando que sólo del 2 al 5% de los gametofitos produjeron callos. De las observaciones concluyeron que los callos obtenidos fueron uninucleados a diferencia de los gametofitos, que eran multinucleados; además, que las células jóvenes de la periferia contenían cloroplastos.

En el año de 1971 se llevaron a cabo estudios de diferenciación, producción de metabolitos secundarios, obtención de haploides a partir de cultivo de anteras, estudios genéticos, citológicos y embriogénicos.

Takebe, Labid y Melchers (1971) realizaron aislamientos de protoplastos del mesófilo de las hojas de tabaco en un medio semisólido con 0.6% de agar; además, demostraron que los protoplastos de tabaco pueden cultivarse en placas de agar, con las técnicas de Bergman, e inducir la formación de callosidades que posteriormente regeneraran en plántulas.

En el año de 1972 aparecen los primeros reportes del establecimiento de un híbrido somático en plantas superiores. La mayoría de los trabajos publicados se refieren al aislamiento y cultivo de protoplastos, síntesis de metabolitos secundarios y la utilización de los cultivos nodriza.

Carlson, Smith y Dearing (1972), utilizando el método de Nagata y Takebe (1970), lograron obtener un híbrido entre las especies de *Nicotiana langsdorfi* y *Nicotiana glauca*, mediante la utilización de protoplastos aislados del mesófilo de las hojas: éstas especies presentan diferente compatibilidad sexual.

En el año de 1973 se reportaron trabajos de obtención de haploides, formación de alcaloides en cultivo de células en suspensión, síntesis de metabolitos secundarios, diferenciación, morfogénesis, mutagénesis y fitomejoramiento.

Tuesink (1973) trabajó con un protoplasto de avena (*Avena sativa*). Utilizó manitol diluido en agua destilada como estabilizador osmótico hasta que los protoplastos reventaron y la membrana plasmática se desintegró en pequeñas partículas; también empleó la sacarosa como estabilizador osmótico. Las membranas formaron interconexiones que provocaron estallidos pero con una mezcla de cloruros de calcio y de potasio las membranas se rompieron pero no se desintegraron. Con ello se esperaba que los cambios en las propiedades de la membrana plasmática se reflejaran en el medio y en los experimentos posteriores al aislamiento de los protoplastos.

Street (1973) sugiere que las técnicas de selección de mutantes pueden promover mucha información para estudios de diferenciación celular y para explotar los potenciales biosintéticos de las células cultivadas con técnicas que reproduzcan los factores que controlaron la diferenciación de las plantas.

Durante el año de 1974 los estudios que se realizaron fueron sobre citología, fusión de protoplastos, producción de metabolitos secundarios, fitomejoramiento, propagación y mutagénesis.

Uchimiya y Murashige (1974) reportaron que las células que se mantuvieron en cultivo por 14 días fueron más apropiadas para el aislamiento de protoplastos. Estudiaron la influencia de la concentración enzimática en protoplastos libres y descubrieron que con un 1% de celulasa R10 y 0.2% de macerozima R10 se obtienen buenos resultados para el aislamiento.

Melchers y Labid en (1974) aislaron protoplastos del mesófilo de dos haploides clorofilo deficientes, sensibles a la luz, de variedades de Nicotiana tabacum; expusieron la población a un medio con pH alto, en presencia de iones de calcio para inducir la fusión; la placa de protoplastos fue colocada en un medio nutritivo, incubándolos en presencia de luz. Después de dos meses de desarrollo, una colonia verde regeneró plántulas, que normalmente fueron verdes. El análisis de la F2 reveló la segregación de los tipos mutantes, con los cuales se estableció claramente que las plantas fueron el resultado de la fusión de células somáticas.

Nakamura y colaboradores (1974), mediante cultivo de haploides, redujeron el desarrollo de nuevas variedades de tabaco de 6 a 2 años.

Murashige, Serpa y Jones (1974), por medio del uso de yemas apicales como inóculos iniciales, idearon un método para la multiplicación masiva de Gerbera jamesoni.

En el año de 1975 se realizaron estudios de organogénesis, fitopatología, dimorfismo sexual, aislamiento y cultivo de protoplastos y producción de metabolitos secundarios utilizando las técnicas de cultivo de células vegetales.

Marton y Maliga (1975), demostraron que la resistencia adquirida mediante la utilización de la técnica de cultivo *in vitro* no persiste en la regeneración de las plantas, porque está controlada por un factor Mendeliano simple.

Dix y Street (1975) aislaron líneas con tolerancia persistente a sales de cultivo en Nicotiana sylvestris y Capsicum annum.

Stephens y Wood (1975), utilizaron el cultivo de protoplastos en la investigación de la muerte de células vegetales asociada con la pudrición blanda provocada por Erwinia carotovora; ellos separaron los efectos de las proteasas y fosfatasas producidas por el patógeno, las cuales actúan directamente en protoplastos ocasionando la muerte celular.

Durante el año de 1976 se llevaron a cabo diversos trabajos relacionados con el aislamiento y cultivo de protoplastos, análisis de la estructura del polen en el cultivo de anteras, fitomejoramiento, embriogénesis, mutagénesis, estudios citológicos y producción de metabolitos secundarios.

Seibert (1976), menciona que los beneficios potenciales del uso de cultivo de yemas apicales se han demostrado eficazmente en la conservación criogénica de germoplasma.

Dunwell (1976) realizó un estudio comparativo en el medio ambiente con la inducción y desarrollo de embriones en cultivo de anteras de *Nicotiana tabacum*.

El año de 1977 fue muy productivo, pues se realizaron gran cantidad de trabajos sobre diversos temas, los cuales enfocan la aplicación de cultivo de células en estudios genéticos, morfogénéticos, y organogénéticos fundamentalmente; en éste año se publicaron gran número de artículos sobre hibridación somática mediante el uso de aislamiento y cultivo de protoplastos, obtención de haploides, cultivo y aislamiento de microesporas, estudios de polinización y fertilización in vitro, estudios fitopatológicos y producción de metabolitos secundarios.

En el año de 1978 se utilizó la técnica de cultivo de tejidos para la obtención de híbridos interespecíficos, la regeneración de protoplastos, cultivo de embriones, aspectos de fitomejoramiento, propagación masiva de algunas especies, estudios morfogénéticos, citogénéticos, mutagénicos y embriogénicos.

Barlass y Skene (1978), descubrieron un método para la propagación in vitro de vid a partir de la fragmentación de yemas apicales, las cuales tuvieron un rendimiento de aproximadamente 8,000 plantas por yema a los cuatro meses. Las células apicales crecieron en un medio de cultivo líquido con citocininas en ausencia de auxinas. Las células diferenciadas se transfirieron a un medio sólido, las masas de yemas se transplantaron repetidamente en subcultivos, el enraizamiento se efectuó en un medio básico sin hormonas y después se transplantaron en el suelo y se adaptaron a las

condiciones de invernadero.

Bajaj (1979), menciona que los métodos criogénicos ayudan a preservar las líneas clonales de plantas propagadas vegetativamente en un periodo de tiempo largo. La conservación excelente de germoplasma ayuda al almacenamiento de polen de alta longevidad, manteniendo líneas libres de patógenos y ayudando al intercambio Internacional de germoplasma.

Knauss y Knauss (1979), sugirieron que uno de los problemas de mayor consecuencia en el cultivo de tejidos vegetales es la contaminación bacteriana que se presenta en las etapas de multiplicación y/o enraizamiento. Frecuentemente, la desinfección previa es insatisfactoria, por lo que opinan que el preacondicionamiento del inóculo en un ambiente frío y seco es útil para resolver el problema de la contaminación; además mencionan que no es conveniente el uso de la gentamicina en cultivo de células vegetales.

Dougal y Whitten (1980) almacenaron cultivos de zanahoria Daucus carota L. a menos 140 °C, observando que después de colocarlos en condiciones ambientales adecuadas producen la misma cantidad de antocianinas que los cultivos no almacenados. Esta fue la primera demostración de que los cultivos de tejidos vegetales retienen la capacidad de producir químicos específicos después de un almacenamiento criogénico.

Raghavan (1981), menciona que en los granos inoculados de polen del cultivo de segmentos de anteras de Hyoscyamus niger, el

desarrollo gametofítico y embriogénico normal se debe a la activación de la transcripción y a un tipo de información del ARN.

Kuthey y colaboradores (1981), a partir del cultivo de tejidos de las líneas celulares de Catharanthus roseus, llevaron a cabo la producción de los alcaloides Yohimbina, isositisirikina, horhammerinina, vidolinina, etc.

Lakshmi, Vaidyanathan y Ramakrishnan (1982), hablan de la aplicación del cultivo de tejidos vegetales en el mejoramiento de árboles (árbol de la India), en el que indujeron embriogénesis somática de cultivo de callos obteniendo de 20 a 25 yemas por tubo; posteriormente se indujo a la formación de embriones de los cuales se desarrollaron plantas bien establecidas que se plantaron en una área forestal.

Myerson y Krul (1982), realizaron el cultivo de raíces de Gynura aurantiaca (azul). Las plantas regeneradas de los callos tuvieron diferente desarrollo y fueron morfológicamente distintas de las plantas madre. Las plantas derivadas del cultivo de tejidos fueron más largas, más uniformes en crecimiento y tiempo de floración, tuvieron más flores por planta, fueron más dominantes apicalmente y manifestaron diferente disposición de hojas. Todos estos cambios los retuvieron en subsecuentes generaciones asexuales.

Christianson y Warnick (1983), realizaron el cultivo de hojas de Colvolvulos arvensis, el cual produce yemas vegetativas, que fueron

cultivadas en un medio con sales de Murashige / Skoog, sacarosa, vitaminas y 0.5 mg./lt. de ácido indol3-acético, más 7.0 mg./lt. de 2-isopentenil-adenina. Los medios para la inducción de yemas vegetativas, raíces y callos, pudieron causar la formación de pequeñas cantidades de callos en Cortes del inóculo. La primera formación de callos fue desarrollo intercambiable. Bajo la influencia continua del medio para inducción de yemas, las células o grupos de células pudieron determinarse por la formación de yemas. Esta determinación se canalizó a la formación de yemas: la transferencia subsecuente al medio para inducción de raíces no tuvo efecto en la formación de yemas en el inóculo. El control de la organogénesis por el balance de auxinas y citocininas puede ocurrir entre el tiempo de competencia y el tiempo determinado por el desarrollo de yemas (o raíces). No pudo conocerse si el control es un fenómeno simple o múltiple.

### 3- CONSIDERACIONES GENERALES

Consideraciones generales que deben tomarse en cuenta al proyectarse la planeación de un área adecuada para el cultivo de tejidos vegetales in vitro.

En la planeación y organización de una área adecuada para el cultivo de tejidos vegetales debe de tomarse en cuenta,

principalmente, las condiciones de asépsia en las que se debe de trabajar, así como su funcionalidad.

Una área de cultivo de tejidos vegetales in vitro no es muy distinta de las condiciones e instalaciones que puedan tener cualquier otro laboratorio; las diferencias principales estriban en las condiciones de asépsia que se requieren para el establecimiento de cultivos asépticos, entendiendo como asépsia al conjunto de métodos destinados a preservar de germen infecciosos al organismo vegetal.

### 3.1. Distribución y características de las principales salas de un laboratorio de cultivo de tejidos vegetales in vitro.

Para lograr un buen control aséptico en un laboratorio de cultivo de tejidos vegetales in vitro, el trabajo debe de realizarse en una área estéril repartida en salas separadas; así pues el área aséptica debe poseer:

- a) Sala de lavado.
- b) Sala de preparación de medios y material vegetal.
- c) Sala de siembra y disección.
- d) Sala de incubación.

LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

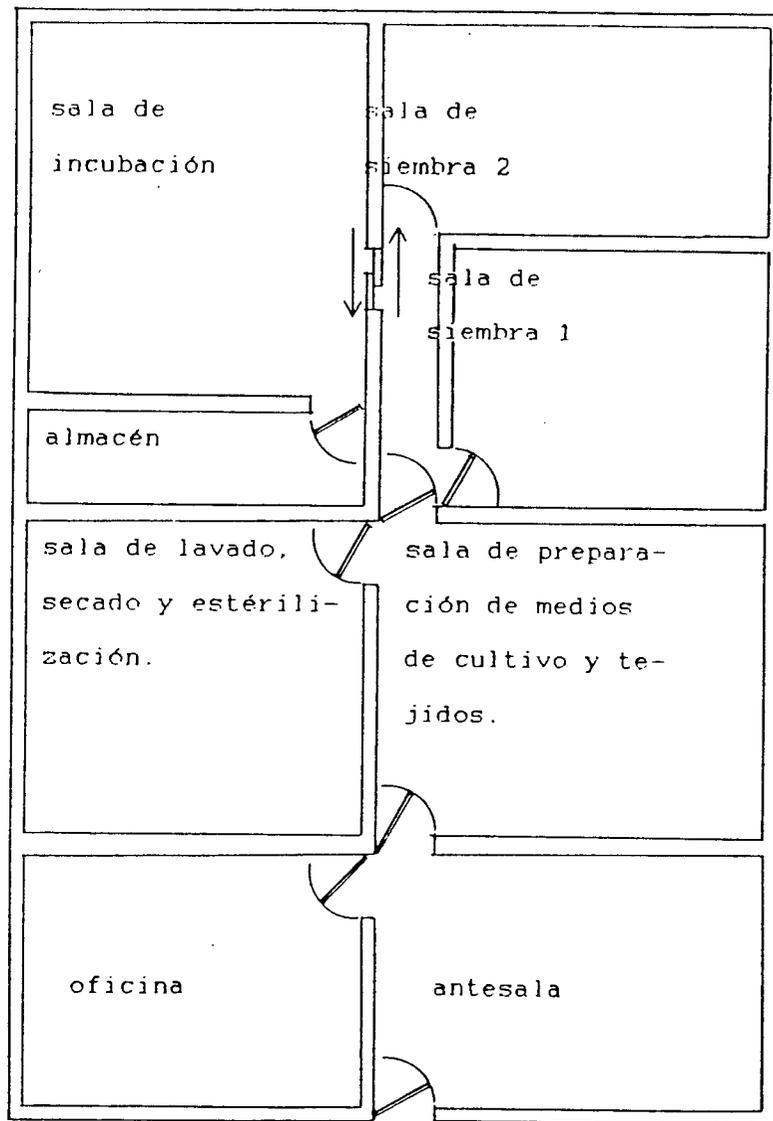


FIGURA 1

Distribucion y partes mas importantes de un laboratorio de cultivo de tejidos vegetales in vitro. Merino M. E. y Granada C.L., 1982.

### 3.1.1. Sala de lavado

En ésta sala se llevará a cabo el lavado de la cristalería en general; también puede emplearse para el primer lavado con detergente del material vegetativo. Aquí puede instalarse el autoclave para esterilizar tanto el medio de cultivo como el material y los tubos o recipientes contaminados. También es recomendable instalar una lavadora de cristalería (opcional) y una estufa u horno para el secado de la cristalería. Es indispensable contar con el material siguiente:

- Cristalería.
- Gabinetes para la cristalería.
- Estufa u horno de secado por convección.
- Autoclave.
- Agua destilada (destilador de agua).
- Fregadero; de preferencia doble tarja profunda.
- Instalación eléctrica; 110 y 220 V.

### 3.1.2 Sala de preparación de medios y material vegetal

En ésta sala se preparan los medios de cultivo que serán utilizados en las diferentes fases del desarrollo de los inóculos, al igual que el material vegetativo del cual se tomará el inóculo seleccionado. En la sala de preparación de medios y material vegetal no se requiere de accesorios o instrumentos especiales. Un laboratorio de química común es suficiente como cuarto de trabajo.

Las principales facilidades con las que debe contar este laboratorio son las siguientes: Varias mesas largas con cubierta resistente a ácidos, en donde se lave el equipo de cristalería; un destilador grande de agua conectado a un aparato desionizador; una mesa de concreto para balanza analítica (si hay un cuarto separado para balanza es más deseable); una mesa para trabajo; anaquel para guardar los reactivos y el material lavado de vidriería, un refrigerador y un congelador para temperaturas muy bajas.

Cuando se utilizan frecuentemente autoclaves y aparatos de Koch se produce vapor de agua y la temperatura aumenta rápidamente, por lo que es mejor separar el cuarto para autoclaves de las oficinas u otros cuartos.

La cristalería que ordinariamente se usa para el cultivo de tejidos se selecciona de la que se utiliza en experimentos químicos o microbiológicos. Sin embargo, poco de este material está diseñado especialmente por investigadores.

Recientemente el cultivo de tejidos animales se ha hecho muy intensivo, especialmente en el campo de la medicina, por lo que la demanda de cristalería y aparatos específicos se ha incrementado bastante.

No hay mucha diferencia entre el cultivo de tejidos animales y el de vegetales, desde el punto de vista de su manejo técnico por lo que muchos aparatos y cristalería son de uso común.

Con ésto se trata de orientar de cuales son los aparatos y la cristalería que son más comunmente utilizados para el cultivo de tejidos vegetales, aunque es claro que existen más pero que no se mencionan en este trabajo debido a que se utilizarán en experimentos relacionados con la genética y que son muy sofisticados, ya que lo que se va a manejar es la producción in vitro en tejidos vegetales específicamente.

El material que se seleccione deberá ser de preferencia de alta calidad y no liberar sustancia alguna, especialmente la cristalería utilizada en la conservación de soluciones nutritivas madres.

### 3.1.3 Sala de siembra y disección

En esta sala se deben de tener los máximos cuidados asépticos; para lograr esto, se emplean cámaras de flujo laminar de aire, utensilios estériles, cubrebocas, cubrecabezas y aire filtrado en la sala; además:

- Vacío para la esterilización por filtración.
- Microscopio estereoscópico.
- Lupa con lámpara.
- Instalación eléctrica 110 y 220 V.
- Instalación de gas.
- Gabinetes.
- Instrumentos de disección.
- Lámpara de luz ultravioleta.

# BIBLIOTECA ESCUELA DE AGRICULTURA

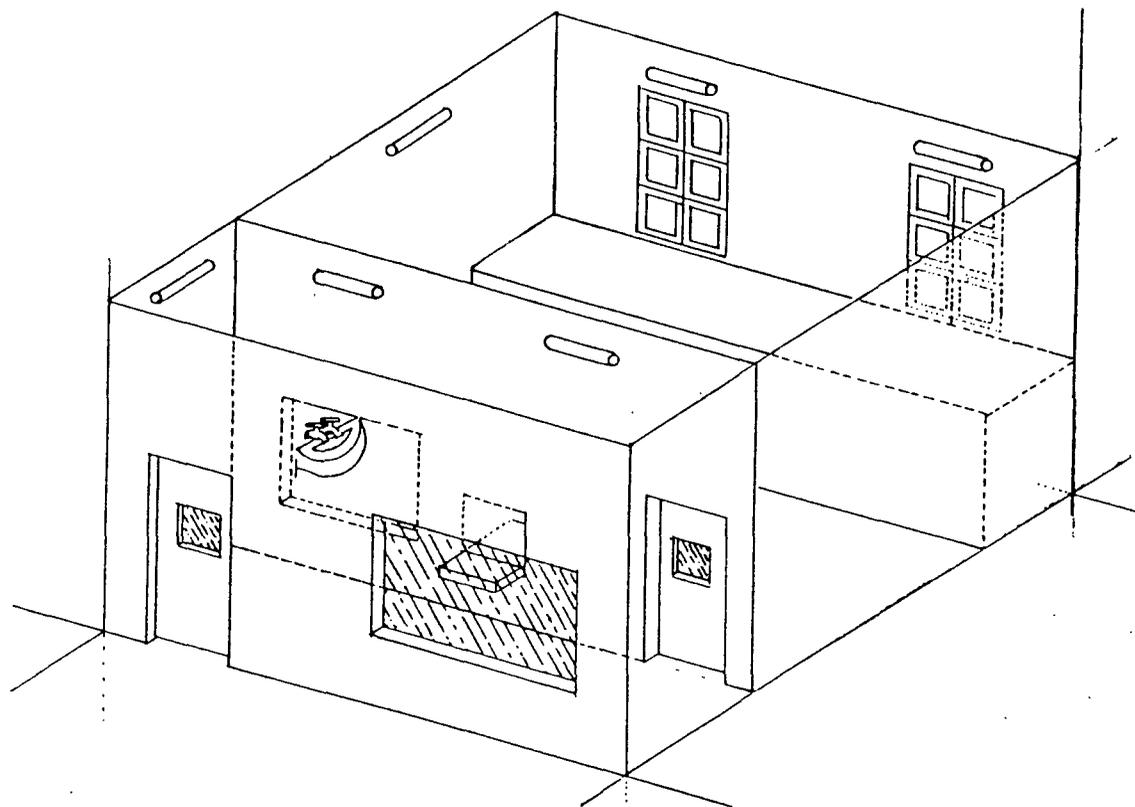


FIGURA 2

Fuente: Proyecto para la construcción de una sala de siembra y disección para el cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. Dr. Masayuki Takeuchi profesor de la Universidad de Saitama Japón.

### 3.1.4 Sala de incubación

En esta sala debe tenerse muy en cuenta las instalaciones eléctricas, pues las diferentes fases del crecimiento de los inóculos necesitarán diferentes fotoperiodos, temperatura, intensidad luminica, etc.

No debe faltar:

- Aire acondicionado y filtrado.
- Control de temperatura.
- Anaquel para incubación, con las características siguientes

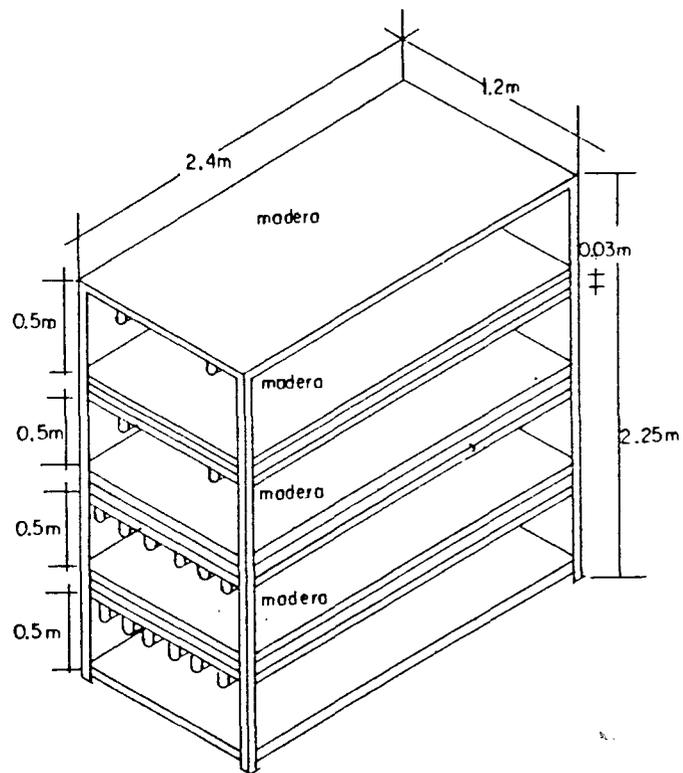


FIGURA 3 UNIDAD PARA INCUBACION CON CUATRO NIVELES  
cada unidad debe construirse, con 50 cm entre cada nivel.  
Niveles dobles y aislados para la intensidad luminica de  
10,000 y 30,000 lux.

Illuminación diferencial recibida Por plantas colocadas de 15 a 45 cm. de distancia de la fuente luminosa (tubos fluorescentes de 40 watts. Vita Lite, TH12, de 48"). (Ver figura 4).

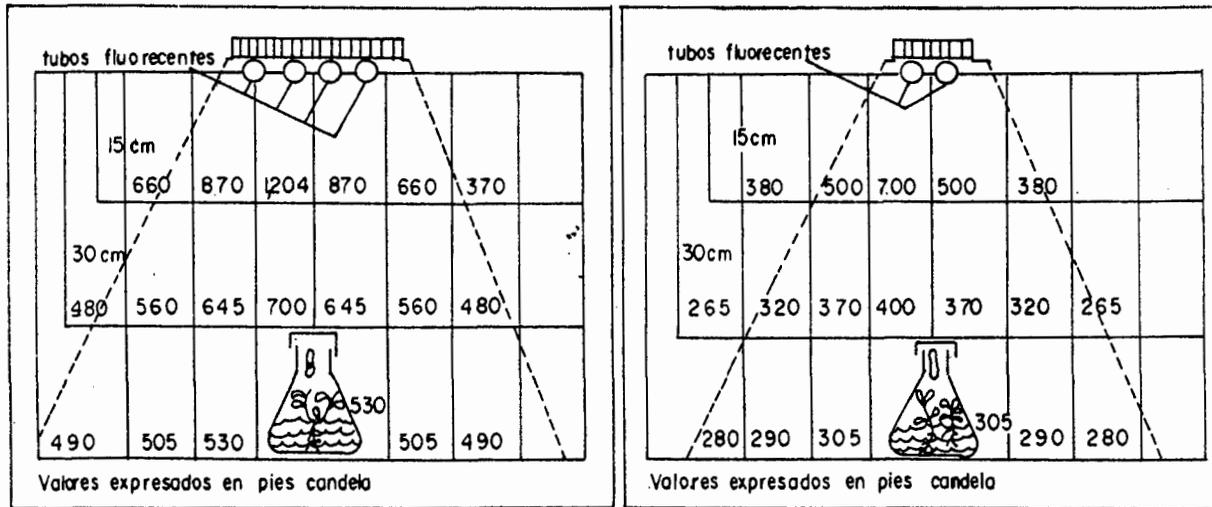


FIGURA 4

Intensidades luminicas que recibe el cultivo *in vitro* a diferentes distancias de la fuente de iluminación.

- Colocación de balastras fuera de la sala.
- Termostatos separados para la temperatura de día y de noche.
- timer (reloj con alarma).
- Lámparas de 2.4 m de longitud, cuando sea posible.
- Lámparas de luz fría o Gro Lux para 1,000 y 3,000 lux (usar una lámpara/60 cm. de ancho del anaquel por 1,000 lux).
- Lampara Power Groover para 10,000 y 30,000 lux ( usar una lám- para/60 cm. de ancho del anaquel por 10,000 lux.
- Debido al calor generado, pueden necesitarse algunos ventilado res extras en el cuarto o sala.

## 3.2 Control del aire en el laboratorio

### 3.2.1 Aspectos generales

El aire que respiramos es una mezcla de los gases que forman la atmósfera: es incoloro, inodoro, elástico, insípido, mal conductor del calor y de la electricidad, salvo cuando está saturado con humedad o fuertemente ionizado.

La composición química del aire es principalmente de oxígeno (21%), nitrógeno (78%) y el restante 1% está compuesto de argón, neón, criptón, xenón, helio, óxido nitroso, vapor de agua de (0.01-0.02%), anhídrido carbónico (0.03-0.07%), metano (de la descomposición de la materia orgánica) y monóxido de carbono (de residuos de la combustión de madera, gasolina, etc.).

La población microbiológica del aire, la forman generalmente hongos, bacterias, y virus.

El aire que nos rodea contiene diversas partículas: para eliminar algunas de ellas es necesario filtrar el aire.

En algunos lugares y en ciertas áreas de trabajo el aire debe de estar limpio, como en los hospitales (salas de operación y lugares aislados para infectología), en la industria (investigación laser, en la preparación y lectura de medios de cultivo, producción de semiconductores, líneas de llenado de productos farmacéuticos), etc.

Para responder a las necesidades de estas industrias, se han fabricado filtros HEPA (height efficient particles air) llamados también filtros absolutos. Un filtro de este tipo puede retener el 100% de las partículas de humo que miden mas de 0.3 micras.

### 3.2.2 Flujo laminar

El flujo del aire que nos rodea puede ser laminar, es decir se mueve en líneas rectas paralelas en determinado espacio, con velocidad uniforme, en una sola dirección y que toma la forma de los objetos que se encuentran a su paso. También puede ser turbulento, es decir, sin dirección constante. Por otra parte los filtros HEPA actúan mas eficazmente si el flujo de aire es laminar porque éste se distribuye uniformemente en la superficie del filtro.

En un sistema de flujo laminar, las partículas sólo tienen una oportunidad de contaminar a su paso un frasco abierto. Además, el aire sin partículas, en su movimiento, va limpiando el ambiente.

### 3.2.3 Importancia de las unidades de flujo laminar

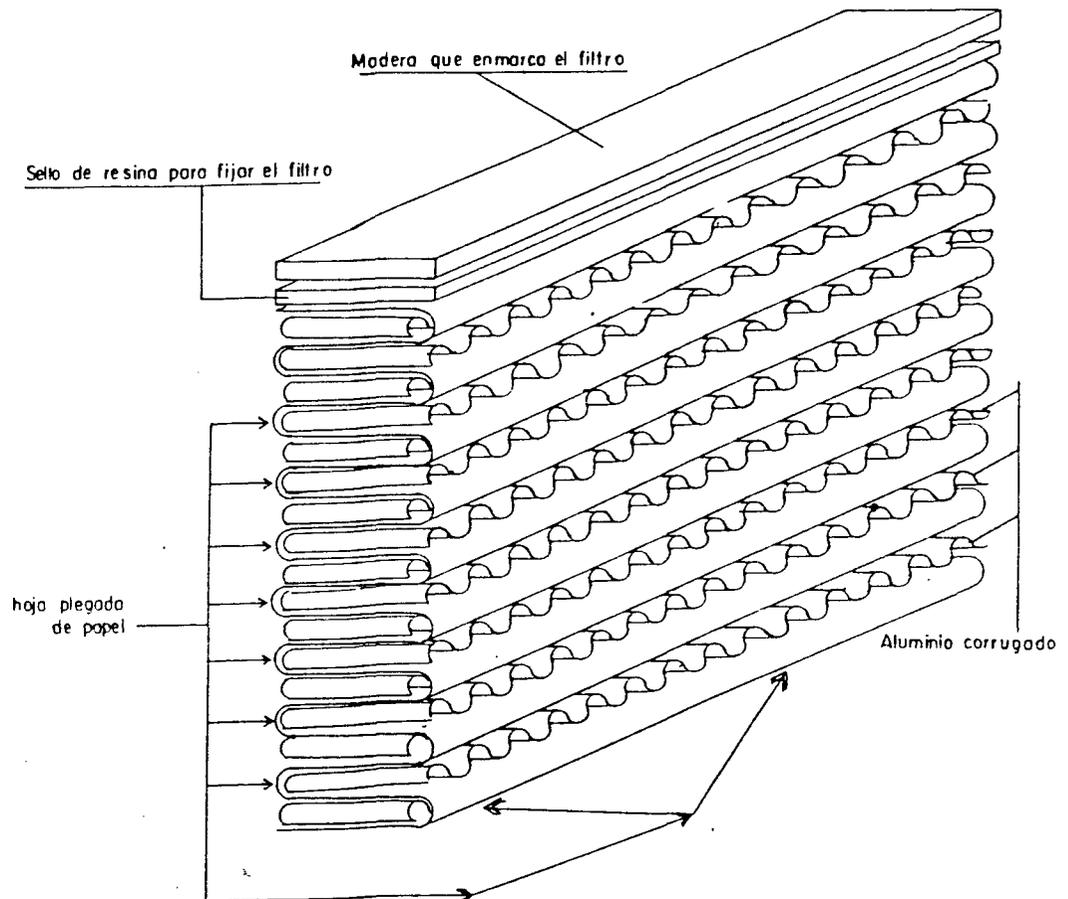
Por su gran versatilidad, el flujo laminar tiene un gran número de aplicaciones en diferentes industrias.

Las unidades de flujo laminar se han diseñado para crear una área de trabajo estéril, lo que protege a los materiales de ser contaminados por el medio ambiente, ya que las técnicas de flujo laminar permiten controlar la contaminación microbiológica en el aire mediante dos procesos simultáneos:

- 1.- La introducción de aire estéril en una área de trabajo mediante filtros absolutos (HEPA), ya que éstos retienen partículas desde 0.3 micras en adelante, y su diseño interior obliga a las partículas a detenerse en el medio filtrante obteniéndose un aire libre de partículas.
- 2.- Al introducir esa masa de aire en el área de trabajo a velocidades muy bajas, el aire avanza en una sola dirección tomando la forma de los objetos que se encuentran a su paso, evitando la contaminación exterior y la que podría provenir de los objetos citados, dentro de la zona de trabajo.

### 3.2.4 Filtración del aire

Para evitar que haya contaminación dentro de el área de trabajo se hace pasar el aire a través de un filtro especial, el cual está construido con microfibras de borosilicato formadas en una hoja plana por reensamble de papel. Esta hoja está plegada por la parte de atrás; por delante tiene separaciones de aluminio corrugado, ocasionando que el aire penetre más lejos y que parta del pliegue. (Ver Figura 5)



**FIGURA 5** Corte en isométrico de un filtro absoluto mostrando la estructura y características de los materiales usados para su construcción (papel de microfibras de borosilicato en forma plegada con separaciones de aluminio corrugado).

### 3.2.5 Mecanismos de acción y eficiencia

Contrariamente a lo que se piensa estos filtros no actúan solamente capturando las partículas, sino que las atrapan y pueden seguir cinco caminos: sedimentación, mecanismos electrostáticos, intercepción, impacto inerte y difusión.

La sedimentación y los mecanismos electrostáticos ofrecen la mínima efectividad para la extracción de partículas del flujo de vapores con filtro de fibra. La intercepción ocurre cuando una partícula sigue la trayectoria del vapor de aire y pega en él y las retiene, el efecto de la intercepción está en relación con el tamaño de la partícula.

El impacto inerte ocurre cuando una partícula relativamente larga cruza las líneas de vapor de aire impactándose y es retenida en las fibras del filtro. La difusión ocurre con partículas muy pequeñas.

Con esta técnica, el filtro HEPA remueve de 9,995 al 9,997 de cada 10.000 partículas de 0.3 micras de diámetro.

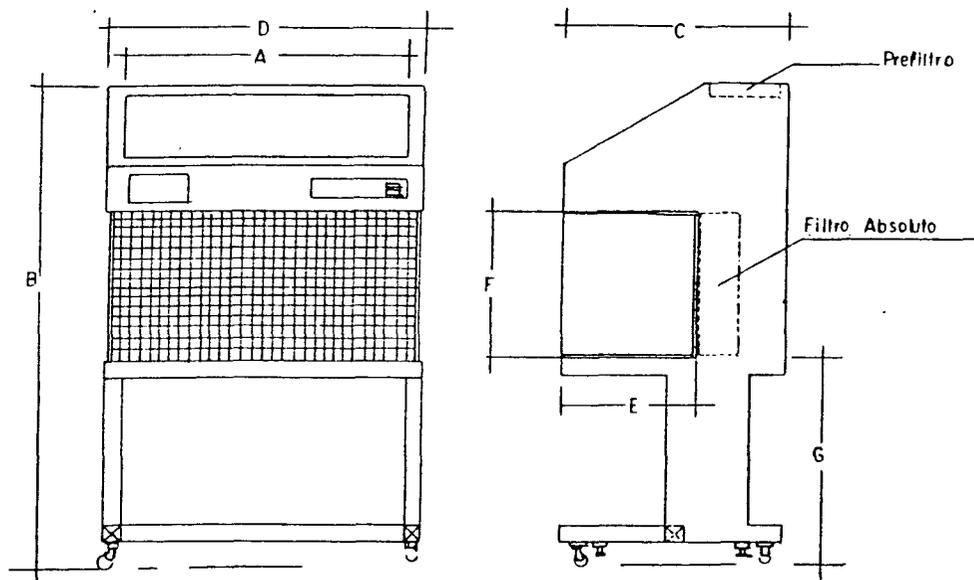
La variación de la eficiencia (99.95 - 99.97%) está de acuerdo con las normas de control de calidad. Muchas industrias pueden usar filtros de 99.95% pero los laboratorios con aplicaciones farmacéuticas requieren el filtro de 99.97%.

Debe notarse que es poco común que las partículas transportadas por el aire contengan organismos viables que sean exactamente de 0.3 micras; por lo mismo, la eficiencia de los filtros HEPA es mayor de

99.95% llegando a un 99.99%. Los filtros operados con las debidas precauciones, segun el tipo de trabajo que se realice, tienen un nivel de filtración del 99.99%. La vida de estos filtros generalmente depende del uso y de la limpieza del laboratorio. Lo normal es que tenga una duración de 3 a 5 años con 48 horas de trabajo por semana.

### 3.2.6 Características de la unidad de flujo laminar

La unidad de flujo laminar provee un alto nivel de limpieza aún dentro de zonas fuertemente contaminadas; además, permite la máxima visibilidad y acceso al área de trabajo (Ver figura 6).



DIMENSIONES (CM.) APROX.

MODELO	A	B	C	D	E	F	G
A-09	90	185	86	95	53	57	80
A-12	120	185	86	125	53	57	80

Figura 6 Unidad de flujo laminar propuesta por VECO INTERNACIONAL INC. 15565 Northland Dr. Suite 200 Southfield, Mich. 48075 E. U. A.

La mesa de trabajo puede estar cubierta por plástico laminado, lámina inoxidable o lámina rolada en frío y pintada. Los paneles laterales de la unidad son de cristal lo que permite la visibilidad a través de los mismos, así como la entrada de iluminación.

El acceso al motor y equipo se obtiene removiendo la parte posterior de la unidad.

La unidad puede contar con un indicador opcional de presión diferencial, mediante el cual se obtienen características del filtro absoluto.

### 3.3 Clasificación de los niveles de riesgo al trabajar con microorganismos

Los organismos potencialmente patógenos se catalogan, de acuerdo al riesgo que hay al trabajar con ellos, en tres categorías:

Bajo riesgo: En este nivel, los microorganismos tienen mínimo efecto en personas, animales y plantas bajo condiciones ordinarias de uso. Esta clasificación está restringida a todos los agentes etiológicos designados clase I por el Departamento de Salud y el Centro de Servicios Humanos para el Control de la Enfermedades en los Estados Unidos.

Riesgo Moderado: Este nivel requiere condiciones especiales para el control o retención porque:

- a) Son patógenos a personas, animales y plantas.
- b) Por su concentración.
- c) Por alteración genética.

Esta clasificación incluye todos los agentes etiológicos designados clases II y III por el Departamento de Salud y el Centro de Servicios Humanos de los Estados Unidos.

Alto riesgo: Este nivel necesita medidas de control adicionales y mayores a las usadas en el nivel de riesgo moderado. Estos organismos se operan con varios peligros:

- a) Con bajas dosis se infecta al personal, animales y plantas.
- b) Alto riesgo en el manejo del laboratorio.
- c) Concentración
- d) Liberación de microorganismos infecciosos aerobios.
- e) Alteraciones o recombinaciones genéticas que incrementan el potencial patógeno.

Esta clasificación incluye todos los agentes etiológicos designados clase IV y V por el Departamento de Salud y el Centro de Servicios Humanos para el Control de Enfermedades en los Estados Unidos, y virus oncogénicos clasificados como de alto riesgo por el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos.

### 3.3.1 Medidas de seguridad

Para impedir la contaminación y a la vez elevar el nivel de protección para el personal, se recomienda usar ropa que haya sido lavada, doblada, envuelta y esterilizada antes de cada uso para impedir que se transporte contaminación por este medio.

Al trabajar con microorganismos de riesgo patógeno, se deben tomar algunas precauciones especiales como son: cubrir totalmente el cuerpo sin impedir la visión ni la respiración, para ello se debe contar con lo siguiente:

- a) Cubrebocas.
- b) Capucha.
- c) Overol.
- d) Guantes.

- e) Botas de tela.
- f) Gafas o careta.
- g) Visera.

Una vez terminado el trabajo, la ropa usada se debe de esterilizar para evitar alguna posible contaminación. Luego se procede a lavarla con el mecanismo usual.

### 3.4 Características de las instalaciones en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales in vitro

Al proyectarse el espacio requerido para las salas de el área estéril, se puede tener una amplia variación en cuanto a las dimensiones apropiadas para las necesidades del laboratorio; lo cual dependerá de la intensidad de la investigación, de la calidad de los experimentos y del número de investigadores.

Es muy conveniente tener varias salas con el mismo diseño cuando se tenga un grupo numeroso de investigadores, y especialmente cuando se trate de enseñanza y trabajen juntos estudiantes e investigadores.

Dentro de las principales salas que se necesitan para el cultivo de tejidos vegetales in vitro tenemos:

- Sala de siembra y disección.
- Sala de incubación.
- Sala de preparación de medios y material vegetal.

BIBLIOTECA ESCUELA DE AGRICULTURA<sup>41</sup>

- Sala de lavado.
- Sala de productos quimicos (almacén).

#### 3.4.1 Sala de siembra y de incubación

La sala de incubación y la sala de siembra y disección son las más importantes ya que se requiere que estén asépticas, pues de esto dependerá que las operaciones que se hagan en ellas sean más sencillas, que se reduzcan las pérdidas por contaminación y consecuentemente, se evite la pérdida de tiempo empleado por experimento y se obtengan resultados más satisfactorios.

En base a los anterior, es necesario considerar detalladamente la planeación de estas salas ya que es muy difícil cambiarlas una vez que han sido establecidas.

De preferencia estas salas deberán de tener pisos de mosaico, linóleum o vinilo; los muros y los techos carecerán de rugosidades o grietas, para presentar una textura uniforme y tersa para el pintado de muros y bóvedas, ya que las superficies lisas facilitan las labores de higiene y evitan la contaminación por acumulación de partículas.

Estas salas deberán de equiparse con aire acondicionado el cual deberá de ser aséptico y circular de dentro hacia afuera, con el objeto de que desaloje la humedad y los gases producidos durante la combustión de los mecheros, la respiración y la transpiración del personal.

Muchos investigadores recomiendan aplicar aceite mineral en pisos y paredes para evitar que el polvo se levante; es indispensable que el aceite no sea resbaloso cuando seque.

Estas salas deberán de equiparse con lámparas de luz ultravioleta, las cuales se colocarán en los muros y bóvedas a los costados de las mesas de trabajo, con el fin de mantener las salas en condiciones asépticas. Se debe tomar en cuenta la ubicación de éstas ya que no hay efecto esterilizante en los lugares sombreados.

Las lámparas ultravioleta deben de estar apagadas cuando se esté trabajando y es necesario evitar la exposición directa de ojos y piel a este tipo de luz debido a que se inflaman las partes expuestas.

Dentro de la sala de siembra y disección se recomienda tener como equipo de operación: mesa y silla lavables, lavabo, anaquel, carro de mano, disponibilidad de gas y energía eléctrica.

#### 3.4.2 Sala de lavado y preparación de medios

La sala de lavado y la sala de preparación de medios y material vegetal deberán de contar con muebles equipados con varias llaves de gas, agua, contactos para corriente eléctrica, con uno o varios fregaderos o lavabos, estantes, armarios y aparadores para colocar el material de vidrio de uso corriente, el material pequeño, los frascos para soluciones, etc. Además se instalará en este cuarto una báscula de precisión (sensibilidad = 0.01 g), un medidor de pH, una o varias estufillas de dos hornillas, un refrigerador y un congelador.

En cuanto a muros, techos y pisos, no es indispensable que sean como los de las salas anteriores, pero si lo fueran se facilitaría tener el área más limpia.

En cuanto a la sala de productos químicos (almacén), las paredes se recomienda pintarlas de negro (si es posible). Los productos inflamables se almacenan en una sala especial en el exterior de los edificios (esto es necesario por razones de seguridad).

4-PROYECTO DE DISEÑO SOBRE UNA AREA ADECUADA  
PARA EL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES IN VITRO

Las anteriores consideraciones nos señalan las características de un laboratorio de cultivo de tejidos vegetales a gran escala, o para trabajos científicos muy sofisticados ligados a experimentos de ingeniería genética. Sin embargo nuestro propósito como primera etapa, es el enfocarnos a la reproducción *in vitro* de tejidos vegetales específicamente.

Considerando nuestra experiencia en la práctica de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, y pensando en la posibilidad de llegar a construir una área adecuada para el cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, creemos que se pueden suprimir dos de las salas que se expusieron en las consideraciones generales, y tratar de adaptar las funciones de éstas salas a las condiciones actuales de cualquier laboratorio de la Facultad. Las dos salas que se suprimieron corresponden a las funciones de lavado, preparación de medios, preparación de material vegetal y de cristalería.

Podemos suprimir estas dos salas, pues con un buen manejo se pueden hacer en el área común del laboratorio los trabajos realizados en ellas.

En las prácticas que se realizaron, las funciones de las salas que se están suprimiendo, se manejaron sin tener las condiciones adecuadas obteniendo resultados satisfactorios.

#### 4.1 FACULTA DE AGRONOMIA U. DE G. PLANO GENERAL

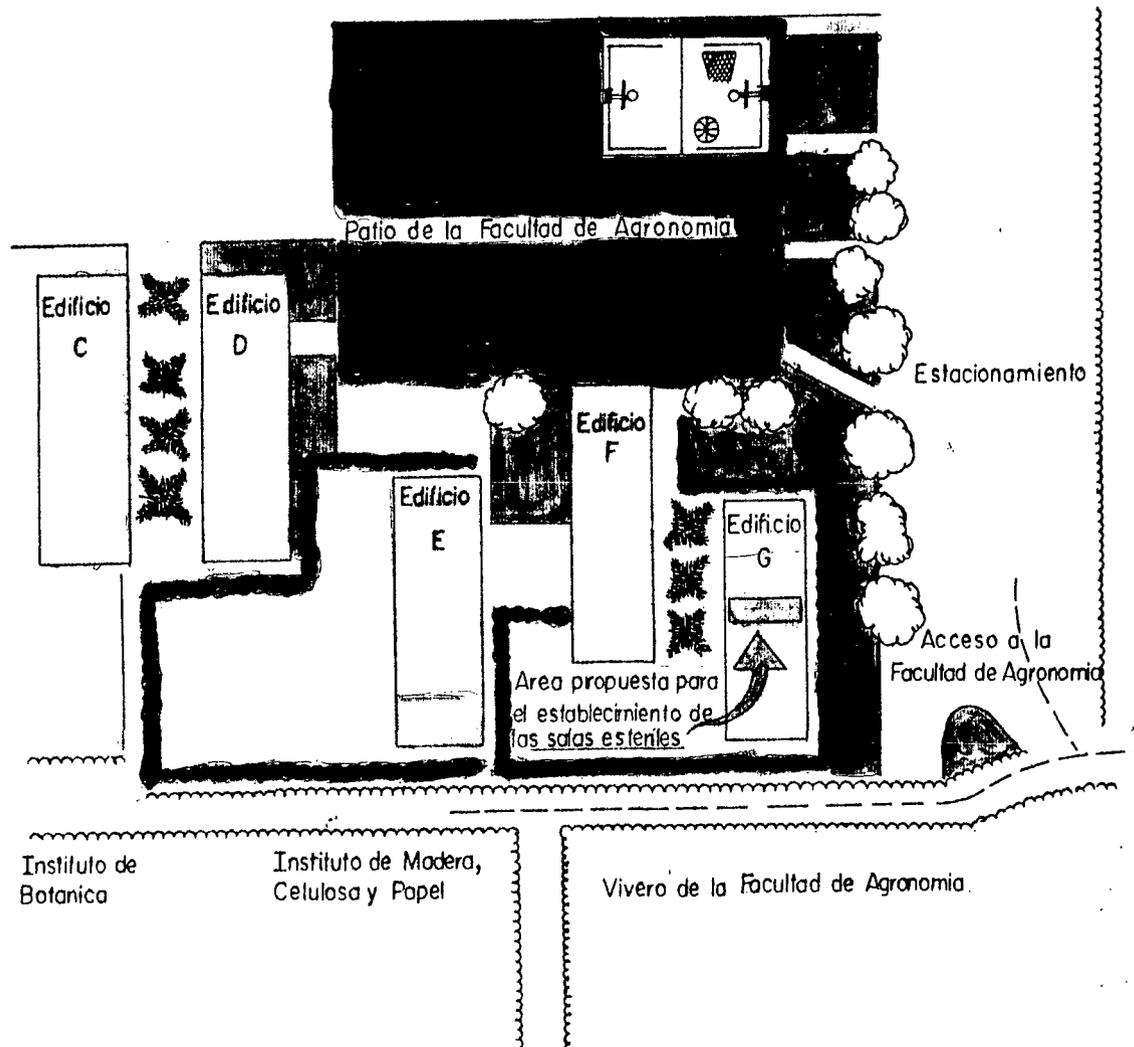


FIGURA 7 PLANO GENERAL

Ubicación del lugar propuesto en el diseño de una area estéril para el cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Guadalajara.

#### 4.2 Condiciones actuales

El laboratorio de bioquímica se encuentra en regulares condiciones: con esto se pretende decir que las prácticas básicas de bioquímica y química se pueden hacer sin ningún problema, y con un buen esfuerzo se realizarían trabajos más sofisticados.

Este laboratorio cuenta con una área de 103.74 metros cuadrados de la cual, para el desarrollo de las prácticas, sólo se aprovechan 79.00 metros cuadrados que es donde se encuentran las mesas de trabajo, anaqueles para guardar la cristalería y tarjas para el lavado de la misma: la capacidad de almacenaje de los anaqueles es de 7.6 metros cúbicos, (el número de alumnos puede ser de 36).

Actualmente el laboratorio funciona para prácticas de bioquímica y fisiología específicamente.

La decisión de establecer el área de cultivo de tejidos vegetales al fondo del laboratorio, fue debido a que es una área despejada y ofrece las condiciones más adecuadas de instalaciones; además no se realizarían modificaciones radicales, sino que se ajustaría a las condiciones actuales. Ver figura 8.

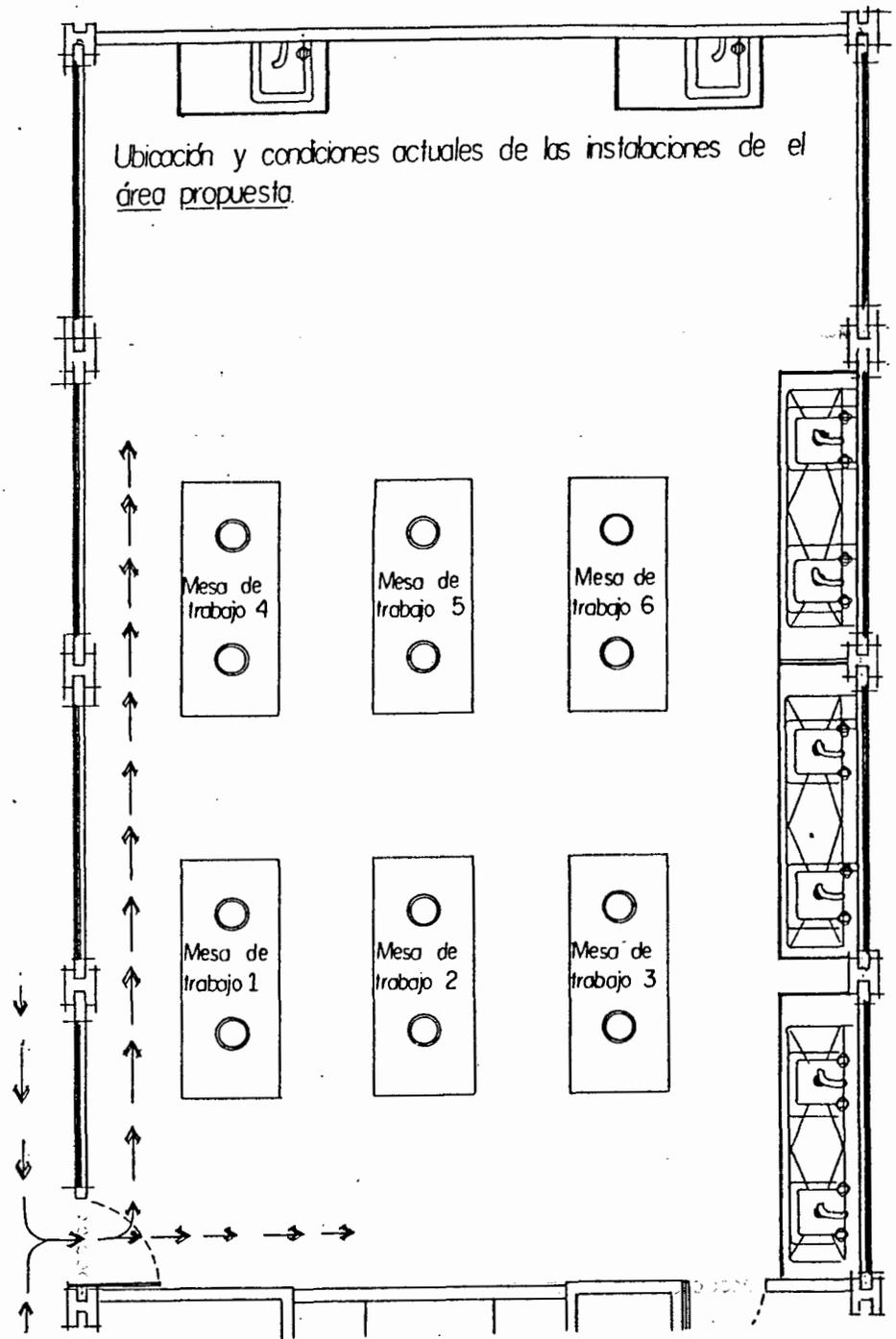


FIGURA 8 Plano en planta de las condiciones actuales del laboratorio, en el cual proponemos una area para el diseño.

#### 4.3 Area propuesta

En la figura 9 el área que se enmarca en verde, cuya superficie es de 24.74 metros cuadrados, no es indispensable para la elaboración de las prácticas en el laboratorio, a pesar de que cuenta con instalaciones de gas, agua, electricidad, drenaje, iluminación, gabinete con tarjas y mesas de trabajo.

El área enmarcada en azul es la normalmente utilizada para prácticas; tiene una superficie de 79.00 metros cuadrados, en donde se puede trabajar hasta con 36 alumnos cómodamente por práctica. En suma, el dibujo refleja las posiciones y condiciones actuales del mobiliario.

En la figura 10 se puede apreciar el área adecuada para cumplir con los propósitos de establecer una área aséptica para el cultivo de tejidos vegetales in vitro. Así mismo, se enmarca el acceso y dimensión de esta área.

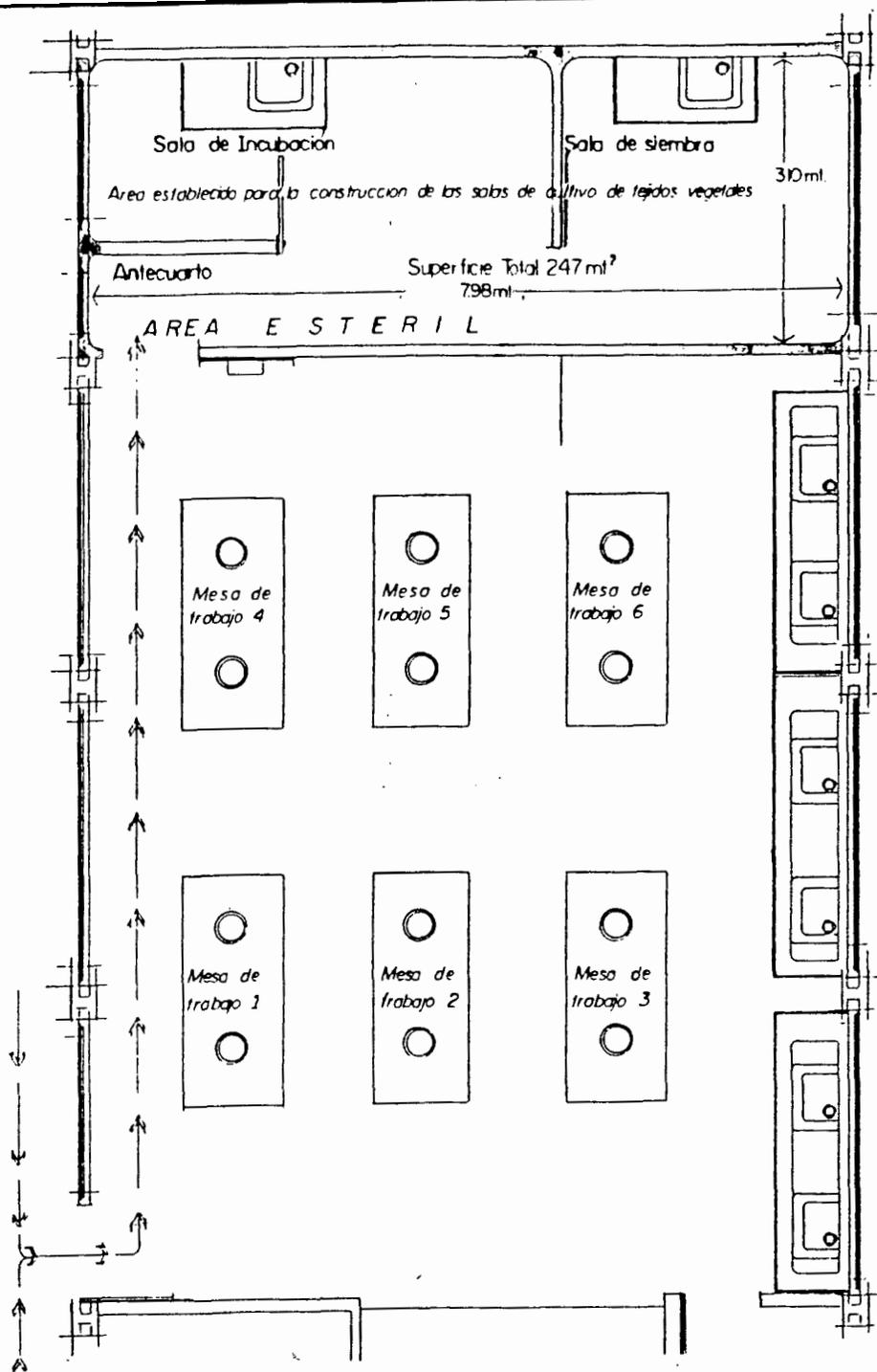


FIGURA 9 Plano en planta que muestra las dimensiones y distribución para el diseño del area esteril.

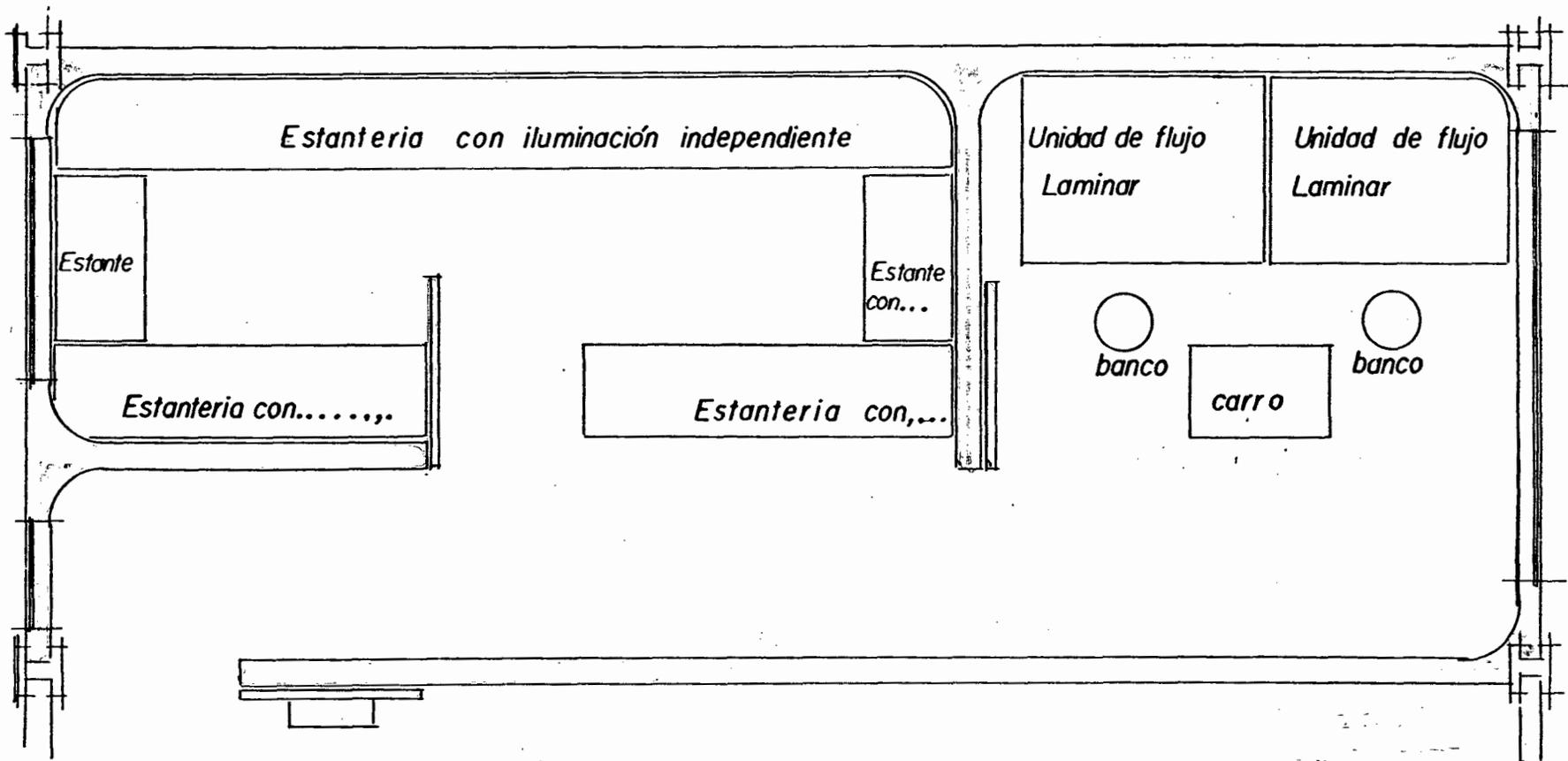


FIGURA 10 Plano en planta del diseño propuesto, con características de ubicación del mobiliario, en este diseño la estanteria tiene una capacidad de incubación en frascos para cultivo (tipo Gerber) de 5,411 unidades, en un solo tendido.

## 5.- GUIA ARQUITECTONICA

## 5.1 Proposición para el proyecto

En base a las sugerencias anteriores se propone para el diseño del área aséptica, dividirla en tres partes que cumplirán con las condiciones más importantes del cultivo de tejidos vegetales *in vitro*: las partes son:

- a) Antecuarto.
- b) Sala de incubación.
- c) Sala de preparación, siembra y disección de material.

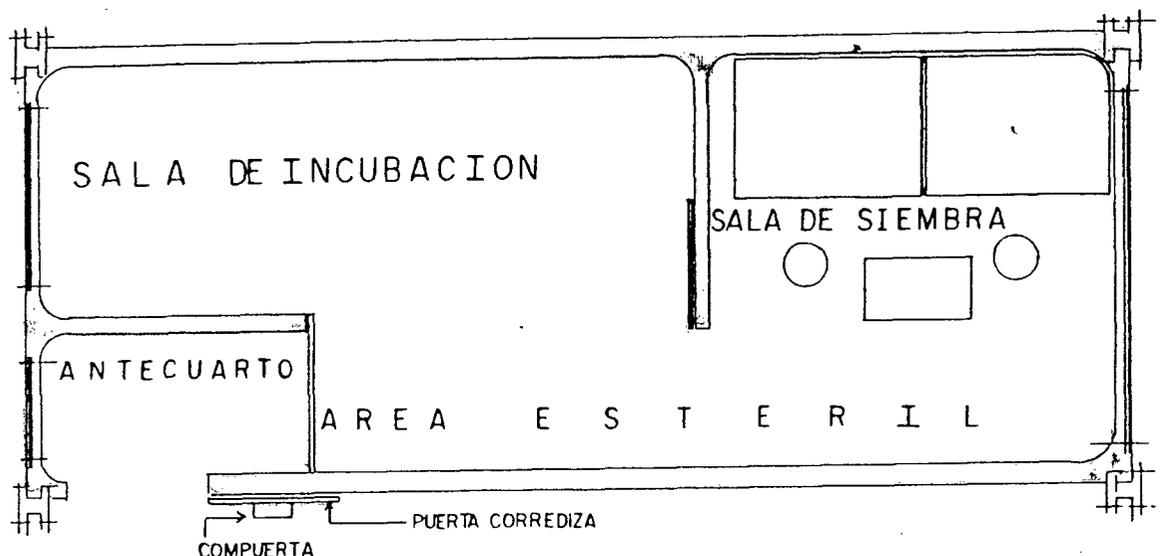


FIGURA 11. Plano en planta mostrando la distribución de las diferentes áreas de trabajo en un laboratorio de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*.

El área propuesta contará con las normas óptimas que se requieren para el cultivo de tejidos vegetales; tendrá un solo acceso con el propósito de controlar el flujo de aire manteniendo un

solo sentido de circulación, provocando una presión constante. Además, este unico acceso permitirá un mejor control del movimiento de personal.

## 5.2 Características del area propuesta

### 5.2.1 Ingreso al area

La puerta de ingreso da acceso directo a un vestibulo o antecuarto; la puerta debe ser del tipo corredizo con una ventana transparente (Ver figura 12).

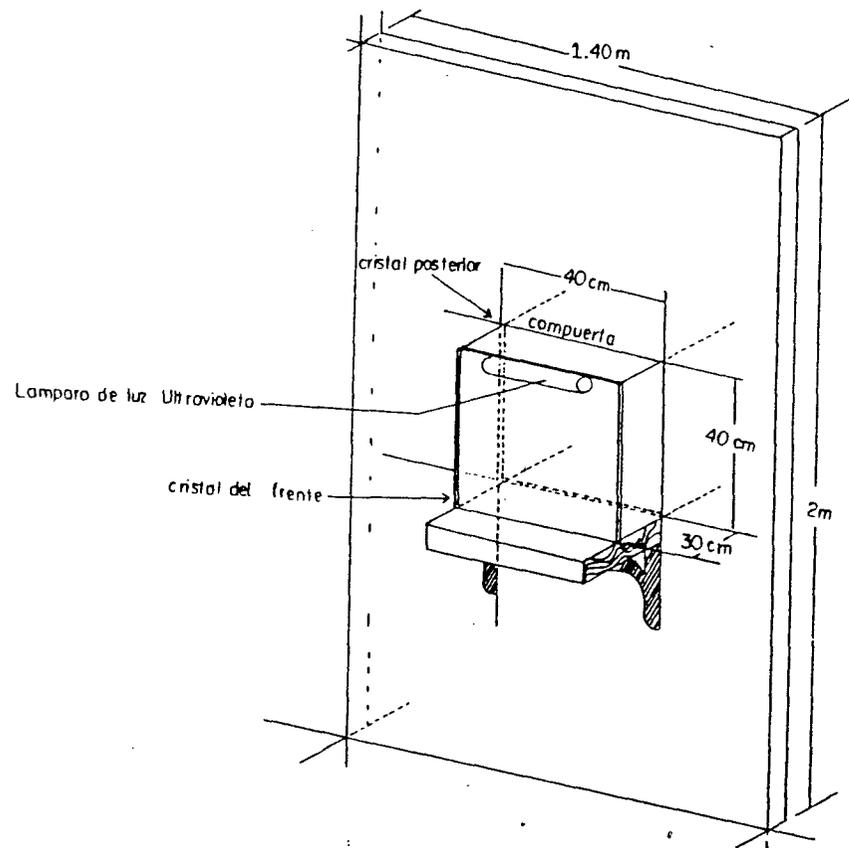


FIGURA 12 Isométrico de la puerta de ingreso que nos muestra su altura, su ancho y un sistema de compuerta.

Esta puerta cuenta con una compuerta a manera de caja o bastidor empotrado, compuesta de dos puerfitas corredizas de cristal y una lámpara de luz ultravioleta.

La compuerta sirve para que cuando se esté trabajando dentro del área estéril y se haya olvidado algún material o instrumento, se pueda meter o sacar a través de esta compuerta (Ver figura 12).

### 5.2.2 Antecuarto

El área estéril contará con un antecuarto o vestíbulo, que se utilizará para cambios de ropa, de mascarilla y guero estéril.

Contará con una banca plegable o adosada al muro y dos percheros para facilitar el cambio de ropa; no habrá ningún otro objeto que pueda causar contaminación.

También se colocarán adecuadamente en el antecuarto varias lámparas ultravioleta para tener un mayor control aséptico del área siguiente (Ver figura 13).

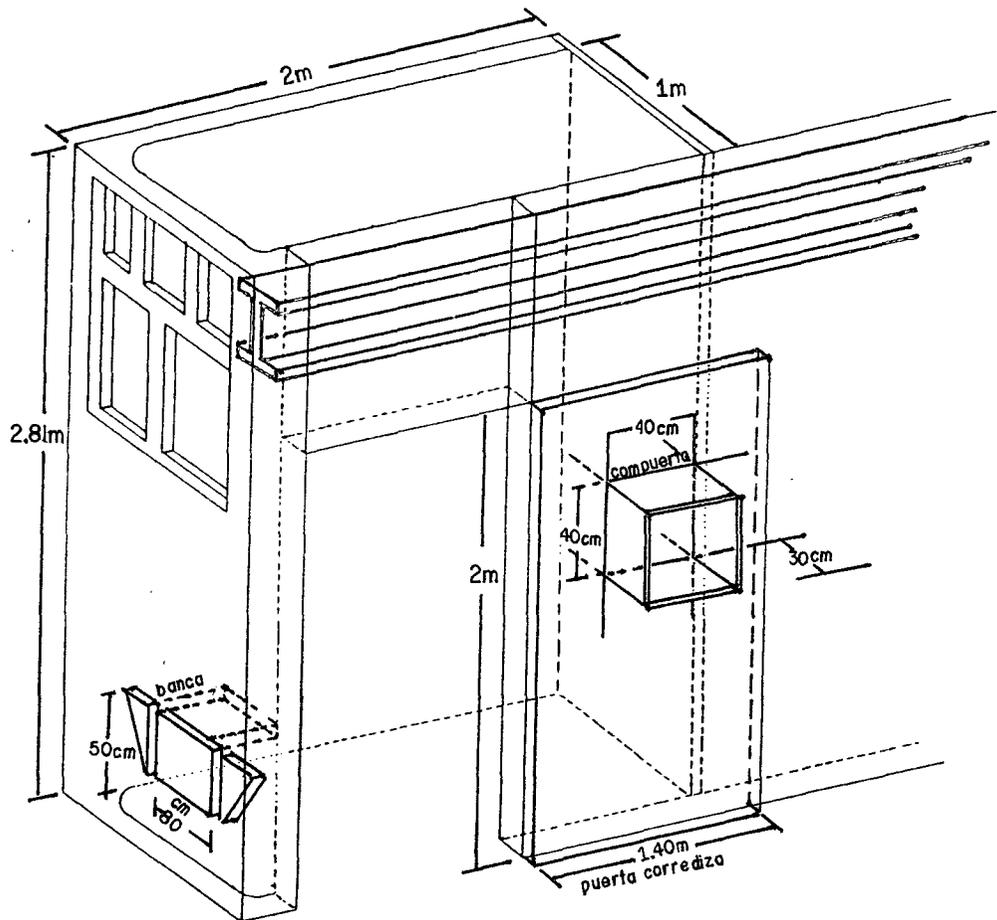


FIGURA 13 Isométrico del diseño de un antecuarto que muestra las características en altura, la anchura, el fondo, puerta de ingreso con medidas y banca plegable empotrada al muro.

El diseño de la banca antes mencionada se hizo con el fin de que no retenga polvo o microbios, que pueda quitarse rápidamente sin tener que salir del área estéril y para tener un espacio más despejado.

Además, otro objetivo de que sea plegable al muro es que no interfiera con la propagación de los rayos ultravioleta, ya que no hay efecto esterilizador en lugares sombreados. (Ver Figura 14).

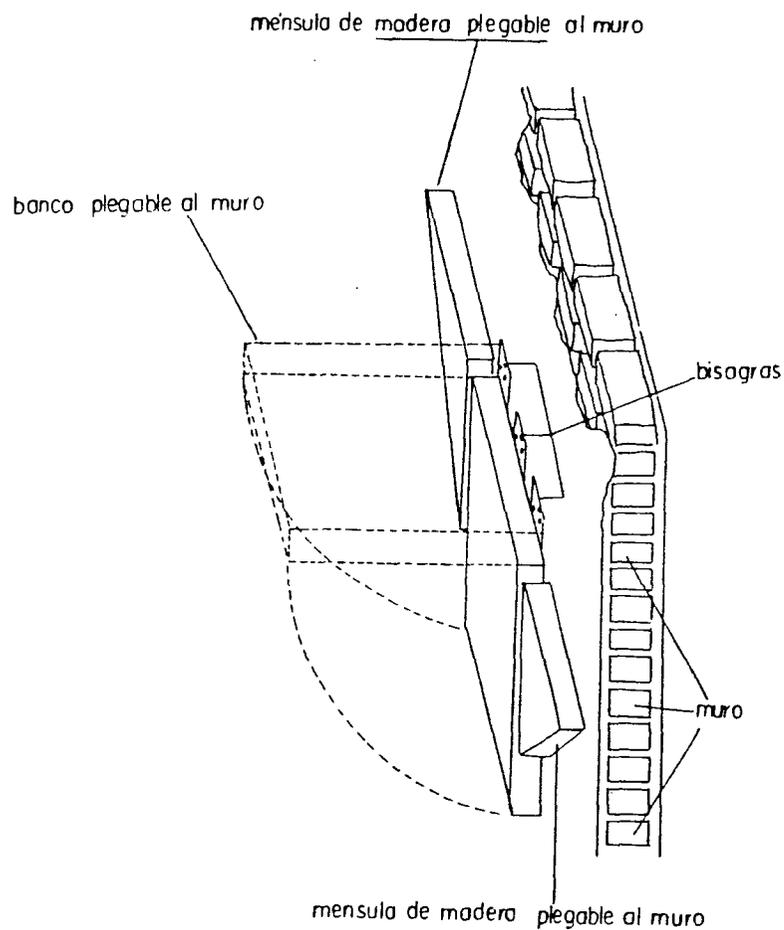


FIGURA 14 Vista en perspectiva de la banca plegable al muro y sus diferentes partes

El antecuarto contará con una segunda puerta que comunicará con el interior de la sala de incubación, y que tendrá una ventana doble de cristal transparente. Además contará con ductos especiales para facilitar la circulación del aire estéril (Ver figura 15).

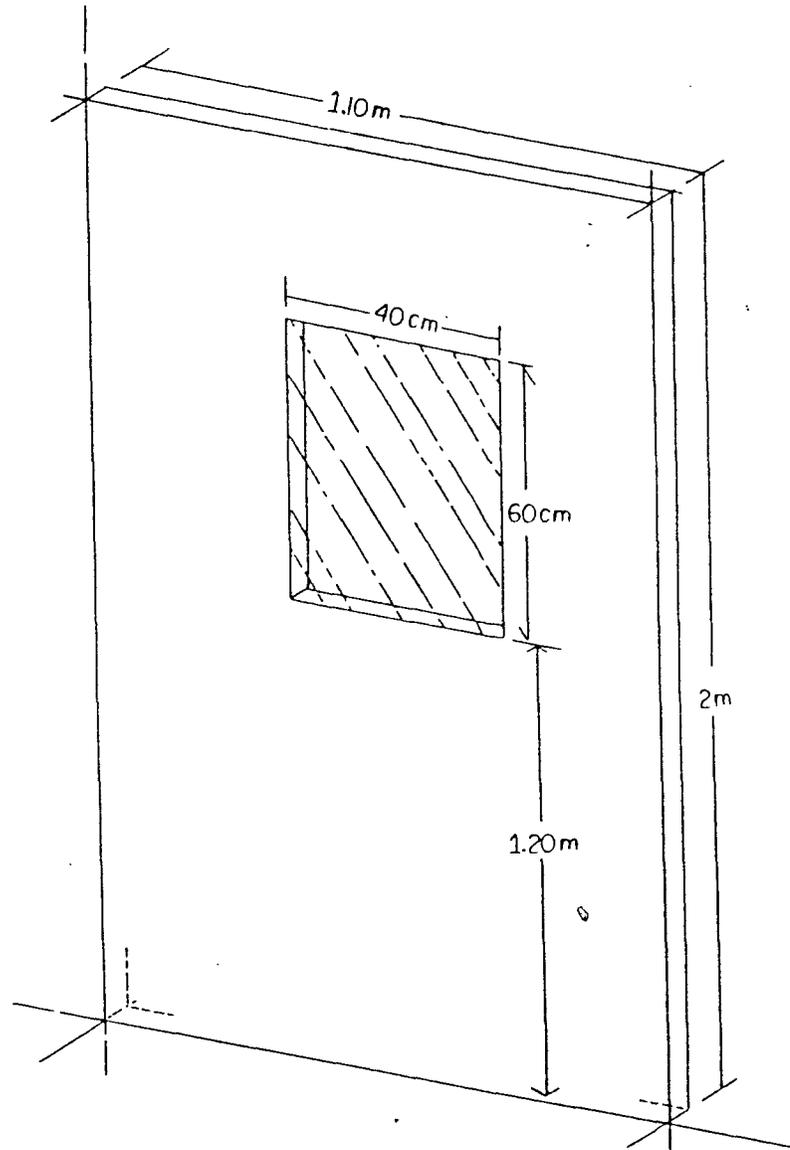


FIGURA 15 Vista en isométrico de la segunda puerta que muestra la altura, ancho y posición de una ventana de servicio.

El área del antecuarto deberá permitir el acceso de personas (Ver figura 16) con un mínimo de contaminación: para favorecer ésto se deberán de cambiar los zapatos por sandalias y esterilizar las suelas en un trapeador de nylon humedecido con Clorámino: la ropa, además de estar esterilizada, deberá ser fresca, holgada y que no desprenda fibras o partículas.

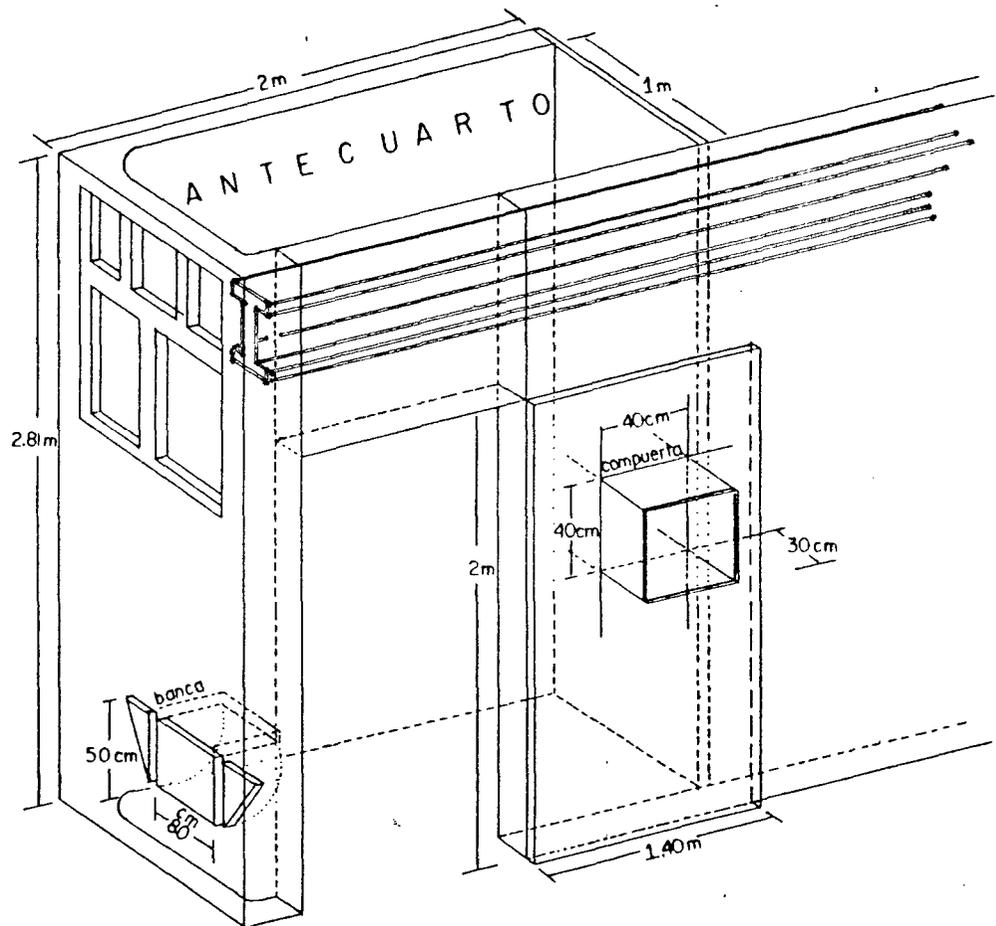


FIGURA 16 Isométrico del antecuarto mostrando sus dimensiones, un sistema de compuerta para la puerta de ingreso y la posición de la banca plegable.

En cuanto a las características de construcción, los techos, muros y pisos estarán perfectamente lisos y pintados con pintura epóxica de color blanco; las uniones o esquinas de los muros estarán terminadas en forma de media caña (opcional), para facilitar las labores de limpieza, evitar acumulaciones de partículas y microbios y ayudar al flujo del aire.

### 5.2.3 Sala de incubación

La condición más importante que se debe tener en el cuarto de incubación es la de mantener una temperatura constante, la cual oscile entre los 25 y 35 °C. Para este propósito es recomendable contar con aire acondicionado o, en su defecto, utilizar incubadoras.

Además, se debe de tener un buen control en la humedad relativa, ya que humedades altas facilitan la contaminación por microorganismos, presentándose principalmente en los tapones de algodón de los frascos o tubos de ensaye que contienen medios de cultivo, en donde fácilmente pueden germinar esporas y desarrollarse posteriormente.

En muchos laboratorios de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* los cuartos de incubación o las incubadoras se colocan cerca del laboratorio de química, pero es más deseable separarlos debido a que se liberan gases tóxicos de nitrógeno por la acción de la luz ultravioleta, o de monóxido de carbono por la flama de los mecheros que se utilizan para calentar las autoclaves, además de otros gases que se producen en el área de trabajo.

En esta sala se debe tener muy en cuenta las instalaciones eléctricas, pues las diferentes fases del crecimiento de los inóculos necesitan diferentes fotoperíodos, temperaturas e intensidades lumínicas (Ver Figuras 17 y 18).

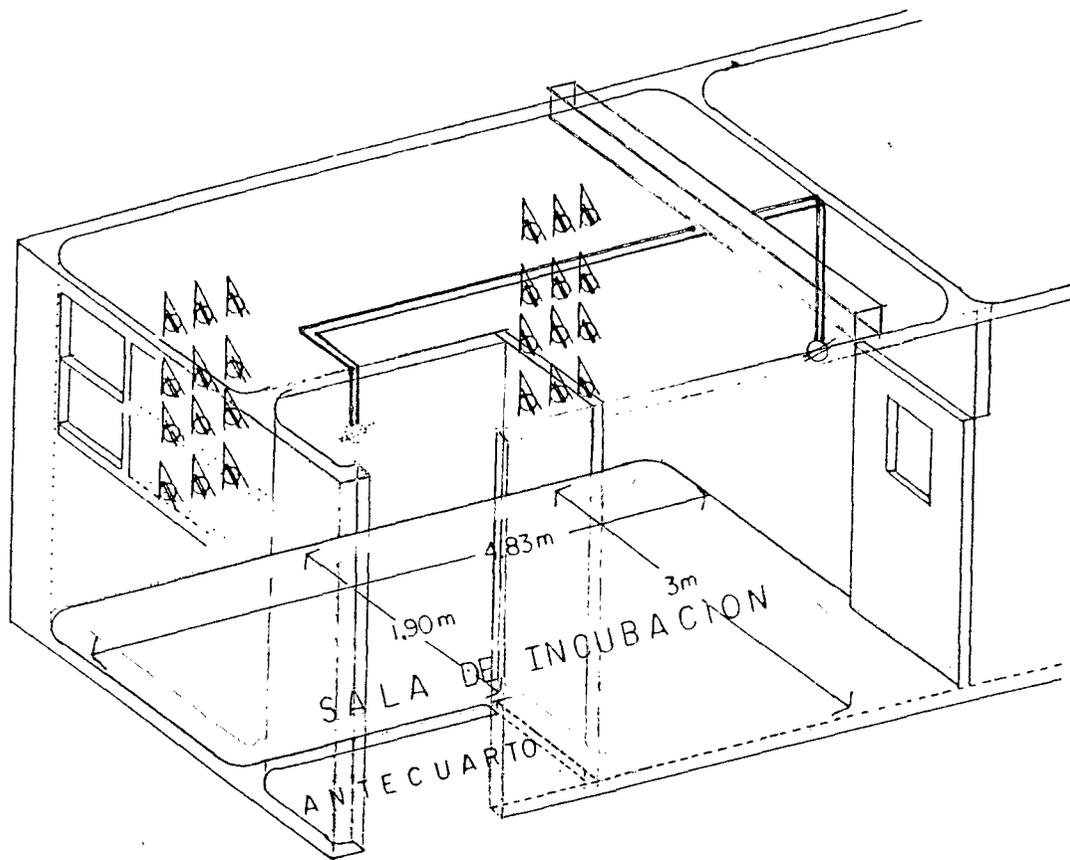


FIGURA 17 Vista en isométrico de la sala de incubación que nos muestra sus dimensiones, la posición del antecuarto con relación a la sala de incubación, las posiciones de los contactos para balastros y la posición de las tomas de energía

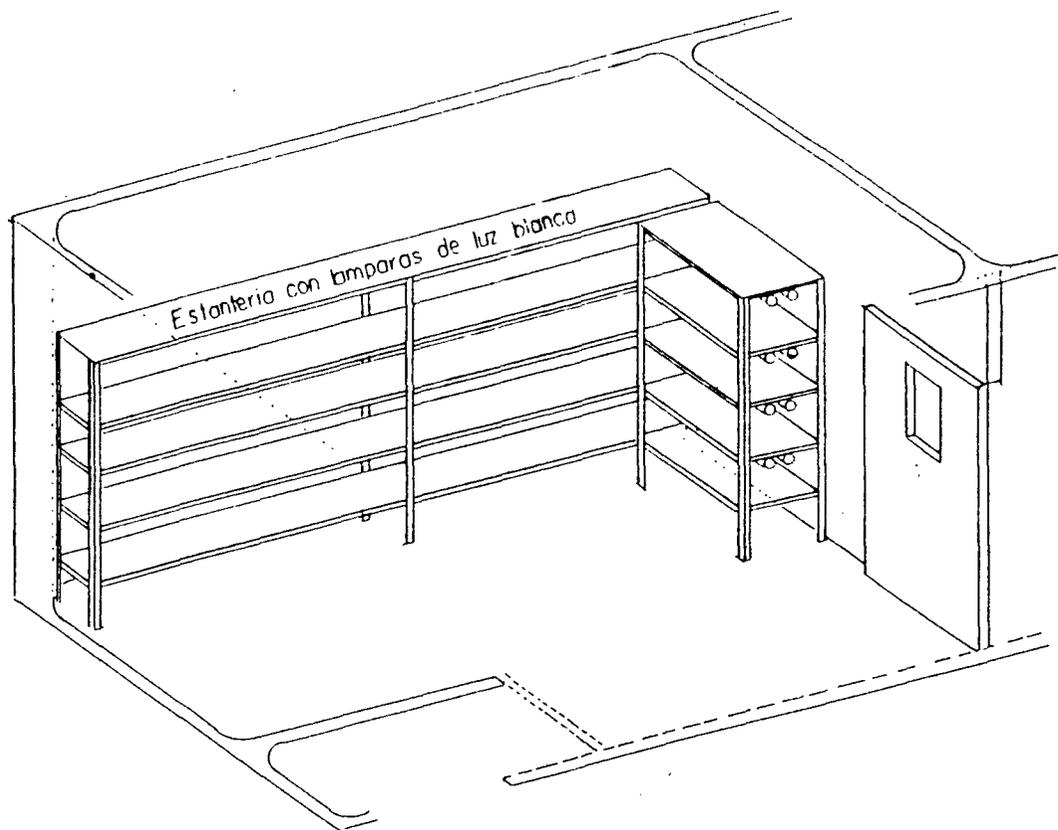


FIGURA 18 Vista en isométrico de la posición de la estanteria dentro de la sala de incubación.

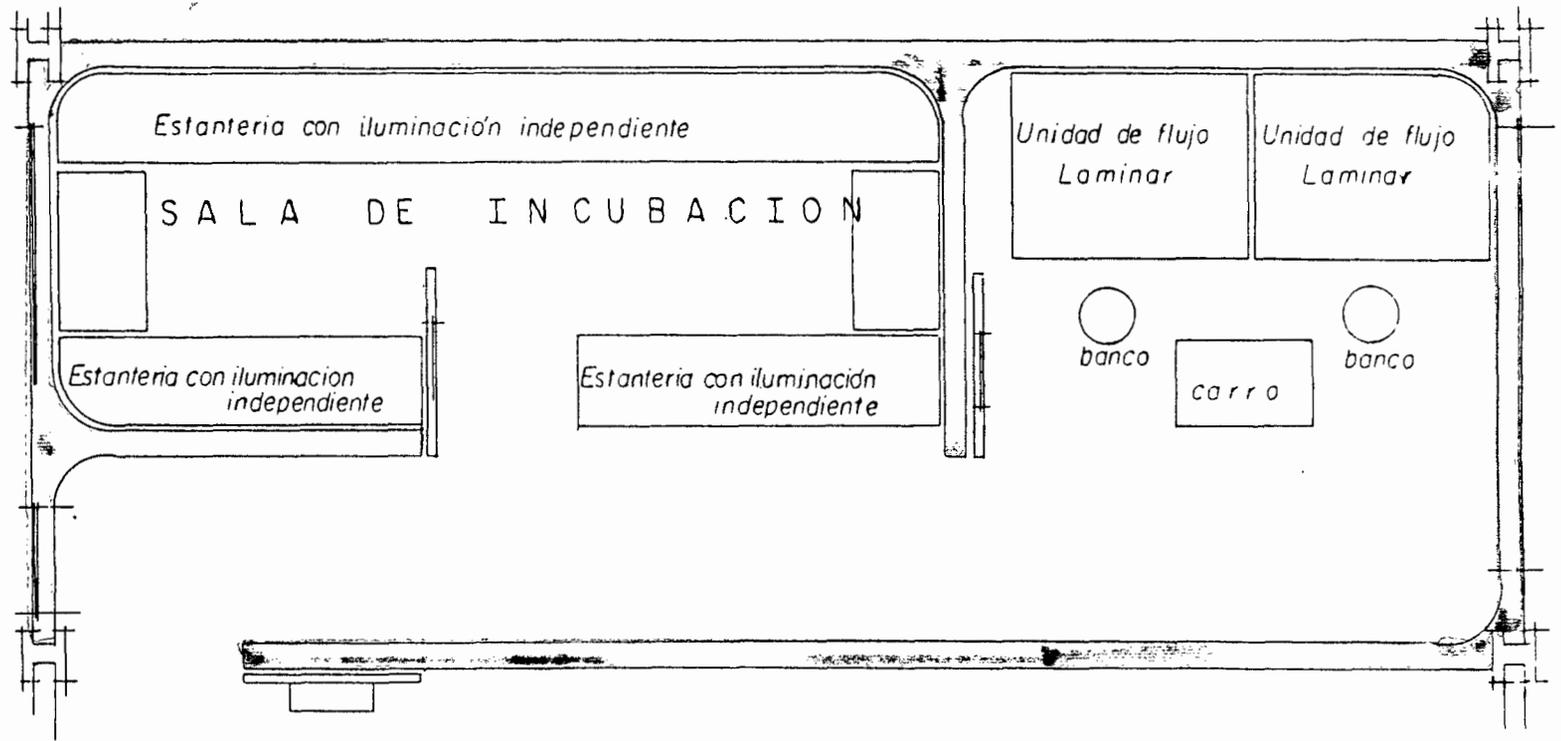


FIGURA 19 Plano en planta que nos presenta la ubicaci3n y distribuci3n de la sala de incubaci3n

A la sala de incubación se le divide generalmente en dos partes que son: un cuarto oscuro y un cuarto con luz controlada en cuanto a la longitud de onda y fotoperiodo (Vera figura 20).

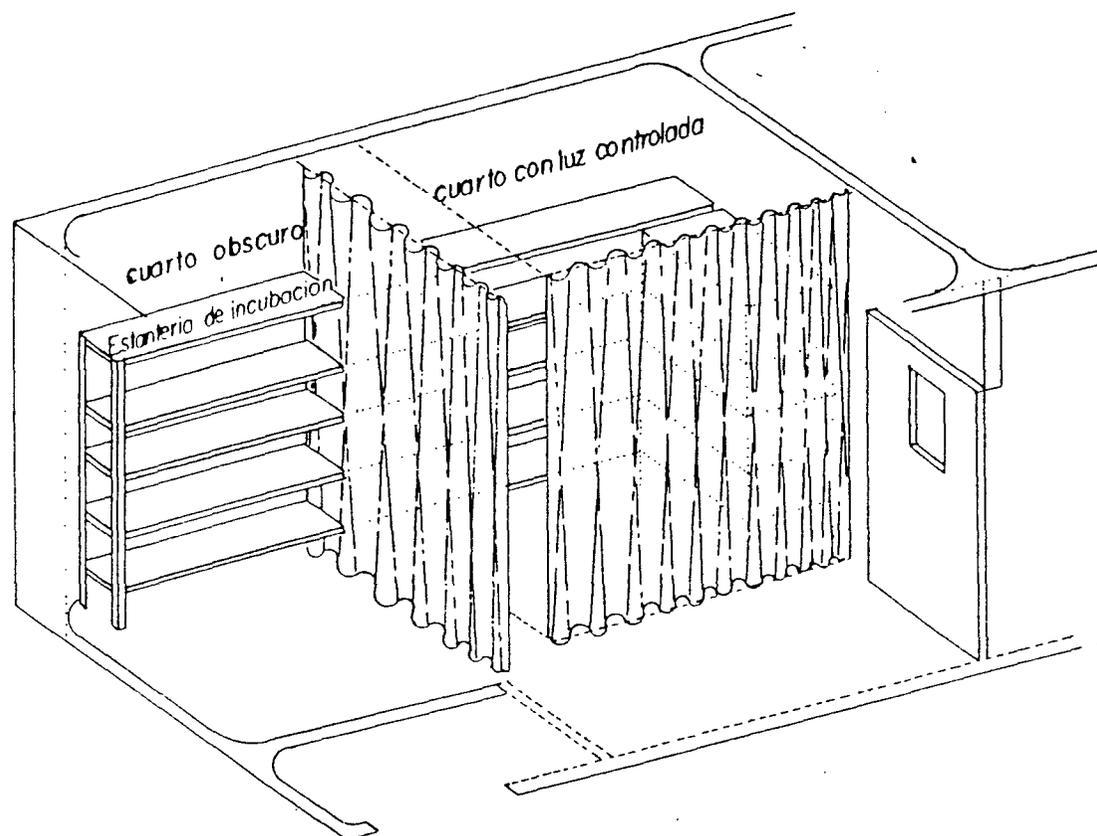


FIGURA 20 Vista en isométrico de la posición y división del cuarto oscuro y el cuarto con luz controlada

Para el control del fotoperiodo se utilizarán lámparas apropiadas según las necesidades e interruptores eléctricos con control de tiempo.

En este cuarto se instalarán estantes o anaqueles para colocar cultivos que no necesitan de movimiento y se podrán utilizar aparatos rotativos y de agitación para los medios que así lo requieran.

Además del equipo antes mencionado se deberá utilizar aire acondicionado filtrado, tener un buen control de temperatura: esto puede lograrse con el equipo de aire acondicionado y/o con la ayuda de equipo extra como ventiladores.

Para el transporte del material vegetal en el área de incubación se utilizarán charolas o canastillas cuando las cantidades sean pequeñas y un carrito anaquel cuando las cantidades sean mayores. (carrito tipo cantina)

Para poder establecer la sala de incubación se determinó una superficie que tiene un frente de 4.88 metros por un fondo de 3.10 metros, lo que hace un total de 12.37 metros cuadrados. A esto se le resta el área que ocupa el antecuarto, que es de 2.00 metros cuadrados, y nos queda una superficie aprovechable de 10.37 metros cuadrados, levantándose tres muros para su delimitación. Los muros tienen las características siguientes:

Primer muro Muro separador, que divide a toda el área establecida para el cultivo de tejidos vegetales por mitad; la altura de este muro es de 2.81 metros, con una longitud de 2.00 metros. Sirve para delimitar la superficie de la sala de incubación.

Segundo muro Muro que separa a toda el área estéril del laboratorio de química, con una altura de 2.81 metros y una longitud de 6.78 metros.

Tercer muro Este muro sirve para definir un antecuarto que funcionará como control de acceso a el área estéril; su altura es de 2.81 metros por una longitud de 2.10 metros. Ver Figura # 19.

El material para la construcción de los muros será de preferencia ladrillo de lama, arena amarilla, y cal de construcción. El recubrimiento de techos y muros levantados se hará con mezcla de 1/2 saco de mortero, 1 saco de cal y dos carretillas de arena amarilla y el terminado será lo más liso posible; las esquinas o juntas se harán a forma de media caña (opcional), para favorecer las labores de limpieza, evitar la acumulación de polvo y facilitar el flujo de aire.



#### 5.2.4 Sala de siembra y disección

Los trabajos que se realizarán en esta sala (Ver figura 22) son el de aislamiento, disección, siembra y transplante de tejidos vegetales. Durante la realización de estos trabajos se deberá conservar el cuarto lo más aséptico posible y evitar la entrada de aire no filtrado.

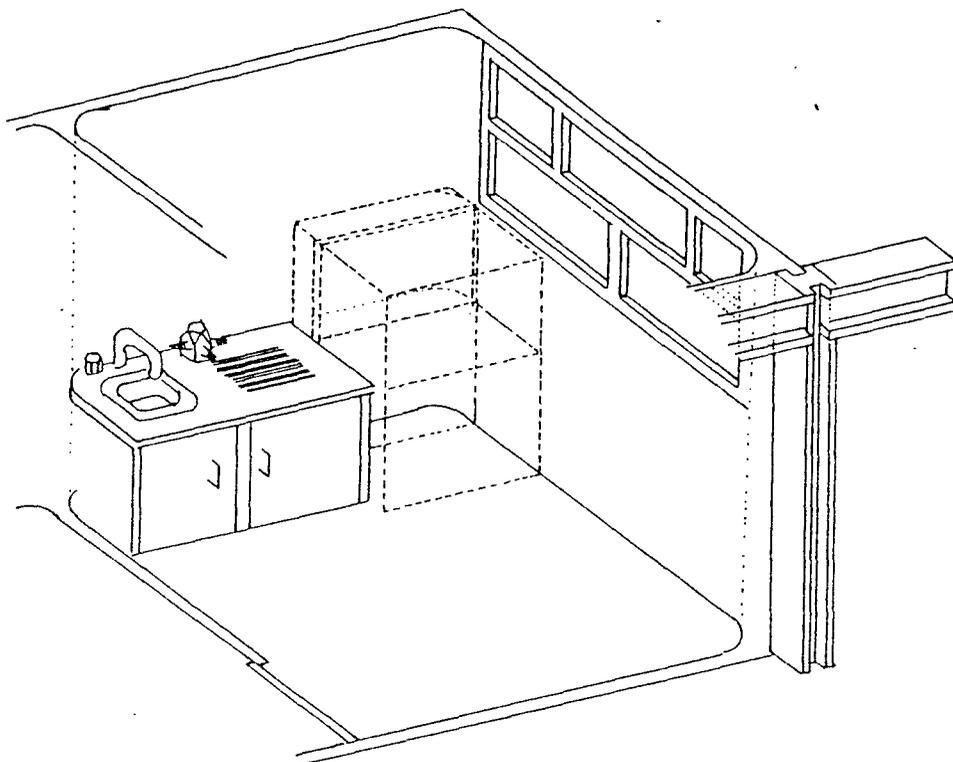


FIGURA 22 Vista en isométrico que muestra la posición del mobiliario y de la posible ubicación de una unidad de flujo laminar en la sala de siembra y disección.

Toda hendidura o grieta deberá de ser resanada y pintada con pintura del tipo epóxica, de color blanco e impermeable al agua.

Los pisos deberán de ser de preferencia de linóleoum, vinilo o mosaico.

La única puerta de acceso a esta sala será del tipo corrediza con las mismas características que la que da acceso a la sala de incubación, y para completar el perfecto funcionamiento de esta sala, contará con aire acondicionado filtrado y estéril, que será enviado a la sala de siembra a través de filtros especiales por un compresor.

Al estar presurizada esta sala, el aire circulará en un solo sentido que será hacia la sala de incubación y de ahí al antecuarto, saliendo de este último por la puerta de acceso a el área estéril.

Durante la realización de trabajos dentro del cuarto de siembra, la humedad y la temperatura aumentan considerablemente debido a la flama que se utiliza generalmente para realizar las operaciones en condiciones asépticas, por lo que tendrá aire acondicionado filtrado y estéril, especialmente cuando se trabaje por periodos prolongados.

### 5.2.5 Instalaciones eléctricas generales de las salas

Las instalaciones eléctricas para la iluminación contarán con dos tipos de luz: luz fría o blanca difundida por tubos fluorescentes de 75 Watts; y luz ultravioleta que deberá de colocarse en las mesas y paredes para esterilizar la sala de siembra (Ver figura 23).

Se debe tomar muy en cuenta el acomodo de este tipo de lámparas (ultravioleta) ya que no hay efecto esterilizador en los lugares en donde no pueda llegar este tipo de luz.

Dentro de ésta sala se tendrá como equipo de operaciones una mesa y una silla (lavables), un banco giratorio, anaquel o gabinete, carro de mano y disponibilidad de gas (opcional) y energía eléctrica. (Ver figura 25).

Una característica importante sobre las instalaciones eléctricas para la incubación e iluminación es que cada balastra se ubique fuera del área aséptica con el fin de evitar el calentamiento de la misma, ya que al estar funcionando la balastra produce calor (Ver figura 26).

A uno de los costados de la sala de siembra se encuentra un ventanal de celosías, las cuales se cambiaran por un cristal corrido que se fijará con silicón, con el fin de que quede lo mas sellado posible.

Y como equipo básico en la sala de siembra tenemos la unidad de flujo laminar de la que a continuación presentamos sus partes y características mas importantes.

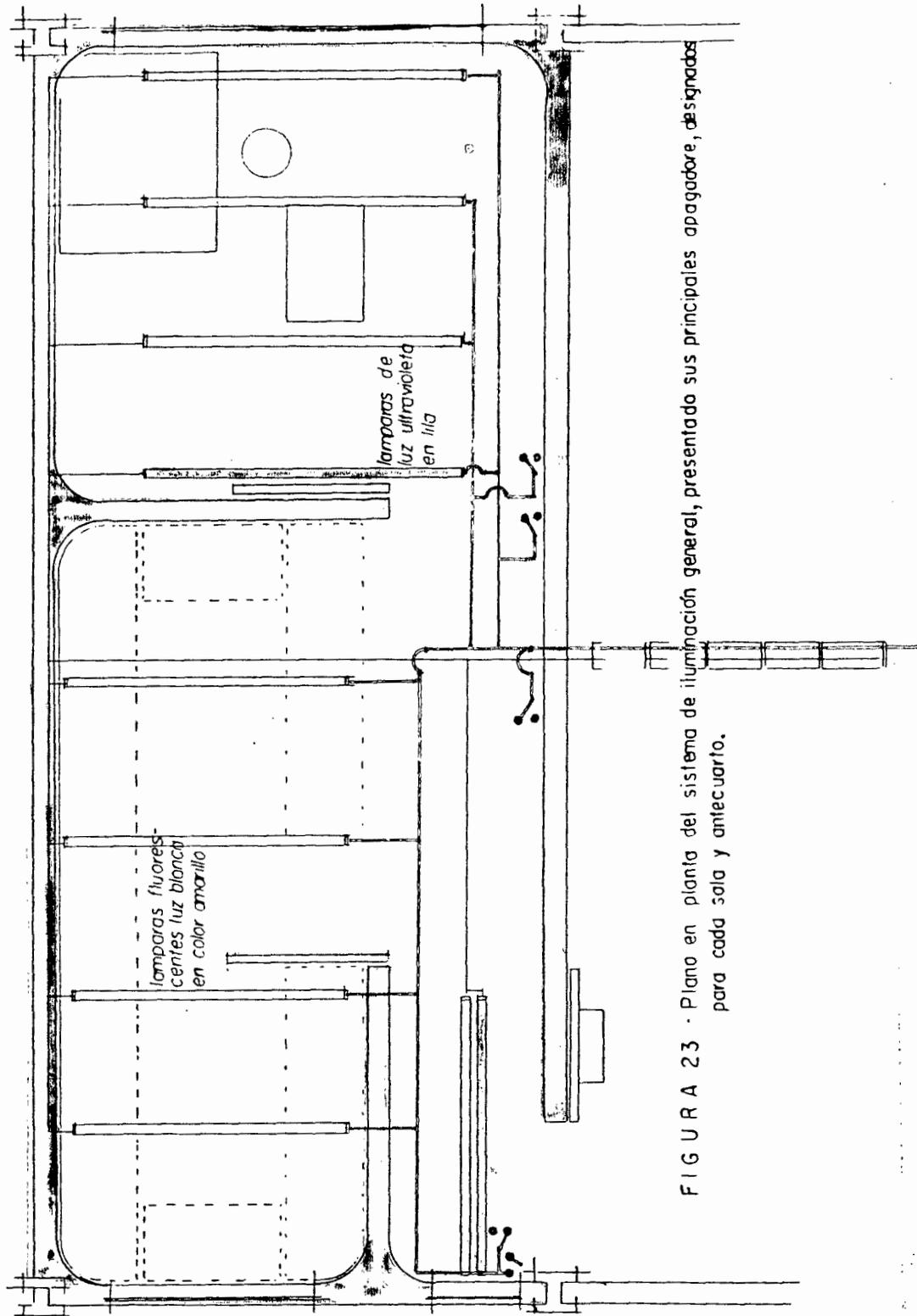


FIGURA 23 · Plano en planta del sistema de iluminación general, presentado sus principales apagadore, designados para cada sala y antecuarto.

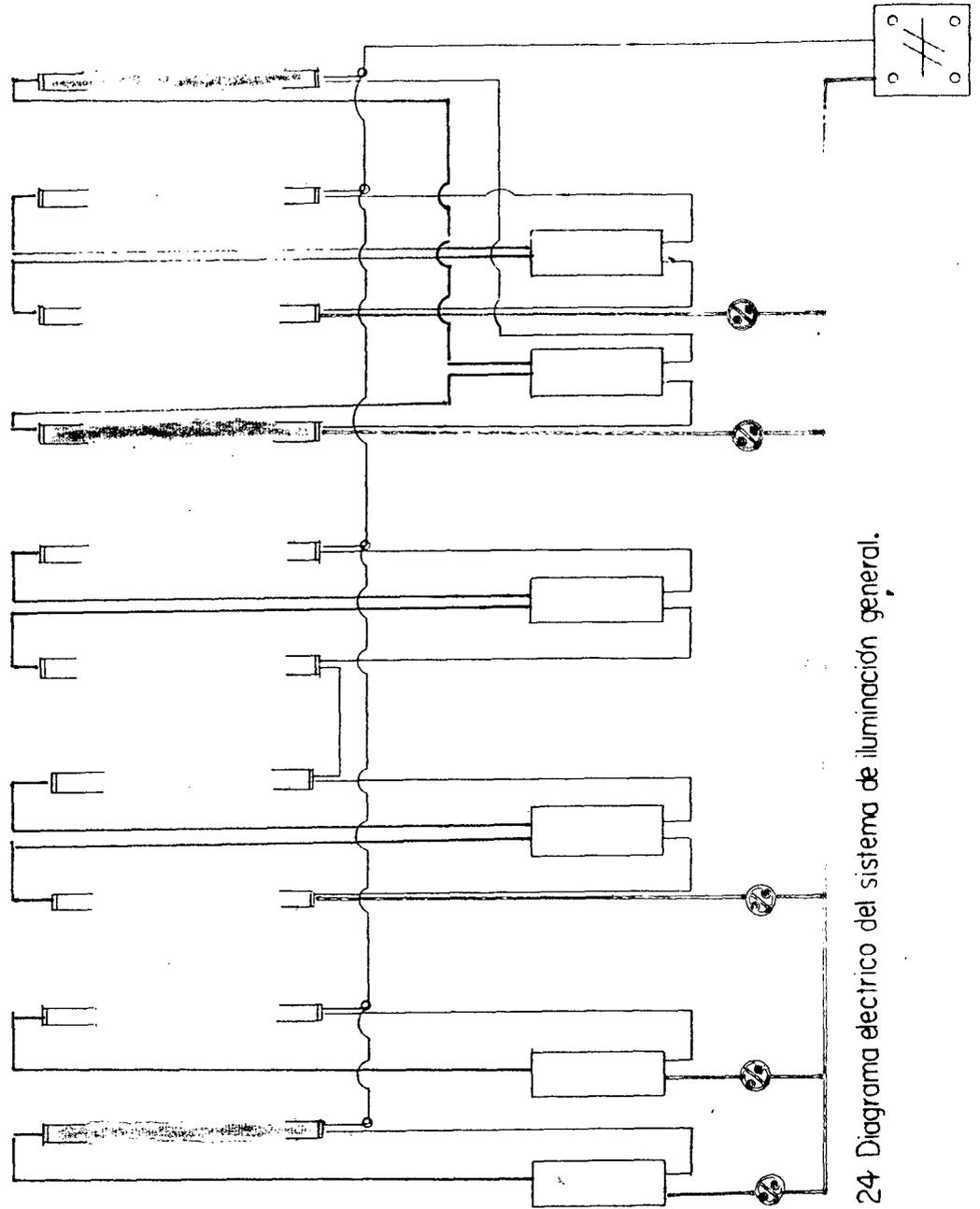


FIGURA 24 Diagrama electrico del sistema de iluminación general.

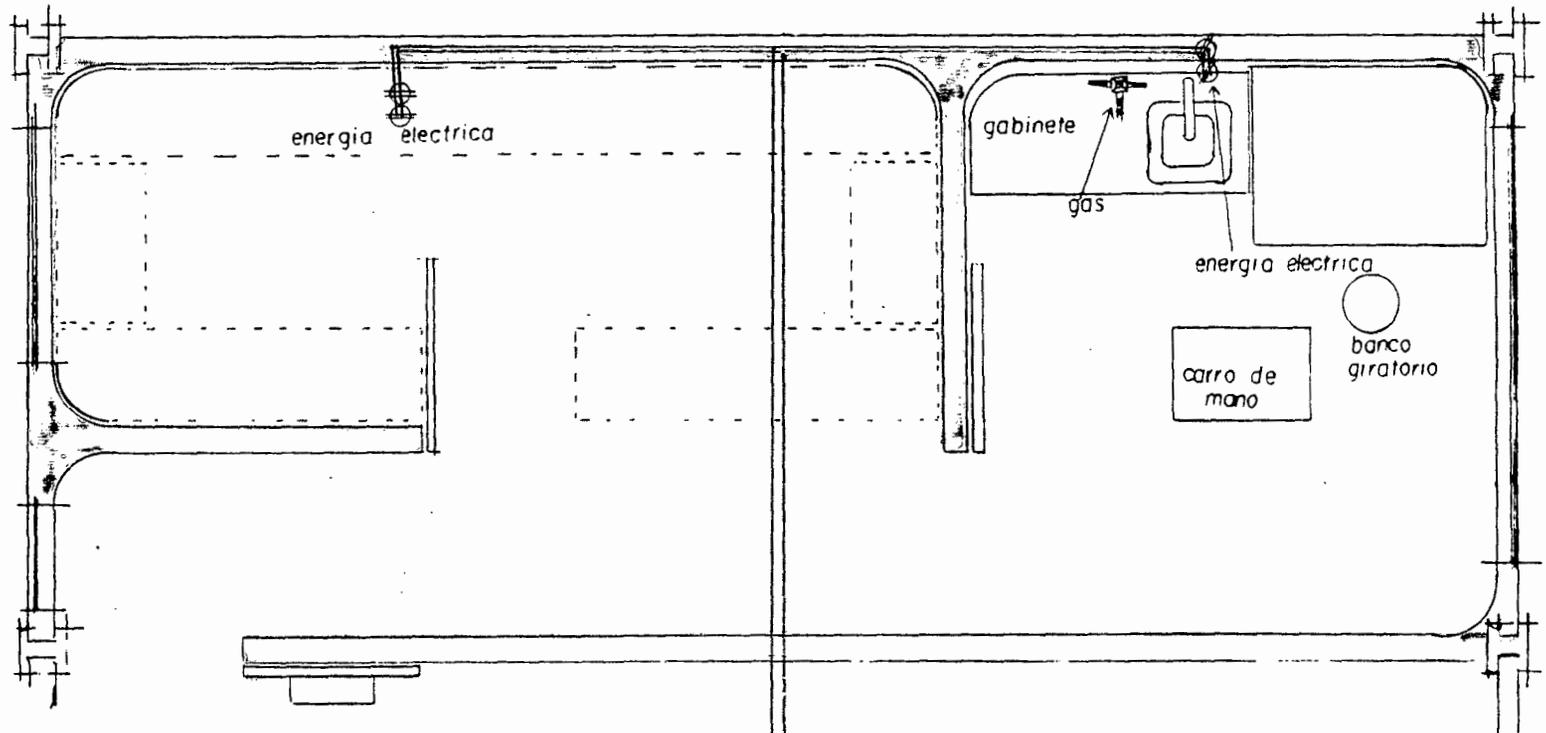
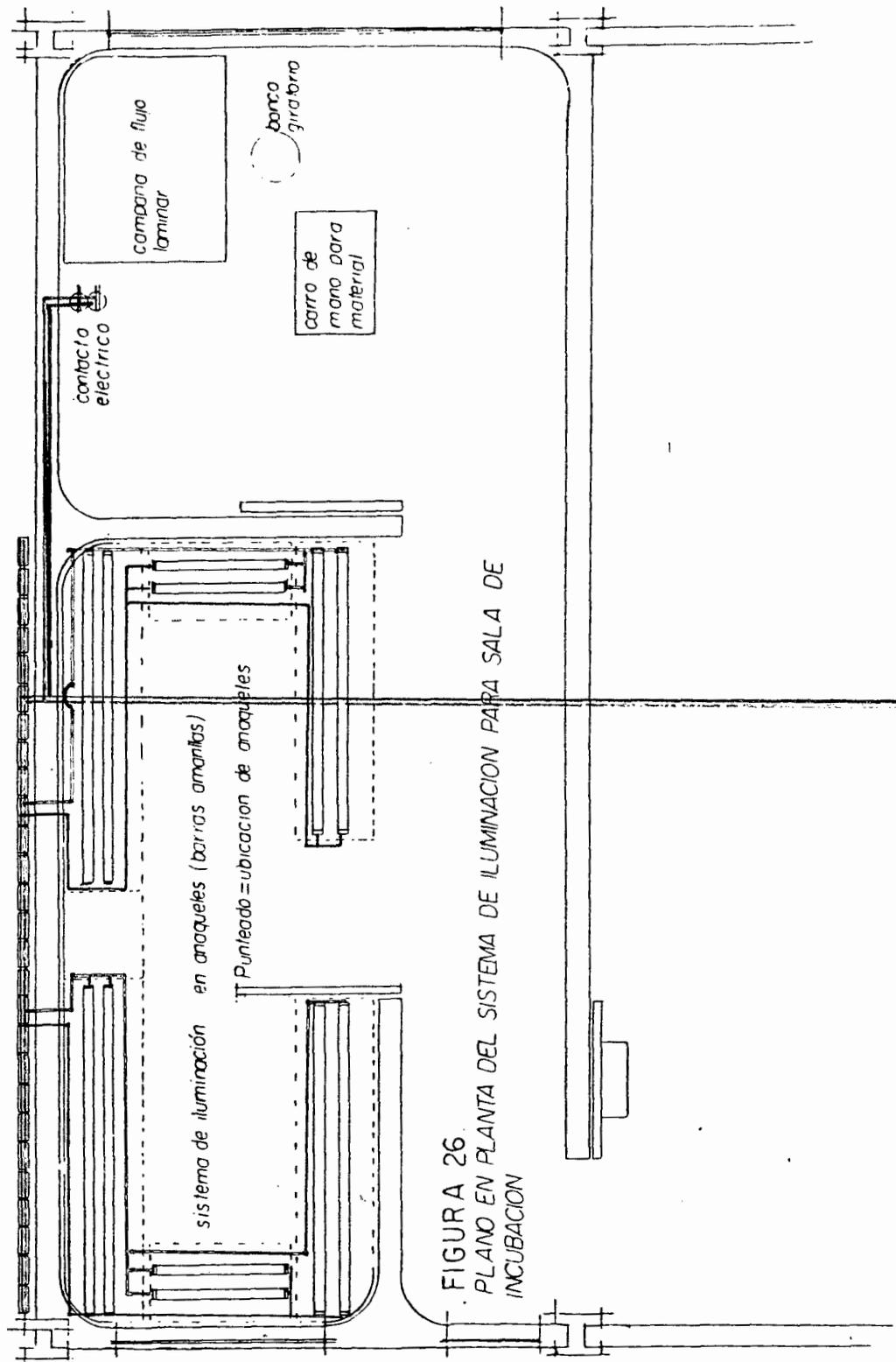


FIGURA 25 Plano en planta de la ubicación de tomas de electricidad y gas.



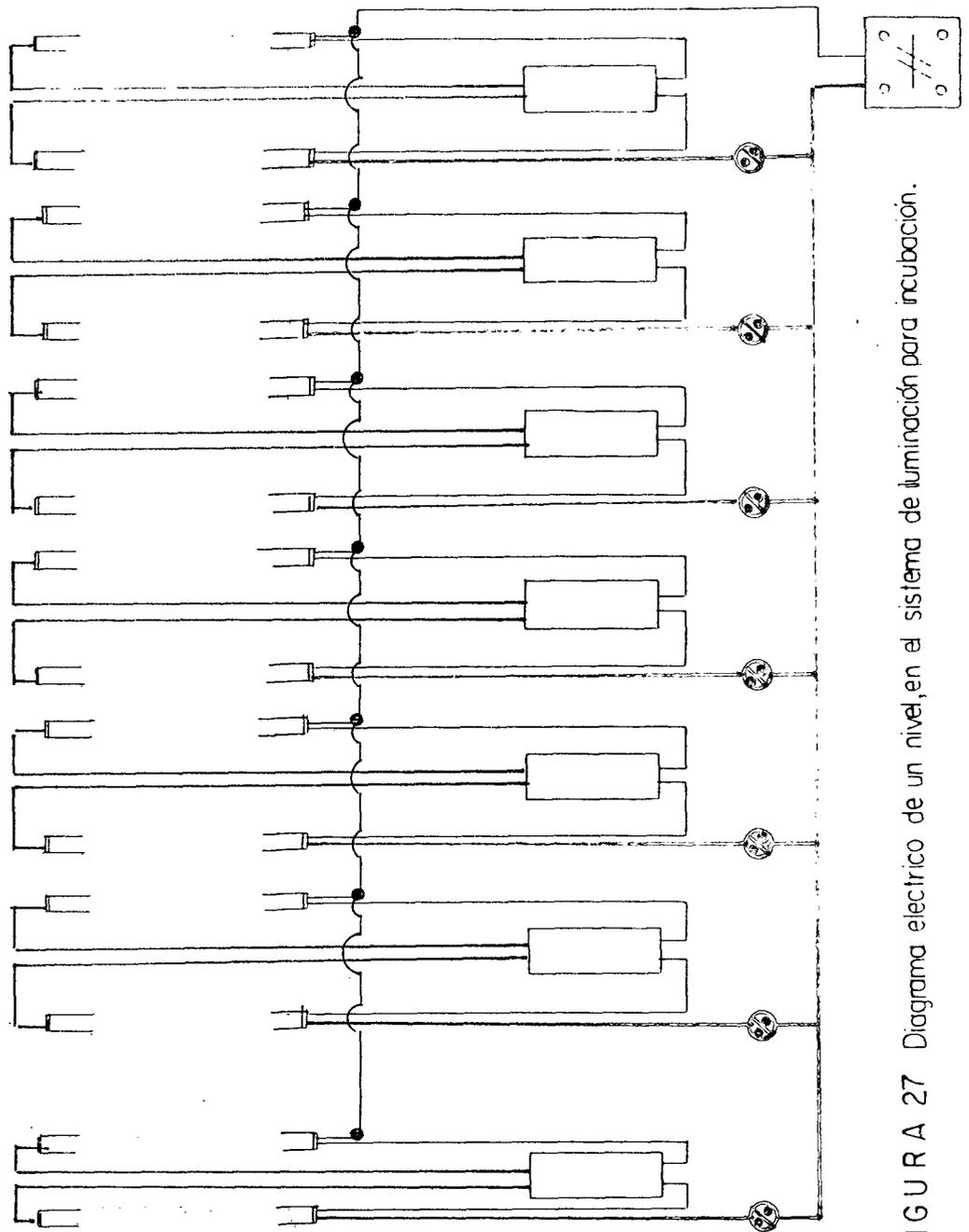


FIGURA 27 Diagrama electrico de un nivel, en el sistema de iluminacion para incubacion.

### 5.3 Unidad de flujo laminar

Las exigencias que se presentan en las instalaciones y equipo caracterizan los problemas que se deben superar en la planificación, diseño y construcción de equipo de protección.

Es por eso que como un pequeño tema aparte, pero que con una gran importancia, proponemos el diseño para la fabricación de una unidad de flujo laminar, con las siguientes características y condiciones:

Una garantía en equipo de protección puede obtenerse con los aparatos conocidos como unidades de flujo laminar, que pueden ser horizontales o verticales dependiendo del flujo de aire que se requiera (Ver figuras 28, 29, 30, 31)

#### 5.3.1 Descripción de las características del material para la construcción de una unidad de flujo laminar

- 1) Un filtro absoluto, con eficiencia del 99.97% y un poder de retención de partículas hasta de 0.3 micras.
- 2) Una estructura tubular de acero de 1 1/4 de pulgada.
- 3) Una mesa de trabajo con superficie de cristal de 4 mm con un sistema de protección lateral de cristal de 4 mm.

- 4) Un motor de 110 V para impulsar una turbina de 950 - 1.200 pies cúbicos por minuto, esto es, dependiendo del tamaño y capacidad del filtro.
- 5) Un interruptor para encendido y apagado del motor.
- 6) Un sistema de luz en el área de trabajo.
- 7) Un sistema de desplazamiento al piso.
- 8) Un prefiltro de fieltro con un marco metálico de aluminio.
- 9) Un marco de ángulo de fierro para sujetar y presionar herméticamente tanto al filtro como a la bolsa de plástico.
- 10) Bolsa hermética que cubre y conecta la salida del aire de la turbina, para conducir el flujo de aire hacia el filtro absoluto.
- 11) Cubierta de madera utilizada como fondo para el prefiltro de fieltro y también como protección para la bolsa hermética.
- 12) Doble interruptor para el sistema de iluminación de la unidad de flujo laminar.

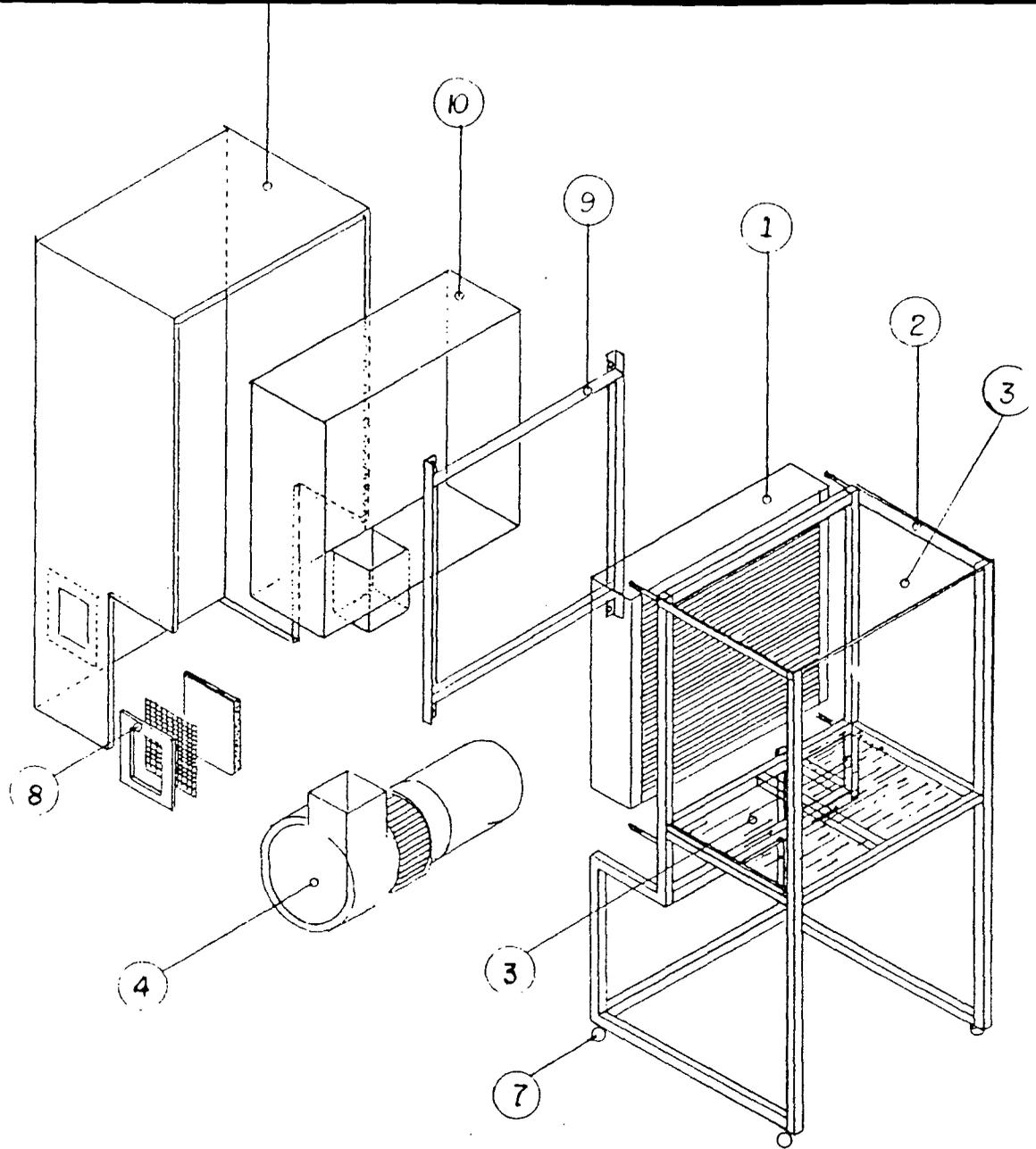


FIGURA 28 Dibujo en despliegue de todas las partes del diseño de una unidad de flujo laminar.

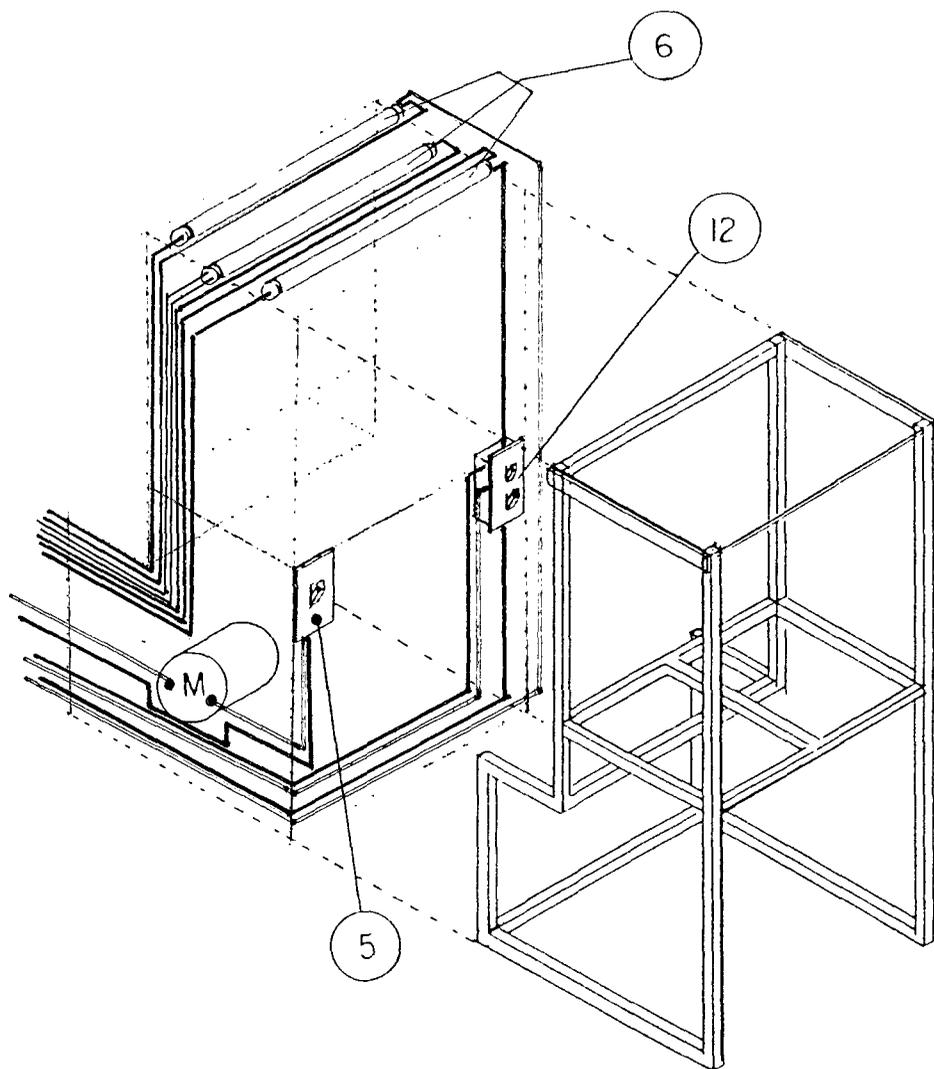


FIGURA 29 Despliegue del sistema electrico e iluminaci3n, de una unidad de flujo laminar.

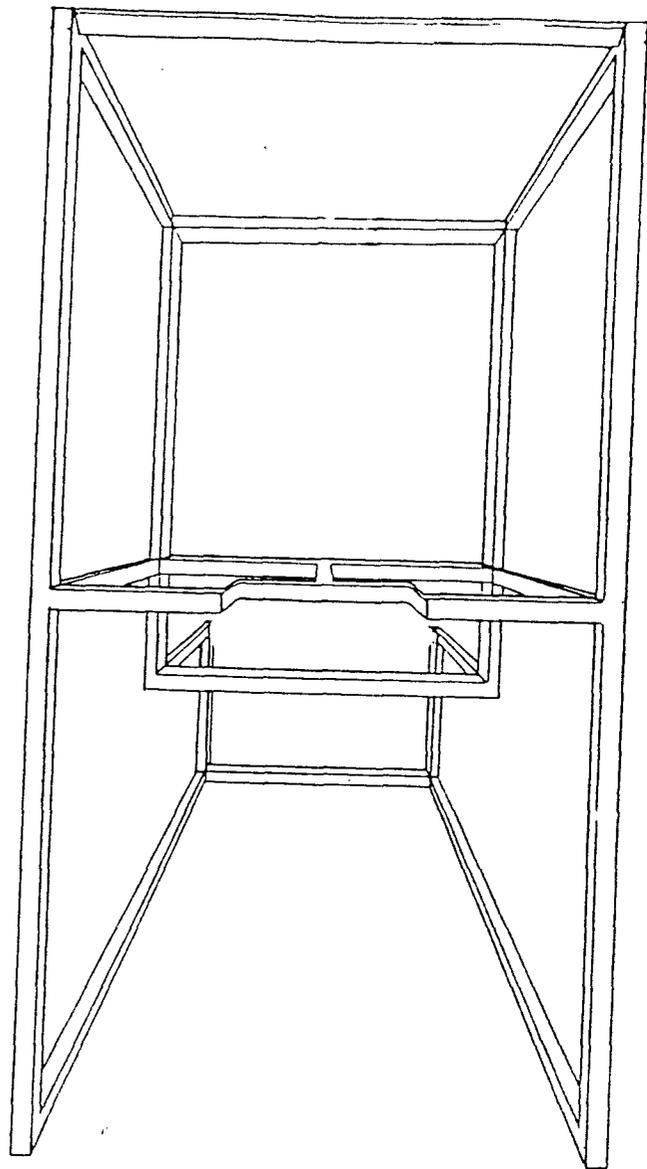


FIGURA 30 Dibujo en perspectiva por el frente de la estructura de la unidad de flujo laminar.

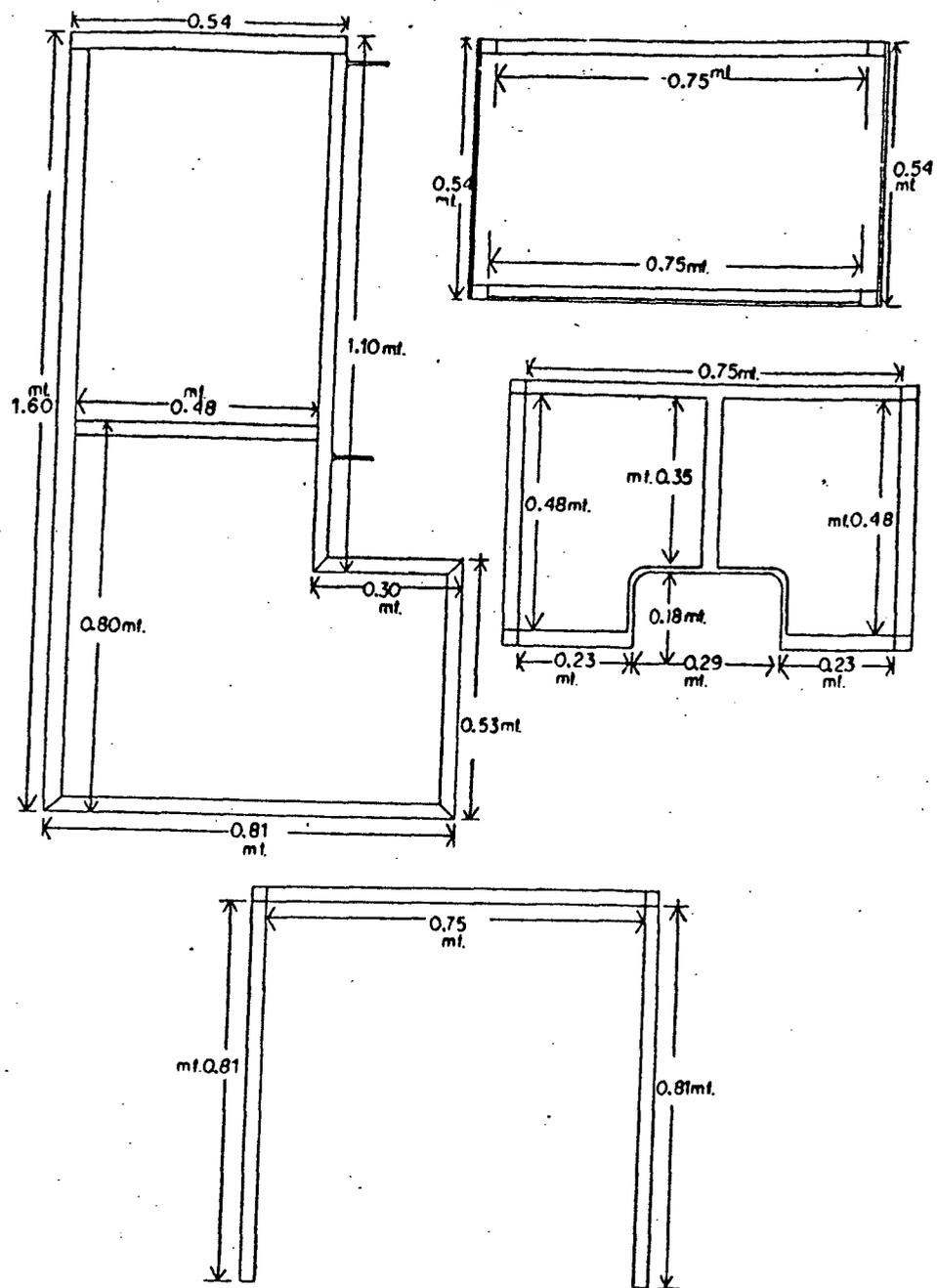


FIGURA 31 Dibujo de todas las vistas o caras con las medidas de cada una de las partes de la estructura de la unidad de flujo laminar.

#### 5.4 Alternativas de proyecto

Como alternativa de uso al área seleccionada para el cultivo de tejidos tenemos el diseño # 2 en donde reducimos el área dedicada al cuarto de siembra y se aumenta el área de incubación; también se cambia el diseño a uno menos complejo sin que por ello se piense que no puede tener el mismo éxito puesto que el uso de una unidad de flujo laminar si bien no nos da una seguridad de éxito del 100% si nos da un porcentaje aceptable, pues hay que tener en cuenta la contaminación sistémica de los tejidos que se usan normalmente.

En el diseño inicial se pueden usar de una a dos unidades de flujo laminar en el área seleccionada para ello, mientras que en éste diseño se puede manejar cómodamente una unidad (Ver figura 323), que si se trabaja en más de un turno nos da la misma eficiencia que dos unidades trabajadas sólo en un turno; por consiguiente tenemos un mayor uso de este recurso y también una superficie mayor para el área de incubación, que en el diseño anterior es de 19.27 metros cuadrados y en éste es de 28.16 metros cuadrados (un 46.1% más que el primero). El cuarto oscuro se puede simular cubriendo el anaquel con un lienzo que impida el paso de la luz hacia el interior y así se evita dedicar una área especial para este propósito.

Y por último presentamos el diseño # 3 que (Ver figura 33), es más sencillo que el anterior pero con un poco de más cuidados puede tener el mismo éxito que los anteriores, con la ventaja de que en éste diseño se logra tener la máxima área de incubación siendo esta de 33.39 metros cuadrados: un 73.39% más que en el diseño # 1.

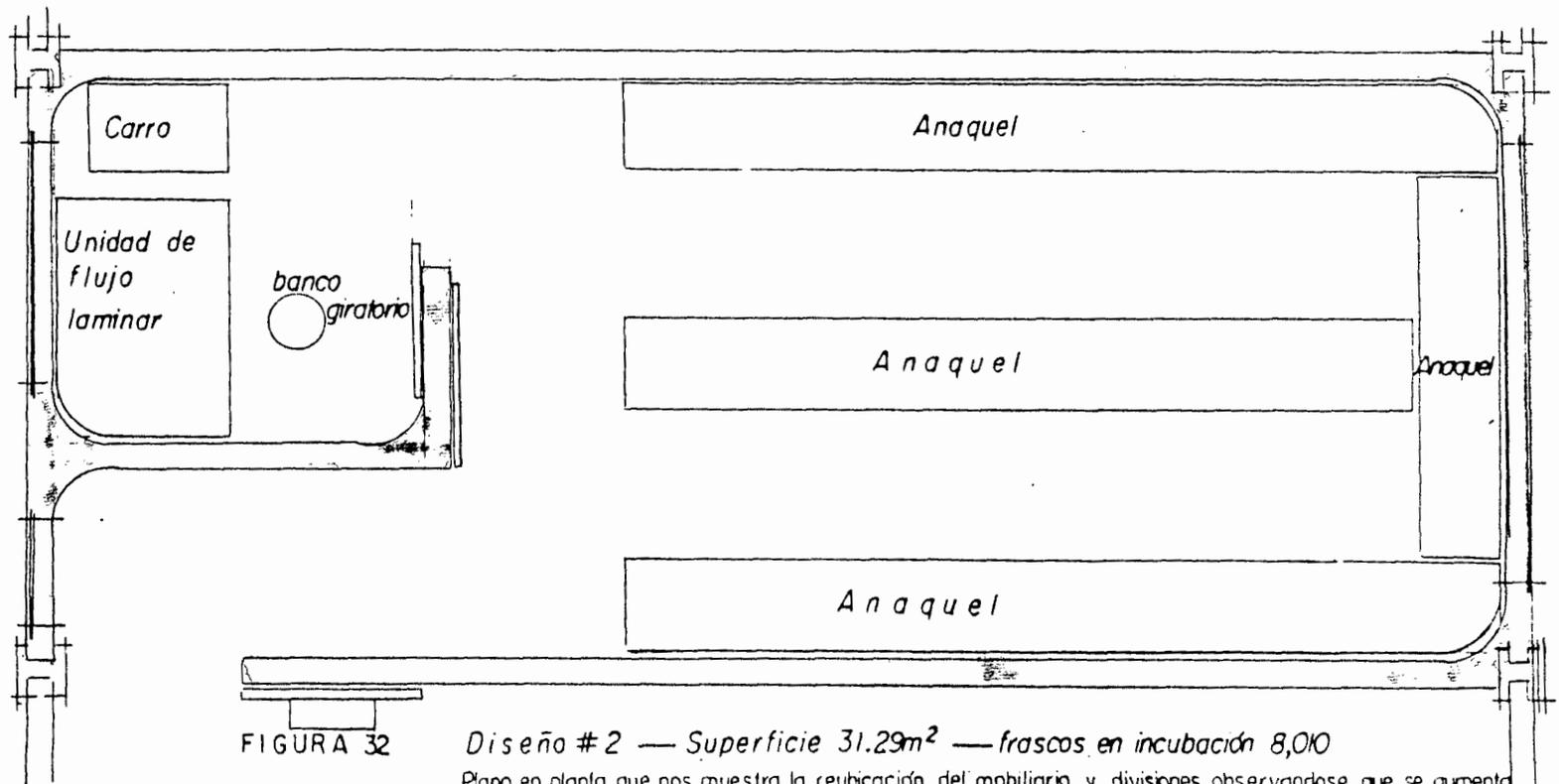
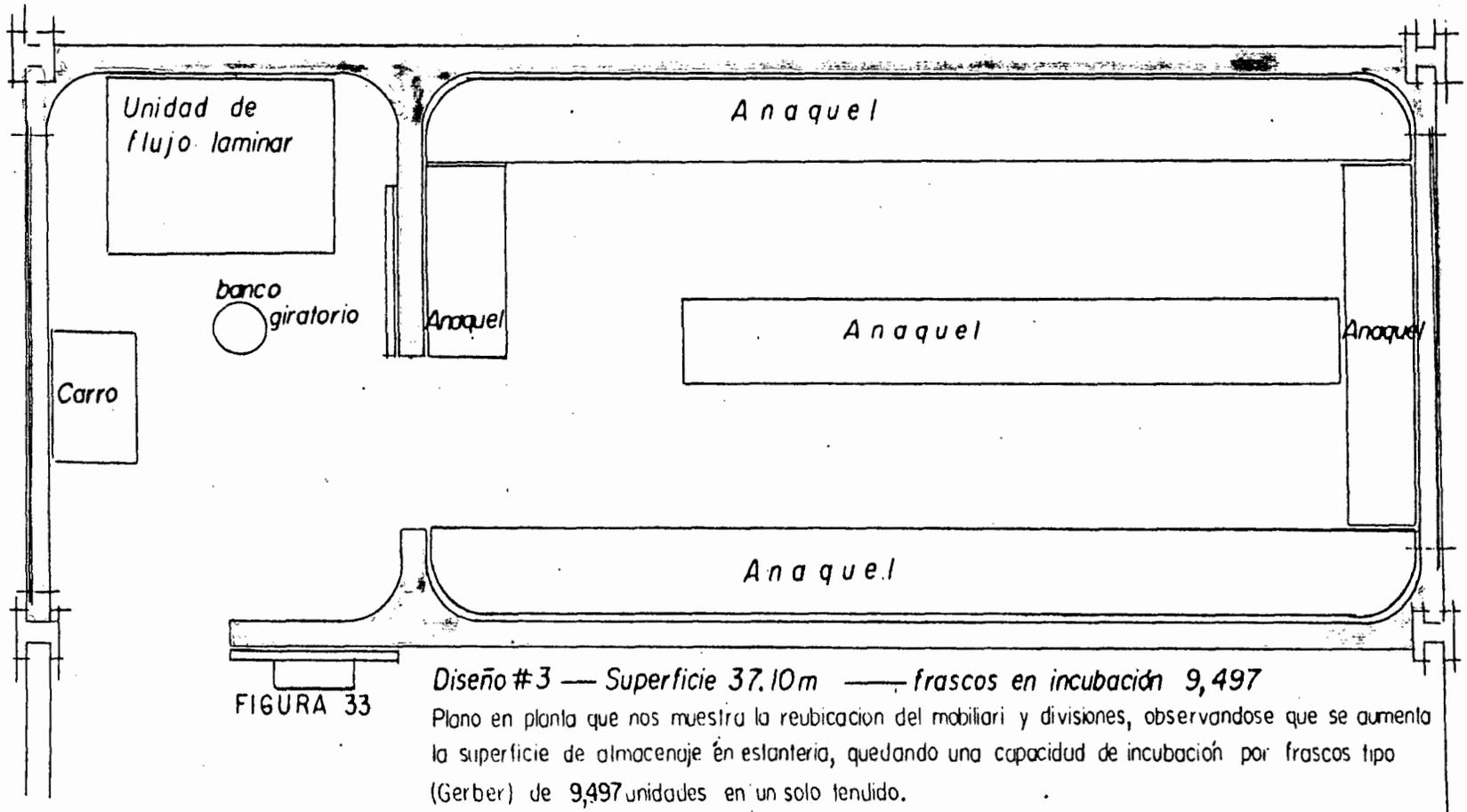


FIGURA 32

*Diseño #2 — Superficie 31.29m<sup>2</sup> — frascos en incubación 8,010*

Plano en planta que nos muestra la reubicación del mobiliario y divisiones, observándose que se aumenta la superficie de almacenaje en estantería, quedando una capacidad de incubación por frasco tipo (Gerber) de 8,010 unidades en un solo tendedero.



## 7.- PRESUPUESTOS

## 6.1 Obra negra:

PRESUPUESTO QUE SE PRESENTA A LA ATENTA CONSIDERACION DE LOS SRS. JOSE DE JESUS RAMIREZ MELINA E INDALECIO RIVERA PLASCENCIA PARA LA CONSTRUCCION DE OBRA NEGRA Y ACABADOS DE LA MISMA EN UN LABORATORIO EN LA FACULTAD DE AGRONOMIA DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA.

CONCEPTO	UNIDAD	CANTIDAD	PRECIO UNITARIO	IMPORTE
1.- Ranurar pisos de cemento con cincel y marro para empotrar muro de soga, incluyendo ranurado de 2 tramos de muro de soga.	m. l.	15.80	3,500.00	55,300.00
2.- Muro de soga de 11 cm de espesor con ladrillo de lama asentado con mortero calhidra-arena amarilla de 1:4, juntas de 1 cm promedio acabado comun (sucio).	m	26.20	20,893.66	547,413.89
3.- Dala intermedia a nivel de cerramiento f' c= 150 kg/cm con acero de refuerzo Armex 15-20-4, cimbra de madera 2 caras acabado comun de 15 x 20 cm.	m. l.	10.78	25,198.24	271,637.03
4.- Castillo de concreto f' c= 150 kg/cm con acero de refuerzo Armex, 4 varillas, cimbra de madera de 2 y 3 caras, acabado comun de 15 x 15 cm, Armex 15-15-4.	m. l.	20.02	26,645.63	533,445.61
5.- Aplanado de 3 cm de espesor en bóveda con mortero-calhidra-arena amarilla de 1:5, acabado pulido.	m	24.13	10,350.53	249,758.29

6.- Aplanado de 2 cm de espesor en muros, con mortero-calhidra-arena amarilla 1:5, acabado pulido.	m	99.30	8.037.44	798.117.79
7.- Boquillas en claros de puertas, con mortero-calhidra-arena amarilla 1:5 acabado pulido.	m. l.	9.31	1.849.42	17.218.00
8.- Suministro y colocación de puertas de tambor de madera-corredizas, incluye rieles y ganchos para colocar candados.	pzas.	3.00	160.000.00	480.000.00
9.- Pintura vinílica en muros y bóvedas, acabado pulido con dos aplicaciones (manos) como mínimo, calidad media.	m	123.43	4.447.31	548.931.47
10.- Limpieza gruesa durante la ejecución de la obra, por metro cuadrado de superficie construida, incluye sacar sobrantes y basura al exterior de la construcción.	m	26.33	407.88	10.741.11

TOTAL \$ 3'512.563.20

NOTA: Este presupuesto no incluye: acarreo de materiales al lugares fuera de la ciudad, gastos indirectos, ni utilidades de quienes se encargan de la obra.

A T E N T A M E N T E

GUADALAJARA, JAL., A 04 DE FEBRERO DE 1991

TALLER DE CONSTRUCCION DEL DEPTO. DE TRABAJO SOCIAL DE LA U DE G.

---

## 6.2 Instalaciones eléctricas

## PRESUPUESTO DEL SISTEMA DE ILUMINACION GENERAL

CONCEPTO	CANT.	UNIDAD	P. UNITARIO	IMPORTE
<b>1.- ELECTRIFICACION</b>				
Salida para lámparas con conductor THW calibre 18	7	Sal.	4.000	28.000
Salida para apagador tipo Italiano.	6	Sal.	4.000	24.000
Salida de balastra para lámpara con conductor TW calibre 18.	48	Sal.	4.000	192.000
			TOTAL =	\$ 244.000
<b>2.- ALUMBRADO</b>				
Bases de 2.00 m equipadas con tubos y reactor	2	Fza.	4.000	8.000
Bases de 1.00 m equipadas con tubo y reactor.	4	pza.	4.000	16.000
Bases de 1.80 m equipadas con tubos y reactor.	6	pza.	4.000	24.000
			TOTAL =	\$ 48.000
<b>3.- ALIMENTACION</b>				
Apagador tipo Italiano.	6	pza.	1.000	6.000
			TOTAL =	\$ 6.000

ELECTRIFICACION TOTAL = 244.000  
ALUMBRADO TOTAL = 28.000  
ALIMENTACION TOTAL = 6.000  
SUMA DE TOTALES = \$ 298.000

\*Nota: Los precios de mano de obra están sujetos a variación en el mercado. No se consideran aquí, trabajos de albañilería (ranuras, -cepas, registros, etc.).

FRESUPUESTO DEL SISTEMA DE ILUMINACION PARA SALA DE INCUBACION

CONCEPTO	CANT.	UNIDAD	P. UNITARIO	IMPORTE
<b>1.- ELECTRIFICACION</b>				
Salida para lámpara con ductor TW calibre 12.	24	Sal.	4.000	96.000
Salida para apagador tipo - Italiano.	24	Sal.	2.500	60.000
Salida de Balastras para -- lámpara con conductor TW -- calibre 18.	48	Sal.	4.000	192.000
			TOTAL	= \$ 348.000
<b>2.- ALUMBRADO</b>				
Bases de 2.00 m equipadas con tubos y reactor.	8	Pza.	4.000	32.000
Bases de 1.80 m equipadas - con tubos y reactor.	8	Pza.	4.000	32.000
Base de 90 cm equipada con tubos y reactor.	8	Pza.	4.000	32.000
			TOTAL	= \$ 96.000
<b>3.- ALIMENTACION</b>				
Contacto sencillo con clavi- ja.	50	Pza.	1.000	50.000
Apagador tipo Italiano.	24	Pza.	1.000	24.000
			TOTAL	= \$ 74.000

ELECTRIFICACION TOTAL = 348.000  
 ALUMBRADO TOTAL = 96.000  
 ALIMENTACION TOTAL = 74.000  
 SUMA DE TOTALES = \$ 518.000

\*Nota: Los precios de mano de obra -  
 están sujetos a variaciones -  
 en el mercado. No se conside-  
 ra aquí, trabajos de albañile-  
 ría ( ranuras, cepas, regis-  
 tros, etc.).

## PRESUPUESTO DE MATERIALES

CONCEPTO	CANT.	UNIDAD	P. UNITARIO	IMPORTE
Apagador tipo Italiano	30	Pza.	1.500	45.000
Contacto sencillo con clavija.	50	Pza.	1.400	72.500
Balastro de 75 Watts.	8	Pza.	31.331	250.000
Balastro de 55 Watts.	11	Pza.	29.000	319.000
Balastro de 40 Watts.	3	Pza.	17.000	51.000
Balastro de 30 Watts.	8	Pza.	12.125	97.000
Tubo fluorescente luz blanca de 75 Watts.	16	Pza.	8.500	133.000
Tubo fluorescente luz blanca de 55 Watts.	21	Pza.	8.000	168.000
Tubo luz ultravioleta de 40 Watts.	6	Pza.	50.000	300.000
Tubo fluorescente luz blanca de 30 Watts.	16	Pza.	9.500	152.000
Conductor de cobre con ferro verde tipo TW -- calibre 18.	164	m.	220	36.080
Conductor de cobre con ferro azul tipo TW -- calibre 18.	164	m.	220	36.000
Conductor de cobre con ferro negro tipo TW -- calibre 18.	15	m.	220	3.300
Conductor de cobre con ferro rojo tipo TW --- calibre 18.	15	m.	220	3.300
Conductor de cobre con ferro negro tipo TW -- calibre 12.	58	m.	680	39.440
Conductor de cobre con ferro rojo tipo TW --- calibre 12.	58	m.	680	39.440

Bases para tubo de 75 Watts.	32	Pza.	4.240	135.680
Canaleta de 2.00 mts.	16	Pza.	6.685	106.960
Base para tubo de 55 Watts.	42	Pza.	4.240	178.080
Canaleta de 1.80 mts.	21	Pza.	6.685	140.385
Bases para tubo de 40 Watts.	12	Pza.	4.600	55.200
Canaleta de 1.20 mts.	6	Pza.	3.825	22.950
Base para tubo de 30 Watts.	32	Pza.	4.600	147.200
Canaleta de 1.00 mts.	16	Pza.	3.825	61.200
			<u>SUMA TOTAL = \$ 2'595.795</u>	

\* Nota: Los precios del material están sujetos a variación en el mercado.

PRESUPUESTO TOTAL DE INSTALACIONES ELECTRICAS

A) PRESUPUESTO DEL SISTEMA DE ILUMINACION GENERAL (MANO DE OBRA).....	298.000
B) PRESUPUESTO DEL SISTEMA DE ILUMINACION PARA LA SALA DE INCUBACION (MANO DE OBRA).....	518.000
C) PRESUPUESTO DE MATERIALES.....	2'595.795
<u>TOTAL = \$ 3'411.795</u>	

\*\*Nota: NO se incluye el costo de diseño del proyecto así como la asesoría y realización de la obra.

GUADALAJARA JAL., ABRIL DE 1991

ATTE. ONMSA ING. EMILIO PEREZ RAMIREZ.

6.3 Presupuesto de suministro e instalación del sistema de aire acondicionado.

PARTIDA	CONCEPTO	UNIDAD	CANTIDAD	P.UNITARIO	IMPORTE
	Unidad manejadora de aire MCA RECOLD modelo AH-35 FC equipada con motor de 1.5 H.P.A 220 /3/60 y transmisión de poleas y bandas, integrada con sección de ventiladores, caja y filtros planos, charola de condensados, serpentín DX 4 MC A 450 en la succión.	Pza.	1	6'325.000	6'325.000
	Unidad de refrigeración MCA YORK, tipo dividido modelo H2 CB-036S-A25, con capacidad para enfriar 36.000 BTU/HR. (3 T.R. nominales), integrada con un compresor tipo hermético, serpentín condensador enfriado por aire, un abanico de aspas de 18" de diámetro y motor de 1/4 de H.P., todo esto montado en gabinete de lamina galvanizada pintada al horno con características eléctricas 220/1 /60 volts., con un consumo total de 22 ampers. y un peso operación de 70 Kgs..	Pza.	1	2'600.000	2'600.000
	Termostato de refrigeración MCA. HONEYWELL, mod. T42B 1027, para una etapa de refrigeración.	Pza.	1	436.200	436.200
	Lamina galvanizada de primera calidad para fabricación de ductos de inyección y retención de aire calibre 24.	kgs.	380	3.550	1'349.000
	Banco de filtros a base de lamina galvanizada calibre 22.	Pza.	1	350.000	350.000
	Filtro absoluto marca VECO o similar para 1600 PCM, modelo HEPA-25; (30" x 48" x 57/8").	Pza.	1	1'450.000	1'450.000
	Filtro de bolsas marca VECO o similar para 1600 PCM modelo - FVAV-2000C VECOFLOW.	Pza.	1	305.000	305.000

Filtro de cartucho marca VECO o similar para 800 PCM, modelo J-060-2 VECOFLOW, de 20" x 25" x 1".	Pza.	2	42.000	84.000
Junta flexible antivibratoria para la interconexión de los equipos al sistema de ductos, fabricadas en marco de lamina galvanizada y lona ahulada calibre 10.	Pza.	2	50.000	100.000
Aislamiento térmico tipo exterior para ductos de retorno a base de placa de poliestireno expandido de 1" de espesor, adherida al ducto con Kold-fas. Impermeabilizada con HI-MASTIK con barrera de vapor de CI-MASTIK y un terminado en manta de poro cerrado y pintura blanca ahulada.	2 Mts.	53	32.320	1'712.960
Sistema de difusión de aire a base de difusores y rejillas de retorno, fabricadas en lamina de acero, con pintura electrostática al horno, en color blanco ostión, de acuerdo a la siguiente relación:				
Rejillas de inyección 14"x12"	Pza.	3	32.550	97.650
Rejilla de retorno de 20"x12"	Pza.	2	39.000	78.000
Toma de aire exterior de 8"x8"	Pza.	1	12.800	12.800
Soportería para ductos a base de colgantes de solera de 3/4" x 1/8" y ángulo de acero, tornillería y tuercas, soldadura eléctrica, etc.	FDA	1	101.140	101.140
Partida por concepto de mano de obra para la fabricación de ductos de alimentación y retorno de aire. Incluye: habilitación, armado, montaje a cualquier nivel y nivelación -- los mismos, así como el sellado del mismo con emulsión asfáltica.	Kg.	380	2.800	1'064.000

BIBLIOTECA ESCUELA DE AGRICULTURA 24

Partida por mano de obra para la instalación del aislamiento térmico a base de placa de poliuretano expandido:

Acabado tipo exterior.	mts.	53	23.600	1'250.800
Mano de obra para la instalación y ajuste de difusores de inyección de aire incluye habilitación y elementos de fijación.	Pza.	6	18.750	112.500
Mano de obra para la instalación de soportería para ductos de alimentación y retorno de aire.	FDA.	1	62.000	62.000
Partida por concepto de interconexión eléctrica final, arranque del sistema, pruebas y ajustes.	PDA	1	650.000	650.000
Partida por concepto de supervisión de obra y coordinación de los trabajos por un ingeniero especializado.	FDA	1	950.000	950.000
Partida por concepto de fletes y acarreos de materiales al lugar de la obra.	FDA	1	1'200.000	1'200.000
Partida por maniobras mecánicas y manuales para colocar equipos en sus bases.	FDA	1	750.000	750.000

TOTAL = \$ 21'041,250

\*Nota: mas el 15% del I.V.A.

GUADALAJARA JAL., A 9 DE ABRIL DE 1991

A T E N T A M E N T E

TEMPERATURA PROYECTADAS S.A. DE C. V.  
ING. AGUSTIN CALDERON GUARDADO

6.4 Presupuestos de estanteria

DISEÑO # 1

CONCEPTO	UNIDAD	CANTIDAD	P. UNITARIO	IMPORTE
Chavetas de lamina de acero pintadas de color gris calibre 22 de 1.95x.45 m.	Pza.	63	9.500	600.500
Poste angular de lamina de acero perforada calibre 18 de 2.20 m de longitud.	Pza.	28	6.500	182.000
Tornilleria completa (con 2 rondana planas, 1 rondana de presión y tuerca) de 1/4" de diámetro por 1/2" de largo.	Pza.	140	155	31.700
Armado y colocación de estanteria.	Ensamble	140	1.428.57	200.000
TOTAL =				\$ 989,200

\*Nota: En el total esta incluido el I V.A. así como el flete del material.

GUADALAJARA JAL., A 1 DE ABRIL DE 1991

EQUIPOS PARA COMERCIO ALESA  
SISTEMAS DE ALMACENAJE

A T E N T A M E N T E

GERENTE: JUAN PARTIDA GARCIA

PRESUPUESTOS DE ESTANTERIA

DISEÑO # 2

CONCEPTO	UNIDAD	CANTIDAD	P. UNITARIO	IMPORTE
Chapas de lamina de acero pintadas de color gris calibre 22 de .85x.45 m.	Pza.	92	8.500	782.000
Poste angular de lamina de acero perforada calibre 18 de 2.20 m. de longitud.	Pza.	40	6.500	260.000
Tornillería completa (con 2 rondanas planas, 1 rondana de presión y tuerca) de 1/4" de diámetro por 1/2 de largo.	Pza.	210	155	32.550
Armado y colocación de estantería.	Ensamble	210	1.428.57	300.000
			TOTAL - \$	1.374.450

\*Nota: En el total esta incluido el I.V.A. así como el flete del material.

GUADALAJARA JAL., A 1 DE ABRIL DE 1991

EQUIPOS PARA COMERCIO ALESA  
SISTEMAS DE ALMACENAJE

A T E N T A M E N T E

GERENTE: JUAN PARTIDA GARCIA

PRESUPUESTOS DE ESTANTERIA

DISEÑO # 3

CONCEPTO	UNIDAD	CANTIDAD	P. UNITARIO	IMPORTE
Charolas de lamina de acero pintadas de color gris calibre 22 de .85x.45 m.	Pza.	100	8.500	826.500
Poste angular de lamina de acero perforada calibre 18 de 2.20 m de longitud.	Pza.	46	6.500	299.000
Tornillería completa (con 2 rondanas planas, 1 rondana de presión y tuerca) de 1/4" de diámetro por 1/2" de largo.	Pza.	240	155	37.200
Armado y colocación de estanteria.	Ensamble	240	1.428.57	342.857
			TOTAL = \$	1.605.557

\* Nota: En el total esta incluido el I.V.A. así como el flete del material.

GUADALAJARA JAL., A 1 DE ABRIL DE 1991

EQUIPOS PARA COMERCIO ALESA  
SISTEMAS DE ALMACENAJE

A T E N T A M E N T E

GERENTE: JUAN PARTIDA GARCIA

6.5 Presupuesto de mobiliario y equipo

CONCEPTO	UNIDAD	CANTIDAD	P. UNITARIO	IMPORTE
MUEBLES:				
Carrro de mano tipo cantina, con charolas de acero inoxidable.	Pza.	1	487.000	487.000
Banco giratorio para laboratorio con espaldera para 12 horas de trabajo.	Pza.	1	338.000	338.000
Silla lavable plegable de acrílico transparente.	Pza.	1	73.000	73.000
EQUIPO:				
Unidad de flujo laminar	Pza.	1	9'056.171	9'056.171
			TOTAL - \$	9'958.171

\*Nota: En el total no está incluido el I.V.A.

GUADALAJARA JAL., A 26 DE ABRIL DE 1991

VECO GRUPO DEVINSA

A T E N T A M E N T E  
 ASESOR TECNICO: JOSE LUIS ARGUELLES

American Journal Hospital Pharmacy. January 1980. BIOMEDICAL APPLICATIONS OF LAMINAR AIRFLOW. Vol. 18

American Journal Hospital Pharmacy. Nov. 1982. FORMALDEHYDE DECONTAMINATIONS OF LAMINAR FLOW BIOLOGICAL SAFETY CABINETS. Vol. 38

Auge R., Beauchesne G., Boccon J., Decourtye L., Digat B., 1986 CULTIVO IN VITRO. Editorial: CIENTIFICA (FML).

CONACYT. 1981 Transplante y Movilización de Genes. México.

Hurtado M. Daniel V., Merino M. M. E. Abril 1987. CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES. Instituto de Biología de la U.N.A.M. Editorial: Trillas.

Hospital Pharmacy. Nov. 1981 ASEPTIC TECHNIQUE A SAFETY PRECAUTION. Vol. 16

Organization of the United Nations. Roma 1987. TISSUE CULTURE OF SELECTED TROPICAL FRUIT PLANTS. Plant Production and Protection. (paper 69).

Parental Drugs Association. Filadelfia 1981. LAMINAR AIR FLOW.

Solomon E.P., Villee C.A., Davis P.W. BIOLOGIA 1987. Editorial Interamericana, México. 4 D.F.

Takeuchi. M. 1973. METODOS DE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES. Secretaría de Agricultura y Ganadería. Escuela Nacional de Agricultura. Colegio de Posgraduados. Rama Genética.

Wetherell D.F., 1982. INTRODUCTION TO IN VITRO PROPAGATION. Avery's Plant Tissue Culture Series. UNIVERSITY OF CONNECTICUT, Wayne New Jersey.

Werner. S. y Bermejo. B. 1970 traductora de la tercera edición Alemana LABORATORIOS QUIMICOS Y BIOLOGICOS. (Proyectos de construcción e instalación). Editorial: Blume-Tuset. 17. Barcelona-6. Editorial Labor. S.A. Calabria.

8- APENDICE

# MATERIAL NECESARIO EN UN LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES IN VITRO

## 8.1 CRISTALERIA

- Tubos de ensaye.
- Matraces Erlenmeyer.
- Cajas de petri.
- Matraz Sakaguchi.
- Matraz de tipo T y Matraz Steward.
- Matraz Carrel y Matraz Earle.
- Botellas para cultivo.
- Vidrieria para microcultivos:
  - Tubos de ensaye delgados y cuadrados.
  - Camara de Van Tiegham.
  - Portachjetos con concavidad.
- Vasijas fermentadoras.
- Botellas para reactivos o para soluciones madres.
- Pipetas.
- Probetas graduadas.
- Matraces volumétricos.
- Botellas para pesadas.
- Goteros con pera de goma.
- Vasijas de vidrio con boca de salida.
- Tubos para centrifuga y hematocrito.
- Hematocitómetro.
- Destilador.
- Matraces Balón.
- Matraces aforados.
- Cubreobjetos.
- Portachjetos.
- Lámparas de alcohol.
- Buretas.
- Tapones para tubos de ensaye.
- Propipetas.
- Cánulas para cajas de petri.
- Cánulas para pipetas.
- Agitador para matraces Erlenmeyer.
- Gradillas para tubos, etc.

## 8.2 INSTRUMENTAL

- Pinzas.
- Tijeras.
- Pisturi.
- Descorchador.
- Cánula.

- Agujas para inoculación.
- Espátula.
- Microespátulas.
- Pinzas de Mohr, etc.

### 8.3 EQUIPOS Y APARATOS

- Filtros y esterilizadores.
  - Cajas para inoculaciones.
  - Incubadoras.
  - Hornos para secado.
  - Autoclaves.
  - Refrigerador y Congelador.
  - Agitadores.
  - Aparatos con movimiento ascendente y descendente
  - Aparatos rotativos de movimiento vertical para -  
cultivos.
  - Balanza de torsión.
  - Balanza analítica.
  - Medidores de pH.
  - Centrifugas.
  - Destilador.
  - Lavadora de cristalería (opcional).
  - Desionizador.
  - Lavadora de pipetas.
  - Agitador magnético con calentamiento.
  - Unidad de flujo laminar.
  - Lupa con lámpara.
  - Bomba de vacío.
  - Timer (reloj con alarma).
  - Lámparas (luz blanca y luz ultravioleta).
  - Termostatos.
  - Balastras.
  - Microscopio invertido.
  - Microscopio de contraste de fase.
  - Aparato para fotomicrografía.
  - Microscopio óptico.
  - Microscopio electrónico.
  - Microscopio de inmersión.
  - Termómetros.
  - Soporte universal.
  - Anillos.
  - Picetas.
  - Tubería de plástico.
  - Mecheros Bunsen.
  - Papel filtro.
  - Parafilm.
  - Gasa.
  - Algodón.
- 
- Toallas de papel.
  - Detergente (uso diario).
  - Cloralex.
  - Escalera de tijera.

#### 8.4 REACTIVOS

- Nitrato de Amonio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ )	500 g.
- Nitrato de Potasio ( $\text{KNO}_3$ )	500 g.
- Cloruro de Calcio ( $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )	500 g.
- Sulfato de Magnesio ( $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )	500 g.
- Fosfato de Potasio Monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	500 g.
- Fosfato de Sodio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )	500 g.
- Acido Bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ )	500 g.
- Acido-etilén-diamino-tetracético (sal disódica) - - - ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ )	250 g.
- Sulfato Ferroso ( $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )	500 g.
- Sulfato de Manganeso ( $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )	250 g.
- Sulfato de Cobre ( $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )	250 g.
- Molibdato de Sodio ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )	500 g.
- Sulfato de Zinc ( $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )	500 g.
- Cloruro de Cobalto ( $\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )	250 g.
- Ioduro de Potasio (KI)	250 g.
- Hidróxido de Sodio (NaOH)	500 g.
- Hidróxido de Potasio (KOH)	500 g.
- Acido clorhídrico (HCl)	1 L.
- Buffer pH 7	1 L.
- Buffer pH 10	1 L.
- Sacarosa o azúcar de mesa	15 Kg.
- Acido 3-indolacético (AIA)	5 g.
- Acido 3-indolbutírico (AIB)	5 g.
- Acido 1-Naftalenacético (ANA)	1 g.
- Acido 4-clorofenoxiacético (ACP)	1 g.
- Acido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)	1 g.
- N -furfuril adenina (KIN)	5 g.
- N -isopentil adenina (ZiP)	5 g.
- N -bencil adenina (BA)	5 g.
- Sulfato de Adenina Hidratado	1 g.
- i-inositol	1 g.
- Tiamina HCl	1 g.
- Acido Ascórbico	1 g.
- Acido Nicotínico	1 g.
- Piridoxina HCl	1 g.
- Caseína Hidrolizada	1 g.
- Carbón activado	1 Kg.
- L-cisteína	1 g.
- Agar-agar	5 kg.
- Etanol 96%	(uso diario).

BIOTECNOLOGIA ESCUELA DE AGRICULTURA

## 9.5 MATERIAL NECESARIO EN INVERNADERO

- Reguladores de luz.
- Termómetros.
- Higrómetros.
- Pisos de concreto.
- Aire filtrado.
- Mosquiteros.
- Nebulizadores.
- Riego y fertilización automática.
- Sustratos estériles.
- Bancales para macetas.
- Macetas.
- Ventiladores.
- Caldera.
- Refrigeradores.