

TP N° 1: MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo para células, tejidos u órganos aportan las sustancias esenciales para el crecimiento y controlan, en gran parte el patrón de desenvolvimiento *in vitro*.

El metabolismo general de la planta que crece en condiciones de *in vivo* se reproduce en el cultivo *in vitro*, aunque las condiciones especiales requieren, en muchos casos el suplemento de nutrientes, sobre todo como complemento de sustancias biosintetizadas por las células que deben ser adicionadas en forma de compuestos orgánicos para las necesidades metabólicas, energéticas y estructurales inmediatas.

Estos medios están sustentados en el uso de macronutrientes, micronutrientes, suplementos orgánicos (vitaminas, carbohidratos) y reguladores de crecimiento. La elección de las sustancias y las combinaciones entre ellos fueron probados desde los comienzos del desarrollo de las técnicas de cultivo *in vitro*, dando como resultado las soluciones de Knop, Gautheret, De Fossard, White, Gamborg (B5) y Murashige & Skoog (MS), entre otras. Las tres últimas son las más utilizadas en la actualidad, aunque pueden modificarse para los casos de materiales que así lo requieran.

Componentes de los Medios Nutritivos:

El estudio de los medios nutritivos se orienta a obtener formulaciones de composición conocida y controlada, de modo de lograr resultados reproducibles en cualquier época y lugar. Para su preparación se usarán drogas libres de impurezas minerales, de calidad analítica (drogas proanálisis).

◆ Agua

Es el componente que se encuentra en mayor cantidad en el medio y es una fuente potencial de impurezas que puede afectar el crecimiento de los cultivos.

El agua utilizada en la preparación de medios de cultivo debe ser destilada y desionizada, o bidestilada. Esto se logra mediante el uso de destiladores, filtros de carbón activado o acetato de celulosa y columnas de intercambio iónico. Se debe almacenar en envases de material que no aporten impurezas orgánicas o inorgánicas. (vidrio o PVC)

◆ Macronutrientes

Los macronutrientes son elementos esenciales que la planta los requiere en cantidades del orden de gramos/litro (C, H, N, O, S, Mg, Ca, K, P). Son incluidos en los medios de cultivo en forma de sales inorgánicas, pudiendo el nitrógeno y el azufre ser incorporados como suplemento orgánico (P.ej. caseína hidrolizada, urea, aminoácidos).

El comportamiento de los elementos esenciales en el cultivo *in vitro* difiere en ocasiones, de lo observado *in vivo*, debido principalmente a las condiciones propias del crecimiento en un ambiente confinado.

◆ Micronutrientes

Los micronutrientes son elementos esenciales que la planta requiere en cantidades del orden de mg/litro (Fe, Mo, Ni, Cu, Zn, Mn, B). Los micronutrientes del medio de Murashige & Skoog incluyen todos aquellos elementos minerales aceptados como esenciales para plantas superiores, con el agregado de Co y I. El agregado de Na⁺ o Cl⁻ se verifica para algunos medios en particular, como acompañantes de otros iones.

◆ Carbohidratos

Las células, tejidos y plántulas cultivadas *in vitro* no poseen las condiciones de irradiación ni la concentración de CO_2 adecuada para realizar fotosíntesis que sustente su crecimiento. Por ello los carbohidratos proporcionan la energía metabólica y los esqueletos carbonados necesarios para la biosíntesis de aminoácidos y proteínas, polisacáridos estructurales como celulosa, etc.

La sacarosa es el carbohidrato más utilizado en la preparación de medios de cultivo. Las concentraciones varían dentro de ciertos rangos de acuerdo al tipo de respuesta esperada, la más utilizada es de 3% p/v. Otros azúcares como fructuosa, glucosa, celobiosa, maltosa, rafinosa y galactosa son recomendados para algunas especies en particular.

◆ Vitaminas

Las vitaminas, en la mayoría de los casos, cumplen funciones de cofactores de reacciones enzimáticas (tiaminafosfato, piridoxina), en otros se comportan como sustrato de reacciones metabólicas (ácido nicotínico). La combinación de vitaminas en el medio de cultivo se definió a partir de los primeros estudios de cultivo de raíces. La composición vitamínica, en el caso de medio MS, está constituida por tiamina (Vitamina B1), ácido nicotínico (niacina) y piridoxina (vitamina B6), a la que normalmente se le adiciona el aminoácido glicina. Las concentraciones más usuales oscilan entre 0.1 a 0.5 mg por litro de solución de medio. Otros compuestos utilizados son: ácido ascórbico, ácido fólico, riboflavina y biotina. En todos los casos las variaciones en la formulación está dada por la especie utilizada y la respuesta buscada.

◆ Mio inositol

El mio inositol es una hexosa cíclica hidroxilada, que se incorpora al medio MS y a la mayoría de los medios de cultivo usados en la actualidad. Su presencia es necesaria en todas las células para lograr la ciclación de la glucosa. Debido a que la biosíntesis no siempre se verifica *in vitro*, se hace imprescindible su incorporación a los medios. Posee efecto estimulador para el crecimiento de callos y en la organogénesis directa de algunas especies. Se usa en concentraciones de 100 mg/l. Actualmente se sabe que el myo-inositol se incorpora a las moléculas de fosfolípidos de la membrana plasmática. Otra función estaría asociada a la conjugación de auxinas, formando un complejo auxina-inositol, que es inactivo como regulador de crecimiento.

◆ Hormonas Vegetales y Reguladores de Crecimiento.

Las hormonas son compuestos orgánicos, no nutrientes, sintetizados por la planta, que actúan en muy baja concentración ($10^{-6}M-10^{-8} M$) y que desencadenan diversas respuestas fisiológicas. Se caracterizan por expresar su acción en lugares distantes de su sitio de síntesis. Existen sustancias sintéticas, con similares características, a las que se denomina reguladores de crecimiento. En ambos casos se trata de moléculas de relativamente bajo peso molecular (28 Da a 346 Da)

Las hormonas vegetales se agrupan en 5 clases, fundamentalmente en base a su acción fisiológica:

- Auxinas
- Citoquininas
- Giberelinas
- Etileno
- Acido abscísico

En la planta pueden encontrarse en forma libre o ligadas, considerando a esta última como una forma de "almacenaje".

Son considerados mensajeros químicos pues establecen una comunicación intercelular a través de toda la planta. En la célula las hormonas interactúan con una proteína específica denominada receptor. El complejo hormona- receptor es la forma activa de la hormona.

Una segunda fase incluye la activación o represión de genes específicos.

De la misma forma que en la naturaleza, en donde cada hormona interactúa con otras hormonas para producir una respuesta en la planta, los reguladores vegetales de crecimiento (PGR) son utilizados, en cultivo *in vitro*, en concentraciones del orden de partes por millón (ppm) y la elección del tipo de PGR y la cantidad relativa de cada uno de ellos en el medio de cultivo está determinada por la respuesta esperada.

Ejemplos de PGR utilizados en cultivo *in vitro* de plantas

Clase de Reguladores	Abreviatura o nombre común	Nombre químico
Auxinas	AIA	Ác. 3-indolacético
	ANA	Ác. Naftalenoacético
	AIB	Ác. Indolbutírico
	ApCFA	Ác. (4-clorofenoxi) acético
	2,4-D	Ác. 2,4-diclorofenoxiacético
	Picloran	Ác. 4-amino-3,5,6-tricloropico-línico
	ANOA	Ác. naftoxiacético
Citoquininas	Kinetina (KIN)	6-furfurilaminopurina
	BAP (BA)	6-benzilaminopurina. 6-benziladenina
	2Ip	Isopentiladenina
	Zeatina (ZEA)	N-(4-hidroxi-3-metilbut-2-enil) aminopurina
	PBA	(6-benzilamino)-9-2-tetrahidropiranyl-9H-purina
	Tidiazurón (TDZ)	1-fenil-3(1,2,3-tidiazol-5il)urea
Giberelinas	Ac. Giberélico (GA ₃)	2,4a,7-trihidroxi-1-metil-8-metilen-gib-3-ene-1,10-ácido carboxílico-1,4-lactona
Inhibidores	ABA	Ácido abscísico
Etileno	Etileno	C ₂ H ₄
	Ethephon, Ethrel	Ácido 2-cloroetilfosfónico

◆ Mezclas complejas utilizadas para la preparación de medios de cultivo

Para la estandarización de un medio de cultivo es necesario que los componentes y sus cantidades sea reproducibles, aun así se usan mezclas complejas como extracto de levadura, agua de coco, extracto de malta e incluso extractos del mismo material vegetal a cultivar. También se usan extractos de micelios autoclavados de algunos hongos y otros elicitores para inducir la síntesis de metabolitos secundarios.

◆ Otros aditivos

Son utilizados en casos de especies que muestran dificultades para expresar una respuesta en cultivo *in vitro*. Como ejemplo pueden mencionarse a la adenina, etilxantato de sodio, glutatión, antibióticos, fungicidas, aunque el más utilizado es el carbón activado.

◆ Agentes gelificantes

Los medios de cultivo pueden ser líquidos o sólidos. En el primer caso normalmente exige algún soporte o agitación para asegurar la oxigenación del explante. Se usan puentes de papel de filtro o de fibras de celulosa, o se colocan los medios en agitadores orbitales (shaker) o en recipientes con flujo y reflujo del medio de cultivo.

En los medios sólidos o semisólidos se utilizan diferentes agentes gelificantes. El agar es un polisacárido extraído de algas marinas, debe disolverse en agua hirviendo y la gelificación se logra a pH 5.8 aproximadamente.

Actualmente existen otros agentes gelificantes como el "phytagel" comercializado por Sigma y el "gerlite" de la firma Merck & Co. Todos están constituidos por polisacáridos del ácido glucurónico con ramnosa y glucosa y grupos O-acetil.

◆ El pH

Es necesario ajustar el pH de la solución con el fin de lograr una correcta gelificación del medio y considerando que el pH también incide en la capacidad de absorción de sales minerales. En general el pH no debe ser inferior a 5,8 y es ajustado con HCl o NaOH 1N, luego de agregar todos los ingredientes excluido el agente gelificante. En ocasiones se agrega soluciones tampón (MES), debido a que la capacidad tamponante de los medios de cultivo es baja y los valores de pH decrecen con el autoclavado y, en muchos casos, se altera por la absorción de iones durante el cultivo y con la excreción de metabolitos del explanto.

PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR UNA SOLUCION MADRE DE MS X 10

Material

- Balanza analítica
- Vasos de precipitado y matraces Erlenmeyer
- Frascos para almacenar soluciones
- Varillas de vidrio
- Refrigerador
- Agua bidestilada
- Drogas pro análisis

Procedimiento

La solución salina de Murashige & Skoog (1962) se prepara de la siguiente manera:

Solución N°1: Macronutrientes y micronutrientes

1. En una probeta colocar 1000 ml de agua bidestilada.
2. Pesar, añadir y agitar hasta disolver (uno a uno), los siguientes compuestos:

Macronutrientes

NO₃NH₄ 16,50 gr/l

NO₃K 19,00 gr/l

$\text{Cl}_2\text{Ca } 2\text{H}_2\text{O}$	4,40 gr/l
$\text{SO}_4\text{Mg } 7\text{H}_2\text{O}$	3,70 gr/l
$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$	1,70 gr/l

Micronutrientes

H_3BO_3	0,062 gr/l
$\text{SO}_4\text{Mn } 4\text{H}_2\text{O}$	0,223 gr/l
$\text{SO}_4\text{Zn } 4\text{H}_2\text{O}$	0,086 gr/l
IK	0,0083 gr/l
$\text{MoO}_4\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,0025 gr/l
$\text{SO}_4\text{Cu } 6\text{H}_2\text{O}$	0,00025 gr/l
$\text{Cl}_2\text{Co } 6\text{H}_2\text{O}$	0,00025 gr/l

3. Envasar, rotular y colocar la solución en la heladera.

Solución N°2: Quelato de hierro.

1. Pesar 0,373 gr de Na_2 EDTA y disolver en 350 ml de agua bidestilada, con calor.
2. Pesar 0,278 gr de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y disolver en 350 ml de agua bidestilada, con calor.
3. Mezclar ambas soluciones y completar el litro.
4. Envasar en un frasco acaramelado, rotular y colocar la solución en la heladera.

Solución N°3: Vitaminas.

1. En una probeta colocar 1000 ml de agua bidestilada.
2. Pesar, añadir y agitar hasta disolver (uno a uno), las siguientes vitaminas:

Glicina	0,020 gr/l
Ac. Nicotínico	0,005 gr/l
Tiamina	0,001 gr/l
Piridoxina	0,005 gr/l

(el mio inositol se agrega directamente al preparar el medio de cultivo 1 gr/l)
3. Envasar, rotular y colocar la solución en la heladera.

PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR REGULADORES DE CRECIMIENTO

Materiales

- Balanza analítica
- Vasos de precipitado y matraces Erlenmeyer
- Frascos para almacenar soluciones
- Varillas de vidrio
- Refrigerador
- Agua bidestilada
- PGR (ANA-BAP)
- Solventes (dimetil sulfóxido, alcohol 96°)

AUXINAS: (ANA) Ác. Naftalenoacético 20 ppm.

Procedimiento

1. Pesar 0,02 gr de ANA (se almacena en el freezer).
2. Disolver con algunas gotas de alcohol 96°.
3. Colocar 1000 ml de agua bidestilada en un erlenmeyer y mezclar con el regulador.
4. Envasar, rotular y colocar la solución en la heladera.

CITOCININAS: (BAP) 6-benzilaminopurina 20 ppm.

Procedimiento

1. Pesar 0,02 gr de BAP (se almacena en el freezer).
2. Disolver con algunas gotas de dimetil sulfóxido (es necesario tener cuidado con el fuego, también es tóxico).
3. Colocar 1000 ml de agua bidestilada en un erlenmeyer y mezclar con el regulador.
4. Envasar, rotular y colocar la solución en la heladera.

PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR LOS MEDIOS DE CULTIVO

Materiales

- Balanza analítica
- Vasos de precipitado
- Solución de macronutrientes y micronutrientes de MS
- Solución de quelato de hierro
- Solución de vitaminas de MS
- Varillas de vidrio
- Sacarosa
- Agar
- Agua bidestilada
- Mio inositol
- PGR (ANA-BAP)
- pH metro
- OHNa 1N y HCl 1N
- Microondas
- Frascos de vidrio
- Papel de aluminio
- Bandas elásticas
- Autoclave

MEDIO DE AISLAMIENTO

Procedimiento

1. Pesar en una balanza analítica 30 gr de azúcar y 6,5 gr de agar.
2. En un vaso de precipitados agregar 300 ml de agua bidestilada (PH 7) y la sacarosa (mezclar con una varilla de vidrio hasta disolverla completamente).
3. Agregar 400 ml de agua bidestilada y el agar.
4. Aforar a 1000 ml.
5. Cocinar el medio de cultivo en el microondas, durante 12 minutos aproximadamente en 4 períodos de 3 minutos cada uno (al finalizar cada período se mezcla con varilla de vidrio).
6. Una vez finalizada la cocción dispensar el medio de cultivo en frascos, taparlos con papel de aluminio y ajustar el papel al borde del frasco con una banda elástica.
7. Colocar los frascos dentro del autoclave (verificar que tenga agua suficiente) y autoclavar durante 20 minutos a 120°C y 1 atmósfera de presión.

MEDIO PARA INDUCIR LA PROLIFERACION DE BROTES ADVENTICIOS

Procedimiento

1. Pesar en una balanza analítica 30 gr de sacarosa, 6,5 gr de agar y 0,1 gr de mio inositol.
2. En un erlenmeyer de 1 litro agregar 300 ml de agua bidestilada (PH 7) y la sacarosa (mezclar con una varilla de vidrio hasta disolverla completamente).
3. Agregar 100 ml de la solución de macronutrientes y micronutrientes de MS, agitar; 100 ml de la solución de quelato de hierro, agitar y 100 ml de la solución de vitaminas de MS, agitar.
4. Incorporar el mio inositol.
5. Añadir los PGR, en este caso particular 1,5 ppm de BAP.
6. Aforar a 950 ml.
7. Ajustar el pH en 5.8 con gotas de OHNa 1N.
8. Agregar el agar, agitar.
9. Aforar a 1000 ml.
10. Cocinar el medio de cultivo en el microondas, durante 12 minutos aproximadamente en 4 períodos de 3 minutos cada uno (al finalizar cada período se mezcla con varilla de vidrio).
11. Una vez finalizada la cocción dispensar el medio de cultivo en frascos, taparlos con papel de aluminio y ajustar el papel al borde del frasco con una banda elástica.
12. Colocar los frascos dentro del autoclave (verificar que tenga agua suficiente) y autoclavar durante 20 minutos a 120°C y 1 atmósfera de presión.

MEDIO PARA INDUCIR LA PROLIFERACION DE EMBRIONES SOMATICOS

Procedimiento

1. Pesar en una balanza analítica 30 gr de sacarosa, 6,5 gr de agar y 0,1 gr de mio inositol.
2. En un erlenmeyer de 1 litro agregar 300 ml de agua bidestilada (PH 7) y la sacarosa (mezclar con una varilla de vidrio hasta disolverla completamente).

3. Agregar 100 ml de la solución de macronutrientes y micronutrientes de MS, agitar; 100 ml de la solución de quelato de hierro, agitar y 100 ml de la solución de vitaminas de MS, agitar.
4. Incorporar el mio inositol.
5. Añadir los PGR, en este caso particular 1,5 ppm de 2,4-D.
6. Aforar a 950 ml.
7. Ajustar el pH en 5.8 con gotas de OHNa 1N.
8. Agregar el agar, agitar.
9. Aforar a 1000 ml.
10. Cocinar el medio de cultivo en el microondas, durante 12 minutos aproximadamente en 4 períodos de 3 minutos cada uno (al finalizar cada período se mezcla con varilla de vidrio).
11. Una vez finalizada la cocción dispensar el medio de cultivo en frascos, taparlos con papel de aluminio y ajustar el papel al borde del frasco con una banda elástica.
12. Colocar los frascos dentro del autoclave (verificar que tenga agua suficiente) y autoclavar durante 20 minutos a 120°C y 1 atmósfera de presión.

MEDIO PARA INDUCIR EL ENRAIZAMIENTO

Procedimiento

1. Pesar en una balanza analítica 30 gr de sacarosa, 6,5 gr de agar y 0,1 gr de mio inositol.
2. En un erlenmeyer de 1 litro agregar 300 ml de agua bidestilada (PH 7) y la sacarosa (mezclar con una varilla de vidrio hasta disolverla completamente).
3. Agregar 50 ml de la solución de macronutrientes y micronutrientes de MS, agitar; 50 ml de la solución de quelato de hierro, agitar y 100 ml de la solución de vitaminas de MS, agitar.
4. Incorporar el mio inositol.
5. Aforar a 950 ml.
6. Ajustar el pH en 5.8 con gotas de OHNa 1N.
7. Agregar el agar, agitar.
8. Aforar a 1000 ml.
9. Cocinar el medio de cultivo en el microondas, durante 12 minutos aproximadamente en 4 períodos de 3 minutos cada uno (al finalizar cada período se mezcla con varilla de vidrio).
10. Una vez finalizada la cocción dispensar el medio de cultivo en frascos, taparlos con papel de aluminio y ajustar el papel al borde del frasco con una banda elástica.
11. Colocar los frascos dentro del autoclave (verificar que tenga agua suficiente) y autoclavar durante 20 minutos a 120°C y 1 atmósfera de presión.

MEDIO PARA INDUCIR LA PROLIFERACION DE CALLO

Procedimiento

1. Pesar en una balanza analítica 30 gr de sacarosa, 6,5 gr de agar y 0,1 gr de mio inositol.
2. En un erlenmeyer de 1 litro agregar 300 ml de agua bidestilada (PH 7) y la sacarosa (mezclar con una varilla de vidrio hasta disolverla completamente).

3. Agregar 100 ml de la solución de macronutrientes y micronutrientes de MS, agitar; 100 ml de la solución de quelato de hierro, agitar y 100 ml de la solución de vitaminas de MS, agitar.
4. Incorporar el mio inositol.
5. Añadir los PGR, en este caso particular 1,5 ppm de ANA.
6. Aforar a 950 ml.
7. Ajustar el pH en 5.8 con gotas de OHNa 1N.
8. Agregar el agar, agitar.
9. Aforar a 1000 ml.
10. Cocinar el medio de cultivo en el microondas, durante 12 minutos aproximadamente en 4 períodos de 3 minutos cada uno (al finalizar cada período se mezcla con varilla de vidrio).
11. Una vez finalizada la cocción dispensar el medio de cultivo en frascos, taparlos con papel de aluminio y ajustar el papel al borde del frasco con una banda elástica.
12. Colocar los frascos dentro del autoclave (verificar que tenga agua suficiente) y autoclavar durante 20 minutos a 120°C y 1 atmósfera de presión.