

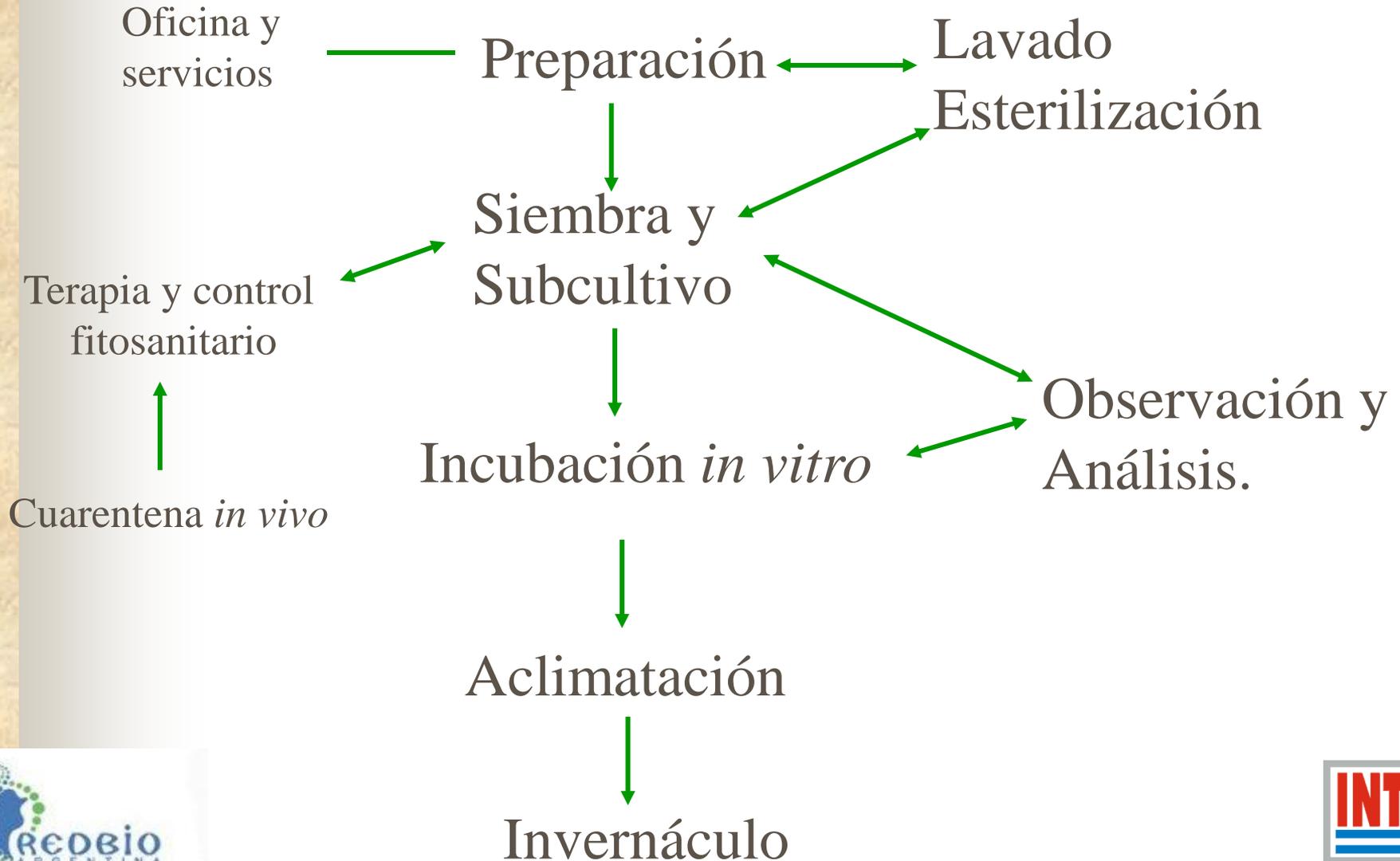
Micropropagación al alcance de todos los bolsillos: “desde Biofábricas 2.0 hasta cámaras estériles caseras”



Definición

Técnica por la cual se aísla una porción de la planta (explanto) proporcionándole, de forma artificial todas las condiciones físicas y químicas para que las células expresen todo su potencial. En condiciones estériles.

Organización del laboratorio y flujo de trabajo



Equipamiento para el laboratorio de cultivo *in vitro* vegetal

Área preparación

Mesadas, reactivos en uso, heladeras, freezer, balanzas, pHmetro, agitador magnético, material de vidrio (volumétrico, cultivo, etc.), fungibles, microondas, cocina, balanzas (granataria y precisión), dispensador de agua destilada.

Área lavado y esterilización

Mesadas, autoclave, olla de presión, destilador de agua, estufas de esterilización y secado, bandejas y/o gradillas de secado, lava vajilla, lava pipetas, cocina, dispensador de agua destilada, cinta indicadora de esterilización, bandejas para el descarte del material contaminado, guantes.

Área de subcultivo

Equipo de flujo laminar, mecheros, alcohol, microscopios estereoscópicos (lupas), instrumentos para disección (bisturios, diferentes tipos de pinzas, agua destilada estéril, barbijos, guantes de latex, recipientes con alcohol 96°C.

Equipamiento para el laboratorio de cultivo *in vitro* vegetal

Área de observación {
Microscopio estereoscópico (lupa)
Microscopio binocular
Cámara fotográfica

Área de aclimatación {
Bandejas plásticas, nylon para cámara húmeda
Frascos para riego
Disponibilidad de agua de buena calidad
Diferentes tipos de sustratos, macetas

Área de invernáculo {
Bandejas plásticas, nylon para cámara húmeda
Frascos para riego
Disponibilidad de agua de buena calidad
Diferentes tipos de sustratos, macetas

Preparación y esterilización del material

Fuentes de contaminación

Tejidos



El área de trabajo



Instrumentos



Recipientes



Operador





(Roca y Mrojinski, 1993)



Pasos para la desinfección de explantos

- ✓ El pre tratamiento con suspensiones antifúngicas es de gran utilidad.
- ✓ Limpieza o dilución de los contaminantes (agua y cepillo, según el caso).
- ✓ Lavado en EtOH 70° C (20-30 seg.).
- ✓ Hipoclorito de sodio (1% a 3% de Cloro activo) 20 minutos con o sin detergente.
- ✓ Enjuague con agua estéril bajo flujo laminar.

Alternativas

- ✓ Bicloruro de Mercurio HgCl_2 (0,1% a 3%, durante 3 a 10 minutos).
- ✓ PPM (5-cloro-2-metil-3(2H)-isothiazolona y 2-metil-3(2H)-isotiazolona)

Proceso de esterilización

El agente esterilizante por excelencia es el calor

- Húmedo
- Seco

Húmedo: Vapor a presión, 1 atm. 121°C durante 20 minutos es lo usual.

Método de Koch, vapor vivo a 100 °C (en desuso)

Seco: Por aire calentado a 170 °C -180 °C durante 2hs como mínimo.

Para sustancias termolábiles, existen alternativas como la ultrafiltración, filtros de 0,22 μ

Lavado del material

Tanto la limpieza como el enjuague de los recipientes de cultivo son de suma importancia.

- ✓ Se minimiza la aparición de contaminantes
- ✓ Se garantiza la ausencia en el recipiente de elementos que pueden modificar al medio de cultivo.

Pero ¡OjO! que las soluciones limpiadoras son peligrosas tanto para el operador.

Como para el medio ambiente (i.e: la sulfocrómica o sulfonítrica)



Medios de Cultivo

¡¡¡¡¡Muy importante: antes de diseñar el medio de cultivo tiene que tenerse claro el objetivo del ensayo!!!!

¿Cómo empezar? Hay que revisar la bibliografía.

Componentes del medio

- a) Carbono.
- b) Nutrientes minerales.
- c) Vitaminas.
- d) Reguladores del crecimiento.
- e) Agente gelificante (en caso de medio semi-sólido).
- f) Otros compuestos específicos para la especie de interés.

a + b + c son los componentes del medio base

Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales...

Cuadro 2.2. Composición de cuatro medios básicos (MB) para el cultivo in vitro de tejidos.

Componentes	Contenidos en cada medio (mg/ litro) ^a			
	MS	B5	N6	Wh
NH ₄ NO ₃	1650	—	—	—
KNO ₃	1900	2500	2830	80
KH ₂ PO ₄	170	—	400	—
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	150	166	—
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	250	185	737
(NH ₄) ₂ SO ₄	—	134	463	—
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	—	—	—	288
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	—	150	—	19
KCl	—	—	—	65
Na ₂ SO ₄	—	—	—	200
KI	0.83	0.75	0.80	0.75
H ₃ BO ₃	6.20	3.00	1.60	1.50
MnSO ₄ .H ₂ O	—	10.00	—	—
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.30	—	4.40	6.65
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.60	2.00	1.50	2.67
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	0.25	—	—
H ₂ MoO ₄	—	—	—	0.001
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.025	—	0.01
Fe ₂ (SO ₄) ₃	—	—	—	2.50
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.80	27.80	27.85	—
Na ₂ EDTA	37.30	37.30	37.25	—
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	0.025	—	—
Glicina	2.00	—	2.00	3.00
Tiamina-HCl	0.10	10.00	1.00	0.10
Piridoxina-HCl	0.50	1.00	0.50	0.10
Acido nicotínico	0.50	1.00	0.50	0.50
Mioinositol	100.00	100.00	—	100.00
Sacarosa	30,000	20,000	50,000	20,000
pH	5.7	5.5	5.8	5.5

a. MS = Murashige et al., 1962; B5 = Gamborg et al., 1968; N6 = Chu et al., 1975; Wh = White, 1943. Con modificaciones de Yeoman et al., 1977 y Singh et al., 1981.



Preparación del medio de cultivo

Cuestiones a tener en cuenta:

- 1) Calidad de agua: bidestilada.
- 2) Reactivos de alta pureza.
- 3) Estado de las soluciones madres.
- 4) Componentes termolábiles.



Preparación del medio de cultivo (variantes)

a) Medios semisólidos, sin termolábiles.



b) Medios líquidos con o sin sustancias termolábiles.



c) Medios semisólidos con una o más sustancias termolábiles.



Laboratorio convencional de cultivo de tejidos

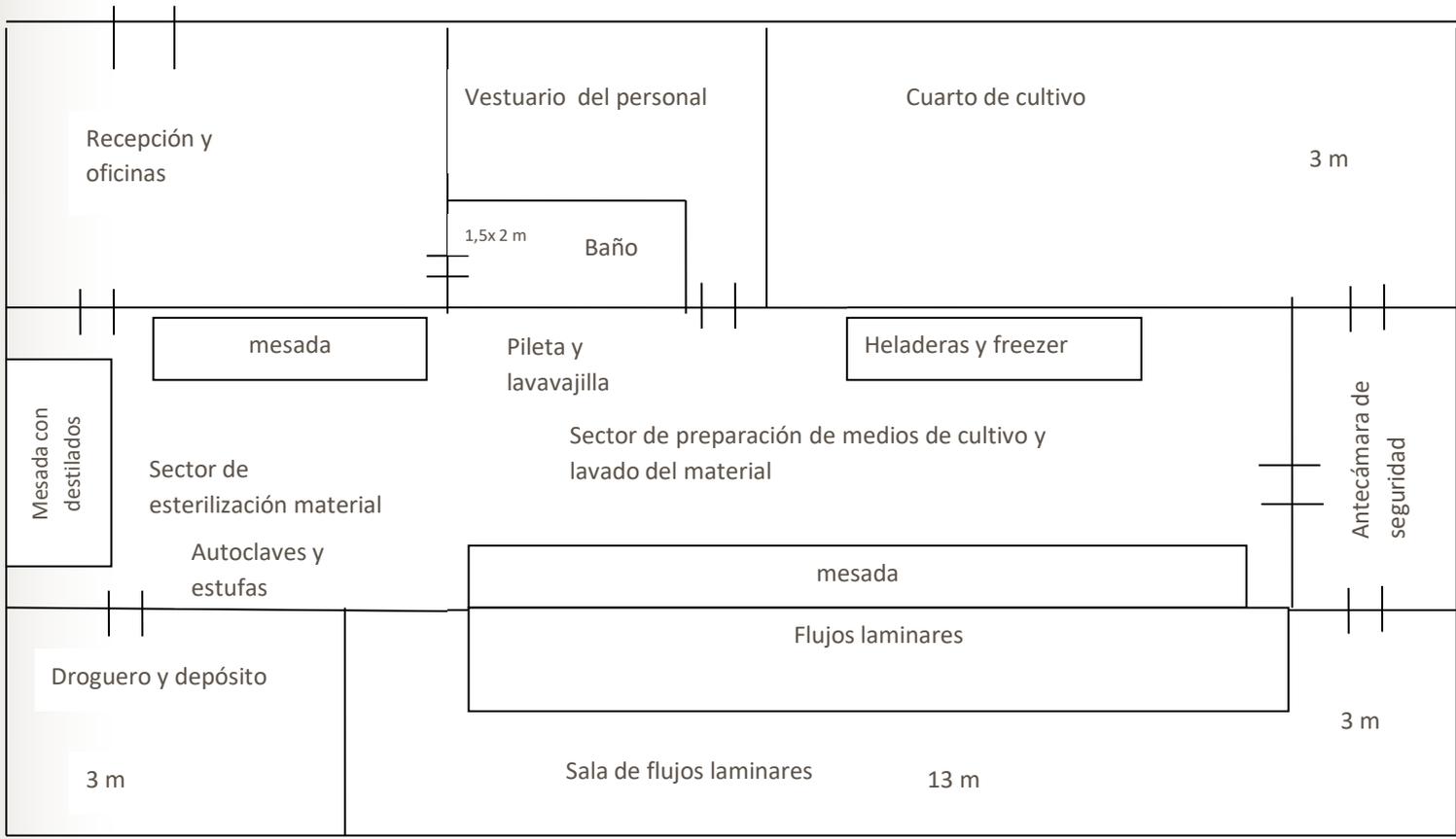
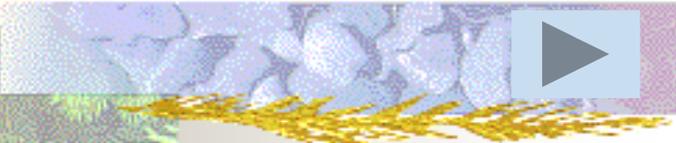






¿Preguntas?

**!!!!Hágalo ahora o
calle para siempre!!!!**



Tejidos

Pueden llevar contaminantes en su superficie y/o en su interior

-Los de la superficie se eliminan por métodos estándares (etanol/lavandina).

-Los internos requieren fungicidas y/o antibióticos o bacteriostáticos.

Sulfato de gentamicina, estreptomina, penicilina (10 a 50 mg/l).

Plant preservative mixture (PPM)

-Termoterapia: tratamiento de de los explantos a 35-45°C.



Contaminantes más comunes del área de trabajo

Bacterias y esporas de hongos que habitan en el ambiente.

Se las evita por medio de cámaras de flujo laminar, el sistema de prefiltro y el filtro absoluto.

Flujo de aire laminar  velocidad constante y homogénea

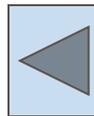




Instrumentos

Deben ser esterilizados antes de usarse

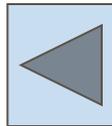
Los metálicos se flamean luego de inmersión en EtOH 70 !OjO!, con la pérdida del temple y la acumulación de materia orgánica carbonizada. Se los debe mantener dentro del área del flujo.



Recipientes

La superficie externa de los recipientes esterilizados se debe tratar con ETOH 70° C.

Se recomienda flamear la boca de los tubos de cultivo antes y después de haber sembrado el explanto.





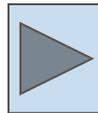
El operador es una fuente primaria de contaminación, se recomienda el uso de:

- ✓ de guardapolvo.
- ✓ Guantes.
- ✓ Cofia.
- ✓ Barbijo.
- ✓ Lavado de manos y brazos.
- ✓ Enjuagados con ETOH 70 antes de una sesión de trabajo.



Medios semisólidos sin sustancias termolábiles

- 1) Incorporación del medio basal, de los reguladores del crecimiento y otros compuestos. Ajuste de pH
- 2) Adición y disolución del agar. Distribución en los recipientes de cultivo (tubos, placas, frascos)
- 3) Esterilización en autoclave.





Medios líquidos con o sin sustancias termolábiles.

Se sigue el mismo procedimiento que en “a”, pero sin adicionar agar y esterilizando por filtración en caso de tener alguna sustancia termolabil





Medios semisólidos con una o más sustancias termolábiles.

- 1) Incorporación de los compuestos que pueden ser esterilizados en autoclave (MB, algunos reguladores, sacarosa y otros compuestos). Ajustar pH.
- 2) Adición y disolución del agar.
- 3) Esterilización en autoclave.
- 4) Esterilizar por filtración los termolábiles y adicionarlos al medio bajo flujo laminar (50°C).
- 5) Dispensar en tubos estériles bajo flujo laminar.

