

P5. CULTIVO DE MERISTEMOS

Objetivos:

- Identificar la estructura del meristemo
- Extraer meristemos en condiciones estériles
- Iniciar la puesta en cultivo de los meristemos
- Relacionar la técnica con la obtención de plantas libres de virus

Material

Para la esterilización

- 2 vasos de precipitados o erlenmeyers de unos 250 ml
- 1 probeta de 100 ml
- 1 probeta de 10 ml o p
- Agua destilada
- Agua destilada estéril
- Lejía comercial
- Tween-20
- Papel de filtro
- Rotulador

Para el cultivo

- 2 tubos estériles (que se llenaran parcialmente con etanol 80%)
- 2 tubos con agua estéril
- Bisturí i pinzas
- Mechero con alcohol (o esterilizador eléctrico)
- Pulverizador de alcohol (etanol 70%)
- Placas de Petri estériles
- Papel secante
- Vaso de precipitados grande
- Tubos con medio de cultivo inclinado (MS+ 3% sac +)

Procedimiento:

1. Introducir los fragmentos de rama en un vaso de precipitados (o erlenmeyer) y cubrir con una solución acuosa de lejía comercial al 20% (v/v) con Tween 20. Mantenerlos en la solución esterilizante durante diez minutos, durante los cuales se agitará el recipiente repetidamente.
2. Trasladar el recipiente con los fragmentos de rama a la cámara de flujo, decantar la solución esterilizante en un recipiente adecuado y efectuar tres aclarados con agua destilada estéril.

3. Sacar de la cámara de flujo todo el material utilizados en la esterilización de los fragmentos de rama y que ya no sea necesario.
4. Trabajando en la cámara de flujo, coger un fragmento de rama con las pinzas y sujetarlo bajo la lupa. Observando a través de esta, ir separando una a una las hojas que cubren la yema hasta que sólo queden 2 primordios foliares y se vea claramente el meristemo entre ambos. Las pinzas deben sujetar la rama cerca de la zona en que se encuentra la yema, de forma que la sujeción sea firme.

NOTA: las pinzas y el bisturí se esterilizaran (a la llama o con aplicación de calor) frecuentemente para mantener la esterilidad de las operaciones de extracción. Tras cada esterilización se enfriarán el los correspondientes tubos con agua estéril antes de su uso.

5. Cortar con la punta del bisturí el meristemo por su base y depositarlo en la parte superior de la superficie inclinada del medio de cultivo.
6. Identificar adecuadamente los tubos de cultivo y trasladarlos a la cámara de incubación.

