

P1. PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO

Objetivos

Comprender la metodología de preparación de medio de cultivo utilizada habitualmente en los laboratorios de cultivo *in Vitro*.

Preparar algunos de los medios de cultivo necesarios para las siguientes prácticas a partir de soluciones stock concentradas.

Introducción

De entre la gran diversidad de medios de cultivo *in vitro* utilizados habitualmente, el medio Murashige y Skoog (MS) es el medio más conocido. Se elaboró tomando el cultivo *in vitro* de tabaco como modelo y siguiendo un procedimiento cuantitativo se determinaron las concentraciones más adecuadas de todos los nutrientes. El medio MS es apto para la mayoría de las especies, por lo que es de amplia utilización, excepto para las más sensibles a la salinidad ya que se caracteriza por tener una elevada concentración salina. En esos casos puede recurrirse a otros medios o simplemente utilizarlo diluido (1/2 MS, 1/4 MS).

Macronutrientes		Concentración Solución stock	ml/L
NH ₄ NO ₃	1.65 g/l	X10	100
KNO ₃	1.9 g/l		
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.37 g/l		
CaCl ₂ .aq	0.33 g/l		
KH ₂ PO ₄	0.17 g/l		
Micronutrientes			
KI	0.83 mg/l	X100	10
H ₃ BO ₃	6.2 mg/l		
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.3 mg/l		
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6 mg/l		
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25 mg/l		
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025 mg/l		

CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025 mg/l		
Hierro			
Na ₂ EDTA	37.3 mg/l	x200	5
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8 mg/l		
Vitaminas			
Inositol	100	x200	5
Acido Nicotinico	0.5		
Piridoxina HCl	0.5		
Tiamina HCl	0.1		
Glicina	2		

Los distintos medios de cultivo pueden prepararse a partir de soluciones concentradas (ver datos en la tabla) o bien a partir de productos comerciales preelaborados (Sigma-Aldrich...).

A estos elementos se puede añadir (según especifique el protocolo que estamos aplicando): sacarosa (como fuente de C), reguladores de crecimiento y gelificante.

Material

- Soluciones stock
- Pipetas y ayudante de pipeteado
- Probetas (de volumen adecuado para el volumen de medio a preparar)
- Erlenmeyer (de capacidad suficiente para el volumen de medio a preparar)
- pH-metro
- Balanza
- Phytigel
- Sacarosa
- Reguladores de crecimiento
- Soluciones de OHNa y HCl 0.1 M

Procedimiento

1. Calcular las cantidades necesarias de los componentes del medio a partir del volumen de medio a preparar.
2. Añadir unos 100 ml de agua destilada en el recipiente escogido para preparar el medio.
3. Añadir el volumen necesario de las soluciones de macronutrientes, micronutrientes, hierro, vitaminas y reguladores de crecimiento (en su caso).

4. Añadir la cantidad de sacarosa requerida y agitar hasta disolución completa.
5. Ajustar al volumen final con agua destilada.
6. Ajustar el pH a 5.7 con la ayuda de soluciones 0.1 M de HCl o OHNa.
7. Añadir el gelificante (phytagel).
8. Disolver el gelificante con calor (agitador magnético con calefacción, autoclave, horno microondas).
9. Dosificar en el recipiente de cultivo (tubos, cajas magenta, baby foods...) y rotularlos adecuadamente.
10. Esterilizar el medio y su recipiente en autoclave a 121 °C (15 p.s.i). durante 15 minutos.
11. Guardar el material utilizado hasta el momento de su utilización.

PLANTILLA DE PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

		Concentración Solución stock	ml/L				
Macronutrientes							
NH ₄ NO ₃	1.65 g/l	x10	100				
KNO ₃	1.9 g/l						
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.37 g/l						
CaCl ₂ .aq	0.33 g/l						
KH ₂ PO ₄	0.17 g/l						
Micronutrientes							
KI	0.83 mg/l	x100	10				
H ₃ BO ₃	6.2 mg/l						
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.3 mg/l						
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6 mg/l						
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25 mg/l						
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025 mg/l						
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025 mg/l						
Hierro							
Na ₂ EDTA	37.3 mg/l	x200	5				
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8 mg/l						
Vitaminas							
Inositol	100	x200	5				
Acido Nicitnico	0.5						
Piridoxina HCl	0.5						
Tiamina HCl	0.1						
Glicina	2						
Otros compuestos							
Sacarosa							
Phytigel							
pH final 5.7							