

P5. MICROPROPAGACIÓN DE ESPECIES HERBÁCEAS

Objetivos:

- Comprender los métodos de micropropagación de especies herbáceas.
- Comprobar el efecto de diversos reguladores del crecimiento y sus interacciones sobre la morfogénesis de los cultivos in Vitro.
- Micropropagar diferentes especies vegetales.
- Comparar los resultados obtenidos con las diferentes especies utilizadas.

Material

Para cada grupo

- Material vegetal
- Pipetas y ayudante de pipeteado
- Probetas (de volumen adecuado para el volumen de las soluciones esterilizantes a preparar)
- Erlenmeyer 250 ml estéril
- Erlenmeyer con 200 ml de agua estéril
- Pinzas y bisturí
- Lejía comercial
- Alcohol

Para cada cámara de flujo laminar

- Placas de Petri con los distintos medios de cultivo
- Placas de Petri estériles
- Pinzas y bisturí
- Vaso de precipitados de 500 ml
- Pulverizador con alcohol al 70%
- Mechero de alcohol (o esterilizador eléctrico)
- 2 tubos con alcohol 80% y 2 tubos con agua destilada estéril
- Rotulador
- Parafilm

Procedimiento:

Cada grupo iniciará la micropropagación a partir de una especie diferente partiendo de un cultivo en maceta de un Centro de Jardinería.

Obtención de secciones.

Cortar algunas hojas desde la base del pecíolo, tallos o capítulos florales inmaduros (según la especie y las instrucciones facilitadas por el profesor), lavarlas con agua jabonosa y aclararlas posteriormente.

Trocear las secciones obtenidas en fragmentos de unos 1.5 cm de longitud aproximadamente.

Esterilización del material vegetal

Introducir las secciones en un vaso de precipitados (o erlenmeyer) y cubrir con una solución acuosa de lejía comercial al 20% (v/v) con Tween 20. Mantener durante veinte minutos, durante los cuales se sometió al recipiente a varias agitaciones.

Trasladar el recipiente con las secciones a la cámara de flujo, decantar la solución esterilizante en un recipiente adecuado y efectuar tres aclarados con agua destilada estéril.

Puesta en cultivo

Extraer las secciones estériles y depositarlas en una placa de Petri estéril (o sobre un cristal estéril por pulverización de alcohol) donde se procederá a prepararlas para su cultivo.

Recortar los bordes de las secciones para eliminar los tejidos que pudiesen haber sido afectados por el tratamiento esterilizante, de forma que se obtengan secciones de 1 cm² aproximadamente (en el caso de limbo foliar) o fragmentos de tallo/pecíolo de 1-1'5 cm de largo.

Depositar en condiciones asépticas 4 secciones por placa de Petri con medio de cultivo (MS + 3% sacarosa) y Reguladores de crecimiento según la tabla siguiente:

Tabla 2. Reguladores de crecimiento en los medios de cultivo a ensayar	
NAA	BA
0	0
0,05	0,05
0,05	0,2
0,05	0,8
0,05	3,2

Sellar las placas de Petri con parafilm, rotularlas debidamente y trasladarlas a la cámara de cultivo regulada a un fotoperíodo de 16 h y 24 °C.