

Cultivo “*in vitro*” a partir de hojas de la planta del tabaco

Nicotiana tabacum

INTRODUCCIÓN

El cultivo “*in vitro*” de células vegetales consiste en un cultivo de plantas o partes de plantas (explantos) incorporados en un medio adecuado. Las células totipotentes son células somáticas que tienen la capacidad de dividirse y diferenciarse en una planta madura si se coloca en un medio específico, es decir, la totipotencialidad es la capacidad de una célula vegetal de dar lugar al desarrollo de una planta completa.

El medio de cultivo en los que el tejido puede crecer se compone de una mezcla de sustancias, como sales inorgánicas, suplementos orgánicos, una fuente de carbono (sacarosa), agar (para un medio de cultivo sólido) y hormonas que inducen el crecimiento y diferenciación (por ejemplo, la auxina y las citoquininas inducen la elongación o la división celular).

Las muestras de vegetales han de prepararse previamente, desinfectándolas y obteniendo los explantes, es decir, porciones de tejido que se seccionan de la planta para que inicien el desarrollo de una planta en un medio adecuado.

MATERIALES

- Cristalizador estéril
- Varios litros de agua del grifo estéril (6 L aproximadamente)
- Probeta de 500 mL estéril
- Campana de flujo laminar
- Pinzas y mango de bisturí estériles
- Lejía
- Tween 20

Organismos

- Material vegetal: plantas de *Nicotiana tabacum* con 8 semanas de crecimiento aproximadamente, donde se observen hojas de tamaño pequeño o mediano.

Medios de cultivo

- **Medio callos (MC):** para 100 mL
 - Medio Murashige & Skoog (MS): 0.47 g (contiene sales minerales, vitaminas y aminoácidos)
 - Sacarosa: 3 g

Ajustar el pH a 5.8

- Agar especial para vegetales: 0.8 g

Esterilizar en autoclave

Cuando la temperatura esté sobre 50 °C, adicionar las hormonas:

- NAA (naphthaleneacetic acid, 2.0 mg/L): 8 µL
- 6-BAP (6-benzylaminopurine, 0.5 mg/L): 40 µL

• **Medio plántulas (MP):** para 100 mL

- Medio Murashige & Skoog (MS): 0.47 g
- Sacarosa: 3 g

Ajustar el pH a 5.8

- Agar especial para vegetales: 0.8 g

Esterilizar en autoclave

Cuando la temperatura esté sobre 50 °C, adicionar las hormonas:

- NAA o Auxina (naphthaleneacetic acid, 0.1 mg/L): 0.4 µL
- 6-BAP o Citoquinina (6-benzylaminopurine, 1.0 mg/L): 80 µL

• **Para preparar la solución stock de las hormonas:**

NAA: Disolver 500 mg de NAA en 20 mL de etanol al 50%. (Stock a 25 mg/mL).

6-BAP: Disolver 126 mg de 6-BAP en 1 mL de HCl 1M, adicionar 99 mL de agua destilada y esterilizar por filtración. (Stock a 1.26 mg/mL).

PROCEDIMIENTO

1 día de trabajo

¡¡**REALIZAR EL TRABAJO EN LA CAMPANA DE FLUJO LAMINAR!!**

- 1) Seleccionar hojas jóvenes de una planta de tabaco de aproximadamente 8 semanas.
- 2) Preparar 400-600 mL de una solución de lejía al 10%, utilizando para ello agua estéril del grifo y probetas estériles. Adicionar la solución de lejía y unas gotas de Tween-20 al cristizador.
- 3) Coger las hojas con cuidado de no dañarlas y sumergirlas en la solución de lejía, para desinfectarlas bien y evitar así contaminaciones futuras.
- 4) Eliminar cuidadosamente las burbujas de aire de la superficie de cada hoja (sin dañarlas) agitando suavemente con una pipeta pasteur de plástico estéril o una espátula también estéril.
- 5) Dejar las hojas 15 minutos en la solución de lejía.
- 6) Enjuagar muy bien las hojas haciendo 4 lavados con agua estéril, aproximadamente 600 mL de agua por cada lavado.
- 7) Con unas pinzas estériles coger hojas individuales y quitar el exceso de agua. Colocar en una placa de Petri vacía estéril, y con un bisturí también estéril cortar trocitos de hojas de 1cm² aproximadamente, descartando las zonas dañadas por la lejía y los nervios de las hojas.

NOTA: Las pinzas y el mango de bisturí con la cuchilla se mantendrán en etanol en un vaso pequeño y antes de utilizarlos se flamearán a la llama dejando que se enfríen antes de cortar las hojas.

- 8) Colocar los trozos de hojas en las placas de Medio Callos (MC) o Medio Plántula (MP) (4-5 trozos en cada placa), de manera que el envés de la hoja quede en contacto con el medio (algún trozo se puede poner al revés).
- 9) Cerrar las placas con parafilm. Incubar entre 24-26 °C con baja intensidad de luz.