

DEMOTEC

Activitat del grau d'Enginyeria Agroalimentària i del Medi Rural. Biotecnologia, Micropropagació de plantes.

Activitat on es mostrarà la capacitat que tenen les plantes per regenerar una planta sencera a partir d'una porció de teixit mitjançant el cultiu *in vitro*.

Introducció

El cultiu *in vitro* permet el creixement i desenvolupament de material vegetal en recipients que el separen de l'ambient exterior i el mantenen en condicions controlades i asèptiques. Entre les diverses tècniques de cultiu *in vitro*, la micropropagació consisteix en la producció clonal de vegetals a partir, generalment, d'apexs o explants nodals d'una planta mare, dins un medi de cultiu adient i en les condicions favorables per al creixement. La gran producció de noves plantes es veu afavorida gràcies al ràpid creixement del material vegetal *in vitro* i a la proliferació de tiges durant els subcultius.

Un programa de micropropagació pot comprendre les etapes següents:

- Etapa 0: selecció i condicionament de la planta mare
- Etapa I: tractaments d'asèpsia i establiment del cultiu
- Etapa II: desenvolupament i multiplicació dels brots
- Etapa III: arrelament o condicionament dels brots per a la seva aclimatació a condicions *ex vitro*
- Etapa IV: aclimatació a condicions *ex vitro*.

El medi de cultiu

Abans de realitzar l'asèpsia del material vegetal que s'ha d'introduir *in vitro*, és necessari disposar d'un medi de cultiu esterilitzat i dosificat en recipients adients. Una part important del cultiu *in vitro* són els medis de cultiu, ja que allà es troben les substàncies necessàries per al creixement i desenvolupament dels teixits vegetals. Un medi de cultiu és una solució aquosa on es troben dissoltes sals minerals que aporten els elements essencials, macronutrients (N, P, K, S, Ca i Mg) i micronutrients (Fe, B, Mn, Zn, Cu, Mo, i Co). Normalment és imprescindible una

font de carboni, generalment la sacarosa, per suplir l'escassa activitat fotosintètica del teixit in vitro. A més, el medi pot ser enriquit amb aminoàcids, vitamines i reguladors del creixement.

Els medis de cultiu es poden utilitzar de forma líquida o amb un agent gelificant com l'agar. El medi més utilitzat universalment és el de Murashige & Skoog (1962) (MS), amb més o menys modificacions.

Treball en condicions asèptiques

Abans d'iniciar el cultiu de teixits vegetals in vitro cal seguir una sèrie de precaucions per evitar les contaminacions microbianes que podrien fer malbé els experiments. S'han de utilitzar per això una sèrie de procediments asèptics similars a les estrictes precaucions que prenen els cirurgians a les sales d'operacions. Com més estrictes siguem, més petit serà el risc de contaminació.

Tota la manipulació del material esterilitzat prèviament s'ha de fer en un ambient també estèril, per això s'utilitzen cambres bacteriològiques de manipulació amb guants o, com en el nostre cas, cambres de flux laminar. La cambra s'ha d'encendre una estona abans de començar a treballar. Cada matí abans d'iniciar el treball i cada vespre en acabar s'ha de netejar amb una solució d'etanol al 70%. Tot el material que s'introdueix dins la cambra de flux s'ha de polvoritzar amb una solució d'etanol al 70%.

Per a la manipulació de l'instrumental (prèviament esterilitzat) es pot utilitzar l'esterilització per flama després de submergir-lo en etanol, però aquesta pràctica és perillosa, ja que l'alcohol és molt inflamable i el flux de la cabina està dirigit cap a l'operari. Per això les operacions de flamejar l'instrumental s'han de fer amb molta cura. Una altra opció és l'esterilització per calor seca amb un petit forn situat dins la cabina.

Una font de contaminació important són les mans de l'operari, per això és molt important netejar-se les mans amb aigua i sabó i polvoritzar-les amb una solució d'etanol al 70%.

Material

Material vegetal

Brots vegetatius sans de distintes espècies (coleu, violeta africana, etc.)

Material estèril necessari per grup

- Pots amb 100 ml de medi de cultiu MS ajustat pH 5.6 ± 0.1 .
- Paper de filtre (6 plaques petites per alumne).
- 4 litres d'aigua destil·lada.
- Material de dissecció: tisores, bisturís i pinces curtes i llargues, agulles.
- Erlenmeyer de boca ampla.
- Tassons de precipitats grossos.
- Plaques de Petri de plàstic.

Material no estèril necessari

- Tisores, bisturís.
- Material de vidre divers per preparar solució desinfectant.
- 1 L d'etanol al 70%.
- 1 L d'hipoclorit sòdic al 20%.
- Tween 20.

3

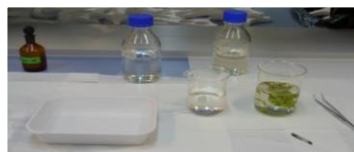
Procediment

Tractament i esterilització del material vegetal

- Eliminau les fulles dels brots amb tisores o bisturí.
- Tallau-ne seccions de 3 cm amb gemmes laterals (foto 1).
- Dins la cabina de flux (si és possible):
- Submergiu-los en etanol al 70% durant 1 minut.
- Submergiu-los en hipoclorit sòdic al 20% (10 g de clor actiu per litre) amb dues gotes de Tween 20, durant 10-15 min.
- Rentau-los tres vegades amb aigua destil·lada estèril dins plaques de Petri estèrils.
- Eixugau-los sobre paper de filtre dins la placa de Petri petita.



Foto 1. Exemple de tall de seccions nodals.



Procediment de desinfecció del material vegetal

Obtenció i sembra dels explants

- Sobre el paper de filtre tallau-ne els dos extrems.
- Trossejau els brots, separant el màxim nombre possible de nus amb la seva corresponent gemma axil·lar (foto 3).



Foto 3. Eliminació dels extrems inferior i superior dels explants

- Sembrau els explants als diferents medis (un pot per espècie amb tres o quatre explants o un sol explant en cas de sembra en tub) (foto 4).



Foto 4. Sembrada en tub de segments nodals (Albarrán et al., 2011)

- Identifiqueu els pots (medi, explant, data, autor de la sembra).

Incubació

- Incubau-los en cambra de cultiu a 25° C, amb un fotoperíode de 16 hores.

Seguiment

- A les tres o quatre setmanes valoreu la viabilitat dels explants i el nombre d'explants desenvolupats.
- Anoteu el desenvolupament de gemmes, arrels, etc.

Identifiqueu en quina espècie s'obtenen millors resultats.