



PROTOCOLO GENERAL DEL LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES (LCTV)

Titulo principal: ASPECTOS BASICOS	Confeccionó:	C. Billard ; C. Dalzotto
Sub-titulo: 2. Preparación de medios de Cultivo	Revisó:	C. Billard 2014
Nº: 2.4. Preparación de 1 litro de medio de cultivo M&S	Publicado	SI NO x WEB x
Año de creación: 2012	Impreso	SI x NO

PREPARACIÓN DE 1 LITRO DE MEDIO DE CULTIVO M&S

INSTRUMENTAL

- Phmetro
- Conductímetro
- Agitador magnético

MATERIALES

- 30 g Sacarosa
- 5,1 g Agar Tipo Britania
- 100 ml Solución x 10 de M&S (Ver protocolo 23-Medio basico M&S)
- Soluciones reguladoras de pH NaOH o KOH en una concentración de 0,1 N para alcalinizar el medio y ácido clorhídrico para acidificar (evitar usarlo por la dificultad de su manipulación) .
- Carbón activado (de ser necesario incorporarlo al medio de cultivo, cantidad necesaria según tratamiento)
- Soluciones hormonales (de ser necesaria su incorporación)
- Erlenmeyer con capacidad de 2 L
- Matraz aforado con capacidad de 1 L
- Vaso precipitado con capacidad de 1 L
- Frascos y/o tubos de ensayo de vidrio, cajas de Petri 5 cm de diámetro, de acuerdo a lo requerido en el ensayo

PROCEDIMIENTO

1. Pesar los componentes sólidos: sacarosa, agar Tipo A Britania para medio semisólido y si se corresponde carbón activado (0,5 a 2 g.L).
2. En el erlenmeyer colocar 500 ml de agua destilada.
3. Retirar del freezer la solución concentrada (SN) de macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, glicina y Myo-inositol, descongelarla en baño maría o microonda.
4. Tomar 100 ml de M&S concentrado y colocarlo en erlenmeyer del paso 2.
5. Calentar la preparación (70 °C) y agregar la sacarosa hasta su disolución.
6. Enrazar el medio de cultivo con agua destilada en el matraz aforado.
7. Colocar el medio del cultivo en el vaso de precipitado y ajustar su pH (5,6 – 5,8) con soluciones reguladoras (Ver protocolo 11-uso phmetro).

8. Pasar el medio de cultivo al erlenmeyer, calentar hasta 80 °C agregar el agar agar agitando periódicamente la solución hasta la disolución del agar (no llegar al punto de hervor), el medio de cultivo debe quedar transparente.
9. Si corresponde agregar carbón activado.
10. En caso que sea un medio de cultivo con reguladores de crecimiento (hormonas) corresponde agregar en esta etapa las alícuotas correspondientes y agitar bien el medio de cultivo completo (Ver protocolo 25- solución hormonal para medio de cultivo).
11. Distribuir el medio de cultivo en recipientes de vidrio de acuerdo al requerimiento del ensayo.
12. Para siembra de semillas de orquídeas se utilizarán cajas de Petri de 5 cm. Esterilizar previamente y secarlas (Ver protocolo 22- Esterilización). El medio de cultivo se colocará en envases de vidrio para su esterilización y posterior distribución en las cajas. Con el medio de cultivo caliente y en mesa de flujo laminar se procederá a distribuir el medio de cultivo en las cajas de petri las que se dejaran en el lugar hasta que se enfríe el medio de cultivo.
13. Una vez fraccionado el medio de cultivo, los tubos y los frascos, son obturados con papel de aluminio y colocados en cestillas.
14. Colocar en el autoclave las cestillas con los recipientes esterilizar a una temperatura de 121 °C y una presión de 1 atm por 20 min (Ver protocolo 17 -uso del autoclave).
15. Una vez finalizada la esterilización dejar enfriar el autoclave, retirar las cestillas y almacenar los recipientes hasta su uso en un lugar protegido de contaminación (usar preferentemente cajas plásticas grandes con tapa hermética).

Confeccionó: Billard Cristina y Carlos Dalzotto (05/03/12) revisado y actualizado por CE Billard, setiembre 2014.

Ultima Actualización: Abril de 2015 (Víctor Lallana)

Como citar este documento:

Billard, C.E. ; Dalzotto, C.A. (2012). Protocolo N° 24. Preparación de 1 litro de medio de cultivo M&S. Disponible en: <http://www.orquier.fca.uner.edu.ar/> [Consulta: dd/mm/aa]