



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

Titulo principal: ASPECTOS BASICOS	Confeccionó:	C. Dalzotto
Sub-titulo: 2. Preparación de medios de Cultivo	Revisó:	C. Billard (2014)
Nº: 2.5. Preparación de soluciones hormonales para medios de cultivos	Publicado	SI     NO  x  WEB  x
Año de creación: 2010	Impreso	SI  x   NO

**PREPARACIÓN DE SOLUCIONES HORMONALES PARA MEDIOS DE CULTIVO**

**INSTRUMENTAL**

- Balanza precisión
- Anafe o microondas para calentar agua
- Heladera para conservar las soluciones

**MATERIALES**

- Erlenmeyer de 50 ó 100 ml
- Espátula metálica para obtener alícuotas de los reguladores vegetales
- Vaso precipitado 250 ml
- Matraz aforado de 100ml para enrazar las soluciones
- Reguladores vegetales
- Ácido clorhídrico
- Hidróxido de potasio KOH 1 o 5 N
- Envases de vidrio oscuro para conservar las soluciones
- Lápiz de grafito y goma
- Rótulos autoadhesivos para los envases de soluciones

**2.5.1. PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DE SOLUCIONES HORMONALES (REGULADORES VEGETALES)**

a) Como preparar 100ml de solución a 500pp de **citocininas - Kinetina (Kin)** Cinetina, BA – BAP (6 - Benzylamina purine)

- pesar 0,05 g, colocarlo en un erlenmeyer de 50 a 100 ml. Agregar gotas de HCl para mojar la droga sin que sobre.
- Dejar disolver 10 a 20 min.
- Si es que no se disuelve agregar un poco de agua caliente, dejar 2 - 3 horas sin agitación. Llevar a 100 ml con agua destilada, una vez que está disuelto y frío y rotulado guardar en la heladera en frasco oscuro.

Para preparar dicha hormona en una concentración de 1000 ppm se debe pesar 0,1 g y seguir el mismo procedimiento antes explicado.

b) Como preparar 100 ml de **auxinas** en una concentración de 500 ppm

Ácido naftalacético (ANA), Acido indolbutírico (IBA)

- Pesar 0,05 g del regulador seleccionado, colocarlo en un erlenmeyer de 50 ó 100 ml.
- Agregar gotas de KOH 1N o 5N según la cantidad, para sólo mojar la droga. Dejar disolver 10 a 20 min.
- Si no se disuelve, agregar agua caliente (40 ml), dejar 2 - 3 horas sin agitación. Se puede calentar un poco.
- Llevar a 100 ml con agua destilada fría, una vez que está disuelto, rotular y guardar en la heladera en frasco oscuro.

Para preparar dichas hormonas en una concentración de 1000 ppm se debe pesar 0,1 g y seguir el mismo procedimiento antes explicado.

## 2.5.2. PROCEDIMIENTO PARA INCORPORAR REGULADORES VEGETALES A LOS MEDIOS DE CULTIVO

Para determinar el volumen de la hormona que se debe adicionar a 1 L de medio de cultivo, se necesitan tener en cuenta:

- La concentración a la cual esta preparada la solución hormonal (ppm).**
- La dosis hormonal que se quiere adicionar al medio de cultivo (mg/L).**

Se dispone de la Tabla 1, de doble entrada donde en la columna de la izquierda se busca la dosis hormonal (mg/L) y en las de la derecha las partes por millón de las soluciones disponibles de las hormonas. Por ejemplo para una dosis de 0,1 g/L de citocinina y una solución hormonal con concentración de 500 ppm, se necesita tomar una alícuota de **2 ml** de la solución hormonal para adicionar a 1 L de medio de cultivo.

**Tabla 1.** Tabla de doble entrada con dosis hormonal necesaria y ppm de soluciones madres de hormonas vegetales.

mg/L	Parte por millón (ppm)			
	250	300	500	1000
0,01	0,4 ml	0,286 ml	0,2 ml	0,1 ml
0,02	0,8 ml	0,57 ml	0,4 ml	0,2 ml
0,05	2 ml	1,43 ml	1 ml	0,5 ml
0,08	3,2 ml	2,28 ml	1,6 ml	0,8 ml
0,1	4 ml	2,86 ml	<b>2 ml</b>	1 ml
0,2	8 ml	5,71 ml	4 ml	2 ml
0,5	20 ml	14,3 ml	10 ml	5 ml
1	40 ml	28,6 ml	20 ml	10 ml
2	80 ml	57 ml	40 ml	20 ml

### Modo de preparar las soluciones

- **Hierro-EDTA.**

Disolver por separado  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  (Ac. Etilendiamino-tetracético).

Agregar el  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  al EDTA.

Si precipita regular pH 3,5-4,5 y calentar a baño María.

Ferric-Sodium Salt-FW 367,1 para  $\frac{1}{4}$  litro pesar 0,9177 g (incluye el Fe y el Na).

- **Kinetina (K) Cinetina: (500 ppm)**

BA-BAP (6-Benzylaminopurine).

Pesar 50 mg (0,05 gr.), colocarlo en un erlenmeyer pequeño.

Agregar gotas de HCl para mojar la droga.

Dejar disolver.

Agregar agua caliente si es que no disuelve y dejar 2 a 3 horas sin agitación.

Llevar a 100 ml con agua destilada.

Guardar en heladera en frasco oscuro.

Se agrega 1 ml por litro de medio.

- **Auxinas: (500 ppm)**

Acido naftalenacético (ANA)

Acido indol-butírico (IBA)

Acido indol-acético (AIA) foto lábil e inestable. NO autoclavar.

Pesar 50 mg (0,05 g) y colocar en un erlenmeyer pequeño.

Agregar gotas de KOH 1 N o 5 N, según la cantidad, para que moje la droga.

Dejar disolver.

Agregar un poco de agua caliente. Si no se disuelve dejar 2-3 h sin agitación.

Se puede calentar un poco.

Llevar a 100 ml con agua destilada una vez que esté disuelto y frío.

Guardar en la heladera en frasco oscuro.

Se agrega 1 ml por litro de medio.

- **Acido Giberélico (GA3)**

Termolábil (1 mgr/ml).

Disolver 12,5 mg. (0,0125 gr.) en 10 ml. de agua destilada.

- **Solución Stock de Tiamina. HCl (4 mg./ml.)**

Disolver 60 mg (0,06 g) de tiamina en 15 ml de agua destilada.

Guardar en congelador.

75 mg en 15 ml.      5 mg/ml

- **Glicina. (400 ppm)**

Pesar 400 mg (0,04 g), disolver y llevar a 100 ml con agua destilada.

**Solución 200 ppm/litro:** Pesar 200 mg=0,2 g y llevar a 1000

- **Benlate (5 g/100 ml de H<sub>2</sub>O o 50 mg)**

Pesar 5 g de Benlate.

Agregar gotas de ETOH 96° hasta hacer una pasta.

Llevar a volumen de 100 ml con agua destilada.

Se agrega 1 ml por litro de medio.

#### Bibliografía

Manuales de cultivo in vitro y consultas de los autores con integrantes de las cátedras de Fisiología Vegetal de UNNE y Rosario.

Ultima Actualización: Abril de 2015 (Víctor Lallana)

#### Como citar este documento:

Dalzotto, C.A.; Billard, C.E. (2010). Protocolo N° 25. Preparación de soluciones hormonales para medios de cultivos. Disponible en: <http://www.orquier.fca.uner.edu.ar/> [Consulta: dd/mm/aa]