



Tema 3

El medio de cultivo

Elementos esenciales

Epstein (1971)

- 1. No se puede completar el ciclo sin él**
- 2. Efecto irremplazable por otro elemento**
- 3. Forma parte de una molécula esencial**

- Macronutrientes**
 - N, K, Ca, P, Mg, S**
- Micronutrientes**
 - Fe, Ni, Cl, Mn, Zn, B, Cu, Mo**

Otros componentes

- **Azúcar**
- **Reguladores del desarrollo**
- **Vitaminas**
- **Agente solidificante**
- **Aminoácidos y otros suplementos de N**
- **Compuestos no definidos (leche coco...)**
- **Tampones**

Algunas reseñas...

- *In vitro*, la incorporación de ión aumenta con la concentración hasta 2xMS, con excepciones
- La incorporación activa es menos dependiente de la concentración de ión que la pasiva
- Ambas están influidas por la concentración de otros elementos, el pH, la temperatura, y el estado fisiológico y bioquímico del tejido
 - La demanda de N aumenta cuando abundan los carbohidratos en las células
- El N y el P (especialmente amonio) se absorben más rápidamente cuando el cultivo empieza a funcionar
- Nutrientes, especialmente micronutrientes, pueden estar como impurezas en el agar

Macronutrientes

- NITROGENO

- Forma oxidada- NO_3^-
- Forma reducida- NH_4^+

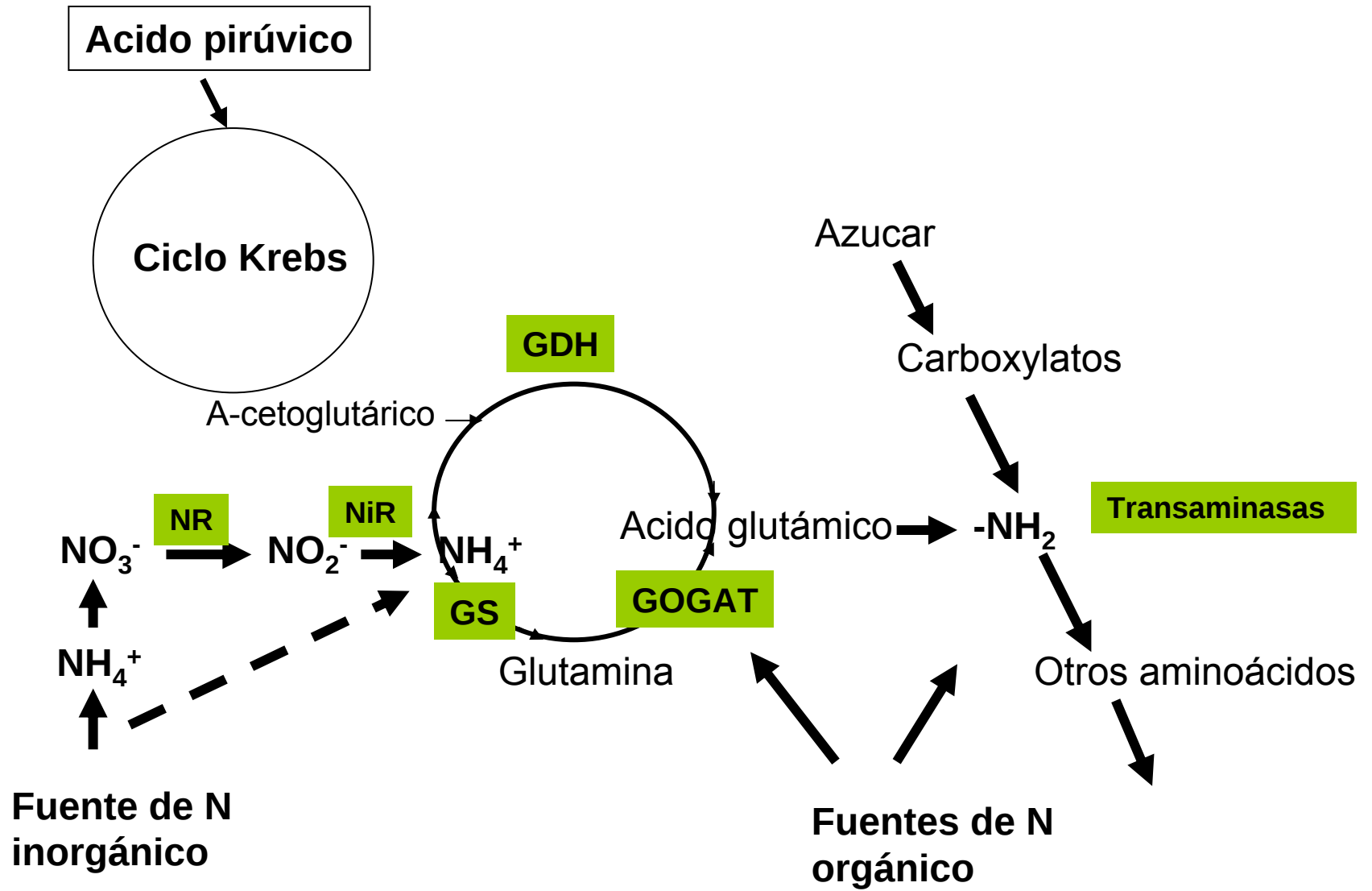
- La toma de nitrato conlleva la salida de aniones, alcalinizando el medio
- La toma de amonio conlleva la salida de protones, acidificando el medio
 - En un medio con ambos, inicialmente la toma más rápida es de amonio y el pH cae, inhibiéndose la toma de amonio y estimulándose la de nitrato.

Correlación entre toma de N, crecimiento celular y conversión de N en materiales orgánicos

- **Una buen suministro de N mantiene las células cultivadas indiferenciadas**
- **La falta de aporte de N dispara el metabolismo de compuestos libres de N, tales como lignina, asociados a la diferenciación de células con pared secundaria**

El NO_3^- es la forma de aporte preferente de N a la planta

- ¿Por qué no añadir sólo amonio al medio de cultivo si el NO_3^- se transforma en amonio?
- Toxicidad del ión amonio a alta concentración
- Necesidad de mantener el pH del medio
- Muchos tipos de cultivo responden mejor con las dos formas
- Evitar hiperhidricidad



Balance correcto de iones?

- Concentración total de N en el medio
- Tasa nitrato/amonio

Importancia del balance nitrato/amonio

Plant species	Type of culture	Results	NO ₃ ⁻ (mM)	NH ₄ ⁺ (mM)	Ratio of NO ₃ ⁻ to NH ₄ ⁺	Total N (mM)	Reference
<i>Nicotiana tabacum</i>	Callus	Optimum callus growth	39.4	20.61	1.91	60.01	Murashige and Skoog (1962)
<i>Nicotiana tabacum</i>	Callus	Equal callus growth and shoot formation	40.0	20.0	2.00	60.0	Behki and Lesley (1980)
			48.0	12.0	4.00	60.0	
			52.0	8.0	6.50	60.0	
	Callus	Callus growth and root formation	24.0	12.0	2.00	36.0	
<i>Nicotiana tabacum</i>	Shoot regeneration from leaf disks	Optimal number of shoots	40	20	2.3	60	Ramage and Williams (2002)
<i>Dioscorea</i> spp.	Callus	Callus growth and adventitious plantlets	6.25	6.25	1.00	15.0	Asokan <i>et al.</i> , (1983)
<i>Diospyros kaki</i>	Shoot	Shoot proliferation	19.7	20.61	0.96	40.31	Sugiura <i>et al.</i> , (1986)
<i>Rubus ideaus</i>	Shoot	Shoot proliferation	19.7	10.30	1.91	30.0	Welander (1987)
<i>Prunus avium</i>	Shoot	Shoot proliferation	29.09	10.3	2.82	39.40	Righetti <i>et al.</i> , (1988)
<i>Castanea sativa</i> and <i>Castanea</i> hybrids	Shoot	Shoot proliferation	18.00	3.00	6.00	21.0	Piagnani and Eccher (1988)
<i>Peltophorum pterocarpum</i>	Anther	Callus formation and shoot regeneration	34.7	9.99	3.47	44.6	Lakshmana Rao and De (1987)
<i>Euphorbia esula</i>	Suspension	Plant regeneration	18.00	8.00	2.25	27	Davis <i>et al.</i> , (1988)
<i>Haplopappus gracillis</i>	Suspension	Improved growth rate	33.78	14.99	2.25	8.77	Eriksson (1965)
<i>Oryza sativa</i>	Protoplast	Cell division	18.79	1.01	18.53	19.80	Yamada <i>et al.</i> , (1986)
<i>Allium sativum</i>	Shoot	Shoot proliferation	35.0	8.0	4.4	43.0	Luciani <i>et al.</i> , (2001)
<i>Solanum tuberosum</i>	Shoot	Shoot proliferation	41.3	17.7	2.3	59.0	Avila <i>et al.</i> , (1998)

Aminoácidos como única fuente de N



- *Nicotiana tabacum*: Muller and Grafe, 1978.
- *Daucus carota*: Anderson, 1976.

- **Glicina, glutamina**
- **Hidrolizados de proteínas: caseína**
 - **Calcio**
 - **Fosfato**
 - **Microelementos**
 - **Mezcla de hasta 18 aa**

Beneficios

- Ahorro de ATP empleado en la conversión de N inorgánico en aa.
- Agente quelante
- Aumento de la asimilación de N
- Evitar la toxicidad del amonio en ciertos cultivos
 - Gamborg and Shyluk 1970
 - **Ochatt** and Caso 1986; Ochatt and Power (1988a,b)
- Crecimiento en cultivos a bajas densidades
 - Kao and Michayluk 1975

Fosfato

- **Presente en:**
 - Ácidos nucleicos, fosfolípidos, coenzimas...
- **Forma de absorción:**
 - H_2PO_4^-
- **Funciones:**
 - Energía vía fotosíntesis/respiración
 - Regulación de la actividad de proteínas

Potasio

- **Potencial osmótico de las células**
- **Extensión celular**
- **Movimiento de estomas**
- **Regulador del pH**
- **Activación de enzimas**

Sodio

- **Estabilizador osmótico en plantas halófitas**
 - Acumulan altas concentraciones en vacuolas y mantienen la presión de turgor necesaria para el crecimiento
- **Esencial sólo en plantas CAM tolerantes a la sal**
 - Necesario para fijar CO_2 en fotosíntesis

Magnesio

- Esencial para la clorofila
- Formación de ATP
- Agregación de las subunidades de ribosomas
- Como el potasio, balancea y neutraliza aniones y ácidos

Azufre

- Síntesis de proteínas
- Síntesis de lípidos
- Regular la estructura y actividad de proteínas mediante puentes S-S
 - Glutation
 - Detoxificación de radicales del O
 - Tioredoxina y Ferredoxina
 - Química redox

Calcio

- Equilibrio de aniones pero no es fácilmente difusible
- Unión a moléculas biológicas y establecimiento de enlaces coordinados
 - Estructura y propiedades de la membrana celular y lámina media de la pared celular
 - Síntesis de celulosa
 - Cofactor enzimas síntesis de ATP
 - Mensajero secundario (calmodulina)

Cloro

- Apertura estomática
- Mantenimiento de la presión de turgor
- Equilibrio iónico en los cambios en los niveles de K, Mg y Na
- Fotolisis *in vitro*, *in vivo*?

Micronutrientes

- Fe, Mn, Zn, B, Cu, Co, Mo
- Componentes de proteínas de importancia metabólica y fisiológica
- Funcionamiento del aparato genético
- Actividad de los reguladores del desarrollo

Manganeso

- **Actividad de enzimas**
 - descarboxilasas, dehydrogenasas, kinasas, oxidasas, superóxido dismutasas
- **Estructura del cloroplasto**
- **Reacciones redox (Mn II-Mn IV)**
 - fotosíntesis

Zinc

- **Componente de metalo-enzimas**
- **Requerido por más de 300 enzimas**
 - DNA y RNA polimerasas
- **Relacionado con las síntesis de IAA a partir de triptófano**

Boro

- Integridad y funcionamiento de la membrana plasmática y pared celular
- Biosíntesis de lignina
- Mantenimiento de la actividad meristemática
- Acción del fitocromo y respuestas de las plantas a la gravedad

Cobre y Molibdeno

- Cu(I) and Cu (II)
- Unión a enzimas que reaccionan con el O
 - Citocromo oxidasa (respiración)
 - Superóxido dismutasa (eliminación de radicales del O formando agua)
- Plastocianina (transferencia electrónica en fotosíntesis)
- Mo: metabolismo del N
 - nitrato reductasa y nitrogenasa

Cobalto

- **Vitamina B12**
 - Síntesis de ácidos nucleicos
- **Protección contra la toxicidad de quelados metálicos**
- **Inhibición de reacciones oxidativas catalizadas por Fe y Cu**
- **Inhibe la síntesis de etileno**

Aluminio y Niquel

- Al
 - Cultivo de helechos
- Ni
 - Ureasa (urea $\longrightarrow$ amonio)

Iodo

- Euwens (1976)
 - Evita el browning en la palma de coco
- Quoirin and Lepoivre (1977)
 - Mejora supervivencia y desarrollo de meristemos de *Prunus*

Silicio

- Segundo elemento más abundante en la Tierra
 - 46.6% Oxígeno(O)
 - 27.7% Silicón(Si)
 - 8.1% Aluminio(Al)
 - 5.0% Hierro(Fe)
 - 3.6% Calcio(Ca)
 - 2.8% Sodio(Na)
 - 2.6% Potasio(K)
 - 2.1% Magnesio(Mg)
- Epstein 1971
 - Importante en estrés biótico y abiótico
- No se añade normalmente

Hierro

- **Reacciones redox**
 - Cloroplastos, mitocondria, peroxisomas
- **Requerido en la formación de precursores de clorofilas**
- **Componente proteína ferredoxina**
 - Transporte electrónico en fotosíntesis

- Problemas de precipitación en medios aireados y/o ligeramente alcalinos
 - Fe^{2+} se oxida a Fe^{3+} y el Fe libre precipita como $\text{Fe}(\text{OH})_3$
 - Skoog y cols. empiezan a usar EDTA en medio de cultivo de callo de tabaco en 1956 y discuten los resultados en Murashige and Skoog (1962)

Compuestos quelantes

- **Compuestos quelados**
 - Los metales pueden ser ligados o secuestrados en solución en condiciones donde los cationes libres podrían reaccionar con los aniones y formar compuestos insolubles
 - El quelado debe poder liberar el ión

Cruickshank et al. 1987. El Cu^{2+} unido a aa es más activo biológicamente que el ión libre

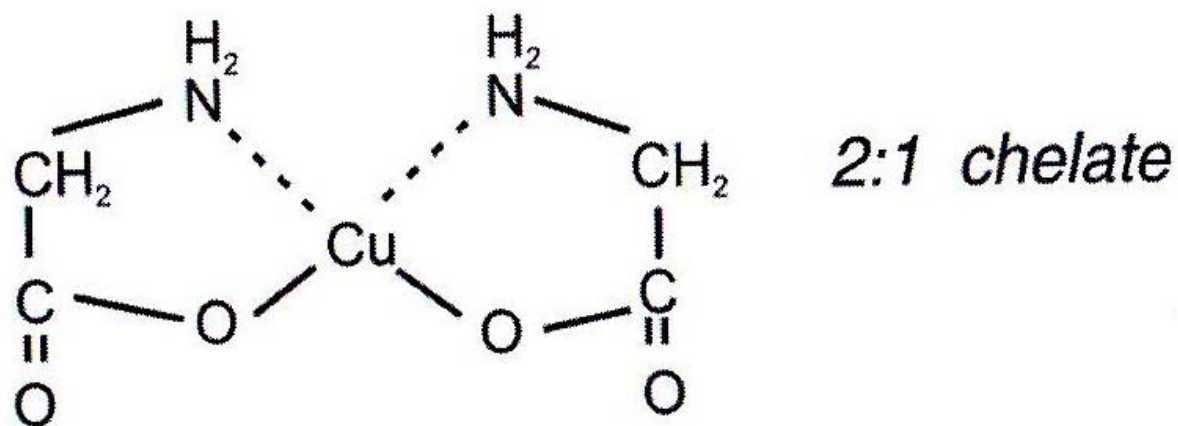
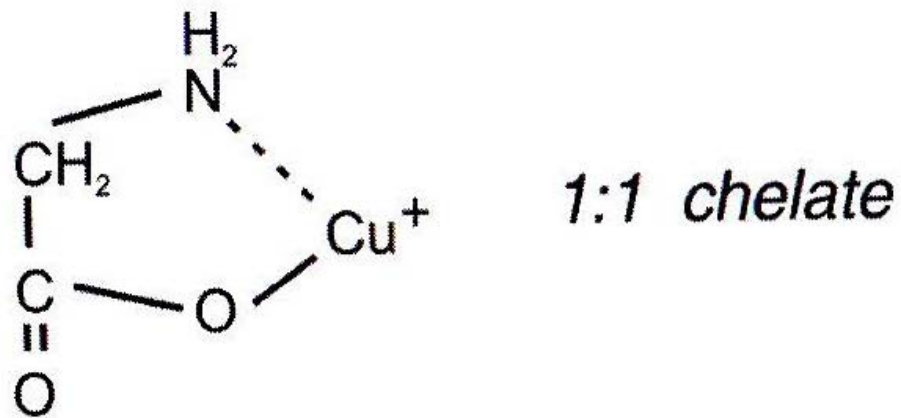
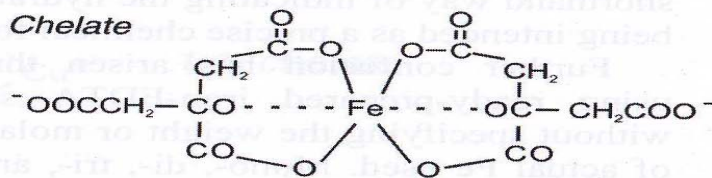


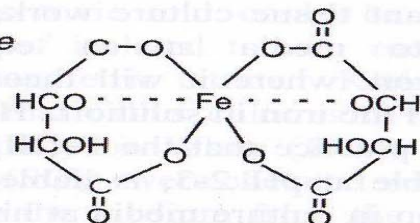
Fig. 3.5 Copper chelated with amino acid, glycine.

Chelate

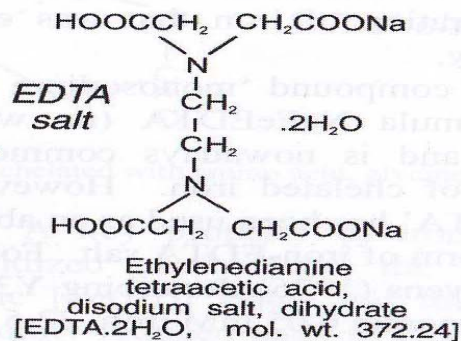


2:1 chelate of ferric (Fe III)
ion with citrate

Chelate



2:1 chelate of Ferric (Fe III)
ion with tartrate



**EDTA
salt**

.2H₂O

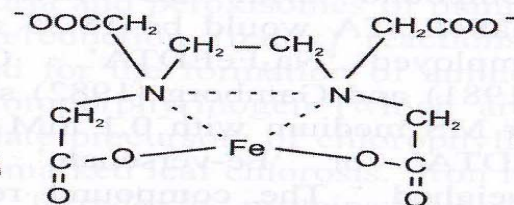
HOOCCH₂ CH₂COONa

Ethylenediamine
tetraacetic acid,
disodium salt, dihydrate

[EDTA.2H₂O, mol. wt. 372.24]

Plus
Fe²⁺

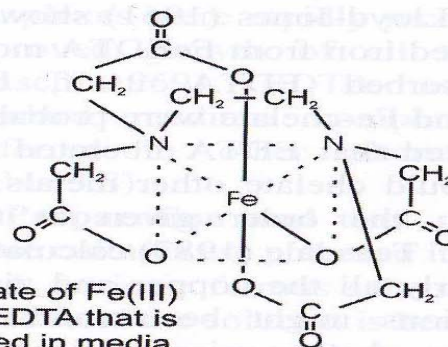
**Fe(II)EDTA
chelate
in solution**



Chelate of Fe(II)
with EDTA

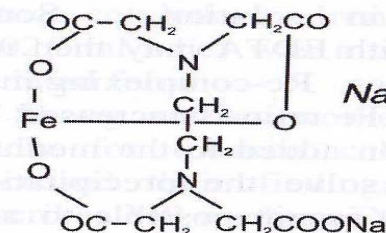
(e⁻)

Chelate of Fe(III)
with EDTA that is
formed in media



**Fe(III)EDTA
chelate
in solution**

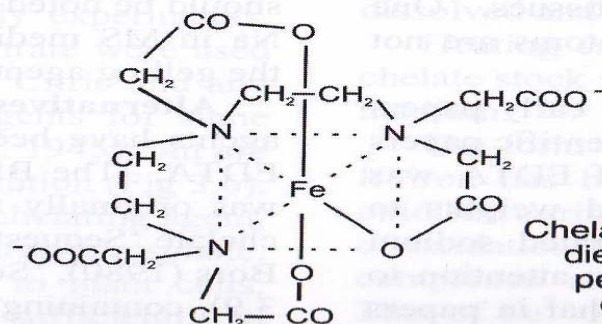
**NaFe(III)EDTA
salt**



Ferric sodium salt
of EDTA

[NaFe(III)EDTA, mol. wt. 367.07]

**Fe(III)DTPA
chelate
in solution**



Chelate of Fe(III) with
diethylenetriamine
pentaacetic acid
disodium salt

Agentes quelantes

- **EDTA**
 - Ethylenediaminetetraacetic acid
- **EGTA**
 - Ethyleneglycol-bis(2-minoethylether)tetraacetic acid
- **EDDHA**
 - Ethylendiamine-di(0-hydroxyphenyl)acetic acid
- **DTPA**
 - Diethylenetriaminepentaacetic acid
- **DHPT**
 - 1,3-diamino-2-hydroxypropanetetraacetic acid