

Departamento de Fermentaciones Industriales
Madrid

Mejoras en el cultivo de tejidos vegetales

por

J. L. García-Bilbao (*) y José M.^a Garrido (**)

(Recibido para publicar el 24 de octubre de 1959)

Al iniciarse recientemente estudios sobre el cultivo de tejidos vegetales, el principal problema que se nos planteó fue su conservación, pues aunque conseguidos inicialmente libres de infecciones microbianas, posteriormente nuestro trabajo se perdía. El algodón que cerraba tubos y frascos al encontrarse en un ambiente sumamente húmedo se convertía en un medio óptimo para el desarrollo de un gran número de hongos filamentosos, que acababa atravesando el tapón e invadiendo nuestros cultivos.

Dos soluciones cabían a este problema: el algodón se impregnaba con un compuesto fungicida o fungistático, o bien se le sustituía por un material que pudiera flamearse fácilmente y que previniendo el acceso de esporas externas, permitiera una buena aireación (1, 2 y 3).

Los ensayos realizados con ácido sórbico y con lana de vidrio constituyen el objeto de esta comunicación.

Material y métodos

Cultivos de tejidos de la zona del cambium de la raíz de la zanahoria en frascos Erlenmeyer (100 c. c.), conteniendo

(*) Doctor en Ciencias Químicas por la Universidad de Madrid; ex-Research Associate of the Rockefeller Institute. New York.

(**) Doctor en Ciencias Químicas por la Universidad de Madrid, Doctor of Philosophy de la Universidad de Manchester, Director del Departamento de Fermentaciones Industriales del Patronato "Juan de la Cierva".

un medio nutriente semisólido (10 c. c.) fueron llevados a cabo utilizando tres tipos de tapones: a) algodón ordinario, b) algodón impregnado con ácido sórbico, c) lana de vidrio cubierta lateralmente con hilatura fina de amianto, que la hace manejable.

Los tapones y las bocas de los frascos de cultivo fueron protegidos con papel vegetal.

Los cultivos se mantuvieron a la temperatura ambiente (24-26°C) durante un mes en recipientes transparentes conteniendo agua en el fondo (1 cm de altura) y buena aireación.

Raíces de zanahorias frescas y seleccionadas (10-15 cm de longitud), limpias y desinfectadas mediante lavados; una vez secas fueron abiertas por la mitad, exponiendo una superficie aséptica, de la cual mediante una espátula esterilizada se cortaron trocitos cónicos (de menos de 1 cm de diámetro y altura) en la zona del cambium.

Generalmente, se utilizó la solución de GAUTHIERET, modificación M₁ — con 1 % de Agar para darle mayor consistencia sólida a pH = 6; si bien en alguna ocasión, fue sustituida la parte mineral por la más completa fórmula prescrita por HELLER (4,5).

La esterilización se llevó a cabo en autoclave y soluciones de hipoclorito sódico y sulfato de cobre al 0,1 % fueron utilizadas en la desinfección.

En la impregnación del algodón se utilizó una disolución alcohólica al 0,4 % de ácido sórbico.

Resultados

a) Siete cultivos de tejidos de la zona del cambium de raíces de zanahorias realizados en frascos Erlenmeyer tapados con un simple algodón esterilizado fueron desperdiciados por el desarrollo de microorganismos a través del tapón (*Penicillium* y otros hongos filamentosos).

b) Siete cultivos del mismo tejido realizados en frascos Erlenmeyer tapados con algodón impregnado con ácido sórbico se conservaron asépticos; apreciándose en un experimento invasión bacteriana. El color de los tejidos se debilita, sin apreciación de crecimiento del tejido.

c) En siete cultivos del mismo tejido llevados a cabo en frascos Erlenmeyer tapados con lana de vidrio cubierta lateralmente con hilatura fina de amianto se conservaron asépticos; apreciándose, también, en uno invasión bacteriana. Sensible palidez de color y desordenado crecimiento del tejido es

apreciado en las zonas desarrolladas. Los tejidos aumentaron tres veces sus tamaños originales, como puede apreciarse en la fig. 1.

El papel vegetal de protección de los tapones y de las bocas de los frascos de cultivo, en general, fue invadido por los microorganismos.

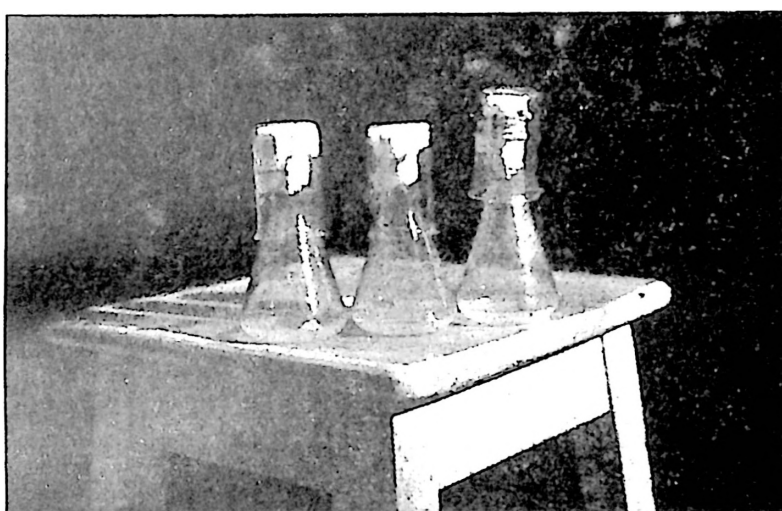


Figura 1. — Tipos de cultivos en frascos Erlenmeyer.

- a) Experimento de la izquierda, con algodón ordinario mostrando la invasión de los hongos.
- b) Experimento del centro, con algodón impregnado con ácido sórbico.
- c) Experimento de la derecha utilizando el tapón de lana de vidrio cubierta lateralmente con hilatura fina de amianto, mostrando el desordenado crecimiento del tejido cambial de la raíz de la zanahoria.

Conclusiones

1.^a El algodón al humedecerse disminuye el acceso de aire. El favorable desarrollo de microorganismos en estas condiciones hace del algodón ordinario un material poco apto para la conservación aséptica del cultivo en ambientes húmedos.

2.^a Al impregnar el algodón con ácido sórbico se evita la invasión de microorganismos en general. El ácido sórbico simplemente adherido, fácilmente puede desadherirse adicionándose al medio.

3.^a El tampón de lana de vidrio cubierta lateralmente con hilatura fina de amianto presenta estas ventajas : se puede flamear y permite buena aireación, óptimas condiciones para una buena esterilización del medio y crecimiento del tejido.

La ocasional invasión bacteriana proviene del tejido en su trasplante.

Resumen

La conservación aséptica de los cultivos de tejidos vegetales en ambientes húmedos realizados en frascos Erlenmeyer tapados con algodón se perdía por desarrollo de un gran número de hongos filamentosos a través del tapón.

El ácido sórbico, como agente fungistático, impregnando el algodón evita la invasión microbiana en general; pero el algodón humedecido disminuye el acceso de aire.

La lana de vidrio cubierta lateralmente con fina hilatura de amianto, pudiendo flamearse — previniendo los efectos de esporas externas — y permitiendo una buena aireación, constituye un práctico tapón.

Summary

Improvements in the Cultivation of Plant Tissues

The aseptic conservation of Plant Tissue Cultures performed in Erlenmeyer flasks stoppered with cotton in humid environments was lost by the development of Filamentous Fungi through the stopper.

Sorbic acid — as fungistatic agent — impregnating the cotton prevents the microbial spread ; but the humid cotton reduces the access of air.

Glass-wool, laterally protected with filature of asbestos, enable to flame — to avoid the effects of external spores — and allowing a good aeration constitutes a practical stopper.

Bibliografía

- (1) EMARD, L. O., and VAUGHN, R. H.: Selectivity of Sorbic Acid Media for the Catalase Negative Lactic Acid Bacteria and Colostridia. *J. Bacteriol*, 63, 487, 1952.
- (2) COSTILLOW, R. N., COUGHLIN, F. N., ROBBINS, E. K., and WEN-TAR HSU: Sorbic Acid as a Selective Agent in Cucumber Fermentations. *Applied Microbiol*, 5, 373, 1957.
- (3) BELL, T. A., ETCHELIS, J. L., and BORG, A. F.: Influence of Sorbic Acid on the Growth of certain species of Bacterial, Yeasts and Filamentous Fungi. *J. Bacteriol*, 77, 573, 1959.

- (4) PHILLIP, R. WHITE: The Cultivation of Animal and Plant Cells. The Ronald Press Company, New York, 1954.
- (5) GAUTHERET, R. J.: The Nutrition of Plant Tissue Cultures. *Ann. Rev. of Plant Physiol*, 6, 433, 1955.