

CIP
64
T65.S

26/3/98

CULTIVO DE TEJIDOS

Manejo de Plántulas In Vitro en la Producción de Semilla de Papa

Judith Toledo, Nelson Espinoza y Ali Golmirzaie

Centro Internacional de la Papa
La Molina - Lima
30 MAR. 1998
BIBLIOTECA

Manual de Capacitación

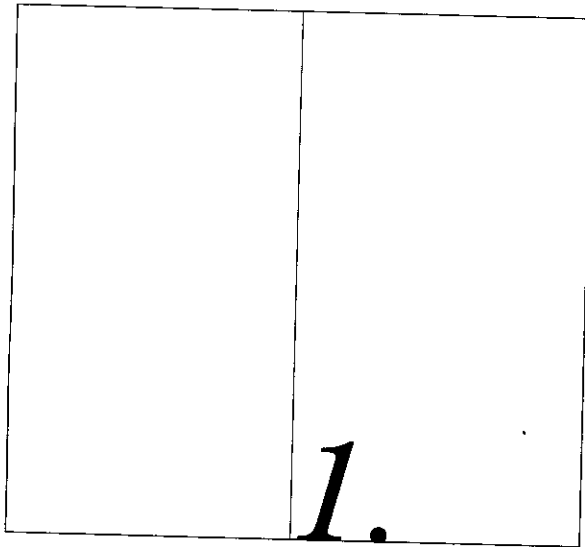
1998

10044

109119



CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA (CIP)



1.

Laboratorio de Cultivo de Tejidos

1.1 UNIDAD DE MICROPROPAGACION

Una unidad de micropropagación comprende un laboratorio de cultivo de tejidos y un invernadero de propagación.

En el planteamiento de una unidad de micropropagación debemos considerar los siguientes factores: el espacio disponible, el medio ambiente, los recursos financieros, el tipo de trabajo que se desarrollará y la capacidad de producción requerida.

Según la capacidad de producción y el espacio disponible podemos considerar tres tipos de unidades de micropropagación:

- a) A pequeña escala. Las instalaciones para el trabajo in vitro pueden ubicarse dentro de una casa en particular, usando el equipo y los materiales con que cuenta y que se pueden adecuar para las labores básicas de micropropagación. Estaría destinado a micropropagar plantas para aficionados, o plantas madres a invernaderos para su posterior propagación por métodos convencionales.
- b) A mediana escala. Se requiere diseñar, implementar y/o adecuar áreas específicas de trabajo, adquirir equipo y materiales propios para este tipo de labor, lo que permitiría incrementar la eficiencia y uniformidad de los resultados en la producción.
- c) A gran escala. Las instalaciones y equipos deben ser diseñados en función al trabajo que desarrollarán con la tendencia a la automatización para mantener un flujo de producción óptimo.

Operaciones Básicas

Las operaciones básicas que se realizan normalmente en un laboratorio de cultivo de tejidos se pueden resumir en:

- a) Lavado del material de vidrio
- b) Preparación de los medios de cultivo
- c) Esterilización de los medios y equipos
- d) Preparación de los explantes y transferencia aséptica de los materiales cultivados
- e) Incubación y crecimiento de los materiales cultivados hasta su madurez.

El trasplante de las plántulas enraizadas y su crecimiento posterior requiere de las condiciones de un invernadero adecuado.

Organización Básica

El laboratorio para el cultivo de tejidos vegetales requiere de una organización básica que comprende tres áreas:

- a) Laboratorio general provisto de espacios para trabajos independientes o comunes. Algunos equipos y materiales pueden ser de uso común para varios trabajadores a la vez (o área de preparación de medios).
- b) Área de manipulación aséptica del material vegetal (o área de transferencia).
- c) Área de mantenimiento de los cultivos bajo condiciones de luz, temperatura y humedad controladas (o cuartos de cultivo).

Como mínimo debe haber dos ambientes separados, uno para el lavado, esterilización, almacenaje de materiales y preparación de medios de cultivo, y otro para el mantenimiento de los cultivos (cuarto de cultivo).

La cámara de transferencia puede ubicarse dentro del laboratorio general o en una habitación especialmente diseñada como cuarto de transferencia, según las condiciones disponibles.

Area de Lavado y Preparación de Medios

La sección destinada para el lavado debe contar con un lavadero grande (de acero inoxidable, resistente a ácidos y álcalis), agua corriente, mesas que permitan trabajar de pie y anaqueles para secar y guardar el material lavado. El área de preparación de medios debe estar equipada con una refrigeradora para guardar los productos químicos y soluciones utilizadas en los medios de cultivo; balanzas, un potenciómetro, una cocina, un mezclador de medios, un destilador de agua y el autoclave u olla de presión. Estos dos últimos equipos deben estar lo más cerca posible al lavadero. Opcionalmente se usa la estufa para secar materiales.

Area de Cultivo

Es el área de incubación de los cultivos, donde las condiciones ambientales óptimas cambiarán según las especies en cultivo, por lo tanto se debe tener en cuenta las variaciones de temperaturas, la intensidad luminosa, la calidad de la luz, la humedad relativa y el fotoperíodo. La temperatura se controla con un equipo de aire acondicionado o con calentadores. Según el cultivo, la temperatura promedio de un cuarto de incubación varía alrededor de 25°C +/- 2°C. Para temperaturas más altas o más bajas se usarán equipos de aire acondicionado que permitan alcanzar las temperaturas deseadas. Es preferible usar termostatos que permitan que la variación de temperaturas en el cuarto no exceda los requerimientos del cultivo.

El flujo de aire debe ser uniforme dentro del cuarto de cultivo para poder conservar la misma temperatura en toda la habitación.

La humedad relativa es controlada indirectamente por los equipos de aire acondicionado. Si la humedad relativa decae bajo 50%, se producirá una pérdida de agua de los medios de cultivo y la concentración de las sales minerales aumentará, en detrimento de los cultivos. Con una humedad relativa alta (80-100%) habrá posibilidad de ingreso de contaminantes en los envases de cultivo. El promedio es entre 60 y 70%.

La fuente de luz está dada por lámparas fluorescentes y el fotoperíodo es controlado por un marcador horario. Las lámparas fluorescentes tienen ventaja sobre las lámparas incandescentes porque tienen una mejor calidad de luz, distribuyen la luz uniformemente y emiten menos calor. Sin embargo, algunos cultivos crecen mejor con una mezcla de ambos tipos de iluminación.

Los cultivos en su mayoría requieren de iluminación que varía entre 500 a 3000 lux. Algunos necesitan más de 5000 lux y otros oscuridad. Al usar lámparas fluorescentes se deberá tener en cuenta que los balastros generan calor y por lo tanto afectan la temperatura del cuarto de cultivo, por lo que los balastros deben instalarse fuera de la habitación.

La disposición de los estantes en los que se ponen los frascos o tubos con los cultivos variará según las dimensiones de la habitación. Los estantes pueden ser metálicos o de madera, de preferencia pintados de color blanco.

La dimensión de los estantes puede ser variable, una plataforma de incubación de 0.45 x 0.90 m, con una altura de 0.30 m, entre plataformas es aconsejable porque permite una buena iluminación, acceso y control a los materiales incubados. El espacio entre el suelo y la primera plataforma debe tener 0.15 m de altura, para facilitar la limpieza del piso. Se debe conservar

una distancia de 0.05 a 0.10 m entre la pared y los estantes para permitir la libre circulación del aire acondicionado.

Se recomienda pintura epóxica antifungosa (utilizada en las cámaras de refrigeración) para las paredes del laboratorio, como medida de prevención.

En la zona de ingreso al cuarto de cultivo, se recomienda colocar una bandeja en el piso con una alfombra que contenga un acaricida y un fungicida, a fin de impregnar los zapatos con estas sustancias.

El cuarto de cultivo debe estar aislado del ambiente externo a fin de mantener la temperatura y humedad relativa apropiadas y evitar el ingreso de contaminantes. Sellar las ventanas convenientemente, si las hay. El acceso al cuarto de cultivo sólo se permitirá al personal que labora en él.

Un laboratorio de cultivo de tejidos puede estar ubicado en cualquier área geográfica. Las condiciones ambientales internas controladas permiten un aislamiento con mínima influencia del exterior.

Para determinar la ubicación del laboratorio de cultivo de tejidos, se debe tener en cuenta los factores siguientes:

- Condiciones ambientales de crecimiento de las especies que se cultivarán
- Disponibilidad de energía eléctrica
- Disponibilidad de agua y desagüe
- Vías de comunicación cercanas.

Proceso de Producción

El proceso de producción comprende:

- La etapa de establecimiento del cultivo in vitro, y
- La etapa de producción.

La etapa de establecimiento del cultivo

Consiste en llevar plantas del campo a in vitro; para ello se selecciona un lote saneado (libre de patógenos) que garantice la calidad, uniformidad y vigor del material que será puesto en el mercado cuando concluya el proceso de producción.

Las plantas seleccionadas serán aquellas que tengan crecimiento, desarrollo y condiciones fitosanitarias óptimas. Estas plantas pueden pasar por el proceso de termoterapia y cultivo de meristemas. Las plántulas servirán como fuente de explantes para el proceso de producción. Si no necesita hacer una limpieza de patógenos, se toman yemas completas y se siembran en un medio de cultivo preventivo; se observan por una a dos semanas y, si se nota infección por bacterias, se tratan con antibióticos hasta que desaparezca la infección.

La etapa de producción

Consiste en la propagación masiva de explantes o plántulas.

El rango de propagación depende de la especie; se ha tomado como referencia los rangos que comúnmente se presentan en la mayoría de los cultivos micropropagados. En un mismo cultivo

bre circulación
ción) para las
l piso con una
os con estas
temperatura
las entanas
personal que

gráfica. Las
ma influencia
en cuenta los

eadado (libre de
puesto en el

y condiciones
ia y cultivo de
roducción. Si
embran en un
infección por

s rangos que
mismo cultivo

el rango de propagación puede variar según el balance de concentración de fitohormonas en el medio de cultivo.

El tiempo de cada ciclo de propagación depende del comportamiento de la especie en el medio de cultivo y las condiciones ambientales a las que está sometida; el promedio se encuentra entre tres y cuatro semanas por cada paso.

Se han tomado como estándar los envases de plástico Magenta, pero cualquier otro se puede adecuar a este propósito. Se considera que diez explantes por envase permiten un buen desarrollo de las plántulas.

Los gráficos a continuación muestran diseños del estante de incubación y del laboratorio de micropropagación.

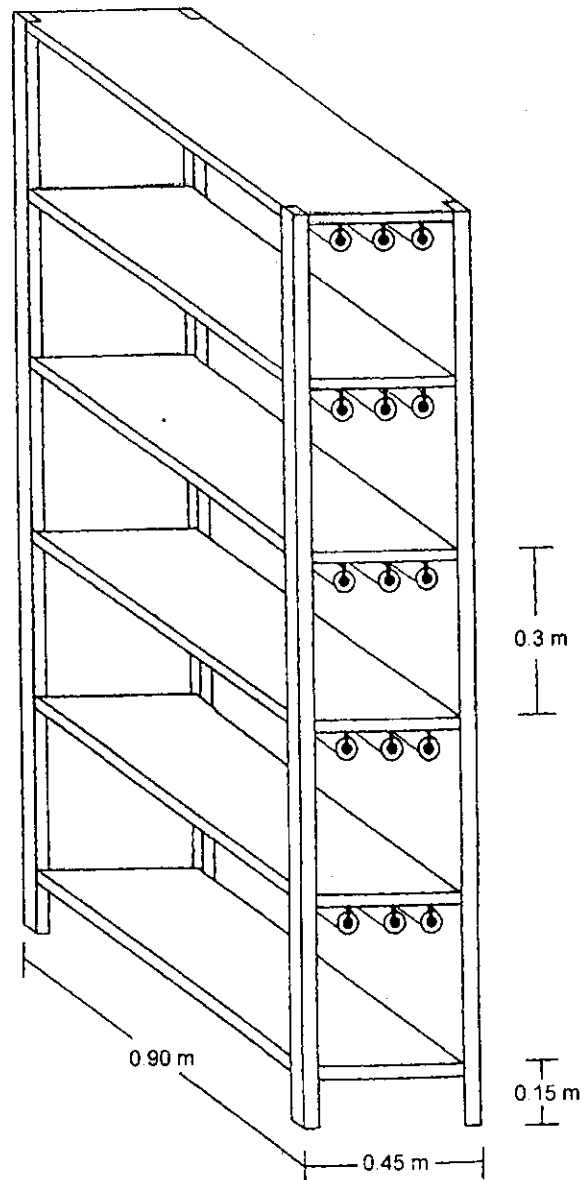
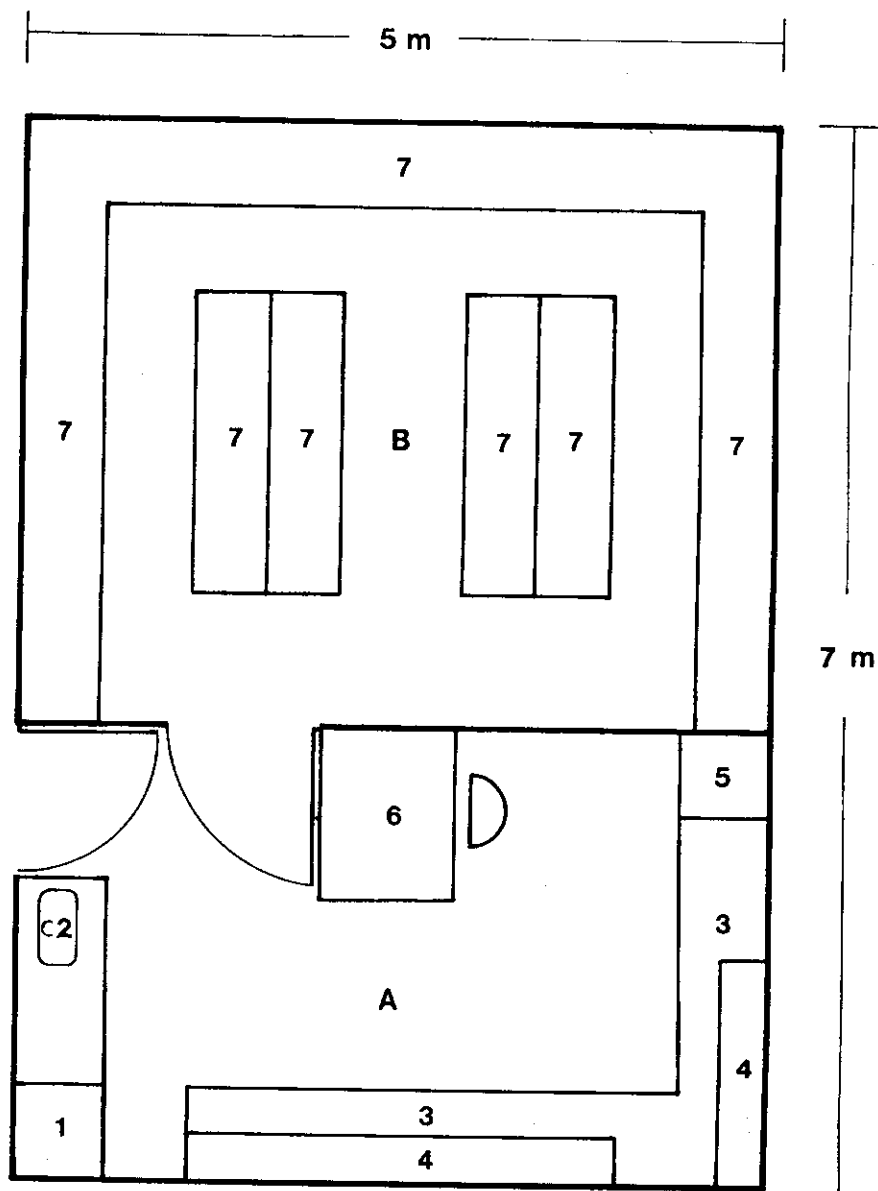


Figura 1 Estante de Incubación



ESCALA 1:50

A Laboratorio
B Cuarto de Incubación

- 1 Autoclave
- 2 Lavadero
- 3 Mesas de trabajo
- 4 Gabinete de pared
- 5 Refrigeradora
- 6 Cámara de transferencia
- 7 Estantes de incubación

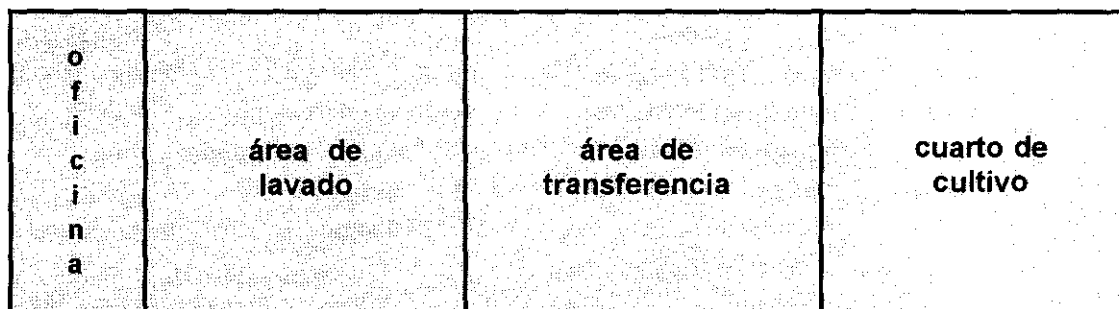
Figura 2 Laboratorio Base de Micropropagación

Condiciones de Asepsia en el Laboratorio

En el laboratorio de cultivo de tejidos la asepsia es uno de los requerimientos más importantes. Una buena asepsia conlleva al éxito del crecimiento de las plántulas junto con el buen uso de los medios de cultivo.

Asepsia en las Instalaciones

El laboratorio de cultivo de tejidos debe contar con cuatro ambientes básicos: la oficina, el cuarto de preparación de medios y de lavado, el cuarto de transferencia y el cuarto de cultivo, los cuales requieren de menor a mayor grado de limpieza, así como de menor a mayor restricción de ingreso de personal.



menor → → → mayor
Nivel de limpieza

La asepsia reside principalmente en mantener los ambientes aislados del ambiente exterior. La limpieza se realiza con mayor exigencia en los pisos, muebles y repisas, usando desinfectantes y evitando el ingreso directo de áreas de invernaderos o campo.

Las puertas de ingreso deben contar con tapetes que se rocían continuamente con un acaricida en polvo.

Al ingresar es necesario usar mandiles, para evitar dispersar el polvo que puede llevarse en la ropa.

Asepsia en el Cuarto de Preparación de Medios y de Lavado

El cuarto de lavado tiene que contar con los materiales necesarios para la limpieza de los tubos usados, los cuales deberán ser guardados en repisas cubiertas para evitar que se empolven. Las mesas y repisas deberán limpiarse continuamente.

Todo material desechado (tubos con plantas viejas o tubos con medio usado) debe ser inmediatamente autoclavado y lavado para evitar la contaminación del ambiente.

El área de preparación de medios es el ambiente en el cual se esteriliza el material por lo que debe estar limpio, para evitar la contaminación de los medios antes de usarlos. Esta área debe mantenerse aislada para evitar el polvo por efecto del ingreso de aire.

Asepcia en el Cuarto de Transferencia

El cuarto de transferencia, en donde se encuentran las cámaras de flujo laminar, es un ambiente en el cual se necesita mayor cuidado en la limpieza por ser el ambiente previo al cuarto de cultivo.

En este ambiente se necesita de un lavabo, en el cual el personal podrá lavarse las manos antes de sentarse a propagar.

Los cuidados principales en esta área deben hacerse en el interior de la cámara de flujo laminar; las paredes internas de la cámara deben limpiarse con alcohol (70%).

Los filtros y prefiltros (Hepa) de las cámaras dispuestos en el interior de éstas deben ser continuamente revisados para evitar posibles contaminaciones.

Los instrumentos en el interior de la cámara deben ser desinfectados con el calor de los quemadores o el mecheró.

Las manos y la superficie de la mesa serán continuamente limpiados con un algodón embebido con alcohol mientras se propaga.

En el interior de la cámara sólo debe estar el material necesario para la propagación y se evitará el ingreso de otros artefactos (radios, libros, etc.).

Nunca debe abrirse un tubo (o magenta) contaminado en el interior de la cámara; éste debe ser inmediatamente autoclavado y lavado.

Asepcia en el Cuarto de Cultivo

La limpieza con desinfectantes debe ser continua en los pisos y repisas. Las gradillas de los tubos deben ser enjuagados con una solución acaricida/fungicida antes de ingresar al cuarto de propagación en el primer uso.

Se debe revisar con frecuencia las puertas interiores y paredes tratando de detectar la presencia de hongos.

Controlar continuamente el normal funcionamiento del aire acondicionado.

1.2 PLAN DE PRODUCCIÓN DE SEMILLA PREBÁSICA

En los programas de producción de semilla se debe desarrollar sistemas de propagación que permitan usar al máximo los ambientes destinados a la producción de semillas. Con base en ello, los invernaderos deben aprovecharse al máximo con plántulas in vitro.

El diagrama adjunto muestra un ejemplo de un plan de producción desarrollado en la estación del INIA en Huancayo, en el cual se realizan tres campañas al año y se propaga material para seis invernaderos, usando 3,850 plántulas por invernadero.

Durante la primera campaña se inicia la propagación de plántulas in vitro en agosto; éstas crecen bajo la continua observación del personal del laboratorio. El 2 de noviembre se trasladan las plántulas a los invernaderos.

Paralelamente, en el invernadero se realizarán actividades de desinfección de suelo y preparación de camas, por lo que el 2 de noviembre ya se tendrá listo el ambiente para la recepción de material.

Se sugiere en este punto que el personal de laboratorio lleve al invernadero las plántulas y participe en la transferencia de las plántulas a camas, así como en el lavado de las magentas, previo a su retorno al laboratorio.

El 7 de marzo (según el diagrama) se tendrán las plantas listas para la cosecha, luego de la cual se procede a preparar el invernadero para la siguiente campaña. Nótese que se toma una semana para cosechar y limpiar (fumigar, renovar camas, etc.)

En las subsiguientes campañas se procede de la misma manera. Podrán realizarse modificaciones de acuerdo a la disponibilidad de personal y a las facilidades con que se cuente.

PLAN DE PRODUCCIÓN DE SEMILLA PREBÁSICA

Variedad: Perricholi

Lugar: INIA - Estación Santa Ana, Huancayo

Condiciones:

2 personas en Micropropagación

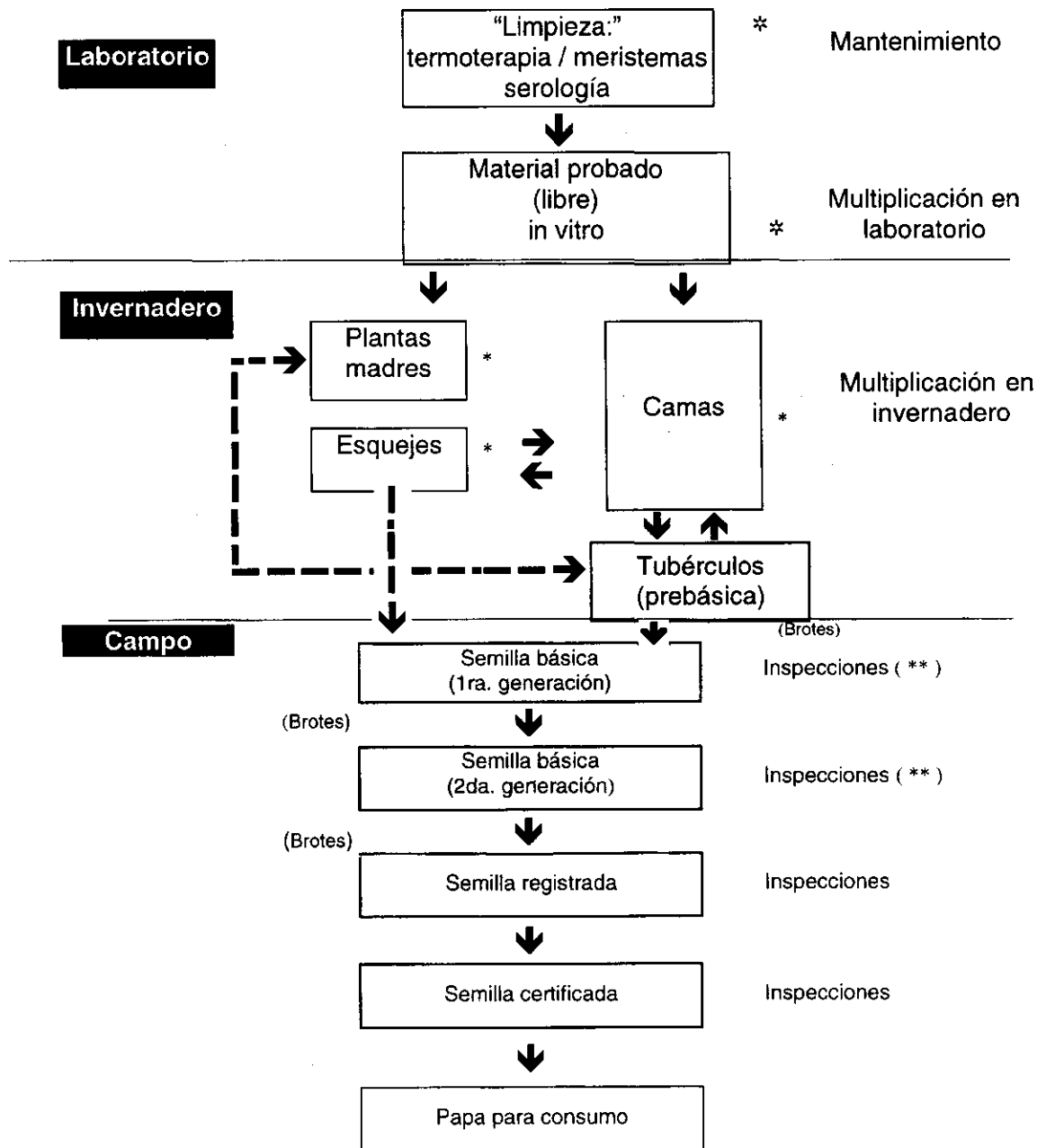
3 Campañas por año

6 Invernaderos

	ago	set	oct	nov	dic	ene	feb	mar	abr	may	jun	jul	ago	set	oct	nov		
Laboratorio micropropagación	X	→	→	→	2			X	→	→	→	7						
													X	→	→	→	12	
Invernaderos transferencia de plántulas				2	→	→	→	3										
									7	→	→	→	7					
														12	→	→	→	13

Este programa indica un caso específico en la coordinación de las actividades de propagación in vitro y transferencia de las plántulas a invernadero.

ESQUEMA GENERAL DEL PROCESO MODERNO DE PRODUCCIÓN DE TUBÉRCULOS - SEMILLAS DE PAPA



* Control de calidad por ELISA
 ** ELISA es opcional

1.3 PLAN DE MULTIPLICACIÓN DE PLÁNTULAS IN VITRO PARA INVERNADERO

La infraestructura que poseen los laboratorios de cultivo de tejidos permite la propagación de grandes cantidades de plántulas para proveer de material a uno o varios invernaderos.

La multiplicación de 3,600 a 4,000 plántulas debe realizarse bajo un programa definido de acuerdo a las condiciones del laboratorio.

El crecimiento de las plántulas propagadas in vitro dependerá del medio utilizado, de las condiciones ambientales del cuarto de incubación y de la variedad; por ello es preciso evaluar las plántulas en las condiciones de crecimiento en relación con el tiempo, para luego establecer un eficiente sistema de acuerdo con nuestros requerimientos.

A continuación se presentan cuatro procedimientos de propagación realizados en diferentes laboratorios (condiciones ambientales diferentes).

Procedimiento 1 (Laboratorio de cultivo de tejidos, INIA-Huancayo)

- Propagar nudos en 8 tubos (4 nudos por tubo) para obtener 32 plántulas con 5 nudos cada una, en 2.5 semanas; las plántulas se cortan, se separan las yemas apicales y las raíces y los tallos se siembran en medio líquido (5 tallos de 4 nudos por frasco).
- Sembrar las yemas apicales (32 yemas) en magentas (25 yemas por magenta).
- Dejar crecer los tallos en medio líquido durante 2.5 semanas para obtener 128 plántulas; juntarlos con las plántulas que crecen en la magenta (32 plántulas), para obtener un total de 160 plántulas.
- Cortar nuevamente las plántulas (en apicales y raíces) y transferirlas a medio líquido (5 tallos de 4 nudos por frasco) durante 2.5 semanas.
- Sembrar las yemas apicales (160 apicales en total) en magentas (25 yemas por magenta). Los 160 tallos sembrados en medio líquido dan origen a 640 plántulas; si añadimos las 160 plántulas que crecen en las magentas, se obtiene un total de 800 plántulas con 5 nudos, es decir 4000 explantes (nudos).
- Sembrar los nudos en magentas; luego de 3.5 semanas se producirán 4000 plántulas listas para invernadero.

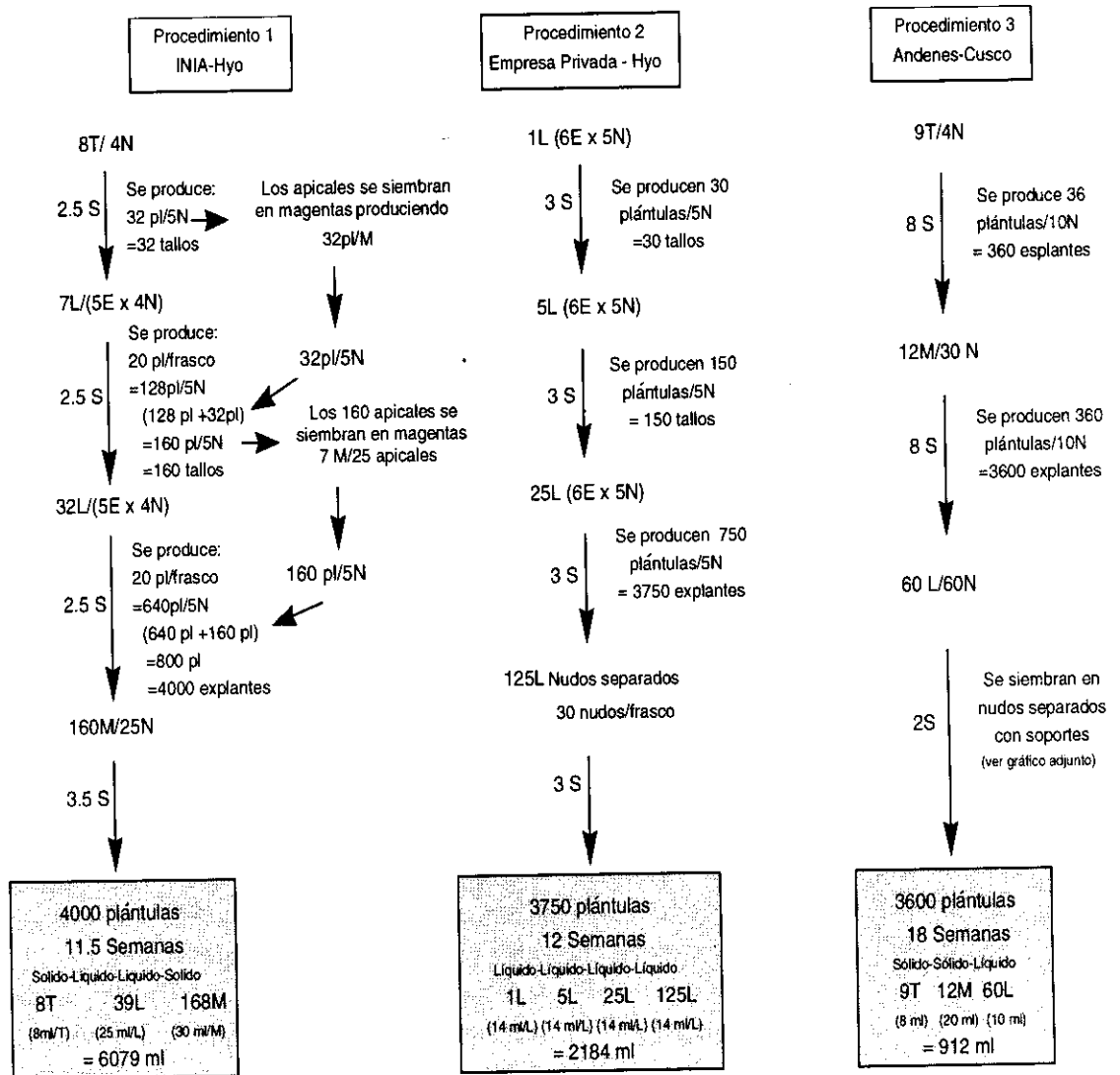
Este procedimiento se realiza en 11.5 semanas bajo un sistema sólido-líquido-líquido-sólido; se usa en total 6,079 ml de medio de cultivo.

Procedimiento 2 (Laboratorio privado en Huancayo)

- Colocar 5 tallos en un frasco (se extrae la yema apical y la raíz), los cuales producirán 30 plántulas en tres semanas (5 nudos por plántula, 150 explantes).
- Propagar las plántulas en 5 frascos de medio líquido (6 tallos de 5 nudos por frasco); luego de tres semanas se obtienen 150 plántulas (5 nudos cada una, 750 explantes).
- Propagar las plántulas en 25 frascos de medio líquido (6 tallos de 5 nudos por frasco); después de tres semanas de desarrollo se obtienen 3,750 nudos (5 nudos por planta) que se propagaran en frascos de medio líquido, como nudos separados.

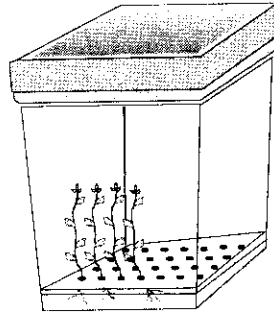
Procedimiento 3 (Laboratorio Andenes en Cuzco)

- Propagación plántulas en 9 tubos con 4 nudos cada uno, dejar crecer durante 8 semanas hasta obtener 10 nudos por plántula (total=360 nudos).
- Sembrar las plántulas en magentas (30 nudos por magenta), hasta obtener 10 nudos por planta en 8 semanas de crecimiento. Este procedimiento aporta 3,600 explantes que se propagan en 60 frascos con medio líquido (60 nudos por frasco) (ver gráfico adjunto). Luego de dos semanas se obtendrán 3,600 plántulas disponibles para la transferencia a invernadero. Este procedimiento se realiza en 18 semanas usando un sistema sólido-sólido-líquido (9 tubos, 12 magentas y 144 magentas. Se usó 3,192 ml de medio de cultivo (los tubos contienen 8 ml de medio y las magentas 20 ml).



S=semanas N=nudos E=esquejes T=tubos L=medio líquido M=magenta

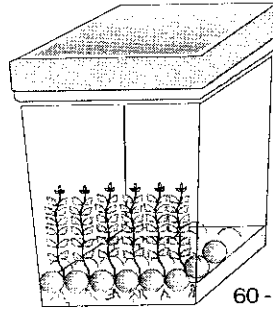
USO DE MEDIO LIQUIDO EN LA PROPAGACION DE PLANTAS



Esqueje:



Medio líquido con soporte

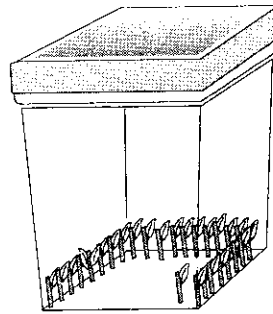
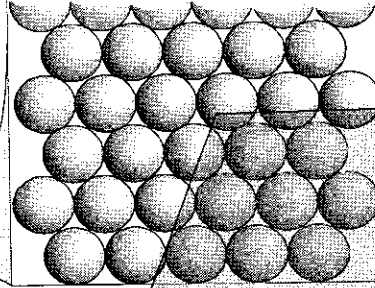


Esqueje:



60 - 70

Medio líquido con soporte. 10 ml

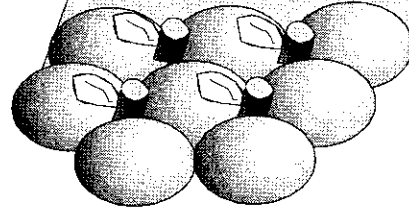


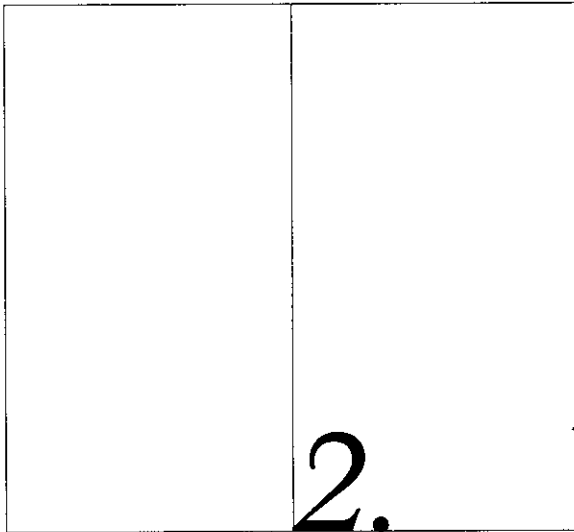
Esqueje:



50

Medio líquido sin soporte. 15 ml





2.

Soluciones Stock

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

INTRODUCCIÓN

El crecimiento de las plántulas in vitro depende principalmente de los medios utilizados y, por lo tanto, de las soluciones preparadas. El medio base Murashige & Skoog (1962) es ampliamente utilizado en los laboratorios de producción de plántulas de papa; las concentraciones de sales y vitaminas que contiene son las adecuadas para un normal crecimiento de las plántulas en condiciones in vitro. En la actualidad los medios base se obtienen fácilmente en su forma comercial, sin embargo, la posibilidad de usar "soluciones stock" permite la disponibilidad de medio de cultivo por muchos años y reduce los costos de producción de plántulas. Además, la

en el laboratorio de cultivo de tejidos requiere de la utilización de reguladores de crecimiento, los cuales deben ser preparados y conservados adecuadamente para su mejor efecto. Por otro lado, a pesar de las condiciones de esterilidad y buen manejo, es posible la presencia de bacterias en el medio; el uso de antibióticos puede proporcionar una ayuda en el mantenimiento temporal de las plántulas. Es necesario establecer los procedimientos de desinfección precisos para evitar el abuso de antibióticos que dañan la estabilidad genética de la planta y alteran los niveles de resistencia de las bacterias.

A continuación se desarrollarán los procedimientos de preparación de las soluciones stock de sales, hormonas, antibióticos y otras que se usan en la preparación de medios de cultivo.

2.1. PREPARACIÓN MEDIO BASE MURASHIGE & SKOOG (MS)

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES STOCK

I. PREPARACIÓN DE STOCK A: SALES

1. Pesar los siguientes reactivos:

NH_4NO_3	35.0 g
KNO_3	40.0 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10.3 g
KH_2PO_4	3.5 g
H_3BO_3	0.1 g
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.4 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2 g
KI	0.02 g
NaMoO_4	0.004 g

Disolverlos en 200 ml de agua destilada

Conservar la solución en un frasco debidamente etiquetado, 4°C.

2. Pesar 5 mg de los siguientes reactivos

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Disolverlos en 10 ml de agua destilada

A 1ml de la solución anterior adicionar 200 ml de agua destilada.

Conservar la solución en un frasco debidamente etiquetado, a 4°C.

II. PREPARACIÓN DE STOCK B: MgSO_4

1. Pesar 3.7 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en 100 ml de agua destilada

Conservar la solución en un frasco debidamente etiquetado, a 4°C.

III. PREPARACIÓN DE STOCK C:

1. Pesar 0.75 g de Na_2EDTA

Disolver en caliente en 20 ml de agua destilada. Dejar enfriar la solución.

2. Pesar 0.55 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
Disolver en 20 ml de agua destilada.
3. Mezclar ambas soluciones y llevar a 100 ml adicionando agua destilada
Conservar la solución en un frasco oscuro debidamente etiquetado a 4°C.

IV . PREPARACIÓN DE STOCK D: Vitaminas

1. Pesar los siguientes reactivos:

Tiamina HCl	20 mg
Glicina	100 mg
Acido nicotínico	25 mg
Pyridoxina HCl	25 mg

Disolver en 500 ml de agua destilada. Mezclar bien.
Repartir en envases de 20 ml y mantenerlos a 0°C.

PREPARACION DE SOLUCIÓN BASE MS:

Para 1 litro de medio base mezclar:

- 100 ml de Solución Stock A
- 10 ml de Solución Stock B
- 5 ml de Solución Stock C
- 10 ml de Solución Stock D.
- 100 mg de Inositol

Completar a 1 litro con agua destilada

MEDIO BASE MURASHIGE & SKOOG

STOCK A (SALES)

NH_4NO_3	35.0 g
KNO_3	40.0 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10.3 g
KH_2PO_4	3.5 g
H_3BO_3	0.1 g
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.4 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2 g
KI	0.02 g
NaMoO_4	0.004 g

Disolver en 200 ml de agua destilada

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	5 mg
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	5 mg

Disolver en 10 ml con agua destilada

Usar 1 ml de la solución y llevarla a 200 ml con agua destilada

STOCK B

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3.7 g
---	-------

Disolver en 100 ml de agua destilada

STOCK C

Na_2EDTA	0.75 g
--------------------------	--------

Disolver en caliente con 20 ml de agua destilada

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.55 g
---	--------

Disolver en 20 ml de agua destilada

Mezclar ambas soluciones en frío y llevar a 100 ml con agua destilada

STOCK D

Tiamina-HCL	20 mg
Glicina	100 mg
Acido nicotínico	25 mg
Piridoxina-HCL	25 mg

Disolverlos en 500 ml de agua destilada. Mezclar bien.

Repartir en viales de 20 ml y mantenerlos a 0°C.

**MEDIO BASE : 100 ml STOCK A + 10 ml STOCK B + 5 ml STOCK C +
10 ml STOCK D + 100 mg Inositol. COMPLETAR A 1 l**

2.2. Solución VAG*(vitaminas+ácido giberético)

Para 500 ml de MSA mezclar:

Tiamina HCL	10 mg
Glicina	200 mg
Acido nicotínico	50 mg
Piridoxina HCl	50 mg
Ácido giberético (Stock 1000 ppm)	10 ml

Llevar a 500 ml con agua destilada
Repartir en envases de 20 ml cada uno.
Usar 5 ml/l
* Solución llamada anteriormente MZA

2.3. SOLUCION DE VITAMINAS

Para 500 ml de solución mezclar:

Tiamina HCl	10 mg
Glicina	200 mg
Ácido nicotínico	50 mg
Piridoxina HCl	50 mg

Llevar a 500 ml con agua destilada
Repartir en envases de 20 ml cada uno.
Usar 5 ml/l

2.4. PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN STOCK DE HORMONAS

PREPARACIÓN DE ÁCIDO GIBÉRELICO (AG₃)

Solución concentrada de ácido giberético: 1000 ppm

1. Pesar 0.2 g de ácido giberético y disolver bien con algunas gotas de alcohol. Añadir 200 ml de agua destilada.
2. Guardar en un frasco debidamente rotulado y conservar a 0°C.

El ácido giberético puede ser autoclavado junto con el medio de cultivo, sin embargo es posible que pierda algo de actividad.

Un ml de la solución concentrada (1000 ppm) contiene 1 mg de ácido giberético.

PREPARACIÓN DE ÁCIDO NAFTALENACETICO (ANA)

Solución concentrada de ANA: 1000 ppm

1. Pesar 0.2 g de ANA y disolver bien con algunas gotas de NaOH 1N. Añadir 200 ml de agua destilada.

2. Guardar en un frasco debidamente rotulado y conservar a 0°C.
Un ml de la solución concentrada (1000 ppm) contiene 1 mg de ANA.

PREPARACIÓN DE BENCILAMINOPURINA (BAP)

Solución concentrada de BAP: 1000 ppm

1. Pesar 0.2 g de BAP y disolver bien con algunas gotas de NaOH 1N
Añadir 200 ml de agua destilada.
2. Guardar en un frasco debidamente rotulado y conservar a 0°C.

BAP puede ser autoclavado junto con el medio de cultivo, sin embargo, es posible que pierda algo de actividad.

Un ml de la solución concentrada (1000 ppm) contiene 1 mg de BAP.

PREPARACIÓN DE ÁCIDO INDOLACÉTICO (AIA)

Solución concentrada de AIA: 1000 ppm

1. Pesar 0.2 g de AIA y disolver bien con algunas gotas de alcohol.
Añadir 200 ml de agua destilada.
2. Guardar en un frasco debidamente rotulado y conservar a 0°C.

Se recomienda esterilizar por filtración

Un ml de la solución concentrada (1000 ppm) contiene 1 mg de AIA.

PREPARACIÓN DE KINETINA (KIN)

Solución concentrada de KIN: 1000 ppm

1. Pesar 0.2 g de KIN y disolver bien con algunas gotas de NaOH 1N
Añadir 200 ml de agua destilada.
2. Guardar en un frasco debidamente rotulado y conservar a 0°C.

KIN puede ser autoclavado junto con el medio de cultivo, sin embargo, es posible que pierda algo de actividad

Un ml de la solución concentrada (1000 ppm) contiene 1 mg de KIN.

PREPARACIÓN DE 2,4-D

Solución concentrada de 2,4-D: 1000 ppm

1. Pesar 0.2 g de 2,4-D y disolver bien con algunas gotas de alcohol.
Añadir 200 ml de agua destilada.
2. Guardar en un frasco debidamente rotulado y conservar a 0°C.

2,4-D puede ser autoclavado junto con el medio de cultivo, sin embargo, es posible que pierda algo de actividad

Un ml de la solución concentrada (1000 ppm) contiene 1 mg de 2,4-D.

2.5. PREPARACIÓN DE ANTIBIÓTICOS

RIFAMPICINA (RIMACTAN 300)

1. Cortar pequeños cuadrados de papel filtro (10 mm x 10 mm).
2. Colocarlos en una placa petri y esterilizarlos.
3. (En cámara de flujo) Colocar con una pinza cuidadosamente los cuadrados sobre la superficie de placas petri estériles, ligeramente separados unos de otros.
4. Disolver una cápsula de Rimactan (300 mg) en 150 ml de agua destilada. Esterilizar con filtros de 0.22 μ m.
5. Colocar 3 gotas, aproximadamente 0.09 ml en cada cuadrado.
6. Dejar secar el antibiótico en la cámara de flujo. Conservar los cuadrados en placas petri, cubiertas y cerradas con parafilm.
7. Mantener a 4°C.

Con una pinza tomar un cuadrado de antibiótico por uno de sus extremos, e introducirlo en el tubo. Presionar contra el medio cerca al lugar donde se va a sembrar el nudo. El antibiótico se difundirá y cubrirá el área sembrada incluyendo al nudo.

CEFOTAXIMA SODICA (CLAFORAN)

1. Cortar pequeños cuadrados de papel filtro (5 mm x 5 mm).
2. Colocarlos en una placa petri y esterilizarlos.
3. (En cámara de flujo) Colocar con una pinza cuidadosamente los cuadrados sobre la superficie de placas petri estériles, ligeramente separados unos de otros.
4. Preparar una solución del antibiótico disolviendo 1g Claforan en 25 ml de agua destilada estéril en un frasco erlenmeyer o en una magenta estéril. Esterilizar con filtros de 0.22 μ m.
5. (En cámara de flujo) Colocar una gota de aproximadamente 0.03 ml en cada cuadrado.
6. Dejar secar el antibiótico en la cámara de flujo. Conservarlos en placas petri, cubiertos y cerrados con parafilm.
7. Mantener a 4°C.

Con una pinza tomar un cuadrado de antibiótico por uno de sus extremos e introducirlo en el tubo. Presionar contra el medio cerca al lugar donde se va a sembrar el nudo. El antibiótico difundirá y cubrirá el área sembrada incluyendo al nudo.

2.6. PREPARACIÓN DE HIPOCLORITO DE CALCIO

1. Pesar 50 g de hipoclorito de calcio. Disolver en 1000 ml de agua destilada (5%). Mantener en agitación de 3 a 4 horas y dejar en reposo de 6 a 8 horas o toda la noche.
2. Filtrar la solución a través de papel filtro y mantenerla herméticamente cerrada en un frasco en lugar seguro.
3. Usar 50 ml de solución y añadirle 50 ml de agua destilada.

2.7. PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN ACARICIDA MORESTAN

1. Pesar 5 g de un producto acaricida, disolver en 1000 ml de agua destilada. Agitar bien.
2. Usar la solución fresca. No guardar.

2.8. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA AJUSTAR EL pH

Solución para bajar el pH - Ácido clorhídrico 1N (HCl)

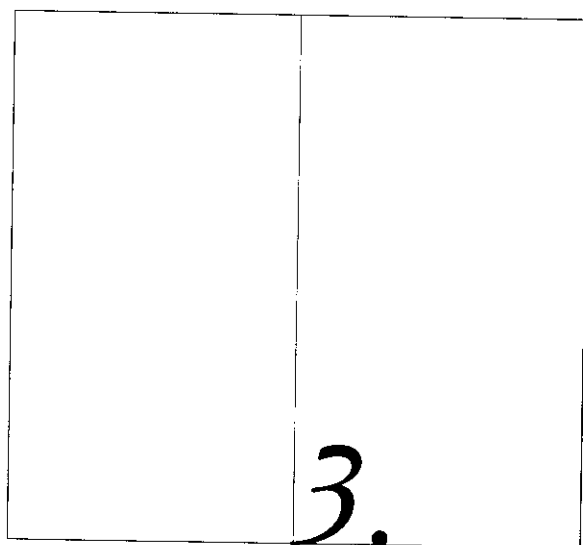
1. Colocar en un vaso 91.4 ml de agua destilada.
(Usar mascarilla y guantes para protegerse de los vapores ácidos.)
 2. Extraer con una pipeta 8.6 ml de ácido clorhídrico (concentrado comercial, 36.5 - 38%)
- OJO: No aspirar para extraer el ácido, usar bulbos de jebes con la pipeta.**
3. Homogeneizar y conservar en un frasco de boca ancha cerrado a temperatura ambiente.

Solución para elevar el pH - Hidróxido de potasio 1N (KOH)

1. Colocar en un vaso 50 ml de agua destilada.
2. Añadir 5.6 g de KOH y disolver bien.
3. Completar a 100 ml con agua destilada. Conservar en un frasco de boca ancha cerrado a temperatura ambiente.

Usos

De acuerdo al pH del medio, añadir gota a gota las soluciones hasta llegar al pH requerido.



3.

Medios de Cultivo

MEDIOS DE CULTIVO EN LA PROPAGACIÓN DE PAPA

El crecimiento de las plántulas *in vitro* depende de factores nutricionales y ambientales, los cuales interactúan para producir una plántula con características similares a las que crecen en el campo.

Los factores nutricionales tienen como base el medio de Murashige & Skoog (1962) compuesto de sales orgánicas, vitaminas, aminoácidos, carbohidratos, reguladores de crecimiento y suplementos orgánicos.

En el caso de papa, los compuestos usados para la preparación de medios de cultivo contienen el medio base más vitaminas y otras sustancias, según el explante que se use; es así que, para

la introducción in vitro uno de los componentes importantes es el ácido giberélico, el cual rompe la dormancia en las yemas acelera el crecimiento del explante. En los medios de conservación se usa el sorbitol, que actúa como un estresante osmótico, porque retarda la absorción de nutrientes y en consecuencia el crecimiento. El medio de tuberización contiene reguladores de crecimiento los cuales, a través de un estrés inducen la producción de microtubérculos.

Otras sustancias que se añaden a los medios de cultivo son:

Las vitaminas, son compuestos que participan en las funciones enzimáticas de la célula, estimulando el crecimiento de los explantes.

Las poliaminas, son compuestos nitrogenados derivados de los aminoácidos que estimulan el crecimiento a través de la división celular.

El carbón activado absorbe las sustancias inhibitoras eliminadas a través de la savia de los explantes en el medio y estimula la morfogénesis y el crecimiento de las raíces.

3.1. MEDIO DE INTRODUCCIÓN IN VITRO

1. Disolver un sobre de MS (medio base Murashige & skoog) en 600 ml de agua destilada.
2. Agregar 25 g de sucrosa y 5 ml de solución de vitaminas. Agitar.
3. Añadir 1 ml de ácido giberélico
4. Llevar el volumen a 1000 ml con agua destilada.
5. Medir el pH y ajustar a 5.6 (elevar con KOH 1N, bajar con HCl 1N)
6. Agregar 3.5 g de Phytigel .
7. Disolver el gelificante en caliente (horno microondas: 100% intensidad, 12 minutos). Agitar hasta que el gelificante se disuelva, evitando que hierva.
8. Distribuir 2 ml en cada tubo de 13x100 mm.
9. Autoclavar a 121°C y 15 libras de presión, durante 20 minutos.
10. Retirar las gradillas de la autoclave y conservar a 4°C hasta el momento de la siembra.

3.2. MEDIO DE PROPAGACIÓN DE PAPA

1. Disolver un sobre de MS (medio base Murashige & Skoog) en 600 ml de agua destilada.
2. Agregar 25 g de sucrosa y 5 ml de solución VAG. Agitar.
3. Llevar el volumen a 1000 ml con agua destilada.
4. Medir el pH y ajustar a 5.6 (elevar con KOH 1N, bajar con HCl 1N).
5. Añadir 3.5 g de Phytigel.
6. Disolver el gelificante en caliente (horno microondas: 100% intensidad, 12 minutos). Agitar hasta que el gelificante se disuelva, evitando que hierva.
7. Repartir 12 ml en tubos de 25x150 mm.
8. Autoclavar a 121°C y 15 libras de presión durante 20 minutos.
9. Retirar las gradillas de la autoclave y conservar a 4°C hasta el momento de la siembra.

3.3. MEDIO DE MERISTEMAS DE PAPA

1. Disolver un sobre de MS (medio base Murashige & Skoog) en 600 ml de agua destilada.
2. Agregar 25 g de sucrosa y 5 ml de solución VAG. Agitar.
3. Adicionar 2 ml de putrescina. (Solución madre: 10 000 ppm.)
4. Llevar el volumen a 1000 ml con agua destilada.
5. Medir el pH ajustar a 5.6 (elevar con KOH 1N, bajar con HCl 1N)
6. Añadir 6 g de agar.
7. Disolver el gelificante en caliente (horno microondas: 100% intensidad, 12 minutos).
Agitar hasta que el gelificante se disuelva, evitando que hierva.
8. Repartir 2 ml en tubos de 13x100 mm.
9. Autoclavar a 121°C y 15 libras de presión, durante 20 minutos.
10. Retirar las gradillas de la autoclave y conservar a 4°C hasta el momento de la siembra.

3.4. MEDIO DE CONSERVACIÓN DE PAPA

1. Disolver un sobre de MS (medio base Murashige & Skoog) en 600 ml de agua destilada.
2. Agregar 20 g de sucrosa, 40 g de sorbitol y 5 ml de solución de vitaminas. Agitar.
3. Llevar el volumen a 1000 ml con agua destilada.
4. Medir el pH, ajustar a 5.6 (elevar con KOH 1 N, bajar con HCl 1N)
5. Añadir 7.5 g de Agar.
6. Disolver el gelificante en caliente (horno microondas: 100% intensidad, 12 minutos).
Agitar hasta que el gelificante se disuelva, evitando que hierva.
7. Repartir 12 ml de medio en tubos de 25 x 125 mm.
8. Autoclavar a 121°C y 15 libras de presión, durante 20 minutos.
9. Retirar las gradillas de la autoclave y conservar a 4°C hasta el momento de la siembra.

3.5. MEDIO DE TUBERIZACIÓN DE PAPA

1. Disolver un sobre de medio base Murashige & Skoog en 600 ml de agua destilada (medio base Murashige & Skoog).
2. Agregar 80 g de sucrosa, 5 ml de BAP* y 500 mg CCC*. Agitar.
3. Llevar el volumen a 1000 ml con agua destilada.
4. Medir el pH y ajustar a 5.6 (elevar con KOH 1N, bajar con HCl 1N)
5. Repartir en botellas.
6. Autoclavar a 121°C y 15 libras de presión, durante 20 minutos.
7. Retirar las botellas de la autoclave y conservar a 4°C hasta el momento de la inducción.
* Uso opcional de acuerdo al genotipo.

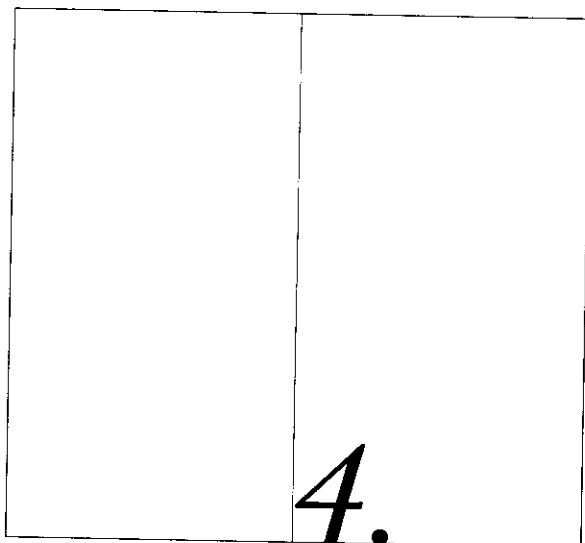
3.6. PREPARACIÓN DEL MEDIO DE PROPAGACIÓN CON CARBÓN

1. Disolver un sobre de MS (medio base Murashige & Skoog) en 600 ml de agua destilada.
2. Agregar 25 g de sucrosa y 5 ml de solución VAG. Agitar.

3. Llevar el volumen a 1000 ml con agua destilada.
4. Medir el pH y ajustar a 5.8 (elevar con KOH 1N, bajar con HCl 1N)
5. Añadir 4 g de Phytigel .
6. Disolver el gelificante en caliente (horno microondas: 100% intensidad, 12 minutos). Agitar hasta que el gelificante se disuelva, evitando que hierva.
7. Adicionar 10 g de carbón activado (Usar mascarilla).
8. Repartir 12 ml de medio en tubos de 25x150 mm
9. Autoclavar a 121°C y 15 libras de presión durante 20 minutos.
10. Retirar las gradillas de la autoclave y conservar a 4°C hasta el momento de la siembra.

PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO DE PAPA (1 LITRO)
FORMULACION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO DE PAPA

Reactivos	Introducción	Propagación	Meristema	Conservación	Tuberización	Prop-Carbón
MS	1 sobre - 1 l	1 sobre - 1 l	1 sobre - 1 l	1 sobre - 1 l	1 sobre - 1 l	1 sobre - 1 l
Solución VAG		5 ml				5 ml
Stock vitaminas	5 ml		5 ml	5 ml		
AG3 (1000 ppm)	1 ml		0.5 ml			
Putrescina (10,000 ppm)			2 ml			
BAP (1000 ppm)					5 ml *	
CCC					500 mg *	
Sucrosa	25 g	25 g	25 g	20 g	80 g	25 g
Sorbitol				40 g		
Carbón activado						10 g
Phytigel	3.5 g	3.5 g		7.5 g		3.5 g
Agar		6 g				



4.

Técnicas de Cultivo de Tejidos

TECNICAS DE CULTIVO DE TEJIDOS

Introducción a Condiciones in Vitro

Hongos y bacterias crecen en la superficie de las plantas y contaminan los medios de cultivo, cuando no son eliminados adecuadamente. El proceso de introducción a condiciones in vitro depende principalmente de la fase de desinfección del explante.

Problemas en la manipulación producen contaminación en la planta in vitro, por lo cual se recomienda un proceso de desinfección igual a la técnica de introducción in vitro. Sin embargo, es posible usar antibióticos incluidos en el medio, pero temporalmente, mientras que las plántulas

crezcan. Entre las bacterias contaminantes se encuentran *Bacillus* sp., *Erwinia* sp., *Pseudomonas* sp., etc.

El uso de desinfectantes no es efectivo en el caso de infecciones sistémicas, porque los patógenos residen en el sistema vascular, en el cual es recomendable el uso de antibióticos específicos y cortes de meristemas o yemas.

Por otro lado, el proceso de introducción in vitro involucra el uso de explantes en diferente estado fisiológico, como las yemas dormantes, las cuales requieren de reguladores de crecimiento (por ejemplo ácido giberélico) para estimular y acelerar el crecimiento de la yema.

Durante el proceso de introducción in vitro hay una estrecha conexión entre el invernadero y el laboratorio; por ello es necesario tomar las precauciones para evitar ingreso de contaminantes al laboratorio.

A) En el invernadero:

1. Cortar esquejes de la planta madre o brotes de yemas de tubérculos de invernadero.

B) En el laboratorio:

1. Sumergir los esquejes durante 10 minutos en un vaso debidamente rotulado que contiene una solución acaricida 0.5% con tres gotas/l de Tween 20.
2. Desechar la solución acaricida y enjuagar los nudos con agua corriente.
3. Preparar la cámara de flujo laminar.
4. Sumergir los esquejes en alcohol de 70% durante 30 segundos y llevar inmediatamente los vasos a la cámara de flujo laminar.

C) En la cámara de flujo laminar:

1. Eliminar el alcohol y reemplazarlo por una solución de hipoclorito de calcio al 2.5%. Mantener los esquejes sumergidos durante 15 minutos.
2. Desechar el hipoclorito y enjuagar los esquejes con agua estéril por tres veces.
3. Mantener los nudos sumergidos en agua estéril hasta el momento de la extracción de las yemas.
4. Disectar las yemas sobre una placa estéril y colocarlas en el medio de cultivo.

Invernadero

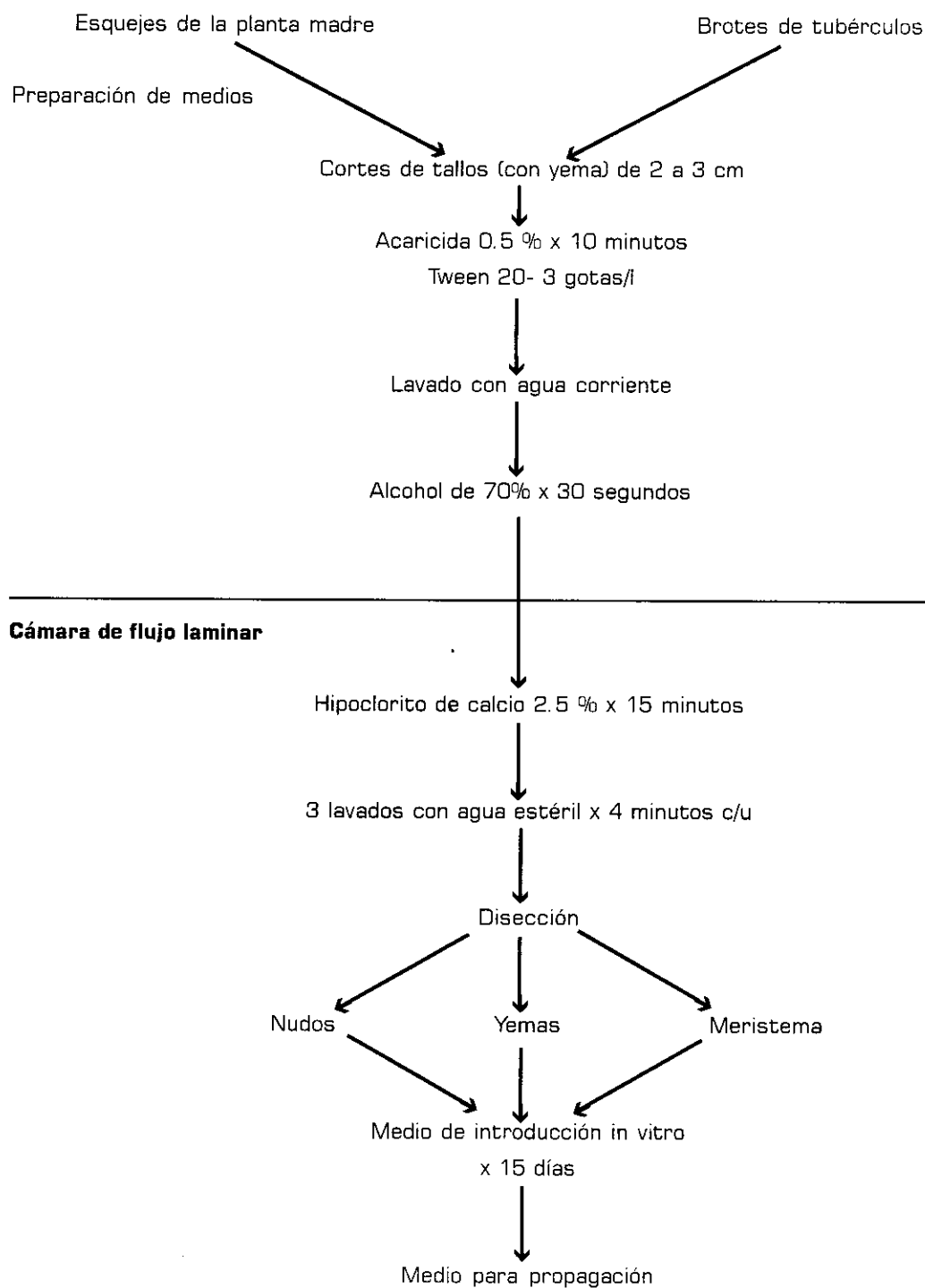


Figura 1 Procedimiento de Introducción a condiciones in vitro

4.1 MICROPROPAGACION

Las plántulas in vitro, "libres de patógenos", se usan como material inicial para los programas de semilla de papa y camote. Los métodos de micropropagación usados en estos programas dependen principalmente de su volumen de producción y de la infraestructura disponible. En el caso de la micropropagación de papa, los métodos básicos usados ya han sido descritos (Dodds, 1988; Espinoza et al., 1992). Estos han sido comprobados en muchas instituciones y están basados en el crecimiento rápido de cortes simples de nudos o tallos con múltiples nudos. A continuación se describen los métodos básicos de micropropagación.

A. Micropropagación de nudos

La micropropagación por nudos está basada en el principio de que el nudo de una plántula in vitro, colocado en un medio de cultivo apropiado inducirá el desarrollo de la yema axilar y originará una nueva plántula in vitro. Este tipo de propagación promueve el desarrollo de una estructura morfológica preexistente. La condición nutritiva-hormonal del medio rompe la dormancia de la yema axilar y promueve su rápido desarrollo (Lizarraga et al., 1992).

Se debe evitar la formación de callo y la regeneración de plantas a partir de éste; en ambos casos se puede afectar la estabilidad genética del genotipo.

Bajo condiciones ambientales controladas la micropropagación es rápida. Cada nudo sembrado en un medio de propagación desarrollará una plántula que ocupará todo el largo del tubo de ensayo, al cabo de aproximadamente 4 semanas para papa y 6 semanas para camote. Las plántulas in vitro resultantes pueden ser transplantadas a condiciones in vivo en pequeñas macetas en el invernadero.

B. Micropropagación por corte de nudos en medios líquido

Esta técnica es aplicada tanto en papa como en camote para producir rápidamente una gran cantidad de nudos. Se preparan cortes de tallo con 5 a 8 nudos, removiendo tanto el ápice como la raíz de la planta in vitro para ser propagados. Los tallos se colocan en el medio líquido de propagación correspondiente (Espinoza et al., 1992; Lizarraga et al.). También es posible usar nudos aislados. Después de un período de 3-4 semanas, germinan los brotes y desarrollan las plantas.

C. Problemas comunes en micropropagación

En el cultivo de tejidos pueden presentarse algunos problemas de acuerdo con el cultivo o variedad con que se trabaje. Para tratar de resolverlos es necesario aplicar uno o varios métodos de prevención/solución, los cuales se mencionan a continuación:

Fenolización

Los explantes frecuentemente se tornan marrones o negruzcos poco después del aislamiento y cuando esto ocurre, se inhibe el crecimiento y el tejido generalmente muere. Los tejidos jóvenes son menos susceptibles al oscurecimiento que los más maduros.

Prevención:

El oscurecimiento de los tejidos —especialmente de los explantes recientemente aislados— y del medio puede prevenirse generalmente siguiendo estos pasos:

1. Removiendo los compuestos fenólicos producidos por dispersión:
 - Absorción mediante carbón activado
 - Absorción por polyvinilpirolidona (PVP)
2. Modificando el potencial redox.
 - Agentes reductores: ácido ascórbico, ácido cítrico, L-cisteína HCl, ditriotreitol, glutation y mercaptoetanol.
 - Menor disponibilidad de oxígeno: medios líquidos estacionarios.
3. Inactivando las enzimas fenolasas.
 - Agentes quelantes: NaFeEDTA, EDTA, dietilditiocarbamato, dimetil-ditiocarbamato
4. Reduciendo la actividad fenolásica y la disponibilidad del sustrato.
 - Bajo pH
 - Oscuridad

Ausencia de enraizamiento

Los explantes pueden formar raíces naturalmente durante la propagación, sin el requerimiento de una etapa adicional de enraizamiento, como en el caso de papa. Sin embargo, algunas especies silvestres de papa pueden manifestar deficiencia en la producción de raíces.

La inducción puede ser lograda incorporando auxinas; las más usadas AIA, ANA e AIB o también adicionando carbón activado al medio de cultivo

Procedimiento de Micropropagación

1. Esterilizar placas petri (colocadas en bolsas de papel o en cartuchos) y preparar la cámara de flujo laminar desinfectando con alcohol las superficies internas.
Esterilizar los instrumentos con ayuda del quemador o el mechero y colocarlos sobre una placa estéril.
2. Destapar el tubo, extraer la plántula y colocarla sobre la placa petri con la ayuda de una pinza.
3. Extraer las hojas y cortar los nudos .
4. Destapar un tubo con medio fresco estéril y colocar el nudo en su interior, tratando de hundirlo ligeramente en el medio y con la yema hacia arriba.
Tapar el tubo.
5. Sellar el tubo con cintas plásticas gas-permeable (parafilm o saran wrap) y rotularlo correctamente.

Se recomienda colocar dos explantes en tubos de 16 x 125 mm, tres en tubos de 18 x 150 mm, cinco en tubos de 25 x 150, y 20-30 en magentas.

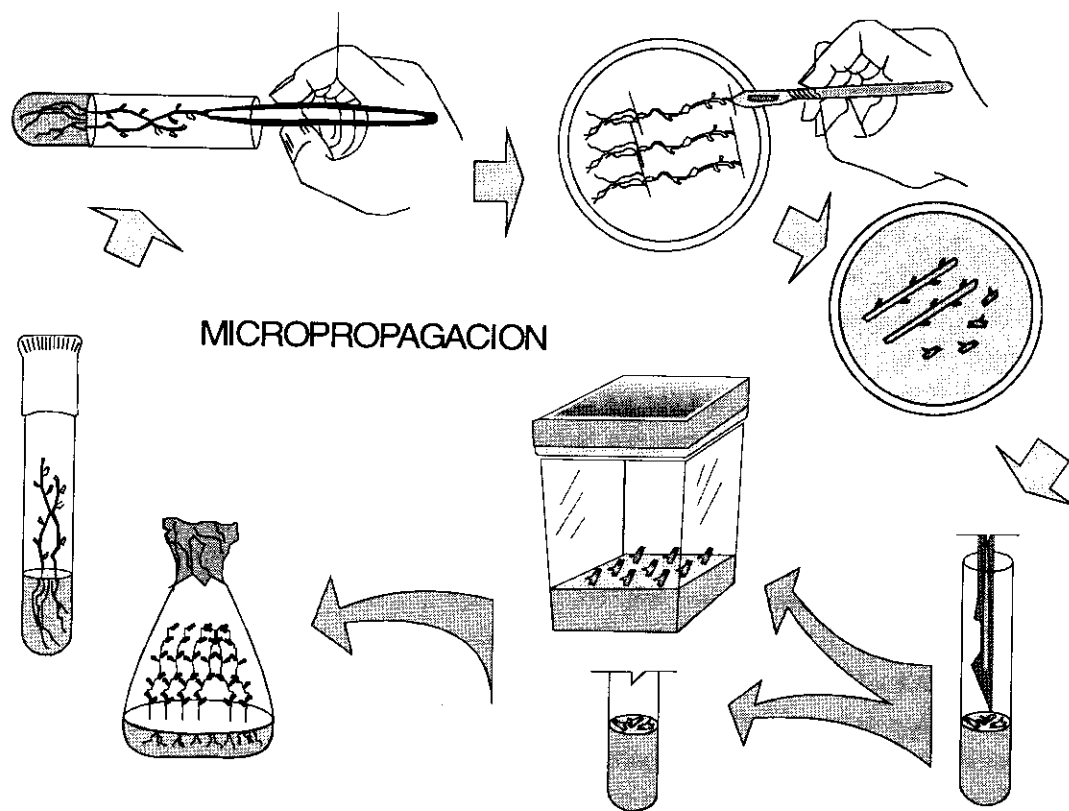


Figura 2 Esquema del proceso de micropropagación de papa

4.2 TUBERIZACION IN VITRO DE PAPA

Los microtubérculos de papa se usan en su mayor parte en los programas de semilla en Europa, donde se producen grandes cantidades (cientos de miles) de semilla prebásica de muy pocas variedades. Mediante esta técnica se producen y almacenan microtubérculos, pudiendo acumular varios miles en un espacio pequeño (en envases húmedos a 4°C) durante largos períodos de tiempo.

La inducción de microtubérculos se produce mediante un efecto de estrés producido por el CCC (cloruro de clorocolina), BAP (6-benzilaminopurina) y la sucrosa, los cuales en oscuridad producirán de 3 a 4 microtubérculos por planta, según la variedad.

Los microtubérculos se usaron en sus inicios como una alternativa en la distribución de germoplasma y como una alternativa en la conservación in vitro.

Durante el proceso de multiplicación de plántulas in vitro es usual la multiplicación de cantidades mayores a las requeridas en el invernadero, por ello, luego de la transferencia sobran algunas magentas. Estas pueden ser usadas para la inducción de microtubérculos. Según los procedimientos indicados, se añade el medio de inducción y se colocan en el cuarto oscuro; Luego de tres meses se producirán microtubérculos que pueden ser cosechados y transferidos

a envases estériles (a 4°C), en donde pueden mantenerse hasta por 10 meses, e incluso ser usados en la siguiente campaña en lugar de plántulas in vitro.

Estos microtubérculos también pueden ser usados como reserva, en caso de que el material in vitro sufra contaminaciones o muera por efectos de temperatura o manejo.

Tuberización in vitro

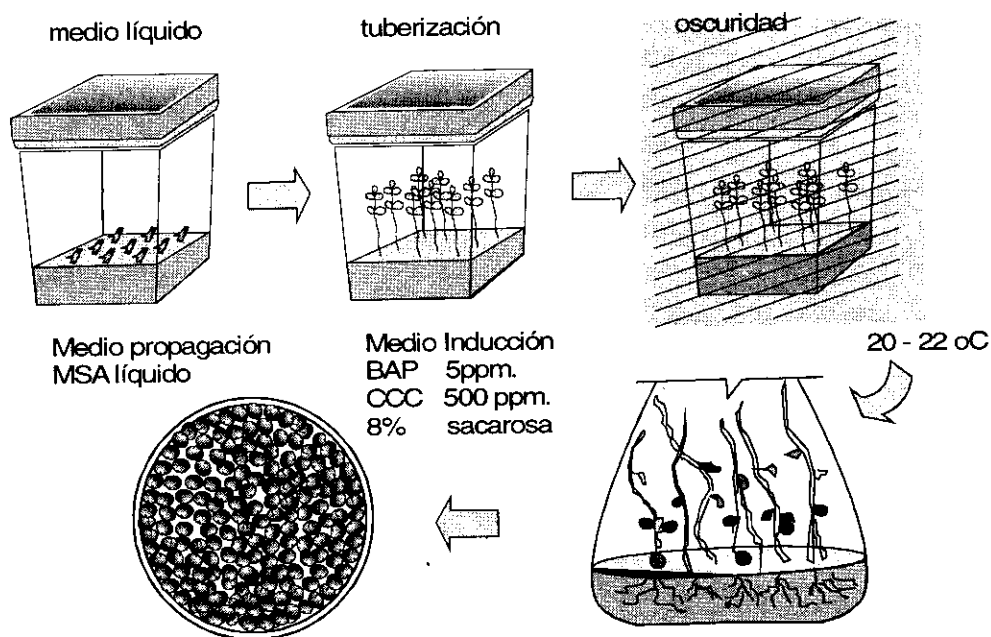


Figura 3 Esquema del proceso de tuberización in vitro de papa

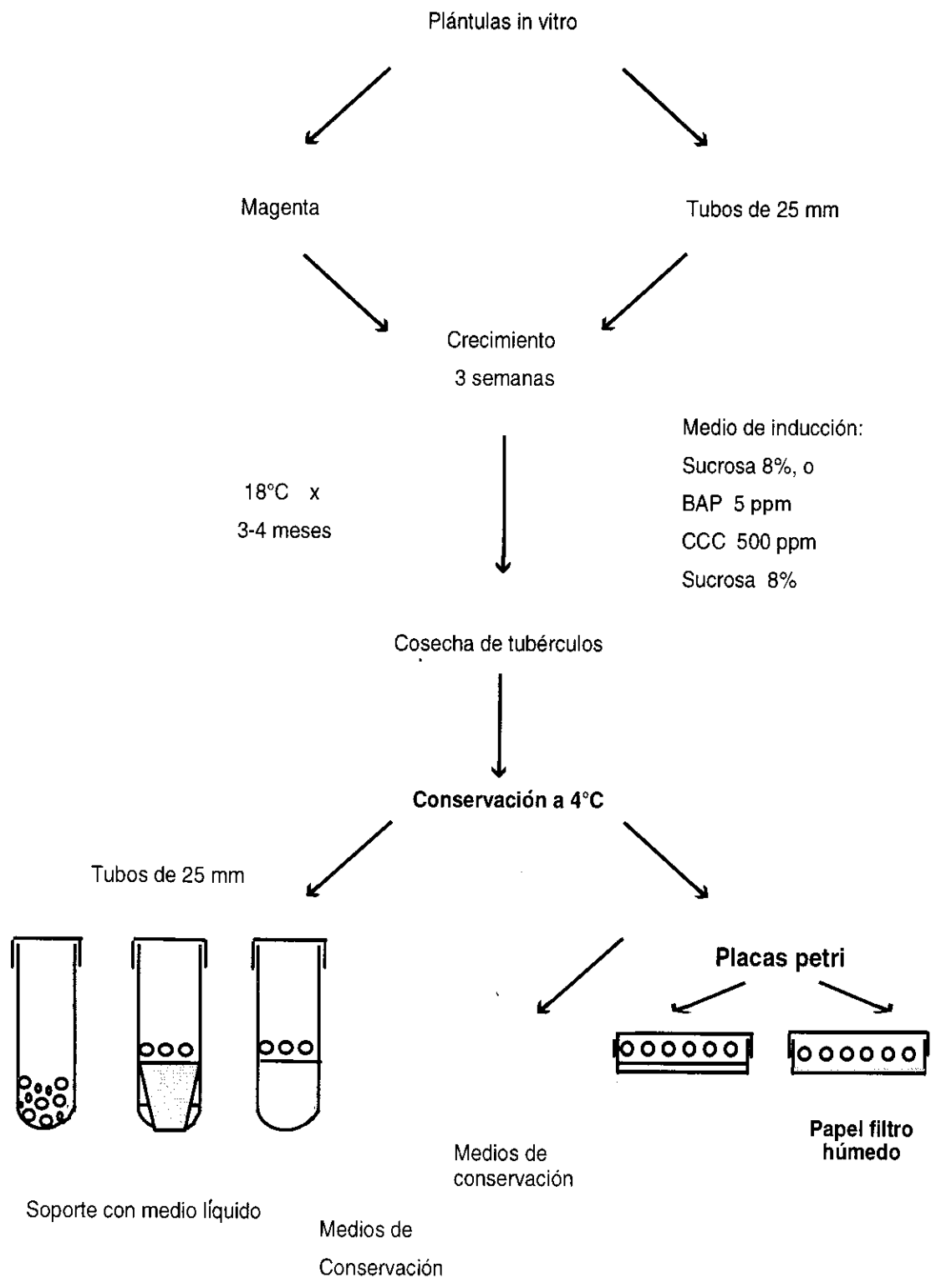


Figura 4 Esquema del proceso de tuberización in vitro de papa

Número de microtubérculos por frasco y peso fresco de tubérculos*.

Entrada	No. microtubérculos/frasco	Peso fresco/tubérculos
Mariva	9.9	163.3
LT-2	12.1	230.0
DTO-2	9.7	108.3
LT-7	19.4	64.5
DTO-33	8.2	80.9
LT-1	15.3	54.9
Piñaza	20.8	39.0
Atacama	8.9	59.0
702867	13.4	93.1
Atzimba	9.8	77.7

Fuente: R. Estrada, P. Tovar, J. Dodds. Centro Internacional de la Papa
 *Se utilizaron 30 nudos por frasco



Figura 5 Comparación en Tamaño y forma de tubérculos in vitro y otro normal.

CONSERVACIÓN DE GERMOPLASMA A MEDIANO PLAZO

La conservación in vitro de germoplasma bajo condiciones normales de crecimiento requiere de una serie de transferencias de las plantas cultivadas a un medio fresco. Esto trae como consecuencia un consumo de tiempo, incrementa la posibilidad de pérdida debido a la contaminación de los materiales durante los sucesivos subcultivos, pérdida de material por error humano o

falla de algún equipo y exige más mano de obra. Una forma de salvar estos problemas es a través de la limitación, restricción o inhibición del crecimiento. Esta aproximación consiste en la reducción de la velocidad de crecimiento a través de la modificación de las condiciones físicas o químicas del cultivo y es aplicable para un período corto o a mediano plazo.

Métodos de Conservación in vitro

El método consiste en mantener los cultivos (yemas, plántulas derivadas de nudos o directamente de meristemas) en condiciones físicas (factores ambientales) o químicas (composición del medio de cultivo) que permitan extender al máximo el intervalo de transferencia a los medios frescos, sin que ello afecte la viabilidad de los cultivos.

Los métodos para reducir el crecimiento de plantas cultivadas in vitro incluyen la reducción de la temperatura y la luz durante el almacenamiento, la incorporación de retardadores de crecimiento en el medio y la inducción de estrés osmótico en el medio, o una combinación de ellos.

Temperatura

La reducción de la temperatura ha sido el recurso más comúnmente utilizado para disminuir el crecimiento de los cultivos. La mayoría de los cultivos in vitro son mantenidos a temperaturas entre 120 y 20 °C; a temperaturas más bajas, la tasa de crecimiento disminuye, pero esta reducción depende de la especie.

Concentración de nutrientes

La relación entre la concentración de carbohidratos y los componentes nitrogenados del medio nutritivo puede tener efecto sobre las tasas de crecimiento.

Uso de reguladores del crecimiento

Entre los reguladores del crecimiento empleados figuran el ácido absísico (ABA), fosphon-D, hidrazida maleica y ácido succínico.

Concentración osmótica

La limitación del crecimiento a causa de la concentración osmótica se debe, a la reducción de la absorción de agua y de nutrientes del medio. Por ejemplo, la sacarosa actúa osmóticamente en concentraciones altas y es altamente metabolizable. Osmóticos no metabolizables como el manitol y el sorbitol son posiblemente más efectivos que la sacarosa en la limitación del crecimiento de los cultivos.

Evaluación de material conservado in vitro

Para evaluar el material bajo estas condiciones se debe tener en cuenta algunos aspectos importantes de la conservación in vitro como la viabilidad y la estabilidad genética.

La evaluación de la viabilidad de los cultivos in vitro debe ser sistemática. En condiciones de crecimiento lento, cuando el período de subcultivo o transferencia se extiende durante meses o

años, aumenta la frecuencia de evaluación de los cultivos. Las características más importantes que se evalúan en el almacenamiento de crecimiento lento de cultivos derivados del ápice de yemas son: contaminación, senescencia de la hoja, número de brotes verdes, número de nudos viables en relación con la longitud del tallo, presencia o ausencia de raíces y formación de callos.

Conservación de entradas en el programa de semilla

En un Programa de Semilla se mantiene un grupo de entradas libres de virus usado en la producción de prebásica; sin embargo, es frecuente que todos ellos no sean propagados en invernadero y se mantienen in vitro para un futuro uso. La propagación continua de las plántulas in vitro deteriora el material, sobre todo si consideramos que las condiciones ambientales no son las adecuadas (luz y temperatura); la alternativa es mantener las entradas en medios de conservación. Cada entrada deberá ser mantenida en tubos de ensayo con cinco repeticiones para evitar posibles pérdidas.

Las condiciones de conservación han sido probadas en la colección de papa del CIP que consta de más de 5,000 entradas, por lo cual se asegura el normal restablecimiento del material luego de la utilización de estos estresantes.

Las plántulas que se usarán en cada campaña deben provenir de la fase de conservación, luego de la cual se micropropagará en medios normales, donde se restablecerá su crecimiento y se continuará con los procedimientos elegidos para la multiplicación de plántulas para invernadero. Cada campaña deberá iniciarse con este material; por ello, se deberá reemplazar las plántulas tomadas para la multiplicación, tratando de mantener 5 tubos en medios de conservación por cada entrada.

Los subcultivos en medios de conservación se realizan aproximadamente cada uno o dos años. La renovación del medio de conservación debe pasar por un previo subcultivo en medios de propagación para el rejuvenecimiento de los explantes.

4.4 ERRADICACIÓN DE VIRUS POR CULTIVO DE MERISTEMAS Y TERMOTERAPIA

Si una planta sana se siembra en el campo, se encuentra expuesta a infecciones producidas por patógenos como nematodos, hongos, bacterias, fitoplasmas, virus y viroides, los cuales influyen negativamente en el rendimiento y en algunos casos producen la muerte. Sin embargo, no todas las células de estas plantas pueden resultar infectadas. Un grupo de células, que se encuentran en continua multiplicación no diferenciada, están libres de virus.

El cultivo in vitro de meristemas aunado con el crecimiento en altas temperaturas da lugar a plántulas de papa libres de virus en más de 90% de los meristemas sembrados. Este método es un procedimiento rutinario establecido en el Centro Internacional de la Papa en la obtención de plántulas libres de virus para la distribución nacional e internacional.

El mantenimiento in vitro de las plantas libres de virus provee la posibilidad de mantener un stock de plantas sanas todo el tiempo, más vigorosas y con un crecimiento más acelerado que las plantas infectadas.

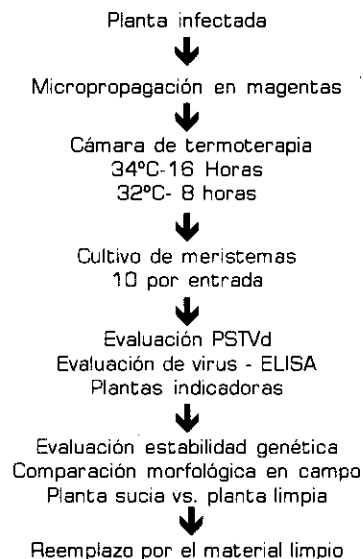
En un programa de semillas es imprescindible iniciar el trabajo con plántulas libres de virus, lo cual redundará tanto en la calidad de semilla como en el rendimiento. El procedimiento de limpieza de virus es largo y costoso; debido a ello, el CIP a través de su programa de distribución de germoplasma, ha puesto a disposición de los usuarios una lista de las principales variedades de papa libres de virus.

PROCEDIMIENTO

1. Aproximadamente 16 a 20 plántulas (infectadas con virus) son propagadas en magentas.
2. Después de un período de crecimiento de 20 a 25 días, o cuando las plántulas tengan 4-5 cm de altura, éstas se colocan en la cámara de termoterapia. Las condiciones ambientales de crecimiento son:

16 horas luz	34°C	8 horas oscuridad	32° C
--------------	------	-------------------	-------
3. La magentas se mantienen en la cámara de termoterapia durante un mes.
4. Luego se extraen las magentas de la cámara se limpia el exterior con alcohol de 96° y se introducen al cuarto de cultivo.
5. Los meristemas se extraen de la siguiente manera.
 Cortar la porción apical y extraer las hojas que cubren el meristema (aproximadamente 3 a 4 hojas); el meristema se aprecia con un primordio foliar que sobresale.
 Extraer el meristema con parte del primordio foliar, cortar sólo la porción translúcida.
 Utilizar una cuchilla nueva .
 Colocar el meristema en el medio de cultivo. Verificar si el meristema se encuentra en el tubo.
6. Evaluar el crecimiento de los meristemas y transferir a medios frescos si es necesario.
7. Cada meristema que da lugar a una planta se denomina "línea", los cuales serán rotulados según la entrada a la que pertenecen. Por ejemplo, Amarilla Línea 1, Amarilla Línea 2, Amarilla Línea 3, etc.
8. Se propagan 5 tubos con varias plantas para evaluar virus de papa, PSTVd, PVT, para determinar el rango de hospederos, evaluación morfológica y para mantenimiento in vitro.
9. Se obtienen los resultados de cada evaluación y se reemplaza el material sucio por el limpio.

PROCEDIMIENTO DE LIMPIEZA DE VIRUS



ANEXOS

1. Formas de reducción de costos en la producción de Plántulas in vitro

Reemplazando fuentes de Carbono

Reactivo utilizado:	Sucrosa Grado II	\$ 11.95 / kg
reemplazar por:	Azúcar comercial	\$ 1.80 / kg

Diluyendo las sales base:

Sales base Murashige & Skoog 1 Sobre - GIBCO 23118-037
MS/2 , MS/3 y MS/4 . Mejor dilución : MS/2

Usando otro tipo de gelificantes o soportes

Agar	\$ 125.70 / kg	(8.0 g)
Phytigel	\$ 148.50 / kg	(3.5 g)
Agargel	\$ 105.50 / kg	(3.5 g)
Maizena	\$ 14.00 / kg	(9-10 g)
Harina de camote	\$ 21.00 / kg	(9-10 g)

Soportes:

grava gruesa:	Usar los intersticios entre piedras
cuarzo:	Usar los intersticios entre piedras
Papel aluminio:	Haciendo orificios para colocar los nudos
Papel filtro:	Haciendo orificios para colocar los nudos
Soportes:	colocando los nudos sobre o en los soportes

SIGMA M1917

Utilizando Medios con vitaminas incluidas

MS sin vitaminas	SIGMA M 5524	\$1.60/L
MS + Tiamina	SIGMA M 5519	\$ 1.60/L
MS +vitaminas	SIGMA M 6899	\$ 1.60/L

Utilizando otras fuentes de agua destilada no mineral

Destilación (gas, corriente eléctrica, tiempo personal)	
bidón de agua San Luis	\$ 4.5

Utilizando Luz natural (crecimiento de plántulas frente a ventanas y luz natural indirecta)

Luz natural (> 4000 lux)	
Luz artificial (3000 lux, 3 fluorescentes)	

Tiempo vs. Transferencia.

Determinando el tiempo de transferencia a suelo en cada variedad. Se requiere raíces formadas y al menos dos nudos con hojas.

Temperatura

El crecimiento de plántulas a temperaturas mayores de 20°C, se acelera. (No usar temperaturas mayores de 30°C)

2. Materiales y Equipo para el Laboratorio de Cultivo de Tejidos

Tabla 1 Materiales necesarios para el Laboratorio de Cultivo de Tejidos

Descripción	Description	Catálogo	No Cat	Unidades
Bandeja de metal	Stainless-Steel Utility trays	FISHER	13-361d	ea
Beaker 1000 ml	Beaker glass x 1000 ml	FISHER	02-540P	6/pkg
Beaker 2000 ml	Beaker glass x 2000 ml	FISHER	02-540R	4/pkg
Beaker 4000 ml	Beaker glass x 4000 ml	FISHER	02-540T	ea
Beakers 600 ml	Beaker glass x 600 ml	FISHER	02-540M	6/pkg
Beaker 100 ml	Beaker plastic x 100 ml	FISHER	05-591-10B	12/pkg
Beaker 1000 ml - plástico	Reusable plastic Beakers-1000 ml	FISHER	02-591-10G	3/pkg
Beaker 2000 ml - plástico	Reusable plastic Beakers-2000 ml	FISHER	02-591-10H	ea
Beaker 4000 ml - plástico	Reusable plastic Beakers-4000 ml	FISHER	02-591-10J	ea
Beaker 600 ml - plástico	Reusable plastic Beakers-600 ml	FISHER	02-591-10F	4/pkg
Bidón 20 L	Polypropylene with spigot	FISHER	02-963-2B	ea
Campana de vacío	Large diameter Pyrex-desiccator	FISHER	08-631B	ea
Cartuchos para placas	Fisherbrand-Sterilizer bos	FISHER	03-460	ea
Dispensador 10 ml	Pipette pump il	SIGMA	02-963-2B	ea
Erlenmeyer 1000 ml	Erlenmeyer flasks without stoppers, 1000 ml	FISHER	10-040K	6/pkg
Erlenmeyer 125 ml	Erlenmeyer flasks without stoppers, 125 ml	FISHER	10-040D	12/pkg
Erlenmeyer 2000 ml	Erlenmeyer flasks without stoppers, 2000 ml	FISHER	10-040M	8/pkg
Erlenmeyer 250 ml	Erlenmeyer flasks without stoppers, 250 ml	FISHER	10-040F	12/pkg
Erlenmeyer 4000 ml	Erlenmeyer flasks without stoppers, 4000 ml	FISHER	10-040P	4/pkg
Espátula - pesar chica	Espátula with V shaped spoon	FISHER	21-401-258	ea
Espátula - pesar grande	Fisherbrand spoon/et-lab spoon	FISHER	14-3756-20	ea
Gradillas 13	Plastic racks, 13 mm	FISHER	14-809-22	ea
Gradillas 16	Plastic racks, 16 mm	FISHER	14-809-24	ea
Gradillas 18	Plastic racks, 18 mm	FISHER	14-809-26	ea
Gradillas 25	Magenta 7-Way tray	SIGMA	T8654	10/pkg
Hojas de bisturí # 11	Dissecting knife blade # 11	FISHER	08-916-5B	100/pkg
Descripción	Description	Catálogo	No Cat	Unidades
Hojas de bisturí # 15	Dissecting knife blade # 15	FISHER	08-916-5D	100/pkg
Lavador de pipetas	Pipet washers/rinsers	FISHER	15-530-95A	ea
Magentas	Magenta GA-7 Vessel	SIGMA	V8505	25/pkg
Mecheros	Glass burner	Local		
Parafilm	Parafilm paper 4" x 250 ft	SIGMA	S-8501	ea
Parafilm	Parafilm M 4" x 250"	SIGMA	P-7668	ea
Pinzas	Delicate thumb forceps, cushioning	FISHER	08-953C	ea
Pipetas 1 ml	Pipet glass serological 1 ml	FISHER	13-650-4	6/pkg
Pipetas 10 ml	Pipet glass serologicas 10 ml	FISHER	13-650-4C	6/pkg
Pipetas 5 ml	Pipet glass serological 5 ml	FISHER	13-650-4B	6/pkg
Pipetas desc. 1 ml	Pipet serological disposable 1 ml	FISHER	13-675-15C	200/pkg
Pipetas desc. 10 ml	Pipet serological disposable 10 ml	FISHER	13-675-20	200/pkg
Pipetas desc. 5 ml	Pipet serological disposable 5 ml	FISHER	13-675-22	200/pkg
Pizetas 250 ml	Wash Bottle x 250 ml	FISHER	03-409-22B	6/pkg

Descripción	Description	Catalogo	No Cat	Unidades
Pizetas 500 ml	Wash Bottle x 500 ml	FISHER	03-409-22C	6/pkg
Placa petri grande	Petri dish glass 150x20mm cover-bottom	FISHER	08-747F	12/pkg
Placas petri chica	Petri dish culture 100 x15 mm Cover-bottom	FISHER	08-747C	12/pkg
Plumón indel. Medium	Sigmaware lab markers,broad tip,black	SIGMA	S5894	10/pkg
Plumón indeleble fino	Sigmaware lab markers, fine tip, black	SIGMA	S5769	10/pkg
Probeta 1000 ml	Cylinder glass 1000 ml	FISHER	05-548G	2/pkg
Probeta 2000 ml	Cylinder glass 2000 ml	FISHER	08-562-5G	2/pkg
Probeta 250 ml	Cylinder glass 250 ml	FISHER	08-548E	2/pkg
Probeta 500 ml	Cylinder glass 500 ml	FISHER	08-548F	2/pkg
Tapas - Magenta	Magenta GA-7/GA-7 Vessel Cover	SIGMA	C0542	25/pkg
Tapas 13	Bacticapall polypropylene 13 mm	FISHER	14-127-28A	1000/pkg
Tapas 16	Bacticapall polypropylene 16 mm	FISHER	14-127-28B	1000/pkg
Tapas 18	Bacticapall polypropylene 18 mm	FISHER	14-127-28C	1000/pkg
Tapas 25	Closures pyrex rimless culture tubes	FISHER	14-957-85E	100/pkg
Tapas 25	Closure disposable Sigmaware for 25 mm culture tubes, natural color	SIGMA	C7591	500/pkg
Termómetro Max-Min	Max./Min. Thermometers	FISHER	15-093	ea
Tubos 13x100	Culture test tube 13 x 100 mm	FISHER	14-957C	720/pkg
Tubos 16x125	Culture test tube 16 x 125 mm	FISHER	14-957F	576/pkg
Tubos 18x150	Culture test tube 18 x 150 mm	FISHER	14-457H	576/pkg
Tubos 25x150	Culture test tube 25 x 150 mm	FISHER	14-957M	288/pkg
Tijeras 115 mm	Scissors 115 mm	Local		ea
Lana	wool	Local		ea
Algodón	Comercial cotton	Local		ea
Mandil blanco	Lab coat	Local		ea
Tijeras 7"	Scissors 7"	Local		ea
Cochecito	Small light-Duty cart	FISHER	11-926-50	ea
Step	Kik-Step Stool	FISHER	11-931	ea
Canasta de metal	Stainless-Steel Basket	FISHER	14-799-4	ea
Porta pipetas	Scienceware Polypropylene support	FISHER	13-712-10	ea
Porta beakers-secador	Scienceware electric glassware dryer	FISHER	11-387	ea
Porta beakers	Stainless-Steel Drain/Dy	FISHER	91-162	ea

Tabla 2 Reactivos Químicos

Descripción	Description	Catalogo	No Cat	Unidades
MS	Murashige and Skoog Basal Salt Mixture	GIBCO	23118-037	10 x 1L
Sucrosa	Sucrose Grade II 5 Kg.	SIGMA	S5391	5 kg
Alcohol 96%	Alcohol rectificado	Local		
Phytigel (5Kg)	Phytigel 5 Kg.	SIGMA	P8169	5 Kg
Agar en polvo (1 Kg)	Agar Powder	SIGMA	A1296	1 Kg
Tiamina	Thyamine hydrochloride crystalline	SIGMA	T3902	100 g
Glicina	Glycine free base	SIGMA	G6143	100 g
Acido nicotínico	Nicotinic acid free acid	SIGMA	N0765	100 g
Piridoxina	Pyridoxine hydrochloride crystalline	SIGMA	P8666	100 g
Acido giberélico	Gibberellic acid x 10 gr.	SIGMA	G7645	10 g
Carbón activado	Charcoal activated neutralized	SIGMA	C3790	2.5 Kg
Espermidina	Spermidine trihydrochloride	SIGMA	S2501	5 g
Tween 20	Tween 20 x 500 ml	MERCK	822184	500 ml

Descripción	Description	Catálogo	No Cat	Unidades
AIA	Indole-3 acetic acid	SIGMA	I2886	25 g
ANA	Naphthalene acetic acid x 100 g	SIGMA	N0640	100 g
Micinositol	Myo-inositol	SIGMA	I3011	100 g
Manitol	D-Mannitol	SIGMA	M1902	500 g
Sorbitol	D-Sorbitol	SIGMA	S8143	1 Kg
Putrescina	Putrescine	SIGMA	P3178	25 g
Pantotenato de calcio	D-Pantothenic acid	SIGMA	P6045	100 g
Glucosa	D-(+)-Glucose	SIGMA	G7520	5 Kg
Acido ascórbico	L-Ascorbic acid (Vitamina C)	SIGMA	A2174	100 g
CCC	Chlorochoine Chloride	SIGMA	C4049	25 g
BAP	6-Benzylaminopurine	SIGMA	B3408	5 g

Tabla 3 Equipos

Descripción	Description	Catálogo	No Cat
Potenciómetro	pHmeter	SIGMA	P-7449
Potenciómetro	pHep Stick meter	FISHER	13-300-73
Destilador de agua	Water distiller wheaton 5 L	WHEATON	09-124-100
Cámara de flujo 6'	6' Horizontal Laminar Flow Clean Bench	BAKER	EG-6252
Cámara de flujo 2'	2' Horizontal Laminar Flow Clean Bench	BAKER	IV-22
Filtros de cámaras de flujo laminar 2'	Hepa replacement filter 30 x 48 x 5-7/8 for TT4830 (Cámaras Enviroco)	Enviroco Corporation	69302-p
Filtros de cámaras de flujo laminar 6'	Hepa replacement filter 24 x 72 x 5-7/8 for TT7224 (Cámaras Enviroco)	Enviroco Corporation	69212-p
Agitador magnético	Fisher Porcelain-top stirring hotplates	FISHER	11-499-7SH
Balanza	Ohaus Portable model 200	SIGMA	B-4658
Balanza analítica	Ohaus Model A5605	SIGMA	B-8785
Autoclave	Sterilmatic - sterilizers Chamber 26L x 16"H	FISHER	14-460
Autoclave	Lightweight Sterilizer	FISHER	14-461-5
Microscopio	Microscope Nikon Mod. SM-S-D	Geompex	NMAG1al
Shaker	Haker	THOMAS	8290-f26
Computadora	PC Gateway Professional System P5-100	Gateway	P5-100
Esterilizador Inst.	Sterilizer, Infrared, 120V	SIGMA	S3398
Dispensador	Unispense UP W/ standard 220V	WHEATON	374302
Conecciones-dispensador	3 mm rub tub assembly	WHEATON	374311
Cámara de crecimiento o termoterapia	Biotronette Mark III Environmental Chamber	CMS	258-521
Disp. 25 ml	Bottle top dispenser Brinkmann	SIGMA	D5174
Aire acondicionado	Equipo Aire acondicionado "Carrier" 60,000 BTU	COLD IMPORT	
Vortex	Maxi Mix II, 240 V	Thermolyne	M37610-26