PN-ABD-680 63489

TRANSPORT,
RECEIPT and
PROPAGATION of

In Vitro Potato Plantlets

John H. Dodds, Daniela Silva-Rodríguez, and James E. Bryan

INTERNATIONAL POTATO CENTER (CIP)

1986

ISBN 92-9060-087-X

TRANSPORT, RECEIPT AND PROPAGATION OF IN VITRO POTATO PLANTLETS

1 Transport of tissue culture material
2 Transfer to planting mix
3 Micropropagation
4 Murashige-Skoog medium (modified)

Tissue culture materials consist of small, aseptic plantlets growing on a synthetic nutrient medium. The aseptic nature of this material makes it an ideal method for international exchange of germplasm as it minimizes the risk of transmitting fungal and bacterial diseases.

This booklet contains information for the recipient of in vitro plantlets on the handling procedures to be followed for further micropropagation or transfer to non-sterile growing conditions.

1 TRANSPORT OF TISSUE CULTURE MATERIAL

1.1 **Packing.** The material is packed in polystyrene in a cardboard container. Each package contains several small glass test-tubes, each with three well-developed plantlets. Extra agar media is added to prevent damage from movement during shipment (see Figure 1).

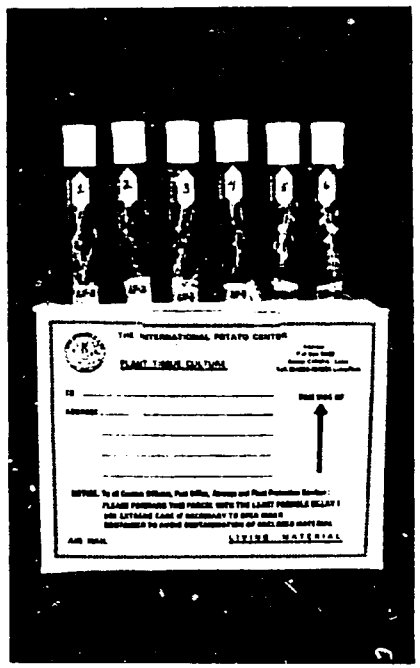


Figure 1.

The test tubes are capped with plastic covers and sealed with parafilm to prevent entry of contaminants into the cultures and loss of water from the media.

1.2 **Shipment.** Whenever possible, tissue cultures are hand-carried to ensure rapid transport. When this is not feasible, the fastest possible method is usually airfreight. In vitro plantlets can survive two to three weeks without light.

1.3 **Handling after arrival.** The cultures should be cleared from customs as quickly as possible. When advance notice of the shipment is known, alert the customs officials of its expected arrival. Carefully remove the test tubes from the package in a laboratory or clean room. Do not open the tubes. Do not remove the plantlets.

If the plantlets have become yellow, place the test tubes under diffused light for about 1 week in a clean room.

In vitro shoot cultures are free from diseases. Work under clean conditions according to the following description (steps 2.4 and 2.5) to prevent contamination during and after unpacking.

1.4 **Use of tissue culture material.** The plantlets can be used in two different ways:

- transfer to planting mix (Section 2),
- micropropagated (Section 3).

2 TRANSFER TO PLANTING MIX

2.1 Materials:

- peat moss
- fine sand (1 mm diameter)
- aluminium foil
- clay pots (8 to 10 cm diameter) or jiffy pots
- larger pots (20 cm diameter)
- distilled water
- 1 % calcium-hypochlorite solution
- 70 % alcohol solution
- strong soap
- fertilizer with high content of phosphorous (5-50-17) or (12-12-12)

2.2 Mix peat moss and sand (1:2 by volume).

2.3 If an autoclave is available, fill the pots with peat moss/sand mix, cover them with aluminium foil, and sterilize for 1 hour. If an autoclave is not available wash the clay pots (jiffy pots are already sterile) with detergent, rinse them well with running water, and sterilize the planting mix and some additional sand separately by any other means (heat, steam, fungicides, etc.).

2.4 Take the pots and the in vitro culture to a clean bench that is protected from air currents, dust, dirt, insects, or other contaminants.

2.5 Wash your hands with strong soap and a 1 % calcium-hypochlorite solution. Then rinse hands in 70 % alcohol.

2.6 Irrigate the pots with a small amount of water.

2.7 Prepare the pot that is to receive the plantlet by making a hole in the center of the peat moss/sand mix with a clean stick or pencil.

2.8 Before removing the plantlets, disinfect the outside of the test tube using a piece of cotton or cloth moistened with 70 % alcohol to reduce the risk of contamination.

2.9 Using clean fingers, remove the parafilm and the plastic cover from the test tube. Work with one tube at a time.

2.10 Gently pull the plantlets with the agar out of the test tube using sterilized forceps (flamed to red heat and cooled) (Figure 2).

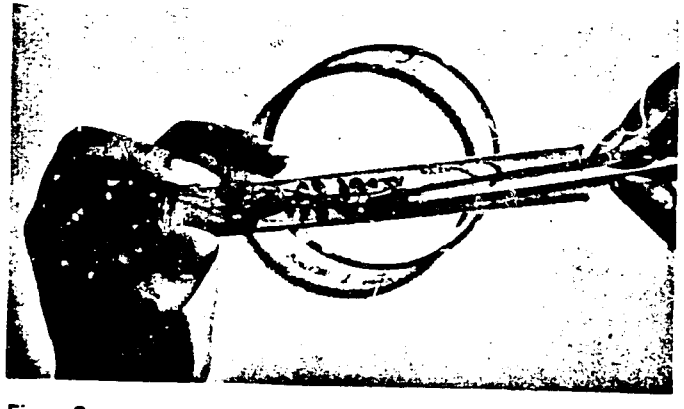


Figure 2.

2.11 Wash the agar from the roots by gently immersing them several times in sterilized water, trying not to wet the rest of the plantlet.

2.12 Separate the plantlets from each other and plant them individually in the holes in the potting mix with the roots plus one or two nodes below the surface (Figure 3).

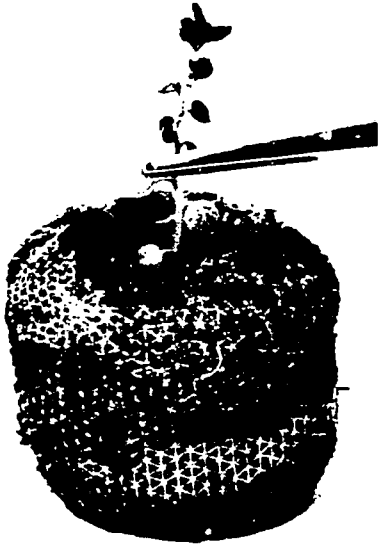


Figure 3.

2.13 Place sterilized sand around the plantlet and press lightly to keep the plantlet straight in the pot.

2.14 Cover the entire plantlet with an inverted (100-150 cm^3) beaker to prevent dehydration until the roots are established (about 10 days).

2.15 Keep the pots in a clean location, at 18 to 25 °C with 14-16 hours illumination.

2.16 Until the plants are well rooted irrigate lightly with tap water if it has a low salt content; otherwise use demineralized or rain water. Do not overwater.

2.17 When roots are established, you may dissolve supplementary nutrient in the irrigation water. Commercial peat moss often contains fertilizer, thus less additional nutrient may be required.

2.18 Gradually expose the plants to the normal atmosphere by removing the beakers for short periods each day.

2.19 Once the plants are established, transfer to larger (e.g. 20 cm diameter) pots. Be careful not to break the roots. When the plants are well rooted, normal fertilizer can be dissolved in the irrigation water. At CIP we use 5 g N:P:K at 12-12-12 per liter water. Apply 50-100 cm^3 per 20 cm diameter pot. Again, do not overwater.

3 MICROPROPAGATION

3.1 Materials, equipment

- Murashige-Skoog medium (see Section 4)
- test tubes
- plastic caps or cotton wool
- forceps
- scalpel
- parafilm
- alcohol lamp
- alcohol 70 %
- autoclave
- sterile work area ("microvoid")

3.2 Prepare the nutritive growth medium according to the procedure given in Section 4.

3.3 Dispense 4 cm^3 of the medium in each test tube. Cap the tubes with plastic caps or cotton wool plugs and autoclave them for 15 minutes. Keep the test tubes vertical while the agar sets.

3.4 Working under sterile conditions (sterile area or "microvoid") follow steps 2.8 to 2.10.

3.5 Transfer the plantlets from the test tube to a sterile petri dish and make nodal cuttings using sterile scalpel and forceps. Each nodal cutting consists of a 0.2-0.5 cm stem segment with an axillary bud (Figure 4).

Figure 4.

3.6 Place each nodal cutting in a test tube. Ensure that each cutting lies horizontally on the agar surface with its axillary bud pointing upwards (Figure 5). Place 3 or 4 cuttings per test tube.

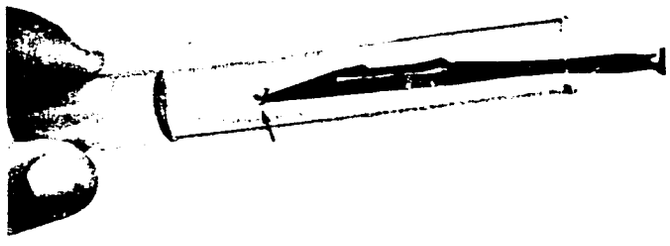
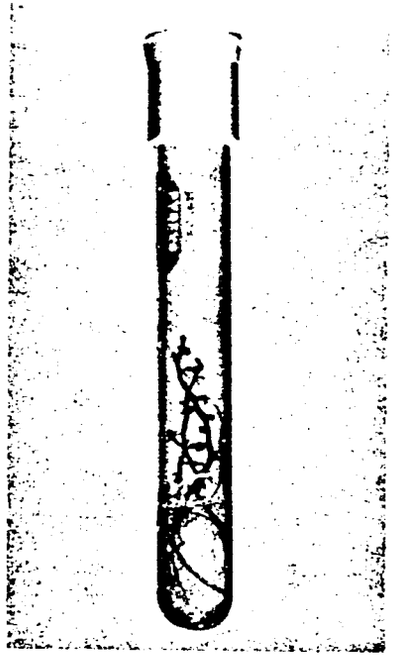


Figure 5.

3.7 Close the test tubes, seal with parafilm, label and place in a clean area where the room temperature is 20-26 °C. Give 1000 Lux illumination for 14-16 hours each day.

3.8 The axillary bud of each nodal cutting grows into an new plantlet within 2-4 weeks and is ready for transplanting to pots as previously described, or for further micropropagation (Figure 6).



4 MURASHIGE-SKOOG MEDIUM (modified)

Prepare the stock solutions in four separate parts:

- Salts
- $MgSO_4$
- Iron
- Vitamin

Salts stock solution: dissolve each in 200 cm^3 glass distilled water

– NH_4NO_3	35	g
– KNO_3	40	g
– $CaCl_2.2H_2O$	9	g
– KH_2PO_4	3.5	g
– H_3BO_3	0.1	g
– $MnSO_4.4H_2O$	0.5	g
($MnSO_4.H_2O$	0.4	g)
– $ZnSO_4.7H_2O$	0.2	g
($ZnSO_4.H_2O$	0.1	g)
– KI	0.02	g
– $Na_2MoO_4.2H_2O$	0.005	g

Dissolve 5 mg (0.005 g) of the following salts together in 10 cm^3 of water; add 1 cm^3 of this solution to 200 cm^3 water for the stock solution

– $CuSO_4.5H_2O$ and $CoCl_2.6H_2O$

Mix the ten individual salt solutions together to make 2000 cm^3 of the salt stock solution.

$MgSO_4$ stock solution

– $MgSO_4.7H_2O$ 3.7 g in 100 cm^3 distilled water

Iron stock solution

– Na_2EDTA	0.75 g
– $FeSO_4.7H_2O$	0.55 g

Dissolve $FeSO_4.7H_2O$ in 20 cm^3 distilled water; Na_2EDTA in 20 cm^3 distilled water heating it up. Mix the solutions, cool, and make up to 100 cm^3 with distilled water.

Vitamin stock solution

– Thiamine HCl 40 mg in 100 cm^3 distilled water

Medium preparation. Prepare 1 liter of the Murashige-Skoog basic medium by mixing the stock solutions with additional materials in the following proportions:

Salts	100	cm^3
$MgSO_4$	10	cm^3
Iron	5	cm^3
Vitamin	1	cm^3
Inositol	100	mg
Gibberellic acid	0.25	ppm
Calcium pantothenic acid	2.0	ppm
Sucrose	3.0	%
Agar	0.8	%

Autoclave for 15 minutes.

International Potato Center
P.O. Box 5969
Lima, Peru

Tel. 366920
Telex 25672 PE
Cable CIPAPA-Lima

This publication was processed and printed
by the Training and Communications Department,
International Potato Center, Lima, Peru, October 1986.

Copies printed: 1 000

XIV-Ph-E&S-08-O-1 000

Centro Internacional de la Papa
Apartado 5969
Lima, Perú

Tel. 366920
Télex 25672 PE
Cable CIPAPA-Lima

Esta publicación se imprimió en los talleres del
Departamento de Capacitación y Comunicaciones,
Centro Internacional de la Papa, Lima, Perú, octubre, 1986.

Tirada: 1 000

XIV-Ph-E&S-08-O-1 000

4 MEDIO DE MURASHIGE-SKOOG (MODIFICADO)

Prepare las soluciones concentradas en cuatro partes por separado:

- Sales
- $MgSO_4$
- Hierro
- Vitaminas

Solución concentrada de sales: disuelva cada una por separado en un vaso con 200 cm^3 con agua destilada

– NH_4NO_3	35	g
– KNO_3	40	g
– $CaCl_2.2H_2O$	9	g
– KH_2PO_4	3,5	g
– H_3BO_3	0,1	g
– $MnSO_4.4H_2O$	0,5	g
($MnSO_4.H_2O$)	0,4	g
– $ZnSO_4.7H_2O$	0,2	g
($ZnSO_4.H_2O$)	0,1	g
– KI	0,02	g
– $Na_2MoO_4.2H_2O$	0,005	g

Luego disuelva conjuntamente 5 mg (0,005 g) de las siguientes dos sales en 10 cm^3 de agua; agregue 1 cm^3 de esta solución a 200 cm^3 de agua para obtener la solución:

– $CuSO_4.5H_2O$ y $CoCl_2.6H_2O$

Ahora mezcle conjuntamente las 10 soluciones individuales de sales para hacer 2 000 cm^3 de la solución concentrada de sales.

Solución concentrada de $MgSO_4$

– $MgSO_4.7H_2O$ 3,7 g en 100 cm^3 de agua destilada

Solución concentrada de hierro

– Na_2EDTA	0,75 g
– $FeSO_4.7H_2O$	0,55 g

Disuelva el $FeSO_4.7H_2O$ en 20 cm^3 de agua destilada; el Na_2EDTA en 20 cm^3 de agua destilada. Caliente esta solución. Mezcle las dos soluciones, enfríe y agregue agua destilada hasta completar 100 cm^3.

Solución concentrada de vitaminas

– Thiamina HCl 40 mg en 100 cm^3 de agua destilada

Preparación del medio. Prepare un litro de medio de Murashige-Skoog, mezclando las soluciones concentradas con los materiales adicionales, en las proporciones siguientes:

Sales	100	cm^3
$MgSO_4$	10	cm^3
Fierro	5	cm^3
Vitaminas	1	cm^3
Inositol	100	mg
Acido giberélico	0,25	ppm
Acido pantoténico cálcico	2,0	ppm
Sucrosa	3,0	%
Agar	0,8	%

Ponga este medio en el autoclave durante 15 minutos.

3.6 Coloque cada nudo en un tubo de ensayo. Asegúrese que cada nudo repose horizontalmente sobre la superficie del agar, con la yema axilar hacia arriba (Figura 5). Ponga 3 a 4 nudos por tubo.

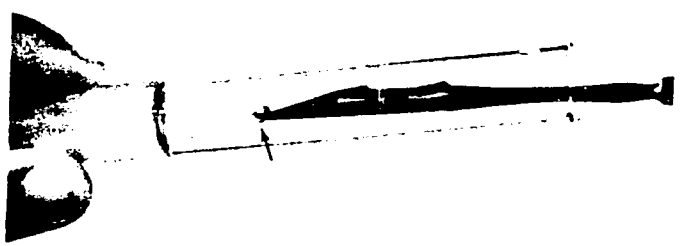


Figura 5.

3.7 Tape los tubos de prueba y séllelos con parafilm, márquelos y colóquelos en un área limpia donde la temperatura ambiental sea de 20 a 26 °C. Dé una iluminación de 1 000 Lux, durante 14-16 horas al día.

3.8 La yema axiler de cada nudo crece para formar una nueva plántula. En aproximadamente 2-4 semanas se encuentra lista para ser trasplantada a macetas, como ya ha sido descrito, o para su posterior micropropagación (Figura 6).

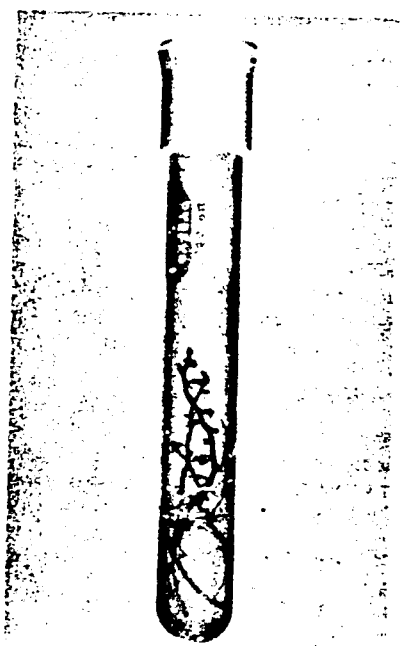


Figura 6.

2.14 Cubra la plántula con un vaso de vidrio (100-150 cm^3) invertido para prevenir la deshidratación hasta que las raíces se hayan establecido, lo cual tomará cerca de 10 días.

2.15 Mantenga las macetas en un lugar limpio, de 18 a 25 °C con 14-16 horas de iluminación.

2.16 Hasta cuando las plántulas se encuentren bien enraizadas, riegue ligeramente con agua corriente si ésta tiene un bajo contenido de sales; de lo contrario use agua desmineralizada o de lluvia. No riegue en exceso.

2.17 Cuando las raíces se encuentren ya establecidas, puede disolver nutrientes suplementarios en el agua de riego. El musgo comercial contiene generalmente fertilizantes por lo que se necesitarán menos nutrientes adicionales.

2.18 Exponga las plántulas gradualmente a una atmósfera normal removiendo los vasos cada día durante períodos cortos.

2.19 Una vez que las plántulas se encuentren establecidas, transfiéralas a macetas más grandes (20 cm de diámetro). Tenga cuidado de no dañar las raíces. Cuando las plántulas estén bien enraizadas se puede disolver fertilizante normal en el agua de riego. En el CIP se han utilizado 5 g de N:P:K de fórmula 12-12-12 por litro de agua. Aplique 50-100 cm^3 por cada maceta de 20 cm de diámetro. Nuevamente, recuerde que no debe regar en exceso.

3 MICROPROPAGACION

3.1 Materiales y equipo

- Medio Murashige-Skoog (ver la Sección 4)
- tubos de ensayo
- tapas de plástico o fibras de algodón
- pinzas
- bisturí
- parafilm
- lámpara de alcohol
- alcohol al 70%
- autoclave
- área estéril de trabajo (o "microvoid")

3.2 Prepare el medio nutritivo de crecimiento según el procedimiento dado en la Sección 4.

3.3 Vierta 4 cm^3 del medio en cada tubo de prueba. Tape los tubos con las tapas de plástico o con tapones de algodón y colóquelos en el autoclave durante 15 minutos. Mantenga los tubos en posición vertical mientras se solidifica el agar.

3.4 Trabaje bajo condiciones estériles (área estéril o "microvoid"), siguiendo los pasos 2.8 y 2.10.

3.5 Transfiera las plántulas de los tubos de ensayo a un plato de petri estéril y corte esquejes con un solo nudo utilizando un bisturí y pinzas estériles. Cada nudo consiste en un segmento de tallo de 0,2-0,5 cm con una yema axilar (Figura 4).

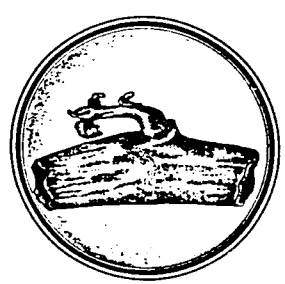


Figura 4.

2.8 Antes de extraer las plántulas, desinfecte el exterior del tubo de prueba utilizando un poco de algodón o tela humedecida en alcohol al 70%, para reducir el riesgo de contaminación.

2.9 Utilizando sus dedos limpios, remueva del tubo de prueba el parafilm y la tapa plástica. Trabaje con un tubo cada vez.

2.10 Con pinzas esterilizadas extraiga suavemente las plántulas con el agar del tubo de ensayo (Figura 2).

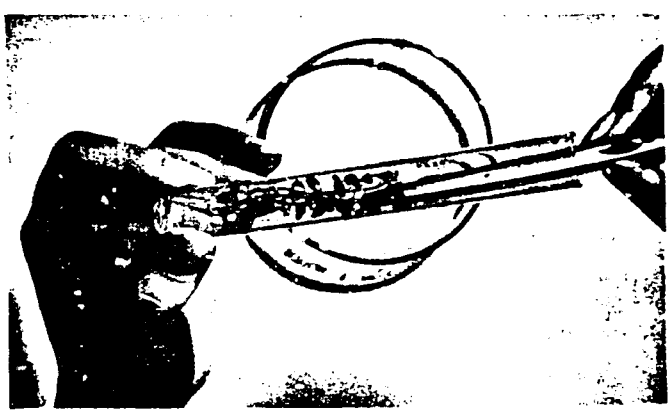


Figura 2.

2.11 Lave el agar de las raíces de la plántula sumergiéndolas varias veces en agua estéril, cuidando de no mojar el resto de la plántula.

2.12 Separe las plántulas unas de otras y siémbrelas individualmente en los huecos de la mezcla en las macetas, con las raíces y con uno o dos nudos debajo de la superficie (Figura 3).

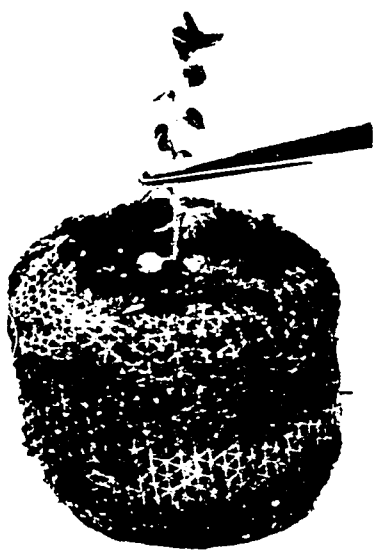


Figura 3.

2.13 Coloque arena esterilizada alrededor de la plántula y presione suavemente para mantenerla derecha en la maceta.

Los tubos de ensayo llevan tapas plásticas y ven sellados con parafilm para evitar el ingreso de contaminantes, así como para evitar la pérdida de agua del medio de cultivo.

1.2 **Embarque.** Siempre que sea posible, las plántulas *in vitro* deben ser transportadas en mano para asegurar un transporte rápido. Cuando ésto no sea posible, el transporte aéreo es generalmente el más rápido. Las plántulas *in vitro* pueden sobrevivir sin luz durante dos a tres semanas.

1.3 **Manejo al recibirlas.** Saque de la aduana las plántulas propagadas *in vitro* tan pronto como sea posible. Cuando tenga conocimiento anticipado del embarque, infórmele a los funcionarios de la aduana, señalando la posible fecha de llegada. Luego, desempaque cuidadosamente los tubos de ensayo, pero no los abra ni saque las plántulas.

Si las plántulas presentan clorosis, coloque los tubos de ensayo bajo luz difusa, en un cuarto limpio, durante más o menos una semana.

Las plántulas de papa propagadas *in vitro* están libres de enfermedades. Trabaje bajo condiciones asépticas, siguiendo el procedimiento indicado en los pasos 2.4 y 2.5, para prevenir la contaminación durante y después del desempacado.

1.4 **Utilización del material enviado.** Usted puede utilizar las plántulas de dos maneras diferentes:

- transferirlas a un substrato de siembra (Sección 2),
- micropropagarlas (Sección 3).

2 TRANSFERENCIA A UN SUBSTRATO DE SIEMBRA

2.1 Materiales:

- musgo
- arena fina (1 mm de diámetro)
- papel de aluminio
- macetas de barro (8 a 10 cm de diámetro), o macetas "jiffy"
- macetas más grandes (20 cm diámetro)
- agua destilada
- solución de hipoclorito de calcio al 1%
- solución de alcohol al 70%
- jabón fuerte
- fertilizante con alto contenido de fósforo (5-50-17) ó (12-12-12)

2.2 Mezcle el musgo con la arena en razón de 1:2 por volumen.

2.3 Si dispone de autoclave, llene las macetas con la mezcla obtenida en 2.2, y cúbralas con papel de aluminio y esterilice durante una hora. Si no dispone de autoclave, lave las macetas de arcilla con detergente y enjuáguelas después con agua corriente. Esterilice la mezcla de siembra y algo de arena adicional por separado, por cualquier otro medio (calor, vapor, fungicidas, etc.).

2.4 Lleve las macetas y las plántulas *in vitro* a una mesa limpia que esté protegida de corrientes de aire, polvo, partículas extrañas, insectos, u otros contaminantes.

2.5 Lávese las manos con un jabón fuerte y una solución de hipoclorito de calcio al 1% y luego enjuáguelas con alcohol al 70%.

2.6 Riegue las macetas con una pequeña cantidad de agua limpia.

2.7 Prepare la maceta que habrá de recibir a la plántula haciendo un hueco en el centro de la mezcla de musgo/arena con un palillo o un lápiz que estén limpios.

TRANSPORTE, RECEPCION Y PROPAGACION DE PLANTULAS DE PAPA, *IN VITRO*

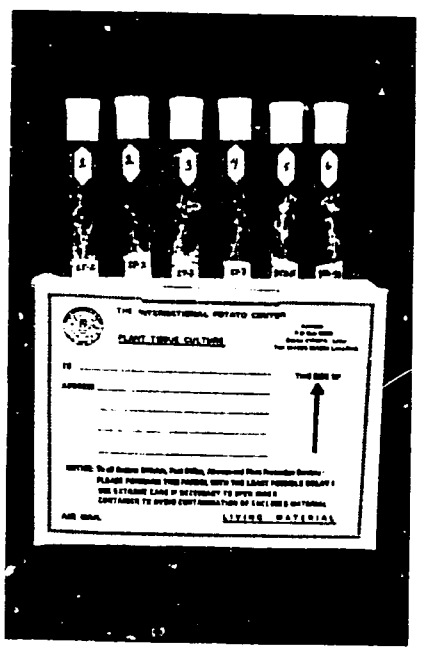
1 Transporte de plántulas de papa propagadas *in vitro*
2 Transferencia a un substrato de siembra
3 Micropropagación
4 Medio de Murashige-Skoog (modificado)

Las plántulas de papa propagadas *in vitro* son asépticas, se conservan en un ambiente estéril y crecen en un medio nutritivo sintético. La naturaleza aséptica del material *in vitro* lo hace un método ideal para el intercambio internacional de germoplasma ya que el riesgo de transmitir enfermedades fungosas y bacterianas es mínimo.

Este folleto contiene información dirigida a quien recibe plántulas *in vitro*, sobre los procedimientos para su posterior micropropagación o su transferencia a un substrato, no estéril, de crecimiento.

1 TRANSPORTE DE PLANTULAS DE PAPA PROPAGADAS *IN VITRO*

1.1 **Embalaje.** El material es embalado en un envase de poliestireno, dentro de una caja de cartón. Cada caja contiene varios tubos de ensayo, en cada uno de los cuales se encuentran tres plántulas bien desarrolladas. Se agrega al medio una cantidad extra de agar para prevenir daños por el movimiento durante el viaje (Figura 1).



TRANSPORTE,
RECEPCION y
PROPAGACION de

Plántulas de Papa In Vitro

John H. Dodds, Daniela Silva-Rodríguez y James E. Bryan

CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA (CIP)

1986

ISBN 92-9060-087-X