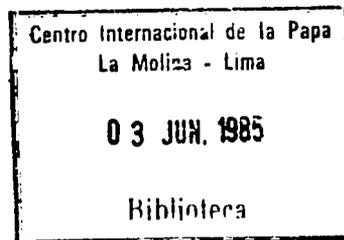


PN-ABD-716  
63527

Documento de Tecnología Especializada 1

# Cultivo de Tejidos: Micropropagación, Conservación y Exportación de Germoplasma de Papa

N. Espinoza, R. Estrada, P. Tovar, J. Bryan y J.H. Dodds



- 5449

Centro Internacional de la Papa  
Apartado 5969  
Lima - Perú

Tel. : 366920  
Cable: CIPAPA-Lima  
Télex: 25672 PE

1985

CULTIVO DE TEJIDOS:  
MICROPROPAGACION, CONSERVACION Y EXPORTACION  
DE GERMOPLASMA DE PAPA

1. Ventajas de las técnicas de cultivo de tejidos
2. Aislamiento de meristemas
3. Micropropagación
4. Mantenimiento y almacenamiento a largo plazo
5. Exportación in vitro
6. Medios de cultivo
7. Bibliografía

El cultivo de tejidos permite la propagación clonal rápida de un gran número de plántulas en un período breve, y la conservación del germoplasma de papa, bajo condiciones controladas, en espacios pequeños y con poca mano de obra. El buen estado de sanidad de muchos cultivos in vitro facilita enormemente el intercambio internacional de germoplasma.

En este documento se describen las ventajas, las metodologías y los materiales de las técnicas de cultivo de tejidos que se emplean en el Centro Internacional de la Papa (CIP) y se analizan las técnicas de aislamiento de meristemas, la micropropagación, el almacenamiento a largo plazo y la exportación in vitro de germoplasma.

## 1. VENTAJAS DE LAS TECNICAS DE CULTIVO DE TEJIDOS

El Centro Internacional de la Papa (CIP) mantiene una colección de germoplasma de papa de aproximadamente 6 000 clones. Esta colección es fuente de diversidad genética aprovechable por fitomejoradores en los programas de papa. La colección está expuesta a una amplia gama de riesgos, como enfermedades infecciosas o condiciones climáticas adversas y su mantenimiento en el campo es costoso. Por eso la colección de germoplasma in vitro posee varias ventajas sobre el mantenimiento en el campo, a saber:

- menores costos de mano de obra,
- ausencia de infecciones de campo,
- ausencia de peligros ambientales como granizadas y heladas,
- acceso oportuno a material para micropropagación,
- acceso oportuno a material para eliminación de patógenos,
- disponibilidad permanente de material para propagación y exportación.

En el CIP se está transfiriendo la colección de germoplasma de papa del campo a in vitro (cultivo de tejidos) pero se necesitan varios años más de trabajo para completar esa transferencia.

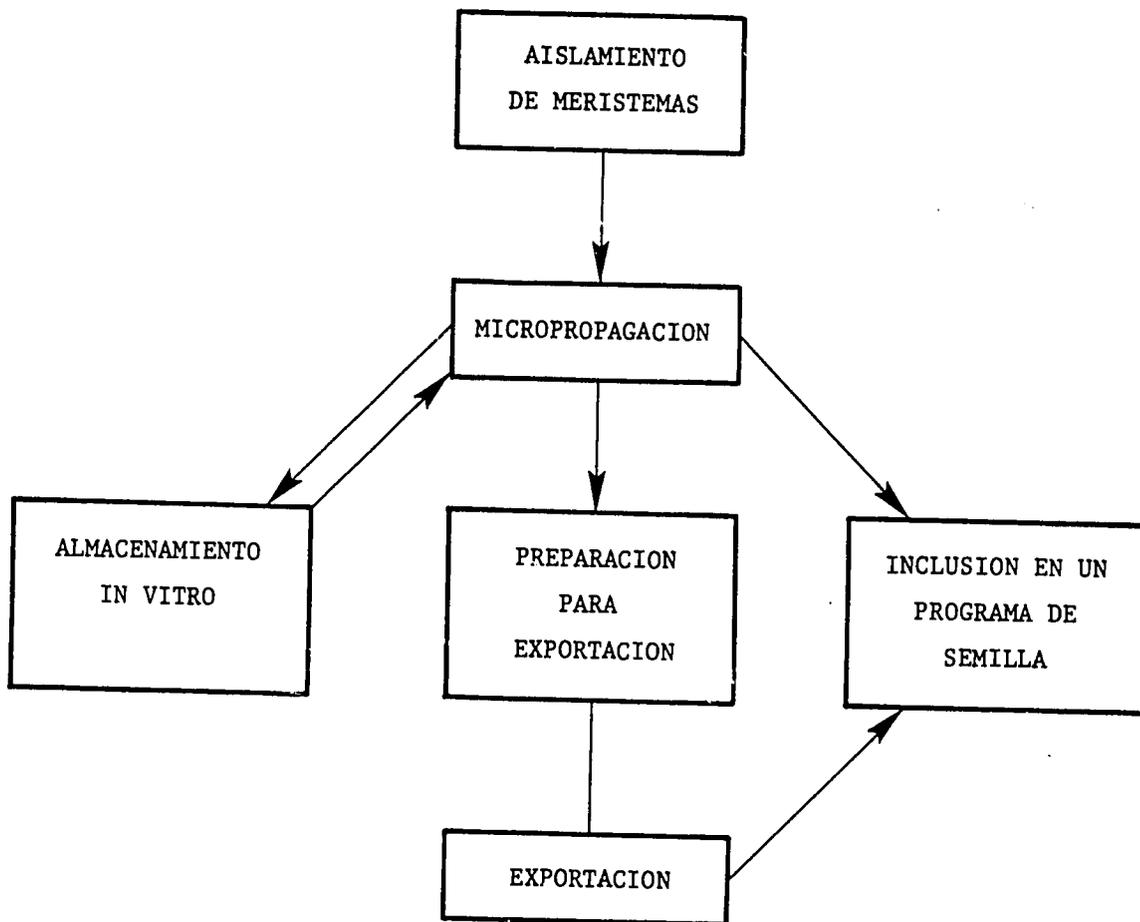


Figura 1. Trayectoria de un clon de papa a través del cultivo de meristemas, micropropagación, almacenamiento y su eventual exportación.

## 2. AISLAMIENTO DE MERISTEMAS

El meristema es un tejido compuesto por células que se dividen rápidamente (células meristemáticas) y constituye el punto activo de crecimiento de la yema vegetal. Para la propagación de cultivos de yemas de papa, el meristema es ideal como material inicial ya que tiene dos características favorables:

- El meristema aislado se desarrolla en el medio de cultivo de una manera genéticamente estable. Este no es el caso, por ejemplo, de los cultivos de callos, que son desorganizados y presentan importantes variaciones genéticas.
- El aislamiento de meristemas reduce el nivel de infección virótica en el tejido y, bajo condiciones apropiadas, puede ser utilizado para una erradicación completa de patógenos.

La cúpula de la yema apical contiene las células verdaderamente meristemáticas y está rodeada por primordios foliares y hojas primarias. Como los tejidos vasculares más diferenciados se encuentran alejados del meristema (constituyen tejidos más viejos en el tallo), los elementos vasculares de los primordios foliares todavía no han estado en contacto con la parte principal del sistema vascular del tallo. De ahí que las partículas de virus, que puedan estar presentes en el sistema vascular, llegan a la región meristemática del ápice solamente mediante un movimiento de célula en célula. Esta es una de las principales razones por las cuales en una planta infectada por virus la concentración de los virus decrece a medida que éstos se acercan al meristema, sea de yema apical o axilar.

En principio esta situación es similar en todos los vegetales; la única diferencia está en la forma del meristema y de los primordios foliares. No se ha comprobado si otros factores como la producción -en las células

meristemáticas- de sustancias inhibitorias de los virus, o el efecto de las hormonas en el medio de cultivo, influyen en la eliminación de los virus mediante el cultivo de meristemas.

El aislamiento bajo condiciones asépticas del ápice meristemático, y su cultivo en un medio aséptico adecuado, conduce el desarrollo de plántulas. Este desarrollo, en general, sigue un modelo que es similar al de la planta entera: las células del meristema se dividen y la diferenciación de los tejidos continúa. La nutrición de la parte disecada de la planta es suplida por un medio artificial. Esta técnica llamada cultivo de meristema, fue aplicada por primera vez hace 30 años por Morel y Martin (1952) en la dalia y puede llevar a obtener plantas libres de patógenos.

La disección aséptica del meristema es un proceso delicado y requiere muchas horas de práctica. La secuencia de disección está presentada fotográficamente en la Figura 2 y se hace de la siguiente manera: Se cortan los tallos en segmentos, cada uno los cuales debe tener un nudo con su yema axilar. Luego con mucho cuidado se eliminan las hojas. Las piezas se desinfectan primero durante 30 segundos en alcohol de 70%, y a continuación en una solución de 2,5% de hipoclorito de calcio durante 15 minutos. Se lavan cuatro veces con agua destilada esterilizada para quitar el exceso de hipoclorito.

Con el apoyo de un microscopio binocular para disección, se desprenden los folíolos que rodean el punto de crecimiento hasta que sólo queden el ápice y algunos primordios foliares. El ápice con dos primordios foliares se corta y se transfiere al Medio A (ver Sección 6). Semanalmente se hace la transferencia a un medio fresco. Después de seis a ocho semanas las pequeñas plántulas son transferidas a tubos más grandes para que continúen su crecimiento. La micropropagación puede iniciarse cuando las plantas tengan 4 cm de altura.

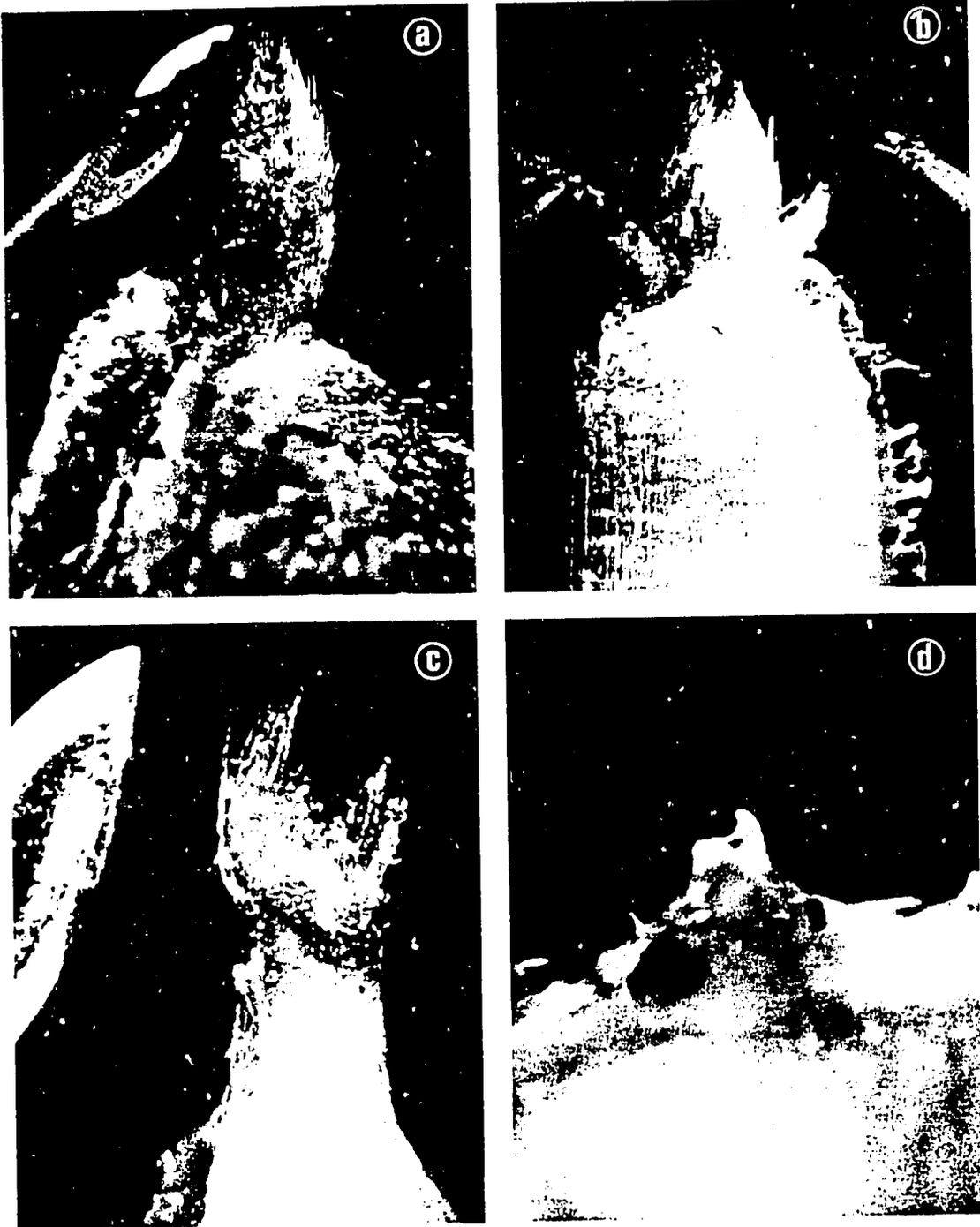


Figura 2. Secuencia fotográfica de la disección de meristemas:  
a Yema aislada en condición estéril.  
b y c Etapas de la disección en que se eliminan las hojas primarias.  
d Meristema completamente diseccionado con dos primordios foliares.

### 3. MICROPROPAGACION

El objetivo de la micropropagación es obtener un número grande de plantas clonales en un período corto. En el CIP, se siguen dos métodos de micropropagación de papa:

- esquejes de tallo para medios de agar,
- esquejes de tallo para medios líquidos.

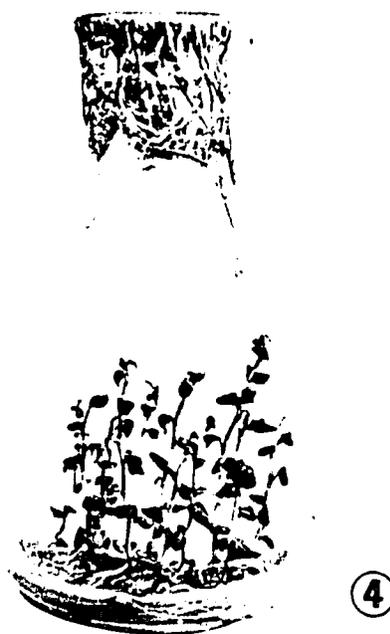
Para ambos casos se utiliza iluminación indirecta durante 16 horas.

Esquejes de tallo para medios de agar. De pequeñas plántulas in vitro, se cortan nudos simples con hojas. Las hojas grandes se disectan con cuidado. Luego se coloca el esqueje sobre la superficie del Medio B, que es sólido. La yema axilar crecerá rápidamente (Figura 3) y en tres o cuatro semanas, habrá otros seis o siete esquejes disponibles para ser transferidos.

Esquejes de tallo para medios líquidos. Se cortan plántulas in vitro en pedazos con tres o cuatro nudos y se eliminan las hojas grandes. Estos segmentos de tallos se introducen en un frasco con 15 cm<sup>3</sup> del Medio F líquido y el frasco se coloca en un agitador horizontal (80 rpm). Después de dos a tres semanas, se ha producido un crecimiento muy veloz (Figura 4) y de cada frasco se obtendrán 60 a 70 nudos.

Cuando se haya producido un número adecuado de plántulas éstas pueden ser trasplantadas a condiciones no estériles.

Enraizamiento y trasplante a condiciones no estériles. A los esquejes de tallo de plántulas in vitro, se les quitan las hojas. Luego los esquejes se colocan en un Medio B donde crecen y enraizan. Cuando las plántulas tengan una altura de tres a cinco centímetros y hayan desarrollado un buen sistema radicular, estarán listas para el trasplante (Figura 5). Las plántulas enraizadas pueden ser trasplantadas a macetas o también a almácigos que contengan una mezcla adecuada de



- Figura 3. Crecimiento de esquejes de tallo en tubos de ensayo.
- Figura 4. Cultivo por agitación para propagación rápida. Las plántulas mostradas aquí están listas para hacer subcultivos.
- Figura 5. Caja que contiene 25 plántulas enraizadas, listas para ser sacadas del ambiente estéril y trasplantadas a condiciones no estériles.
- Figura 6. Plántulas derivadas de material in vitro, unos días después de ser trasplantadas.

musgo y arena (Figura 6). Se necesita cuidado para no dañar las raíces y para lograr que éstas hagan buen contacto con el medio al que han sido trasplantadas. Las plantas se mantienen en un ambiente de humedad relativa alta durante los primeros días.

#### 4. MANTENIMIENTO Y ALMACENAMIENTO A LARGO PLAZO

El material in vitro puede ser conservado en cultivo indefinidamente si se evita la contaminación y se transfiere a medios frescos cada cierto tiempo. Se puede mantener una reserva de material de sanidad comprobada para utilizarlo en el futuro.

Para el mantenimiento a corto plazo, las plántulas se cultivan en el medio B en tubos de ensayo. Estos se sellan con tapas de plástico que puedan ser esterilizadas en autoclave. Aunque los tapones de algodón son apropiados para un almacenamiento a corto plazo, no son recomendados para un almacenamiento a plazo mediano o largo, porque los hongos entran fácilmente en el algodón.

La tasa de crecimiento de las plantas depende de la temperatura de incubación, la composición de los medios y la variedad de la planta. De allí que se requieran, para un almacenamiento a largo plazo, modificaciones de los medios y de la temperatura de incubación.

Tanto el Medio C como el Medio D ejercen un estrés osmótico y pueden ser utilizados para un almacenamiento a 25°C. El estrés reduce la tasa de crecimiento y produce entrenudos cortos. De ese modo se obtienen abundantes nudos para producir esquejes cuando se necesite propagar el material almacenado. Con un almacenamiento en estas condiciones, el material sólo necesita ser transferido una vez al año.

Sin embargo, al utilizar el Medio C, la temperatura puede ser bajada a 8°C, lo cual reduce significativamente la tasa de crecimiento de la plántula y, bajo estas condiciones, sólo se necesita una transferencia cada dos o tres años.

En las condiciones de almacenamiento mencionadas en los párrafos anteriores es posible mantener una colección de germoplasma. Cuando llega un pedido de exportación de un genotipo en particular, éste puede ser sacado del almacenamiento para efectuar la micropropagación.



## 5. EXPORTACION IN VITRO

El material de la colección de sanidad comprobada puede ser exportado a otros países como plántulas in vitro. De un material micropropagado se pueden obtener esquejes con un solo nudo, los cuales son transferidos a tubos de ensayo que contengan el Medio E. Cuando las plántulas tengan una altura de 2 cm y un sistema radicular bien desarrollado, los tubos con las plántulas (Figura 7) se embalan con cuidado para su envío por avión. El destinatario es informado por télex o cable sobre los números de vuelo y guía aérea para que el envío pueda ser liberado de la aduana. Adjunto a cada envío in vitro va una nota que explica el manejo que se le debe dar al material después de ser recibido, un certificado fitosanitario y una tarjeta, para llenar y devolver al CIP, con los detalles sobre el estado del material al llegar a su destino final.

Las plántulas in vitro que se reciben de esta manera, pueden ser transferidas a una mezcla de musgo y arena, en macetas, o continuar siendo micropropagadas.

Actualmente todos los envíos in vitro se hacen en la forma de plántulas de 2 cm de altura, pero se está investigando para complementar o reemplazar este método con la exportación de tubérculos in vitro (Figura 8). Estos son unos tubérculos muy pequeños, asépticos y de sanidad comprobada, que pueden ser inducidos en un medio de cultivo. Es mucho más cómodo transportarlos y su manejo por parte del país de destino es más fácil que en el caso de los tubos de ensayo.

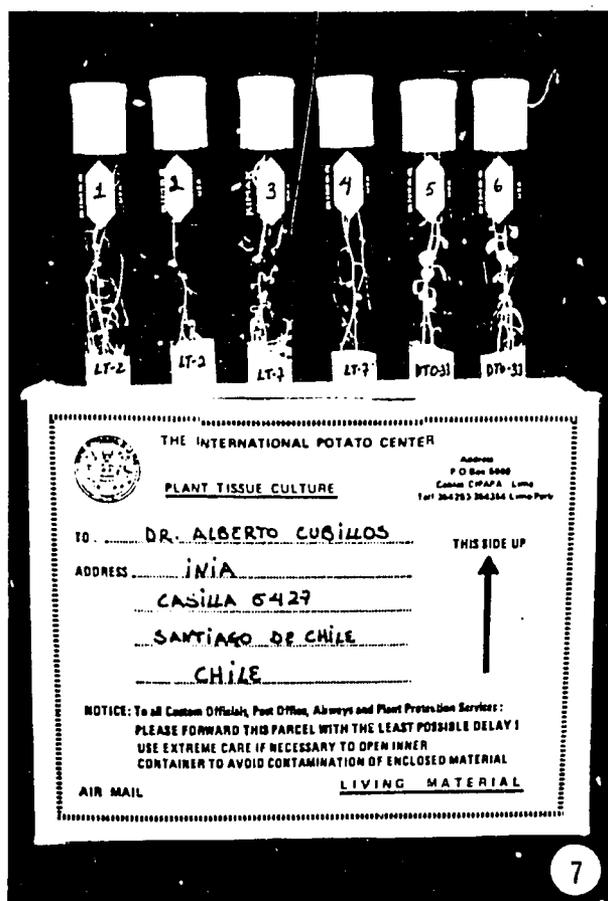


Figura 7. Caja de plántulas in vitro para exportación.

Figura 8. Muestra de tubérculos in vitro después del almacenamiento, que presenta brotes muy crecidos. El plato de petri mide 9 cm de diámetro y da una idea del tamaño promedio de los tubérculos.

## 6. MEDIOS DE CULTIVO

Todos los medios de cultivo utilizados para este trabajo están basados en las sales de Murashige y Skoog (1962). Las soluciones concentradas de estas sales son normalmente preparadas en cuatro partes:

- Sales
- $MgSO_4$
- Hierro
- Vitaminas.

Sales (solución concentrada 10 x); cada sal se prepara en un vaso con  $200\text{ cm}^3$  de agua destilada.

-	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	33	g		
-	KNO <sub>3</sub>	38	g		
-	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	8,8	g		
-	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,4	g		
-	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,124	g		
-	MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,446	g		
	(MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O)	0,338	g		
-	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,172	g		
	(ZnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O)	0,1228	g		
-	KI	0,0166	g		
-	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,005	g		
*	}	-	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,0005	g
*		-	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,0005	g

Total = 2 000 cm<sup>3</sup>

---

\* Preparar previamente una solución concentrada de la siguiente manera: pesar 5 mg de cada una de estas dos sales y disolverlos en 10 cm<sup>3</sup> de agua destilada y tomar 1 cm<sup>3</sup> = 0,0005 g.

MgSO<sub>4</sub> (solución concentrada 100 x)

- MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O                      3,7 g en 100 cm<sup>3</sup> de agua destilada

Hierro (100 cm<sup>3</sup> de solución concentrada)

- Na<sub>2</sub> EDTA                              0,745 g

- FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O                          0,557 g

El FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O se disuelve en 20 cm<sup>3</sup> de agua destilada; el Na<sub>2</sub> EDTA se disuelve en 20 cm<sup>3</sup> de agua destilada a medida que se calienta. Se mezclan el FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O y el Na<sub>2</sub> EDTA, se deja enfriar y se agrega agua hasta completar 100 cm<sup>3</sup>.

Vitaminas (100 ml de solución concentrada)

- Tiamina HCl                            40 mg en 100 cm<sup>3</sup> de agua destilada

Preparación de medios de cultivo. Se prepara un litro del medio básico MS (Murashige y Skoog) mezclando las soluciones concentradas, ya descritas en las siguientes proporciones:

Sales	100 cm <sup>3</sup>
MgSO <sub>4</sub>	10 cm <sup>3</sup>
Hierro	5 cm <sup>3</sup>
Vitaminas	1 cm <sup>3</sup>
Inositol	100 mg

Se agregan la sacarosa y las hormonas que correspondan (véase la sección siguiente.) Los medios, con o sin agar, se esterilizan en autoclave a 121°C, durante 15 minutos a una presión de 103,4 kP (15 libras por pulgada cuadrada).

Los ingredientes agregados al medio básico MS para la preparación de tipos específicos de medios son los siguientes:

Medio	Medios MS + los siguientes ingredientes		
A	0,25	ppm	Acido gibberélico
	2,0	ppm	Acido D-Pantoténico de calcio
	3,0	%	Sacarosa
	0,6	%	Agar
B	0,25	ppm	Acido gibberélico
	2,0	ppm	Acido D-Pantoténico de calcio
	3,0	%	Sacarosa
	0,8	%	Agar
C	4,0	%	Mannitol
	3,0	%	Sacarosa
	0,8	%	Agar
D	4,0	%	Mannitol
	0,5	%	Sacarosa
	0,8	%	Agar
E	0,25	ppm	Acido gibberélico
	2,0	ppm	Acido D-Pantoténico de calcio
	3,0	%	Sacarosa
	1,0	%	Agar
F	0,4	ppm	Acido gibberélico
	0,5	ppm	Bencilamino purina
	0,01	ppm	Acido naftalenacético
	2,0	ppm	Acido D-Pantoténico de calcio
	2,0	%	Sacarosa

## 7. REFERENCIAS

- Conger, B.V. Cloning agricultural plants via in vitro techniques. Boca Ratón (FL, USA), CRC Press Inc, 1981.
- Henshaw, G. Technical aspect of tissue culture storage for genetic conservation. In: Crop Genetic Resources for Today and Tomorrow. Ed. O.H. Frankel y J.G. Hawkes. Cambridge, Cambridge Univ. Press, 1975. 349-358.
- Hu, C.Y., y P.J. Wang. Meristem, shoot tip, and bud cultures. In: Handbook of plant cell culture I. Ed. D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato e Y. Yamada. Nueva York, MacMillan, 1983.
- Hussey, G. In vitro propagation of horticultural and agricultural crops. In: Plant Biotechnology. Ed. H. Smith. Cambridge, Cambridge Univ. Press, 1983. 111-138.
- Morel, G. Meristem culture techniques for the long-term storage of cultivated plants. In: Crop Genetic Resources for Today and Tomorrow. Ed. O.H. Frankel y J.G. Hawkes. Cambridge, Cambridge Univ. Press, 1975. 327-332.
- Morel, G., y G. Martin. Guérison de dahlias atteintes d'une maladie a virus. C. R. de l'Acad. Sc. Paris, 235:1324-1325. 1952.
- Murashige, T. Plant propagation through tissue culture. Ann. Rev. Plant Physiol. (EE.UU.) 25:135-166. 1974.
- Murashige, T., y F. Skoog. A revised medium for rapid growth and bioassays of tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. (EE.UU.) 15:473-497. 1962.
- Roca, W.M., J.E. Bryan y M.R. Roca. Tissue culture for the international transfer of potato genetic resources. Am. Pot. J., (EE.UU.) 56:1-11. 1979.
- Roca, W.M., N.O. Espinoza, M.R. Roca y J.E. Bryan. A tissue culture method for rapid propagation of potatoes. Am. Pot. J. (EE.UU.) 59:691-701. 1978.
- Schilde-Rentschler, L., N.O. Espinoza, R. Estrada y R. Lizárraga. In vitro storage and distribution of potato germplasm. Proc. 5th International Plant Tissue Culture Congress, Tokio. 781-782. 1982.
- Wilkins, C.P., y J.H. Dodds. The application of tissue culture techniques to plant genetic conservation. Sci. Prog. (Oxford) 68:281-307. 1982.
- Withers, L.A. Tissue culture for genetic conservation. Roma, International Board for Plant Genetic Resources, 1980. (Technical Report.)

M