

PN-ABC-982

78773

RESEARCH GUIDE
GUIA DE INVESTIGACION
GUIDE DE RECHERCHE

CIP

Guía de investigación CIP 38

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

1991

John H. Dodds, Ana Panta y James E. Bryan



INTERNATIONAL POTATO CENTER (CIP)
CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA (CIP)
CENTRE INTERNATIONAL DE LA POMME DE TERRE (CIP)

Guía de Investigación CIP 38

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

1991

John H. Dodds, Ana Panta y James E. Bryan

CIP
Apartado 5969
Lima, Perú

Ubicación
Av. La Universidad s/n
La Molina, Lima

Fax 351570
Tel. 366920
Télex 25672 PE

Guías de Investigación CIP (CRGs)

Describen tecnologías que han sido desarrolladas y utilizadas por el CIP y los Programas Nacionales a fin de promover la investigación y el intercambio de información entre científicos. Estos son actualizados regularmente de acuerdo al avance científico.

Dodds, J. H.; Panta, A.; Bryan, J. E. 1991. Transporte, recepción y propagación de plántulas de batata *in vitro*. Guía de Investigación CIP 38. Centro Internacional de la Papa, Lima, Perú. 17 pp.

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

- 1 Transporte de plántulas de batata propagadas *in vitro***
- 2 Transferencia a un substrato de siembra**
- 3 Micropropagación**
- 4 Medio de Murashige-Skoog (modificado)**
- 5 Medio para micropropagación de batata**
- 6 Bibliografía**

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 documento 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 BATATA 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).

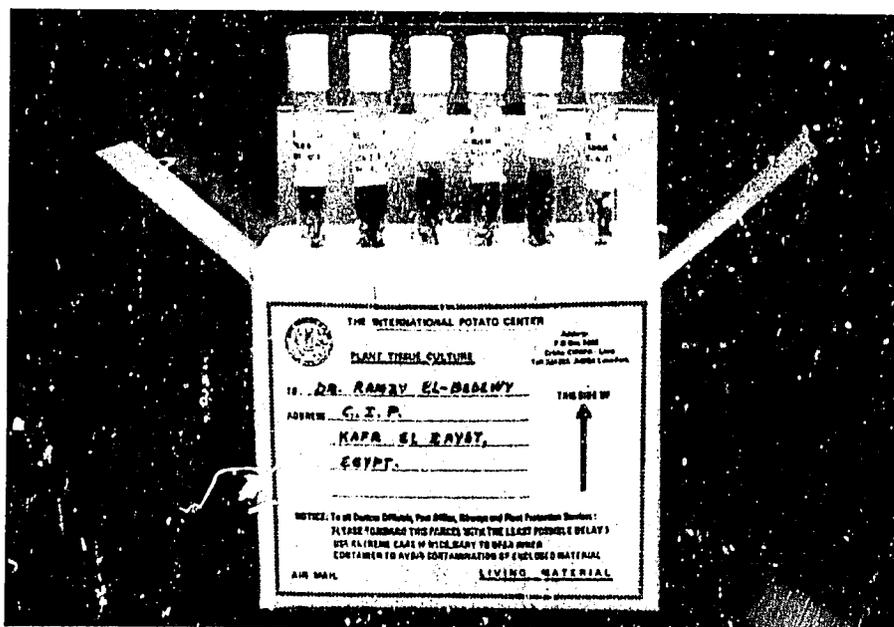


Figura 1

Los tubos de ensayo llevan tapas plásticas y van 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 esto 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 recepcionarlas.** 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:

- transferencia a un substrato de siembra (Sección 2),
- micropropagación (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 de 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.
- 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).

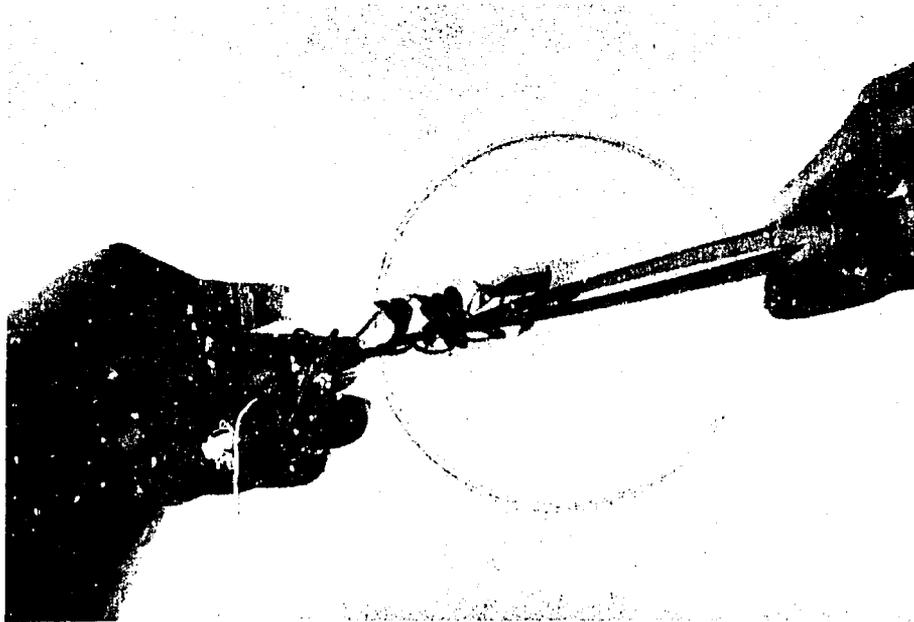


Figura 2

- 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 Siembre cada planta 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.
- 2.14 Coloque la planta dentro de una cámara húmeda durante 48 horas. Retirar la cámara húmeda y esperar hasta que las raíces se establezcan, lo cual tomará cerca de 10 días.

-
- 2.15 Mantenga las macetas en un lugar limpio, de 25 a 27°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, transfíralas 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 cm³ por cada maceta de 20 cm de diámetro. Nuevamente, recuerde que no debe regar en exceso.

3 MICROPROPAGACION

3.1 Materiales y equipo

- Medio de cultivo
(ver la Sección 4 y 5)
- 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 5.

3.3 Vierta 4 cm³ 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 a 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).

3.6 Coloque cada nudo en un tubo de ensayo. Asegúrese que cada nudo repose sobre la superficie del agar, con la yema axilar hacia arriba (Figura 5). Ponga 1 ó 2 nudos por tubo.

3.7 Tape los tubos de prueba y séllelos con parafilm, márquelos y colóquelos en un área limpia donde la temperatura ambiental sea de 25 a 27°C. Dé una iluminación de 45 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{seg}^2$ ó 3,000 lux durante 14-16 horas al día.

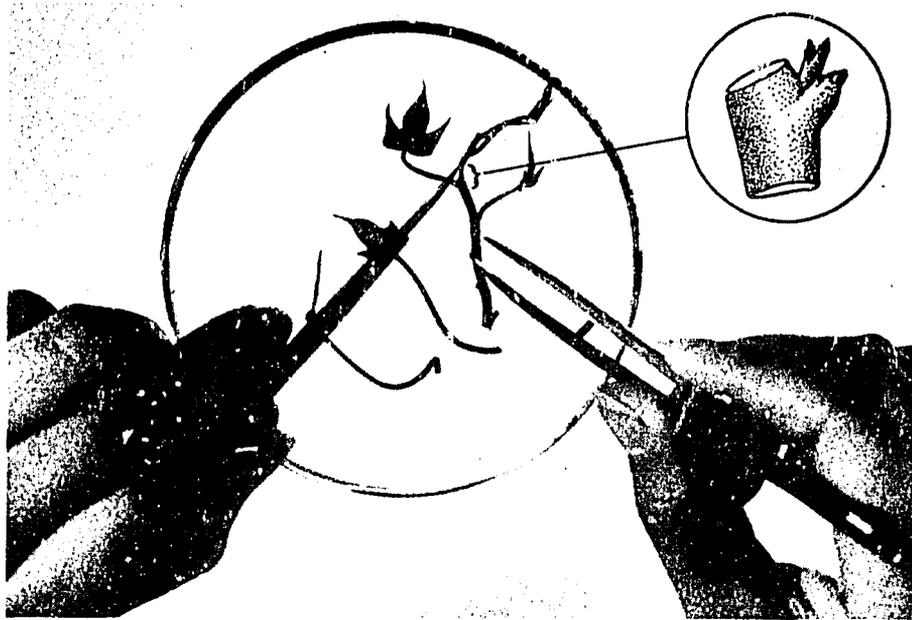


Figura 4

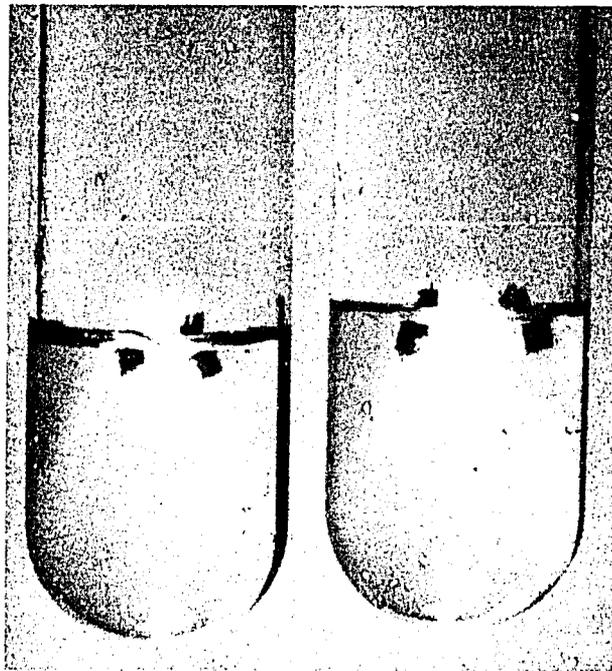


Figura 5

-
- 3.8 La yema axilar 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).

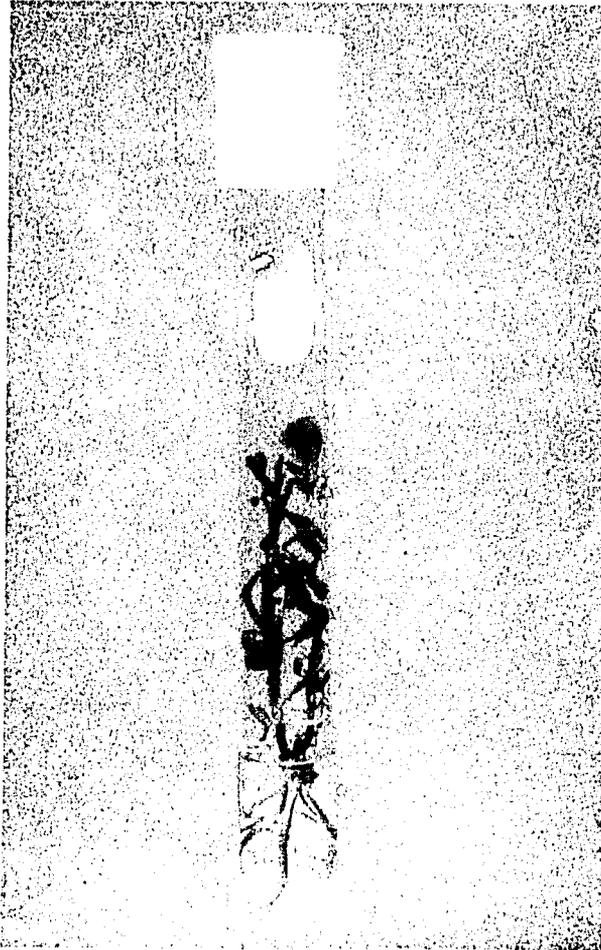


Figura 6

4 MEDIO DE MURASHIGE-SKOOG (MODIFICADO)

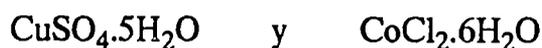
Prepare las soluciones concentradas en cuatro partes por separado:

- 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	35,0 g
- KNO_3	40,0 g
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	9,0 g
- KH_2PO_4	3,5 g
- H_3BO_3	0,1 g
- $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,5 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
$(\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O})$	0,1 g)
- KI	0,02 g
- $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	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:



Ahora mezcle conjuntamente las 10 soluciones individuales de sales para hacer $2\,000 \text{ cm}^3$ de la solución concentrada de sales.

Solución concentrada de $MgSO_4$

- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 3,7 g en 100 cm^3
de agua destilada

Solución concentrada de hierro

- Na_2EDTA 0,75 g
- $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,55 g

Disuelva el $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 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

- Tiamina HCl 40 mg en 100 cm^3
de agua destilada

Preparación del medio. Prepare un litro del 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
- Hierro 5 cm^3
- Vitaminas 1 cm^3
- Inositol 100 mg
- Acido giberélico 0,25 ppm
- Acido pantoténico cálcico 2,0 ppm
- Sacarosa 3,0 %
- Agar 0,8 %

Ponga este medio en el autoclave durante 15 minutos.

5 MEDIO PARA MICROPROPAGACION DE BATATA

El medio de cultivo utilizado para este trabajo está basado en las sales de Murashige-Skoog (1962). Preparar 1 litro del medio de Murashige-Skoog (Sección 4) con los siguientes nutrientes:

- Pantotenato de calcio	2 ppm
- Acido giberélico	20 ppm
- Acido ascórbico	100 ppm
- Nitrato de calcio	100 ppm
- Putrescina HCl	20 ppm
- L-Arginina	100 ppm
- Agua de coco	1%
- Sacarosa	5%
- Agar o	0,7%
Phytigel/Gelrite	0,25%

Ponga este medio en el autoclave durante 15 minutos.

7 BIBLIOGRAFIA

- CONGER, B. V. 1981. Cloning agricultural plants via *in vitro* techniques. CRC Press, Boca Ratón, USA.
- ESPINOZA, N.; ESTRADA, R.; TOVAR, P.; BRYAN, J.; DODDS, J. H. 1984. Tissue culture micropropagation, conservation, and export of potato germplasm. Specialized Technology Document 1. International Potato Center, Lima, Peru. 20 pp.
- HENSHAW, G. 1975. Technical aspect of tissue culture storage for genetic conservation. *In* Frankel, O.H., Hawkes, J.G. (eds.). Crop Genetic Resources for Today and Tomorrow. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 349-358.
- HU, C. Y.; WANG, P. J. 1983. Meristem, shoot tip, and bud cultures. *In* Evans, D.A.; Sharp, W.R.; Ammirato, P.V.; Yamada, Y. (eds.). Handbook of plant cell culture I. MacMillan, New York. pp. 177-227.
- HUSSEY, G. 1983. *In vitro* propagation of horticultural and agricultural crops. *In* Smith, H. (ed.). Plant Biotechnology. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 111-138.
- MOREL, G. 1975. Meristem culture techniques for the long-term storage of cultivated plants. *In* Frankel, O.H.; Hawkes, J.G. (eds.). Crops Genetic Resources for Today and Tomorrow. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 327-332.
- MOREL, G.; MARTIN, G. 1952. Guérison de dahlias atteintes d'une maladie 'a virus. *Comp Renel* 235:1324-1325.
- MURASHIGE, T. 1974. Plant propagation through tissue culture. *Annual Reviews Plant Physiology* 25:135-166.

-
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and biossays of tobacco tissue cultures. *Physiological Plantarum* 15:473-497.
- ROCA, W. M.; BRYAN, J. E.; ROCA, M. R. 1979. Tissue culture for the international transfer of potato genetic resources. *Amer. Potato J.* 56:1-11.
- ROCA, W. M.; ESPINOZA, N. O.; ROCA, M. R.; BRYAN, J. F. 1978. A tissue culture method for rapid propagation of potatoes. *Amer. Potato J.* 59:691-701.
- SCHILDE-RENTSCHLER, L.; ESPINOZA, N. O.; ESTRADA, R.; LIZARRAGA, R. 1982. In vitro storage and distribution of potato germplasm. *Proc. 5th International Plant Tissue Culture Congress, Tokio.* pp. 781-782.
- WILKINS, C. P.; DODDS, J. H. 1982. The application of tissue culture techniques to plant genetic conservation. *Science Progress* 68:281-307.
- WITHERS, L. A. 1980. Tissue culture storage for genetic conservation. Technical Report. IBPGR, Rome. 22 pp.