PN-ABJ-701
J-227

RESEARCH GUIDE
GUIA DE INVESTIGACION
GUIDE DE RECHERCHE

CIP

Guía de Investigación CIP 32

CULTIVO DE TEJIDOS DE *Ipomoea batatas:* MICROPROPAGACION Y CONSERVACION

1990

Rolando Lizárraga, Ana Panta,
Nelson Espinoza, John H. Dodds

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

Guía de Investigación CIP 32

CULTIVO DE TEJIDOS DE IPOMOEA BATATAS: MICROPROPAGACION Y CONSERVACION

1990

Rolando Lizárraga, Ana Panta, Nelson Espinoza, John H. Dodds

CIP
Apartado 5969
Lima, Perú

Ubicación:
Av. La Universidad s/n
La Molina - Lima

Fax 351570
Tel. 366920
Telex 25672 PE

Guías de Investigación CIP (CRGs)

Las Guías de Investigación CIP (CRGs) describen tecnologías desarrolladas y utilizadas por el CIP y los Programas Nacionales con el fin de promover la investigación y el intercambio de información entre científicos. Las CRGs son actualizadas regularmente de acuerdo al avance científico.

Lizárraga, R.; Panta, A.; Espinoza, N.; Dodds, J. H. 1990. Cultivo de tejidos de Ipomoea batatas: Micropropagación y conservación. Guía de Investigación CIP 32. Centro Internacional de la Papa, Lima, Perú. 22 pp.

Guía de Información CIP 32

CULTIVO DE TEJIDOS DE IPOMOEA BATATAS: MICROPROPAGACION Y CONSERVACION

1 Ventajas de la técnica de cultivo de tejidos
2 Introducción de material in vivo a in vitro
3 Aislamiento de meristemas
4 Micropropagación
5 Conservación a largo plazo
6 Medios de cultivo
7 Referencias

El cultivo de tejidos permite la propagación clonal rápida de un gran número de plántulas en un período breve y la conservación de germoplasma, bajo condiciones controladas, en espacios pequeños y con poca mano de obra.

En este documento se describen las ventajas, las metodologías y los materiales usados en 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 y el almacenamiento a largo plazo.

La batata (Ipomoea batatas (L.) Lam.) está considerada en el sétimo puesto en las estadísticas de FAO (1978) como cultivo alimenticio en el mundo.

1 VENTAJAS DE LA TECNICA DE CULTIVO DE TEJIDOS

El CIP mantiene una colección de germoplasma de batata de más de 5000 entradas. Su mantenimiento clonal en el campo es muy costoso y además existe un riesgo de pérdida por enfermedades infecciosas o condiciones climáticas desfavorables. Por eso, su mantenimiento in vitro ofrece las siguientes ventajas:

- menores costos de mano de obra,
- ausencia de infecciones de campo,
- protección contra condiciones ambientales desfavorables,
- acceso oportuno al material en conservación,
- acceso oportuno al material para eliminación de patógenos,
- disponibilidad permanente de material para propagación y exportación (cuando está libre de patógenos).

En el CIP hasta la fecha, se mantienen in vitro 2 800 entradas de la colección de germoplasma de batata.

La especie I. batatas (L.) Lam. es conocida en diversas partes del mundo con diferentes nombres comunes, tales como batata, batata doce, boniato, camote, cumar y sweet potato.

En el presente texto, al nominar a I. batatas, se utilizará el término de batata.

2 INTRODUCCION DE MATERIAL IN VIVO A IN VITRO

La planta madre in vivo debe ser proveniente de invernadero, tener entre uno a dos meses de edad, poseer óptimas condiciones de sanidad, y no tener yemas laterales muy brotadas (en todo caso no deben ser incluídas). En la planta madre se cortan los tallos y se eliminan las hojas dejando un pedazo de pecíolo cubriendo las yemas; los tallos se cortan en segmentos, de 2 a 3 cm de longitud, cada uno con una yema axilar y una porción de entrenudo detrás de la yema, para manipularla fácilmente. Antes de enviarlos al laboratorio in vitro, estos segmentos de tallo son tratados con un acaricida de amplio espectro (que destruya los diferentes estadios de desarrollo de los ácaros) como Morestan-Bayer (Chinometonat) al 0,5 %, durante 10 minutos. Luego, se elimina el acaricida lavando los segmentos de tallo con agua corriente y depositándolos en un envase limpio que se tapa con un plato de petri hasta que se empiece el proceso de desinfección superficial.

Para la desinfección superficial de los segmentos de tallo se elimina el agua corriente del vaso, se agrega alcohol de 96% y se les deja en él por dos segundos; se elimina el alcohol y se agrega inmediatamente una solución de hipoclorito de calcio de 2,5 % (llevado a pH 8 con HCl). También se puede utilizar hipoclorito de sodio o lejía. De ser posible, agregar unas gotas de un agente dispersante-adherente como Tween 20 ó 80 (4 gotas/L de solución). Se lleva el vaso a la cámara de transferencia de flujo laminar, donde después de 15 minutos, bajo condiciones asépticas, se elimina el hipoclorito y se lava tres veces con agua estéril; después del último lavado, para aminorar la fenolización de los explantes, se dejan éstos sumergidos en solución estéril de ácido ascórbico 100 ppm hasta el momento de la escisión.

En estas condiciones se procede a realizar la escisión de yemas eliminando el mayor número de hojuelas y primordios foliares, de tal manera que las porciones escindidas sean lo más pequeñas posibles.

Se considera 0,6 mm un tamaño óptimo, pero el tamaño del explante puede ser mayor si no se cuenta con facilidades para la excisión (por ejemplo: microscopio estereoscópico).

Las yemas son sembradas en el medio de cultivo MMB-I y se mantienen en ella por un período de 15 días. Luego, se transfieren al medio MMB-II, donde se desarrollan como plántulas en un período que varía entre 30 y 60 días. Al cabo de este tiempo, se puede propagar por nudos individuales en el medio MPB.

Para la primera etapa de propagación se utilizan tubos de 16 x 125 mm y para la segunda, tubos de 18 x 150 ó 25 x 150 mm.

Debido a que en estos casos se usan porciones meristemáticas mayores de 0,6 mm, es probable que en algún material se presente contaminación con bacterias saprófitas principalmente. Dado el caso se puede proceder de dos maneras:

1 Si se tiene un microscopio estereoscópico, proceder a escindir meristemas entre 0,4 mm a 0,6 mm y a sembrarlos en el medio de introducción (MMB-I), haciendo transferencias semanales al medio MMB-II.

2 Se puede tratar de erradicar las bacterias o levaduras mediante el uso de antibióticos que se pueden incorporar al medio. En caso de bacterias se recomienda usar Rifampicina (Rimactán 300 CIBA) a una concentración de 40 ppm.

La Rifampicina en solución concentrada (12 000 ppm) y esterilizada por filtración, se coloca en pequeños cuadrados de papel filtro estéril (5 x 5 mm), los cuales se dejan secar en la cámara de flujo laminar; se colocan aproximadamenate 0,03cm^3 de solución concentrada por cada cuadrado de papel.

Se recomienda no utilizarlos después de siete días de haberlos preparado, ya que pierden progresivamene su eficacia.

Este trabajo debe realizarse bajo condiciones de asepsia. Los cuadrados de papel son introducidos en el medio de cultivo junto a la yema sembrada, y ésta debe ser transferida a medio fresco con otro papel-antibiótico cada 3 a 5 días. También se pueden usar otros antibióticos como Cefoxitina (Mefoxin Merck) en dosis de 500 ppm.

En el caso de que la contaminación sea por levaduras, se recomienda usar Amphotericin B en dosis de 0,25 ppm a 0,5 ppm, siguiendo en todos los casos el mismo sistema del papel de filtro.

3 AISLAMIENTO Y CULTIVO DE MERISTEMAS

El meristema es un tejido compuesto por células en división y constituye el punto activo de crecimiento de las yemas. El domo de la yema contiene las células meristemáticas y está rodeada por primordios foliares y hojas primarias. Las células del meristema se dividen y forman los nuevos tejidos. La nutrición de la sección disectada es proporcionada por el medio artificial.

El aislamiento de la zona meristemática en condiciones asépticas y su cultivo en un medio nutritivo adecuado permite el desarrollo de plántulas, siguiendo un patrón de diferenciación similar al del que presenta una planta normal.

La disección aséptica del meristema es un proceso delicado que exige práctica y se realiza principalmente con el objeto de erradicar virus. La secuencia de la disección se muestra fotográficamente (Figura 1) y es llevada a cabo como sigue:

Se cortan los tallos de la planta en segmentos conteniendo cada uno un nudo con su yema axilar, este material se desinfecta con Morestan (Bayer) e hipoclorito de sodio, de igual forma como se realiza para la introducción de material "in vitro" (ver pág. 5).

Después de enjuagar el material con agua destilada estéril, bajo un microscopio de disección y con la ayuda de una aguja ó estilete, se eliminan las hojas que rodean el punto de crecimiento hasta que quede sólamente la cúpula de la yema y dos o tres primordios foliares.

La cúpula con los primordios foliares son disectados con un bisturí y transferidos al medio de cultivo MMB-I. El meristema disectado es transferido semanalmente a medio fresco MMB-II, en este medio al cabo de 6 a 8 semanas el meristema se diferencia en plántula. Estas plántulas son subcultivadas en el medio de propagación (ver sección 6: Medios de cultivo).

Termoterapia: En el CIP, previamente a la escisión de meristemas, las plantas se someten durante un mes a termoterapia de 38°C por dieciseis horas y 32°C por ocho horas bajo luz constante. Este tratamiento a alta temperatura ha aumentado la eficiencia en el proceso de producción de material libre de virus.

Después de la termoterapia, para la escisión de meristemas, se puede utilizar indistintamente yemas axilares o apicales.

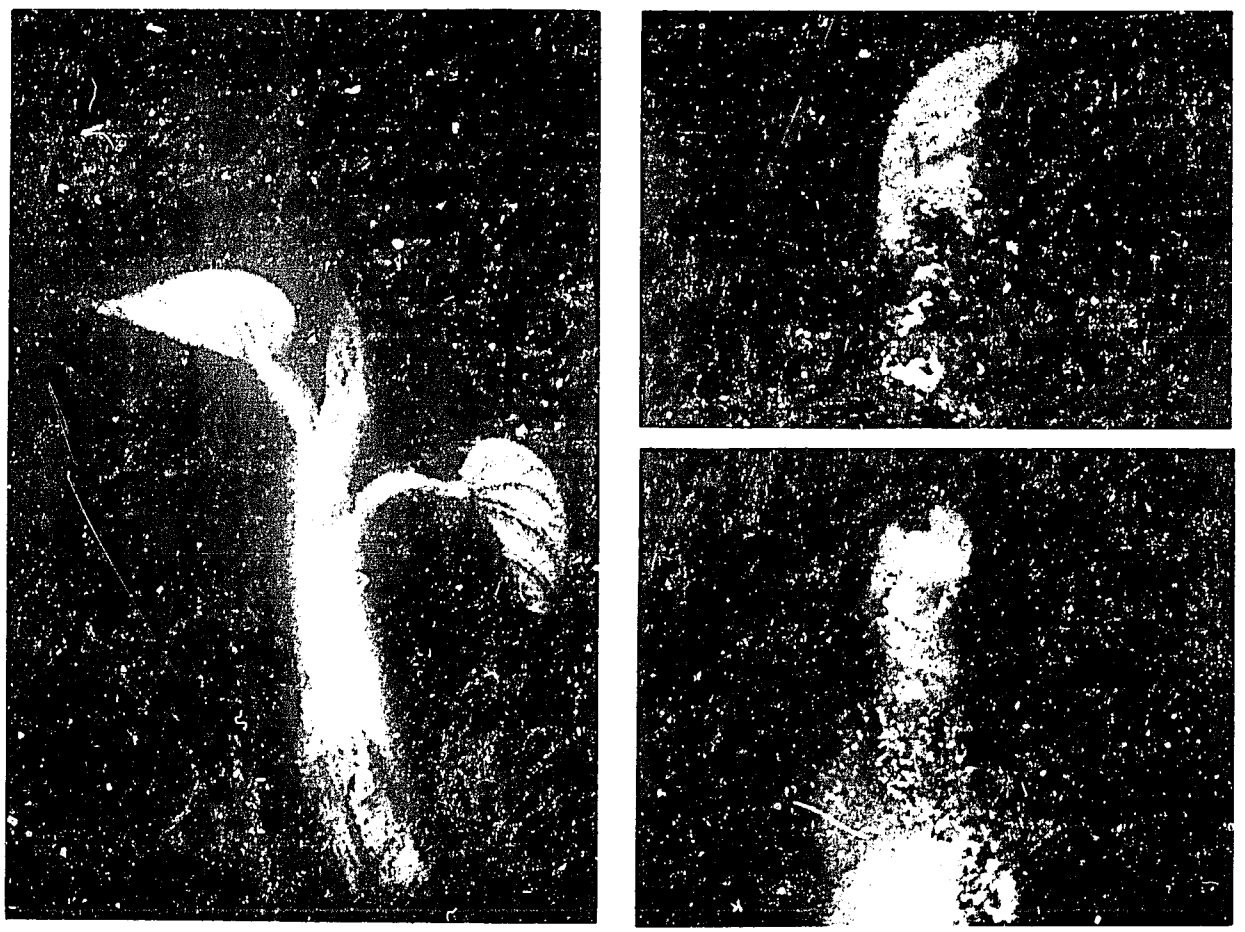

Figura 1. Secuencia fotográfica de la disección meristemática:

A: Yema apical aislada y desinfestada.

B: Estado de la disección donde las hojas primarias han sido extraídas.

C: Meristema con dos primordios foliares.

4 MICROPROPAGACION

El objetivo de la micropropagación es obtener un gran número de plantas clonales en un período corto. En el CIP se siguen los siguientes métodos:

Propagación por nudos. Se basa en que el nudo de una plántula in vitro colocado en un medio de cultivo apropiado induce el desarrollo de la yema axilar del nudo obteniéndose como resultado una nueva plántula in vitro. Es importante notar que este tipo de propagación se basa en el desarrollo de la yema axilar que es una estructura morfológica ya existente. La condición nutricional-hormonal del medio simplemente juega un papel en la ruptura del reposo de la yema axilar y promueve su rápido desarrollo. Se usa el medio de propagación descrito en la sección 6.

Es importante tener mucho cuidado de no permitir la formación de callos y regeneración de plántulas, porque esto tiende a afectar la estabilidad genética del genotipo.

Las plántulas se desarrollan bajo condiciones de días largos (16 horas de luz a 45 $uE/m^2/seg^2$ ó 3000 lux) y con temperaturas de 25 ^oC a 28 ^oC. Bajo estas condiciones los niveles de micropropagación son rápidos y cada nudo se desarrollará como una plántula que logra alcanzar todo el largo del tubo de prueba y está lista para el subcultivo después de seis semanas. (Figuras 2 y 3)

Figura 2
Plántula en desarrollo a partir
de un nudo

Figura 3
Secuencia del desarrollo "in-vitro"

Las plántulas in vitro de batata producidas en esta forma son fácilmente transferidas a condiciones in vivo, ya sea a pequeñas macetas o directamente a camas en el campo. (Figura 4)

Propagación por segmentos de tallo en medio líquido. De igual manera que con la papa, es posible micropropagar batata en envases o frascos por medio de cultivo líquido (Figura 5). Para ello, se preparan segmentos de tallo que tengan 5 a 8 nudos y se remueven tanto el ápice como las raíces de la plántula por propagar. Estos segmentos son sembrados en un medio líquido que contiene ácido gibberélico para romper el reposo de todas la yemas axilares a lo largo del segmento de tallo. Los nudos brotan y entre 3 a 4 semanas se desarrollan en nuevas plántulas que pueden ser usadas como material inicial para la propagación por nudos simples o, nuevamente, por medio de segmentos de tallo en medio líquido, dependiendo de las necesidades del programa. Someter los cultivos a agitación puede acelerar y favorecer el desarrollo de las nuevas plántulas, aunque esto no es imprescindible.

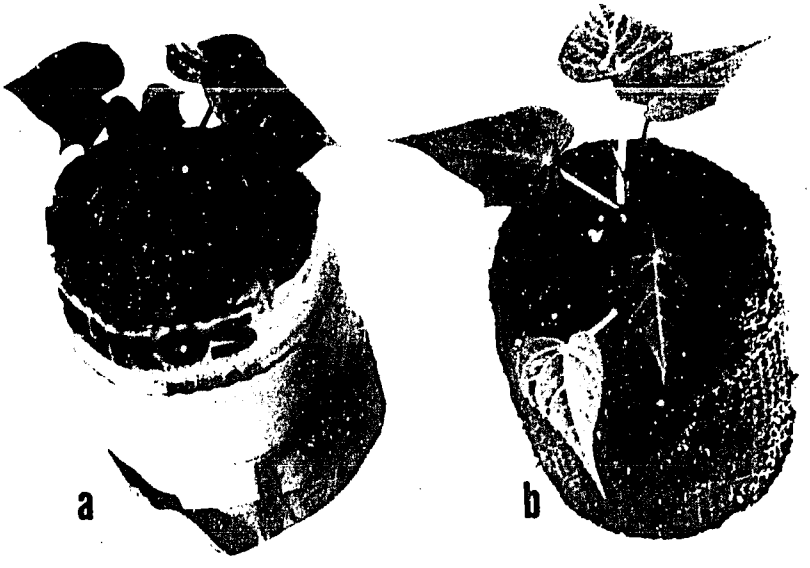

Figura 4 Plántula después de haber sido transferida a compost:

a. compost en envase de fabricación casera (papel periódico)

b. compost en envase de fabricación comercial (jiffy 7)

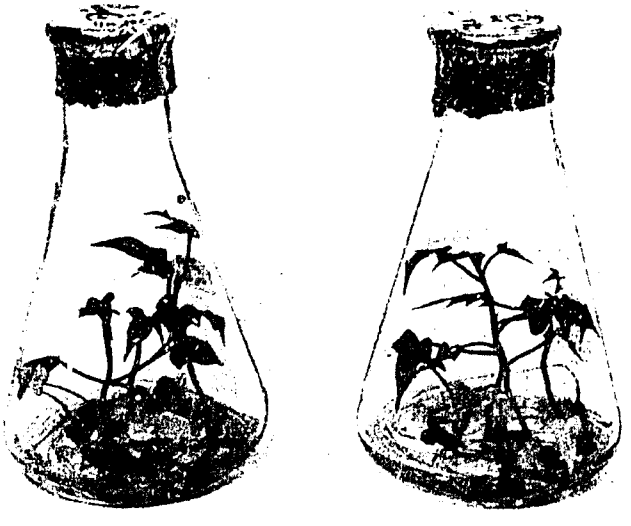

Figura 5 Cultivo en medio líquido para propagación rápida.

5 CONSERVACION A LARGO PLAZO

La conservación a largo plazo es doblemente importante, para la propagación y para la conservación. En un cultivo propagado clonalmente es importante que cada propágulo no sufra alteraciones genéticas, no importa que éstas sean pequeñas, ya que se pueden acumular en el cultivo de una generación a la otra y pueden originar cambios mayores que afectarían la uniformidad y la producción.

En el caso de conservación de clones de germoplasma, es vital hacer un análisis detallado de la estabilidad genética del cultivo. El almacenamiento clonal de germoplasma incluye el mantenimiento de combinaciones específicas de genes (genotipos). Si una plántula sale de almacenamiento con una combinación genética diferente, la validez del método de almacenamiento debe ser cuestionada. La habilidad para detectar cambios genéticos durante la propagación y el mantenimiento dependen de los métodos usados para ello.

En muchas colecciones de germoplasma se evalúan los genotipos almacenados rutinariamente en base a las características morfológicas de las plántulas cuando éstas crecen bajo condiciones controladas. Si las plantas muestran caracteres morfológicos diferentes, por ejemplo, la forma de hoja, el color de las raíces reservantes, etc, es evidente que algún cambio genético ha ocurrido. Sin embargo, un cambio en un gen, como por ejemplo, de resistencia a virus, no podría ser detectado por observación de cambios morfológicos.

Se están usando métodos bioquímicos, tanto en papa como en batata, para estudiar la estabilidad genética. Estos son los análisis de patrones de proteínas solubles e isoenzimas. A pesar de que éstos son métodos altamente efectivos para determinar la variación en productos de genes, no se logra determinar con ellos directamente, cambios en los genes.

Nuevos métodos, como el análisis del polimorfismo por fragmentos de restricción (RFLP) están siendo usados como vías más sensitivas para determinar cambios genéticos. Es importante que los bancos de germoplasma y programas de semillas usen los métodos de mayor sensibilidad para determinar la fidelidad genética de sus sistemas de propagación y almacenamiento.

Medios restrictivos del crecimiento. En muchos años de investigación, se ha logrado el desarrollo de medios de propagación para batata para optimizar el crecimiento rápido in vitro. Pero en el caso de la conservación, el objetivo es limitar el crecimiento a un mínimo, manteniendo la viabilidad de los cultivos. Por este medio es posible maximizar el tiempo entre transferencias (subcultivos) de las plántulas in vitro. En el CIP, por ejemplo, las transferencias del material de batata en conservación se realizan una vez cada año para la mayoría de clones y en algunos casos solo una vez cada año y medio.

Los experimentos que se realizan en laboratorio, tendientes a limitar el crecimiento in vitro de la batata, se basan en el uso de retardantes hormonales del crecimiento, por ejemplo, el ABA (ácido abscísico), inhibidores del crecimiento como el B995, el CCC (cloruro de clorocolina), o reguladores osmóticos, con la adición de azúcares poco asimilables, tales como el manitol o el sorbitol.

La dificultad en este tipo de estudios es que diferentes genotipos van a reaccionar en forma distinta bajo estas condiciones. Cuando una colección de germoplasma tiene que ser mantenida in vitro, el objetivo de los estudios debe de ser el desarrollo de un medio de conservación suficientemente amplio para aplicarlo a un gran número de genotipos.

El medio de almacenamiento no debe permitir la inducción de callos pues éstos pueden producir alteraciones genéticas.

Muchos medios de almacenamiento han sido reportados para batata. En el CIP actualmente, se está usando el medio descrito en el Apéndice 6.

Restrición de temperatura para almacenamiento. El grado de crecimiento de plántulas in vitro puede ser restringido reduciendo la temperatura de incubación. Una temperatura adecuada para lograr un buen crecimiento in vitro de la batata está entre 28°C y 30°C; si la temperatura es de 8°C, el tiempo de supervivencia es menos de un mes. Para los genotipos estudiados hasta la fecha la temperatura óptima sería de 15°C, pero ésto necesita confirmación.

Como en el caso de otros cultivos mantenidos in vitro, por ejemplo yuca, papa, etc., es posible aplicar tanto la temperatura más baja como los retardantes de crecimiento al mismo tiempo. El uso de estrés osmótico y baja temperatura (15°C) es por ahora la mejor y menos costosa forma de mantener una colección de germoplasma de batata.

6 MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo utilizados para este trabajo están basados en las sales de Murashige-Skoog (1962) y en las de Gamborg B-5 (1968).

Medio para introducción in vitro (MMB-I).

-	Pantotenato de calcio	2	ppm
-	Acido gibberélico	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 ó	0,7	%
-	Phytagel/Gelrite	0,25	%

Medio para transferencia de meristemas o yemas (MMB-II).

-	Pantotenato de calcio	2	ppm
-	Acido gibberélico	15	ppm
-	Acido ascórbico	100	ppm
-	Nitrato de calcio	100	ppm
-	Putrescina HCl	20	ppm
-	L-Arginina	100	ppm
-	Sacarosa	5	%
-	Agar ó	0,7	%
-	Phytagel/Gelrite	0,25	%

Medio de propagación (MPB).

-	Pantotenato de calcio	2	ppm
-	Acido gibberélico	10	ppm
-	L-Arginina	100	ppm
-	Acido ascórbico	200	ppm
-	Putrescina HCl	20	ppm
-	Sacarosa	3	%
-	Agar ó	0,8	%
-	Phytagel/Gelrite	0,3	%

Medio para conservación (MCB).

-	Glucosa	2	%
-	Sorbitol	2	%
-	Putrescina HCl	20	ppm
-	Phytagel/Gelrite	0,4	%

Para todos los medios de cultivo se usa el pH = 5,8

Nota: Estos medios de cultivo se han elaborado para lograr un desarrollo uniforme para una colección de germoplasma con un gran número de variedades.

Si se trabaja con pocas variedades, es recomendable utilizar medios de cultivo simples, como las sales de Murashige y Skoog más ácido gibberélico y sacarosa sólamente.

7 REFERENCIAS

Alconero, R.; Santiago, A.C.; Morales, F.; Rodríguez F. 1975. Meristem tip culture and virus indexing of sweet potatoes. Phytopathology. 65: 769-772.

Folquer, F. 1978. La Batata (camote). Estudio de la planta y su producción comercial. Editorial Hemisferio Sur S.A., Buenos Aires. 145 p.

Frison, E.A. 1981. Tissue Culture: A tool for improvement and internanational exchange of tropical root and tuber crops. International Institute of Tropical Agriculture Research Briefs. Vol. 2, No. 1. 22 p.

Frison, E.A.; Ng, S.Y. 1981. Tissue culture and the distribution of disease-free sweet potato material. Annual Report. International Institute of Tropical Agriculture, Nigeria. 74 - 75 p.

Gamborg, O.L.; Miller, R.A.; Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research. 50: 151-158.

Henderson, J.H.M.; Phills, B.R.; Whatley, B.T. 1984. Sweet potato. 302-326. In: Sharp, W.; Evans, D.A.; Ammirato, P. V.; Yamada, Y. (eds.). Handbook of plant cell culture. Macmillan Publishing Company, New York. 644 p.

Kuo, G. 1985. Handling of sweet potato germplasm. Asian Vegetable Research and Developement Center. AVRDC 85-234. 2 p.

Kuo, G.; Lin, S.; Green, S. 1985. Sweet potato germplasm for international cooperations. International Cooperator's Guide. Asian Vegetables Research and Development Center. AVRDC 85-238. 3 p.

Kuo, C.G.; Shen, B.J.; Shen, M.J.; Green, S.K.; Lee, D.R. 1985. Virus-free sweet potato storage roots derived from meristem tips and OOaf cuttings. Scientia Horticulturae. 26: 231-240.

Litz, R.E.; Conover, R.A. 1978. In vitro propagation of sweet potato. HortScience. 13 (6): 659-660.

Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioessays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum. 15: 473-497.

Ng, S.Y.C. 1985. Recomendations for handling tissue culture materials (sweet potato, yam and cassava). Manual Series No. 6. International Institute of Tropical Agriculture, Ibadan, Nigeria. 13 p.

Scowcroft, W.R. 1984. Genetic variability in tissue culture: Impact on germplasm conservation and utilization. AGPGIBPGR/84/152. International Board for Plant Genetic Resources. Rome. 41 p.

Templeton-Somers, K.M.; Collins, W.W. 1986. Field performance and clonal variability in sweet potato propagated in vitro. Journal of the American Society for Horticultural Sciences. 111 (5): 689-694.

Wilkins, C.P.; Dodds, J.H. 1983. The application of tissue culture techniques to plant genetic conservation. Science Program, Oxford. 68: 281-307.

Centro Internacional de la Papa

Procesamiento de Texto: Departamento de Capacitación

Edición e Impresión: Departamento de Ciencias de la Información, 1990

Tirada: 300 copias XVIII-TR-E-13-0-300