

El cultivo *in vitro*: Otra manera de propagar la yuca



Roosevelt H. Escobar, Elizabeth Caicedo, Liliana Muñoz, Auradela Ríos,
Álvaro Azcárate, Carlos Dorado y Joe Tohme

El Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) —miembro del Consorcio CGIAR— desarrolla tecnologías, métodos innovadores y nuevos conocimientos que contribuyen a que los agricultores, en especial los de escasos recursos, logren una agricultura eco-eficiente —es decir, competitiva y rentable así como sostenible y resiliente. La agricultura eco-eficiente reduce el hambre y la pobreza, mejora la nutrición humana y brinda soluciones ante la degradación ambiental y el cambio climático en los trópicos. Con su sede principal cerca a Cali, Colombia, el CIAT realiza investigación orientada al desarrollo en las regiones tropicales de América Latina, África y Asia. www.ciat.cgiar.org

CGIAR es una alianza mundial de investigación que procura lograr una mayor seguridad alimentaria. Su labor científica la llevan a cabo los 15 centros de investigación que conforman el Consorcio CGIAR, en colaboración con cientos de organizaciones socias. www.cgiar.org

El cultivo *in vitro*: Otra manera de propagar la yuca

Roosevelt H. Escobar*, Elizabeth Caicedo, Liliana Muñoz, Auradela Ríos,
Álvaro Azcárate, Carlos Dorado y Joe Tohme



*Correspondencia :
Área de Investigación en Agrobiodiversidad
Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT)
Km 17, Recta Cali–Palmira
A.A. 6713, Cali, Colombia
r.escobar@cjar.org

Centro Internacional de Agricultura Tropical
International Center for Tropical Agriculture
Apartado Aéreo 6713
Cali, Colombia
Tel.: 57 2 4450000
Fax: 57 2 4450073
Correo electrónico: r.escobar@cgiar.org
Sitio web: www.ciat.cgiar.org

Publicación CIAT No. 376
ISBN 978-958-694-111-2 (PDF)
Mayo de 2012

El cultivo *in vitro*: Otra manera de propagar la yuca / Roosevelt H. Escobar, Elizabeth Caicedo, Liliana Muñoz, Auradela Ríos, Álvaro Azcárate, Carlos Dorado y Joe Tohme -- Cali, CO : Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Área de Investigación en Agrobiodiversidad, 2012. X, 52 p. -- (Publicación CIAT no. 376)
ISBN 978-958-694-111-2 (PDF)

Descriptores AGROVOC en español:

1. *Manihot esculenta*. 2. Cultivo de tejidos. 3. Cultivo *in vitro*. 4. Propagación de plantas. 5. Técnicas de laboratorio. 6. Agricultores. 7. Participación de agricultores. 8. Biotecnología. 9. Colombia.

Descriptores locales en español:

1. Yuca. 2. Investigación participativa.

Descriptores AGROVOC en inglés:

1. *Manihot esculenta*. 2. Tissue culture. 3. *In vitro* culture. 4. Plant propagation. 5. Laboratory techniques. 6. Farmers. 7. Farmer participation. 8. Biotechnology. 9. Colombia.

Descriptores locales en inglés:

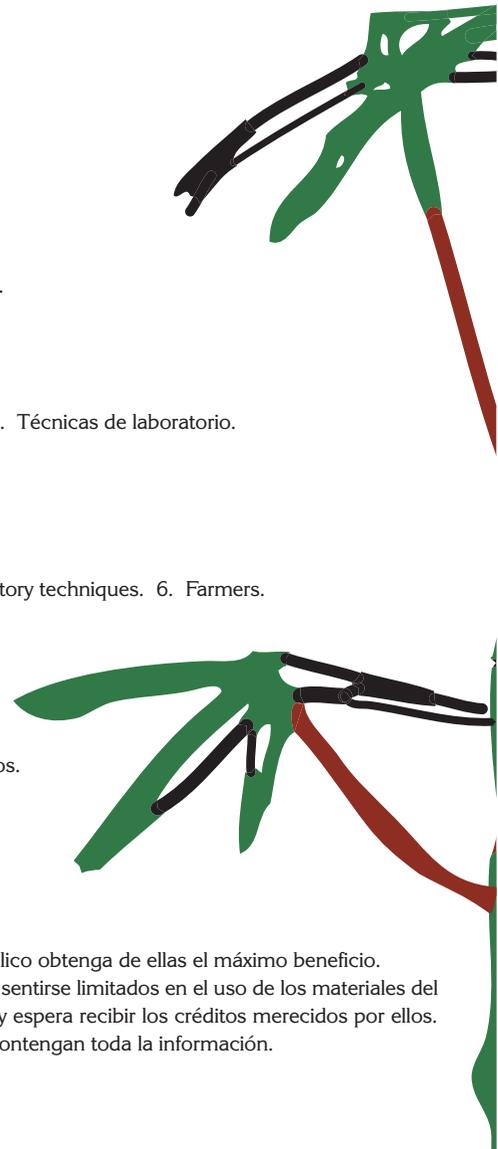
1. Cassava. 2. Participative research.

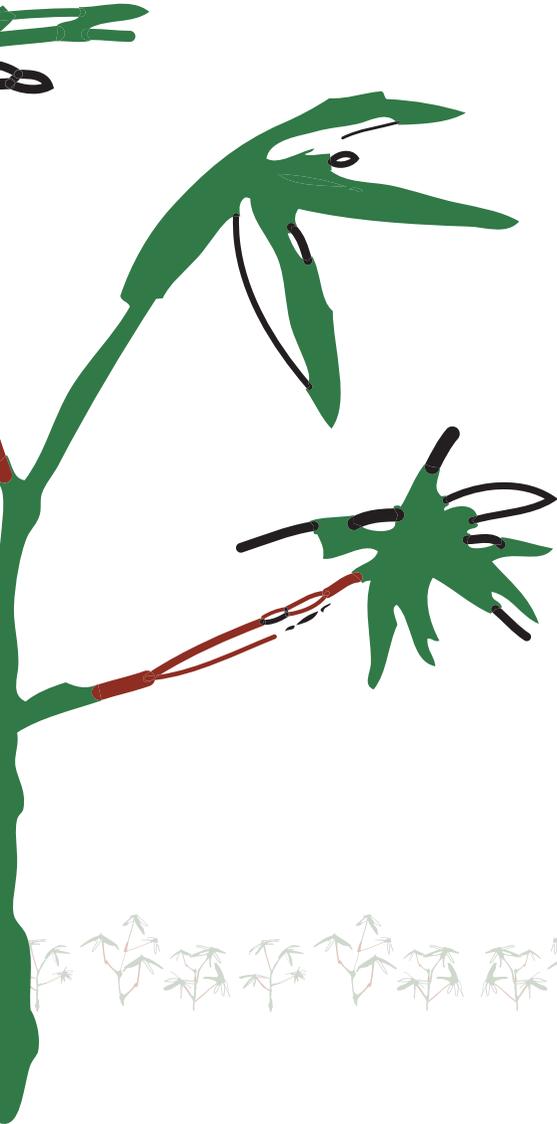
I. Centro Internacional de Agricultura Tropical. II. Escobar, Roosevelt H.
III. Caicedo, Elizabeth. IV. Muñoz, Liliana. V. Ríos, Auradela. VI. Azcárate, Álvaro. VII. Dorado, Carlos.
VIII. Tohme, Joe.

Categoría de materia AGRIS: F2 Propagación de plantas / Plant propagation

Derechos de Autor © CIAT 2012. Todos los derechos reservados.

El CIAT promueve la amplia disseminación de sus publicaciones impresas y electrónicas para que el público obtenga de ellas el máximo beneficio. Por tanto, en la mayoría de los casos, los colegas que trabajan en investigación y desarrollo no deben sentirse limitados en el uso de los materiales del CIAT para fines no comerciales. Sin embargo, el Centro prohíbe la modificación de estos materiales y espera recibir los créditos merecidos por ellos. Aunque el CIAT elabora sus publicaciones con sumo cuidado, no garantiza que sean exactas ni que contengan toda la información.





Dedicatoria

A doña Nohemí Larrahondo (q.e.p.d.)
Agricultora del Cauca
a quien, como lo manifiesta su hijo,
debía ponerle cuidado cuando entraba al lote
“porque... donde se paraba sembraba una mata”.

Al señor Alfaro Mina (q.e.p.d.)
Agricultor del Cauca,
miembro de la Asociación Municipal de
Usuarios Campesinos (AMUC),
convencido de que
“la yuquita es parte de la cultura del norte del Cauca”.





Agradecimientos

Al grupo de mujeres agricultoras de San Rafael, departamento del Cauca, con quienes desarrollamos el modelo de trabajo para establecer el sistema de propagación *in vitro* de bajo costo en Colombia.

A José Restrepo, Carlos Hernández y Gloria Ospina, de la Fundación para la Investigación y Desarrollo Agrícola (FIDAR), con quienes desarrollamos el trabajo social inicial en el departamento del Cauca.

A los agricultores de la Asociación Municipal para el Desarrollo Sostenible de los Pequeños Agricultores (ASOMUDEPAS), San Jacinto, departamento de Bolívar, y a la Empresa Comunitaria de San Rafael (Ovejas, departamento de Sucre) en la costa norte de Colombia que ayudaron a validar el ejercicio y quienes, con el apoyo del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR) de Colombia, establecieron los laboratorios pilotos de producción de material en sus sitios de trabajo.

A María Mercedes Rengifo y Benjamín Anaya, de la Corporación para el Desarrollo Participativo y Sostenible de los Pequeños Productores Rurales (Corporación PBA), y a Amauri Espitia y Rocío Gamez, de los Centros de Investigación Corpoica-Turipaná y Corpoica-Caribia, con quienes validamos esta metodología en los campos de la costa norte.

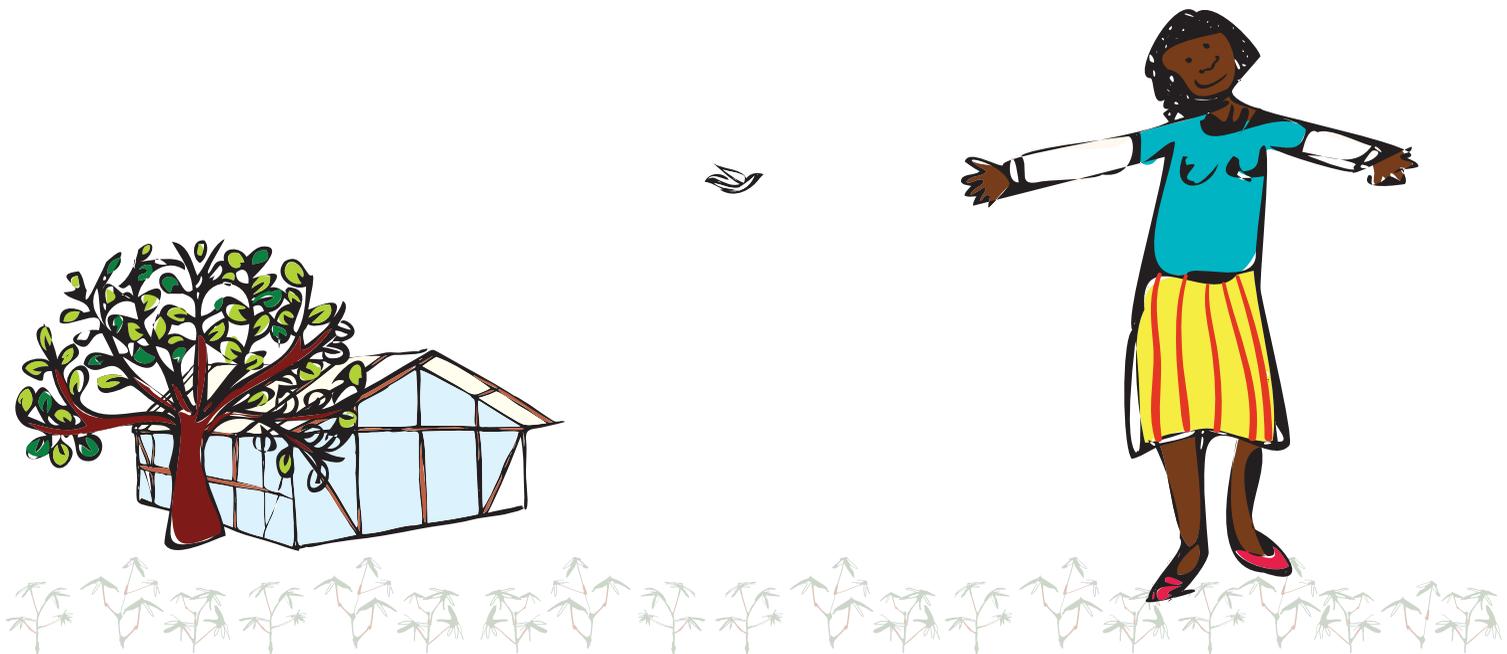
A Myriam C. Duque y Eduardo Figueroa, por la edición y comentarios que mejoraron el texto.

El cultivo in vitro: Otra manera de propagar la yuca

A la Red de Biotecnología de Yuca (CBN, sus siglas en inglés) y al Programa de Investigación Participativa y Análisis de Género (PRGA, sus siglas en inglés), por su ayuda financiera para realizar este trabajo.

A la Fundación Ginés-Mera, por el apoyo financiero en la implementación de los laboratorios de bajo costo a través del uso de materiales de siembra con campesinos (lotes de incremento) de la Asociación Municipal de Usuarios Campesinos (AMUC) del departamento del Cauca, Colombia.

Al Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), por su apoyo a través de los años de investigaciones conducentes a la concepción y desarrollo de este trabajo.





Contenido

Preámbulo	ix
Introducción	1
¿Qué es el cultivo de tejidos?	3
¿Dónde se puede hacer el cultivo de tejidos?	4
<i>¿Qué es un laboratorio de cultivo de tejidos?</i>	5
<i>Reglas que se deben seguir en el trabajo en el laboratorio rural</i>	7
<i>Funciones y actividades a realizar en las áreas de un laboratorio rural</i>	9
¿Qué es un medio de cultivo y cuál es su función?	15
<i>Receta para preparar un medio de cultivo para yuca</i>	18
<i>Preparación del medio de cultivo</i>	19
¿Qué material se debe usar en el proceso de propagación?	25
<i>¿Dónde se puede conseguir?</i>	25
<i>Implementos necesarios</i>	27
<i>¿Cómo se procede a propagar una planta bajo condiciones in vitro?</i>	28
Cómo salir del frasco y volver al suelo: La fase del endurecimiento	33
De vuelta al campo, del banco genético al campo de los agricultores	37
Referencias bibliográficas	39
Anexos	40



Preámbulo

Cuando hablamos de la biotecnología en general, y del cultivo de tejidos *in vitro* en particular, la primera imagen que nos formamos es que su acceso está limitado a personas e instituciones con conocimientos científicos de punta y laboratorios altamente sofisticados. Si bien esta imagen es correcta, la pregunta que nos hemos hecho desde hace mucho tiempo es ¿qué se necesita para que estas tecnologías se pongan realmente al alcance de personas y grupos sociales de escasos recursos, en particular de pequeños agricultores en comunidades campesinas? Esta pregunta y otras parecidas fueron las que motivaron a técnicos, estudiantes y profesionales del CIAT hace ya varios años a desarrollar los procedimientos y técnicas para el cultivo de tejidos bajo condiciones de insumos mínimos (Escobar et al. 2004). Pero esto no fue suficiente; el paso adelante se logró al incorporar a agricultores de escasos recursos, principalmente mujeres, en el proceso, primero en las instalaciones del CIAT y luego en los propios campos de la comunidad. No solo la adaptación de técnicas a esas condiciones fue importante sino, y sobre todo, el manejo de un lenguaje comunal-local para los procesos involucrados en el cultivo *in vitro* de la yuca (Escobar et al. 2006).

Esta cartilla “El Cultivo *in vitro*: Otra manera de propagar la yuca” plasma de manera clara y sencilla tanto las adaptaciones técnicas del método como las lecciones aprendidas, resultado de la interacción continua entre los científicos y técnicos “formales” del CIAT con los científicos y técnicos comunales del Cauca, Colombia.

La yuca, cultivo preferente de pequeños campesinos, ha sido el modelo ideal para desarrollar esta aplicación, pero sin duda los mismos principios técnicos pueden aplicarse a otros cultivos de pequeños productores, principalmente a las raíces y tubérculos.

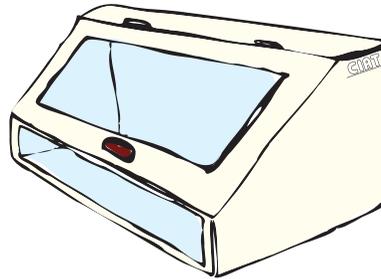
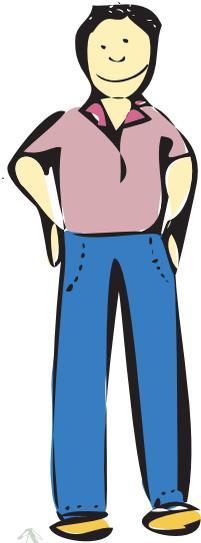
El cultivo in vitro: Otra manera de propagar la yuca

La forma en que la cartilla ha sido diseñada y escrita por sus autores permite no solamente llevar adelante aplicaciones prácticas sino también apreciar su “sofisticación” al integrar el cultivo de tejidos *in vitro* con los medios y métodos locales; estoy seguro que marcará la pauta para iniciativas futuras en este campo. Me imagino y aplaudo la satisfacción de los autores de la cartilla por haber contribuido, mediante este paso, a que el cultivo de tejidos *in vitro* no se quede en el laboratorio de los investigadores sino que sea usado como herramienta por los agricultores para su propio beneficio.

Finalmente, quisiera mencionar que este avance se debe, en gran medida, a la dedicación y entusiasmo continuo de Roosevelt Escobar con el apoyo brindado por el CIAT.

Muchas gracias.

William Roca





Introducción

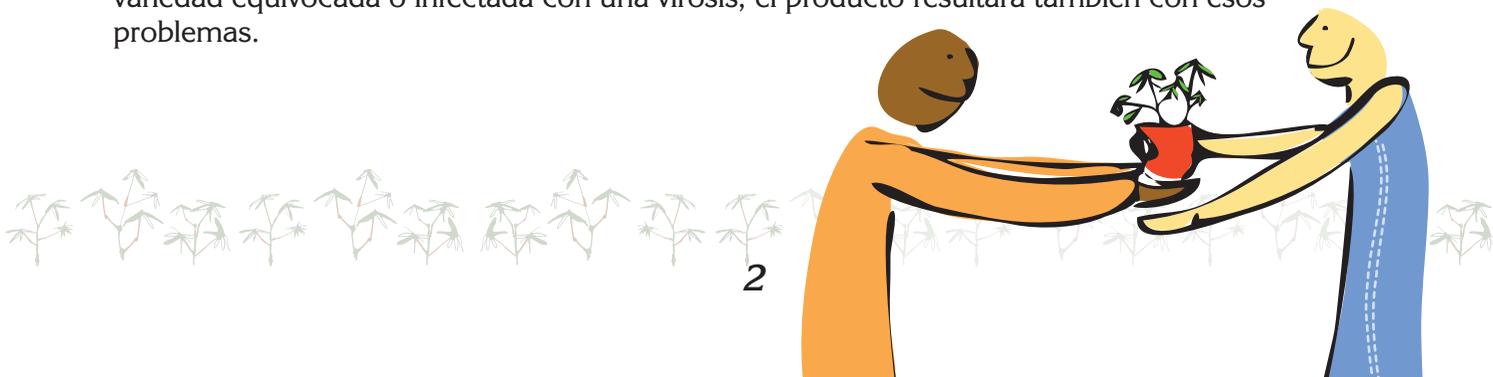
El objetivo de esta cartilla es compartir una forma de propagar y cultivar la yuca, que garantice que los agricultores puedan acceder a material de siembra limpio, certificado y libre de enfermedades, incluyendo los virus, de aquellas variedades de su interés, y que les permita recibir la justa retribución a sus esfuerzos.

La forma normal y convencional que a través de los siglos han utilizado los agricultores en sus fincas para propagar algunos cultivos como la yuca, caña de azúcar, ñame, papa, batata, uva y las violetas, entre otros, se ha hecho a través de partes del cultivo anterior, como son las estacas, tallos, rizomas, tubérculos, hojas, etc. Esta forma de propagar algunos cultivos es un sistema de multiplicación vegetativa, ya que no utiliza semilla botánica verdadera como ocurre por ejemplo, en el cultivo del fríjol o del maíz. Este sistema de propagación vegetativa asegura que se cosechen plantas, raíces y/o tubérculos idénticos, es decir con las características de color, calidad, forma, etc. iguales a la planta que sirvió de patrón inicial en el año inmediatamente anterior.

Ésta sería, entonces, una buena descripción para obtener copias idénticas de una variedad, a través de los ciclos/años de siembras y cosechas. A esta forma de reproducción de copias idénticas se le conoce como multiplicación clonal y es la base sobre la cual descansa la propagación vegetativa. Si bien es cierto que esta forma de propagación ofrece ventajas, la principal es mantener las características que el consumidor prefiere; sin embargo, se puede convertir en una manera muy eficiente para diseminar los problemas y las enfermedades en la finca, en la región o en el país. Ésto se debe a la presencia de bacterias, hongos o virus y otros problemas sanitarios presentes en las plantas madres.

Con el desarrollo de sistemas de propagación clonal en los laboratorios, como es la técnica de propagación *in vitro*, se puede limpiar la planta de enfermedades y poner a disposición de los agricultores material de siembra limpio y certificado con la seguridad de que: (1) las plantas estarán libres de enfermedades, (2) corresponde al clon o la variedad que se necesita, (3) se evitan confusiones o mezclas entre variedades, y (4) en la cosecha se obtendrá una mejor producción.

Debe quedar claro que la escogencia del material para propagar debe hacerse con sumo cuidado, por ejemplo: una yuca de pulpa blanca, con cáscara roja, de buena calidad culinaria y buena producción de almidón/raíces o un material con buena calidad culinaria, alta producción y resistente a una enfermedad. Como se verá más adelante, el punto de partida de este esquema de producción es una buena selección del material que se va a clonar. Recordemos que el sistema clonal copia lo que entra en primera instancia al sistema, y si, por ejemplo, entra la variedad equivocada o infectada con una virosis, el producto resultará también con esos problemas.



¿Qué es el cultivo de tejidos?

Normalmente las personas asocian el término “cultivo de tejidos” con la propagación *in vitro*, pero éste es tan solo una de sus tantas aplicaciones.

Entre otras aplicaciones del cultivo de tejido tenemos:

1. La limpieza de enfermedades, principalmente aquellas causadas por virus, mediante la escisión y cultivo *in vitro* de meristemos apicales de plantas pre-tratadas y su comprobación usando técnicas virológicas de detección específicas.
2. El establecimiento de colecciones o bancos de germoplasma para almacenar, bajo condiciones especiales todas, las entradas o variedades de un cultivo en forma clonal.
3. El intercambio de material, para minimizar la posible diseminación de plagas y enfermedades de un país a otro.

La técnica del cultivo de tejidos consiste en tomar de una parte de una planta (tallos, ramas, hojas, raíces, etc.) porciones de tejido u órganos (diferenciados o no), los cuales se colocan en un medio nutritivo especial, bajo condiciones controladas de luz y temperatura para que continúen su desarrollo, tal y como lo hacía en la planta “madre”. Para lograr este crecimiento y desarrollo se debe eliminar la microflora contaminante externa (hongos y bacterias entre otras), mediante un proceso conocido como desinfección, para evitar que sigan creciendo en el medio de cultivo; si no se controlan estos contaminantes podrían matar el tejido vegetal usado para iniciar el proceso. Por este motivo, es necesario siempre mantener los cultivos de tejidos libres de contaminantes, o sea, en forma aséptica.



¿Dónde se puede hacer el cultivo de tejidos?

El cultivo de tejidos se puede realizar en un espacio limpio donde se pueda controlar y mantener las condiciones de asepsia para que el tejido o porción de planta cultivado pueda crecer y formar de nuevo una planta. Este espacio es conocido como **laboratorio**.

La escala y capacidad de producción de un laboratorio la va a determinar el número de plantas que se puedan propagar a través del tiempo, o por cada ciclo, para lo cual se requerirán ciertos equipos, mano de obra, un espacio e insumos para usar en el proceso.

A manera comparativa, se puede realizar un viaje de la ciudad **A** a la distante ciudad **B** en diferentes formas: a pie, en bicicleta, en moto, en bus o en avión. Al final del ejercicio, igual se llega al sitio de destino (ciudad B), pero es más rápido y probablemente con un menor esfuerzo (y se llega menos cansado), en avión que en bicicleta o a pie.

Sin embargo, de acuerdo con la manera de viajar, al final del camino se tendrán más historias que contar, más paisajes vistos, más gente conocida y un gran conjunto de experiencias (conocimiento adquirido) para compartir, como enseñanzas, con los futuros viajeros. Esto nos demuestra que no hay una única manera de ver y realizar las cosas, pero que con una planeación basada en objetivos claros (escala de producción) y un manejo de los recursos disponibles se puede cumplir con el objetivo (llegar a la meta).



¿Qué es un laboratorio de cultivo de tejidos?

Un laboratorio de cultivo de tejidos es un espacio diseñado de tal manera que permite una producción continua de un material de siembra, el cual fue previamente seleccionado por una característica específica y/o un valor agregado (que lo hace diferente a los demás), y donde se puede controlar y asegurar la asepsia o limpieza durante todo el proceso de multiplicación *in vitro*.

La producción puede ser continua, o a diferentes escalas, de acuerdo con la proyección de la producción y del dinero que se tiene para invertir en el proceso. Asimismo, la distribución, tamaño y el diseño de los espacios o áreas en el laboratorio deben estar acordes con la cantidad de plántulas proyectadas a producir durante el ciclo de propagación y del dinero necesario para su implementación.

En el diseño básico de un laboratorio de cultivo de tejidos se deben considerar las siguientes áreas:

1. Un cuarto para la preparación de medios de cultivo
2. Un cuarto para la esterilización y el lavado de material
3. Un cuarto para la multiplicación o transferencia a medio fresco
4. Un cuarto para el crecimiento y desarrollo del material vegetal

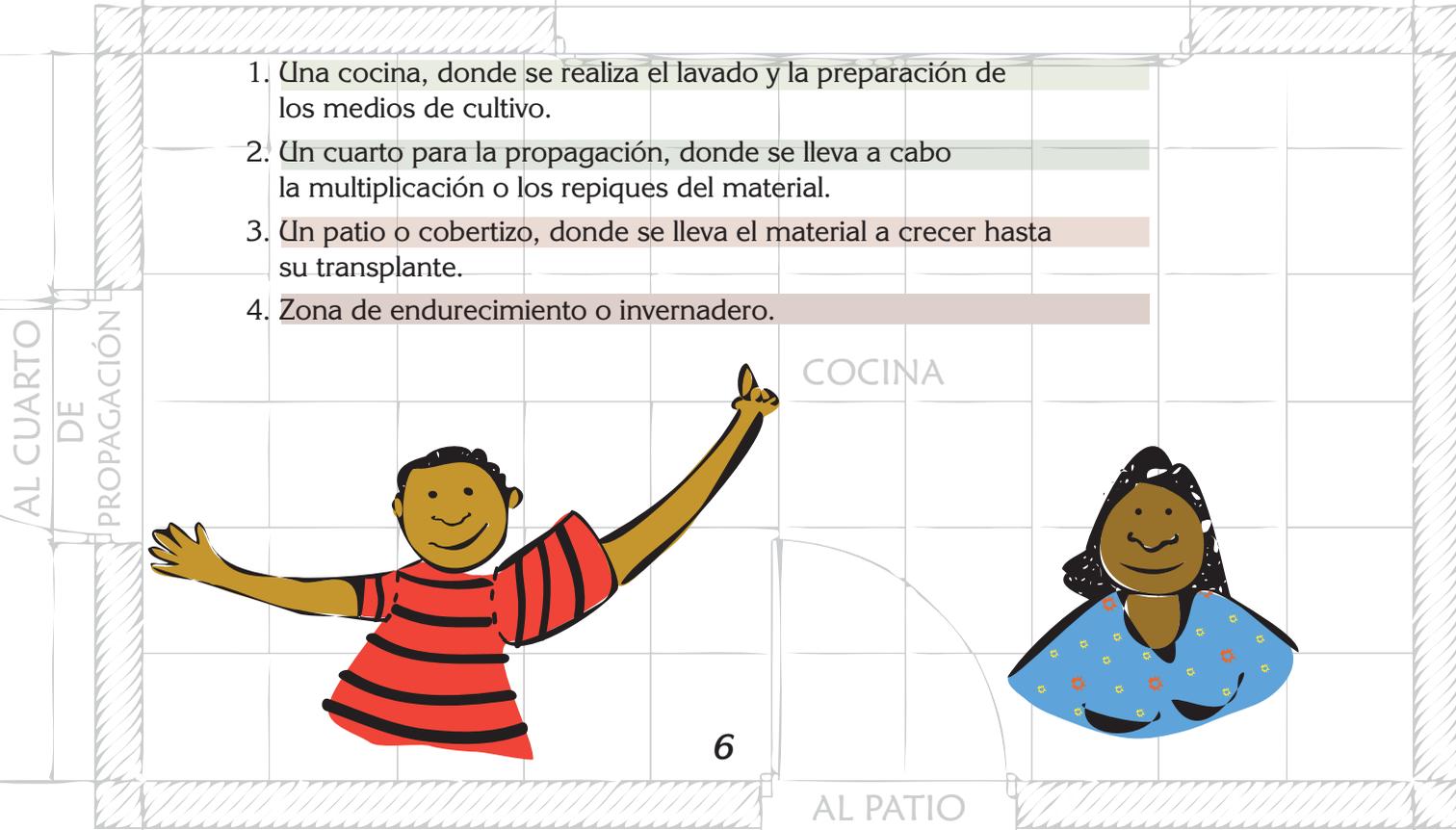




Adicional a estos espacios se debe contar, hacia el exterior del laboratorio, con un espacio que sirva de bodega y otro destinado a cumplir las funciones de invernadero para la transferencia a suelo del material generado en el laboratorio.

En los esquemas desarrollados por el CIAT con agricultores (Escobar et al. 2006), los espacios de un laboratorio rural se ajustan a las siguientes áreas de una casa:

1. Una cocina, donde se realiza el lavado y la preparación de los medios de cultivo.
2. Un cuarto para la propagación, donde se lleva a cabo la multiplicación o los repiques del material.
3. Un patio o cobertizo, donde se lleva el material a crecer hasta su transplante.
4. Zona de endurecimiento o invernadero.



Reglas que se deben seguir en el trabajo en el laboratorio rural

En el espacio en que se realizará la propagación o laboratorio se deben cumplir algunas reglas mínimas para asegurar que el trabajo no se va a perder por la contaminación a causa de bacterias, hongos, presencia de ácaros y/o hormigas, entre otros.

1. Mantener limpia el área de trabajo, evitando la acumulación de polvo y la presencia de hormigas y ácaros. Los pisos se deben barrer (sin levantar polvo) y limpiar a diario con la ayuda de un trapeador humedecido con una mezcla de agua, jabón y un poco de hipoclorito (lejía).
2. Controlar el acceso o entrada al laboratorio de personal extraño (visitantes). Cada vez que alguien ingrese, es posible que entre algún contaminante o agente extraño al proceso.
3. Evitar la entrada de personal con ropa de trabajo o de calle, especialmente si ha visitado el lote/campo de trabajo. Debe tomar un baño y cambiar de ropa y zapatos, como medida de control y prevención a futuros problemas de contaminación en el laboratorio. Se sugiere manejar un par de zapatos solo para el laboratorio.
4. Reparar las grietas de las paredes y de los techos para evitar el deterioro del laboratorio. Esto ayuda a controlar humedades en el mismo, que son causa de contaminación por hongos y puntos de entrada de insectos y arañas.





5. Evitar el anidado de aves y/o murciélagos en los techos y/o bóvedos de las casas que usen como laboratorios, ya que los excrementos y nidos favorecen la proliferación y diseminación de problemas asociados con ácaros, piojos, etc.





Funciones y actividades a realizar en las áreas de un laboratorio rural

Como se dijo anteriormente hay cuatro áreas claves en el laboratorio rural de propagación: La cocina, un cuarto, un patio y una zona para el traslado o endurecimiento. En cada una de ellas se llevan a cabo las siguientes actividades específicas:

En la cocina



Se preparan los medios de cultivo, que en sentido figurado equivaldría a la comida de las plantas a propagar. Un medio de cultivo aporta todos los nutrientes, reguladores de crecimiento, energía y vitaminas que se necesitan para que el tejido crezca fuerte y de buenos “hijos” (propágulos) *in vitro*.

Aquí también se limpian y se lavan los frascos sucios (ya usados o con polvo) y se llenan los frascos limpios con el medio de cultivo antes de su esterilización o autoclavado.

El proceso de esterilización elimina todos los microbios que se encuentran en los medios de cultivo, para evitar la pérdida del tejido inicial durante el proceso de propagación. Este proceso se lleva a cabo en un equipo especial llamado esterilizador o autoclave, que funciona a alta temperatura (lo cual genera vapor de agua) y a alta presión (lo cual ocurre cuando una válvula del equipo se cierra para mantener el aire caliente al interior y evitar que el vapor de agua salga).

En la cocina



El tiempo de autoclave, a una temperatura y presión determinadas ayuda a eliminar los microbios que se encuentran en el medio de cultivo. Este equipo es similar (pero no igual) a una olla de presión; la diferencia es que tiene un manómetro para controlar y medir la presión interna en la olla.

Resulta claro que este equipo debe manejarse con mucho cuidado, evitando golpear los sistemas de medición (manómetros) o la tapa. Nunca se le debe aplicar agua fría al finalizar un ciclo de esterilización para agilizar el descenso de la presión y poder abrirla.

El éxito de la propagación consiste en mantener a raya los contaminantes, y lograr que en el medio de cultivo se desarrollen/crezcan solo los tejidos usados en la propagación, para poder así usar los rebrotes/hijuelos en los ciclos posteriores.

En el cuarto de propagación

Esta parte se considera el centro o corazón del laboratorio rural. Allí se encuentra un equipo que permite mantener las condiciones de limpieza, por medio de la filtración del aire normal del cuarto (que es fuente de contaminación) a través de un filtro especial que elimina los contaminantes ambientales (especialmente esporas de hongos) y mantiene limpia el área donde se trabaja.

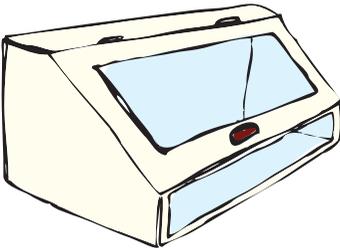
En el cuarto de propagación

Este equipo se conoce como una cámara de flujo laminar y no es más que una caja con un motor y un filtro de alta eficacia en filtración de partículas (denominado HEPA) en la parte trasera o superior que filtra el aire del cuarto (de afuera) y lo envía hacia adentro de la caja donde se va a trabajar con el material vegetal.

Como se puede notar en cada paso existe la posibilidad de que ocurra una contaminación, lo cual hay que tratar de minimizar en lo posible con:

- una buena esterilización del medio de cultivo
- un buen manejo de los procedimientos en la cámara de flujo laminar
- un buen mantenimiento de las condiciones durante el crecimiento del tejido

El operario es una fuente alta de contaminación, por lo tanto durante su manejo no debe hablar sobre el tejido ni tocarlo directamente con las manos. Para ello debe usar pinzas y busturís. Una vez trabajado y sembrado un frasco debe cerrarlo y sellarlo con papel plástico o Vinilpel (usado para guardar los alimentos en la nevera y que evita que se contaminen con olores/sabores de otros alimentos).



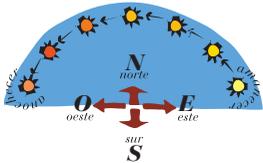
En el patio

Este espacio se diseña teniendo en cuenta las condiciones ambientales del sitio donde se va a establecer el laboratorio.

Si es una zona muy calurosa se deben considerar espacios abiertos o con mallas que permitan la aireación. En sitios fríos se debe colocar plástico alrededor para ayudar a mantener la temperatura o calentar el interior. Siempre se debe considerar como techo algún material que permita el paso de luz, pero que controle el paso del calor. Adaptaciones en el techo pueden ayudar a controlar el paso directo del sol. Para la ubicación de esta área siempre se debe tener en cuenta el punto de entrada (poniente) y salida (saliente) del sol durante el día, para lograr que sea uniforme la iluminación.

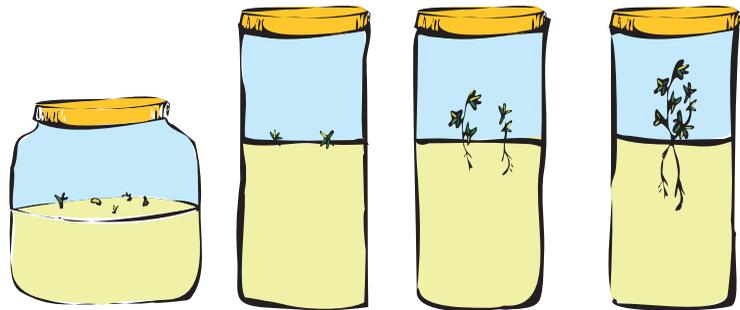
La temperatura ideal para el crecimiento de la yuca es alrededor de 30 °C día/noche; sin embargo, se han registrado temperaturas cercanas a los 40–45 °C al mediodía en la costa norte colombiana, lo cual amerita que se maneje y facilite el tránsito del aire al interior del área con una ventilación (a través de las mallas), y/o con la apertura de los plásticos laterales de acuerdo a lo usado en el diseño y en la construcción de esta área.

En este espacio se deben colocar estanterías o mesas donde puedan descansar los frascos sembrados con el tejido, esperando a que crezcan y formen de nuevo una planta (esto toma aproximadamente 30 a 40 días).



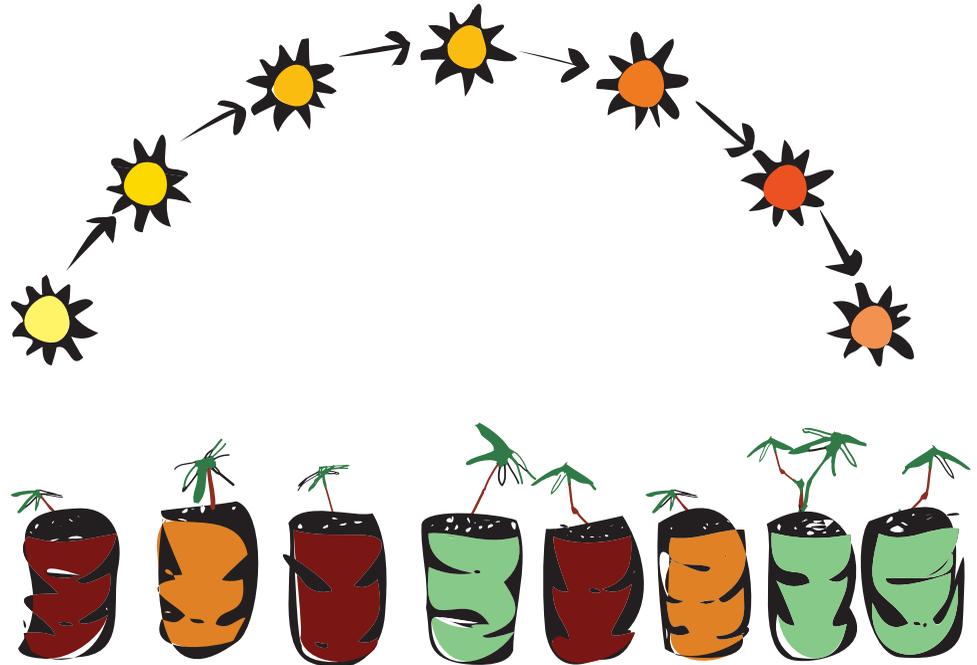
En el patio

En la medida en que se presenten cambios bruscos de temperatura y días húmedos (por efecto de lluvia o cambio de temperatura día-noche) se desarrollan focos de contaminación y acumulación de polvo entre el plástico y la tapa de cada frasco. Para evitar esto debe hacerse una revisión periódica y un control de los focos de contaminación, limpiando cada frasco con una gasa humedecida con una solución diluida de hipoclorito y/o vinagre, durante el desarrollo y antes de abrirlo para su propagación.



La zona de endurecimiento

Este espacio va al final del proceso, y es allí donde las plantas se sacan del frasco y se siembran en el suelo. Resulta obvio, considerar que las plantas que se llevan a esta etapa final deben haber formado de nuevo la raíz, haber crecido y formado algunas hojas para asegurar su recuperación fuera del frasco.





¿Qué es un medio de cultivo y cuál es su función?

Desde el inicio se ha venido hablando del medio de cultivo como parte fundamental de este proceso. Ya se había dicho que en sentido figurado es la comida de las plantas y como bien se sabe, la comida (medida en calidad y cantidad) se convierte en la “gasolina” que hace mover un organismo. Al igual que cualquier comida, tiene un procedimiento de hacerse y unos ingredientes (receta) que hacen que ésta quede apetitosa y sea beneficiosa para nuestra salud. Del mismo modo, para las plantas, un medio de cultivo tiene una receta, unos ingredientes y un balance entre cada uno de los componentes para lograr un buen desarrollo de los tejidos y la formación de plantas fuertes y vigorosas. En la Tabla 1 se pueden consultar los ingredientes básicos de un medio de cultivo y la función de cada uno de ellos.





Tabla 1. Ingredientes básicos para la preparación de un medio de cultivo y sus funciones.

Ingrediente	Fuente de:	Contiene y/o aporta
Solución básica	Nutrientes esenciales	Elementos mayores y menores
Azúcar	Energía	Generalmente azúcar de mesa
Vitaminas y suplementos	Vitaminas	Generalmente tiamina (Vit B1)
Reguladores de crecimiento*	m-Inositol	Otro azúcar esencial para las plantas
	Auxinas	Ayuda a la formación de raíces
	Citoquininas	Ayuda a la formación de rebrotes
Gelificante	Giberelinas	Ayuda a crecer y estirar la planta
	Agar	Da firmeza y soporte al medio

* Aquí se hace una referencia sencilla de los efectos de los reguladores de crecimiento sobre el desarrollo de las plantas; sin embargo, se sugiere consultar otras fuentes de información para complementar su conocimiento donde se podrá notar la acción amplia y la complementariedad de las acciones entre estos compuestos.

De manera comparativa, una solución básica es la fuente de ladrillos (N, P, K, Ca, Mg, S, B, Mn, Mo, Zn, Cu, I, Co, Fe) que le sirven a la planta para construir y mantener sus procesos metabólicos (similar a lo que hacen un fertilizante en el campo). A diferencia de éstos, en el cultivo de tejidos no se puede usar cualquier tipo de fuente de fertilizantes (por ejemplo, se debe eliminar la presencia de urea y altas dosis de compuestos nitrogenados/amoniacaes y presencia de yesos o rellenos, entre otros), ni en altas dosis pues el tejido que se va a cultivar es pequeño y éstos le pueden ocasionar toxicidad y/o una quemazón que limitaría o frenaría por completo (muerte) el desarrollo y la posterior formación de una planta completa.

En los libros especializados en el tema del cultivo de tejidos hay infinidad de soluciones publicadas que pueden ser usadas como medio de cultivo. Éstas se diseñaron de acuerdo al tipo/especie de planta (cultivo) que se va a crecer en él; Por tanto, hay soluciones especiales para crecer orquídeas, árboles forestales, ornamentales, etc.

Hay una solución básica ampliamente usada en diversos cultivos llamada, Murashige y Skoog (MS, por los apellidos de las dos personas que la diseñaron). Esta se puede conseguir en el mercado en forma líquida o sólida, y llegado el caso se pueden adquirir los ingredientes por separado y prepararla uno mismo (ver composición detallada en el Anexo 1).

Si se observa con cuidado, se puede notar que un medio de cultivo es una condición ideal para que crezca una planta, pues se le aporta todo lo necesario para su desarrollo; sin embargo, también se debe considerar que si no se trabaja bien para mantener las condiciones de asepsia, el medio favorece las condiciones para que crezcan y se desarrollen rápidamente los contaminantes. Es bueno recordar aquí que los contaminantes (hongos y bacterias) son más rápidos (eficientes) en crecer y desarrollarse (prolíficos) en el medio de cultivo que las plantas, lo cual puede ocasionar la pérdida y/o muerte del tejido en la mayoría de los casos.

<i>Símbolo</i>	<i>Significado</i>
N	Nitrógeno
P	Fósforo
K	Potasio
Ca	Calcio
Mg	Magnesio
S	Azufre
B	Boro

<i>Símbolo</i>	<i>Significado</i>
Mn	Manganeso
Mo	Molibdeno
Zn	Zinc
Cu	Cobre
I	Yodo
Co	Cobalto
Fe	Hierro



Receta para preparar un medio de cultivo para yuca

Cuando se va a preparar una comida, se sigue una receta. En ella aparecen los ingredientes, las cantidades, la presentación del ingrediente (en forma sólida o líquida) y la manera de proceder para mezclarlos. Luego los tiempos necesarios para su preparación, almacenamiento y cómo servirla a los invitados. Iniciemos la preparación de una cena para nuestras invitadas a comer: los explantes de una planta de yuca (Tabla 2).

Tabla 2. Receta para preparar un litro de medio de cultivo para yuca.

Función	Ingredientes	Cantidad
Solución básica	Solución básica MS*	4,3 g
Fuente de energía	Azúcar de mesa	20 g
Suplementos	Tiamina	1 mg
	m-Inositol	100 mg
Reguladores de crecimiento	Auxinas**	0,5 mL
	Giberelinas**	1,2 mL

* En el Anexo 1 se detallan los ingredientes para hacer uno mismo la solución MS. Sin embargo, como se ha hecho con las asociaciones campesinas, el CIAT ha facilitado la medición y pesajes de cantidades muy pequeñas en los laboratorios rurales.

** Previamente se hizo un estudio de identificación de opciones comerciales, de fácil consecución en las tiendas de agroquímicos y se encontró que el producto comercial Hormonagro® sirve como fuente de la auxina ANA, y el ProGibb® sirve como fuente de la giberelina AG₃.

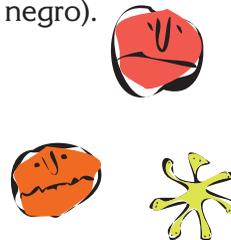
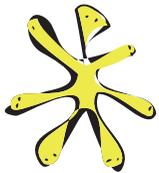


Preparación del medio de cultivo

De acuerdo a la forma disponible para la preparación de la solución básica se deben organizar previamente todos los ingredientes. Si se tiene como opción la solución en forma sólida se toman 4,3 g por cada litro de medio a preparar (ver Tabla 2).

Ahora, si se va a usar una fuente en forma líquida, de acuerdo a la nota del proveedor se debe tomar el equivalente respectivo por cada litro de medio; normalmente, vienen empacados para preparar 10–50 litros (L) de medio. Por otro lado, si se decide hacer las soluciones para preparar uno mismo la solución básica, entonces se deben seguir las indicaciones del Anexo 1A. Antes de usarlas se deben revisar bien, constatar que no estén contaminadas y dejarlas que tomen la temperatura ambiente.

Con respecto a los contaminantes, las bacterias se reconocen porque dan un aspecto lechoso a la solución, como una nata que flota y que produce un olor fétido y desagradable. En medio sólido se ven de aspecto brillante o rugoso, de colores llamativos y en forma de gotitas sobre el medio (conocidas como colonias). Por otro lado, los hongos normalmente se manifiestan como motitas o hilos de algodón (hifas), de aspecto granuloso (por la producción de esporas) y de colores opacos (normalmente blanco, gris, verde o negro).



Por seguridad nunca se debe oler directamente un frasco contaminado por hongos para evitar llevar (aspirar) esporas hacia el sistema respiratorio lo cual puede ocasionar problemas de salud y alergias severas al operario. Todo material contaminado por hongos o bacterias debe ser esterilizado, por lo menos, 1 hora antes de ser abierto y lavado.

De acuerdo a la opción a usar, se coloca la solución basal en 100 mL de agua limpia embotellada de una marca comercial reconocida y que haya sido abierta recientemente. No se puede usar agua del grifo normal, ni agua de pozo, pues en la primera hay minerales disueltos y altos niveles de cloro (usado durante el tratamiento de potabilización), y en la segunda, altas concentraciones de iones de calcio y magnesio que hacen dura el agua; es decir, que tiene un alto contenido de iones/sales, lo cual no permite que en presencia de un jabón se produzca espuma. Las aguas duras son de sabor desagradable (salobre), manchan y desgastan los dientes.

Cualquiera otro tipo de aguas altera por completo la relación de los nutrientes (sales) en la solución basal MS. Una vez disuelta la solución básica, adicione 20 g de azúcar de mesa (equivalente a 4 sobres de azúcar para endulzar café o a 5 cucharas soperas rasas); agite con una cuchara y espere a que se disuelva.

Previamente se deben preparar las soluciones concentradas de tiamina, m-Inositol, ProGibb® y Hormonagro®. Para ello proceda como se indica en la Tabla 3.





Tabla 3. Modo de preparación de las soluciones concentradas de los suplementos —vitaminas y reguladores— de crecimiento necesarios para hacer el medio de cultivo de yuca.

Ingrediente	Peso de producto comercial	Volumen (mL) de agua para disolver
Tiamina	0,5 g	500 mL
m-Inositol	2 g	250 mL
ProGibb®	0,5 g	500 mL
Hormonagro®	0,1 mL	99 mL

Nota: Condiciones de pureza de los productos comerciales expresados como ingrediente activo: Tiamina 100%, m-Inositol 100%, ProGibb® 10% de AG₃, Hormonagro® 17,25 de ANA. Para preparar el ProGibb® inicialmente se disuelve en unas gotas de soda cáustica y luego se completa con agua hasta el volumen final.

Con la ayuda de una jeringa para aplicar insulina (volumen total de medida de la jeringa 1 mL; cada rayita de la jeringa equivale a 0,02 mL), tome las cantidades (volúmenes) indicados en la última columna de la Tabla 4 (los volúmenes mayores se miden con una jeringa de 20 mL, donde cada raya equivale a 1 mL). Una vez se hayan agregado todos los ingredientes, complete el volumen con agua del botellón hasta 500 mL (medio litro)

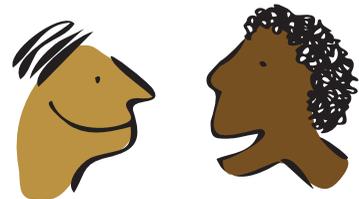


Tabla 4. Volúmenes de suplementos, vitaminas y reguladores de crecimiento necesarios para preparar un litro (1L) de medio para cultivar la yuca.

Ingrediente	Volumen en (mL) por litro medio	Tipo de jeringa	No. de rayas
Tiamina	1	Insulina x 1 mL	50
m-Inositol	13	Grande x 20 mL	13
ProGibb®	0,5	Insulina x 1 mL	25
Hormonagro®	1,2	Insulina x 1 mL	60

Nota: Para las mediciones del Hormoagro® se debe usar dos veces la jeringa de insulina, 50 rayas son 1 mL y 10 rayas adicionales son 0,2 mL.

Para finalizar hay que tomar el pH, que es la medida que indica qué tan ácido (presencia de grupos H+) o básico (presencia de grupos OH-) es un medio. El rango del pH va del 0 al 14, siendo 7 el neutro valor medio. En la escala de 0–7 se encuentra la zona ácida y de 7–14 la zona básica. El mayor grado de acidez es el 0 y el mayor grado de base es el 14.

Para determinar el pH del medio de cultivo se puede usar una tira de papel indicador o tornasol; para ello tome un pedacito o tira del papel e introduzca un borde en el medio. Espere un momento y compare el color que aparece en el papel con la escala que lo acompaña en la caja.

Otra manera de determinar el pH es usando un potenciómetro (equipo especializado para medir el pH que determina su valor en comparación a un estándar), pero requiere periódicamente una calibración y disponer de un dinero para su compra.

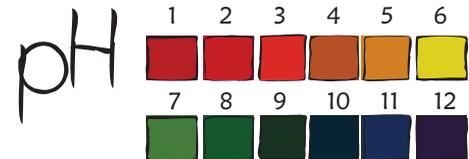




El pH de un medio de cultivo para plantas debe estar alrededor de 6 en la escala. Si está por debajo de este punto (quiere decir que aún está en la zona ácida), se le debe adicionar una gota de soda cáustica diluida en agua. Por otro, lado si está por encima de 7 (quiere decir que está aún en la zona básica), se le debe adicionar unas gotas de ácido (jugo de limón diluidas o vinagre). Cada vez que se adicione soda o jugo de limón debe introducirse un pedazo nuevo de papel indicador de pH y comparar el color obtenido con la escala hasta que coincidan el tono y color con el del pH=6 de la escala.

En una olla esmaltada coloque los otros 500 mL restantes de agua y adicione el gelificante (de acuerdo a la calidad del mismo, la cantidad a usar puede oscilar entre 0,5–0,9%, es decir 5–9 g/L). Una vez disuelto se calienta hasta que hierva y se aclare la solución (se transparenta y da un color amarillo pálido).

La consistencia del medio la da el gelificante (está en relación con su calidad y la cantidad adicionada al medio. El gel se obtiene una vez se haya calentado y enfriado el medio de cultivo). Medios muy duros (con mucho gelificante) no permiten que el tejido inicie a responder al medio y que las raíces crezcan; por el contrario, poco gelificante ocasiona un medio muy blando e inestable que no sostiene el tejido sobre su superficie y que resulta quebradizo (se rompe y desprende fácilmente la superficie). Ambos extremos causan inconvenientes para lograr que el tejido responda de la mejor manera al tratamiento del cultivo; Por tanto, debe ser resuelto antes de iniciar a multiplicar en forma rutinaria en el laboratorio.



Al final mezcle las dos soluciones y sirva en frascos previamente lavados. De acuerdo al tamaño del frasco a usar se calcula la cantidad de medio por cada recipiente. En forma general en frascos de compota se colocan 15–20 mL, en frascos de mayonesa de 20–25 mL/recipiente. La única condición para usar algún tipo de recipiente (vidrio o plástico) es que resista (que no se derrita o que no se quiebre), a alta temperatura y presión alcanzadas durante el proceso de esterilización en la autoclave.

Una vez se dispense el medio en los frascos, se deja enfriar, se tapa cada recipiente, y se le coloca un pedazo de papel periódico, ajustado con una banda elástica, a manera de protector o gorro y se lleva a la autoclave. El tiempo de esterilización se comienza a contabilizar una vez el manómetro de la autoclave alcanza una temperatura de 120 °C y una presión (15 psi, unidad de medida de presión expresada en libras por pulgada cuadrada). El tiempo de autoclavado es entre 20–25 minutos.

Cuando termine el tiempo de esterilización, apague la fuente de calor (eléctrica o de gas) y deje enfriar totalmente (aproximadamente 1,5–2 horas) sin forzar el equipo para que baje rápidamente (recuerde que el interior está a alta presión). Una vez baje la presión a 0, abra la autoclave y deje reposar los medios en un sitio fresco y nivelado por un período de 3 días (se considera un período de maduración). Si el proceso de esterilización fue exitoso, al medio no le deben aparecer contaminantes en la superficie o dentro de ella (dan la apariencia de lentejas o burbujas de aire).

Por seguridad, para no perder material vegetal (plantas propagadas) solo se debe ingresar/usar en el esquema de propagación aquel medio de cultivo que ha sido reposado o madurado durante 3 días posteriores a su esterilización a temperatura ambiente (en el cuarto de propagación o la cocina).





¿Qué material se debe usar en el proceso de propagación?

¿Dónde se puede conseguir?

Estas preguntas deben ser resueltas antes de iniciar la propagación, pues como se dijo al inicio, la selección de las plantas madres previo al proceso de propagación es crucial, ya que lo que entra al sistema es lo que va a salir de él pero en una mayor cantidad (recuerde que este sistema se basa en la propagación clonal y la selección del patrón a copiar es fundamental para lograr el éxito del mismo).

El punto clave de partida de todo este proceso es determinar a ciencia cierta qué es lo que realmente se va a multiplicar. En el CIAT se conservan en forma *in vitro* más 6.000 diferentes clones de yuca. Éstos conforman la colección mundial más completa que representa la diversidad del cultivo de la yuca en América Latina y el Caribe. Esta colección se mantiene bajo la figura del fideicomiso ante los países (es decir, el CIAT opera como un administrador, mas no es el propietario del recurso) y controla o regula el acceso al recurso mediante un acuerdo facilitado ante la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y con los países en donde se originó el recurso biológico.

Para lograr acceder al recurso genético (considerado como todo material biológico que contenga información genética de valor-uso real o potencial en el presente o hacia el futuro) se hace una solicitud directa al CIAT y se firma el Acuerdo Normalizado de Transferencia de Material (<http://isa.ciat.cgiar.org/urg/mta.do>). Luego, a vuelta de correo, de 4–6 semanas se recibirán 5 tubos con 1–2 plantas cada uno del clon que fue solicitado.

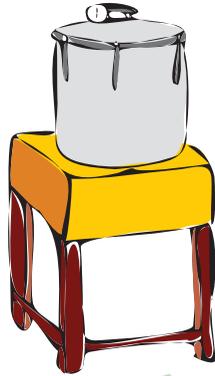
Este servicio no tiene ningún costo y garantiza que se cumplan las normas de cuarentena sanitaria para el intercambio entre los países, que el proceso se inicia con plantas madres *in vitro* certificadas como libres de virus y que el receptor (quien recibe el material) no va a declarar derechos de propiedad sobre el germoplasma. Asimismo se compromete a repartir los beneficios obtenidos cuando haga uso industrial del recurso, no hacia el CIAT sino hacia el sistema de conservación y al país de origen del recurso mismo. Programas de uso del recurso biológico en alimentación básica (programas de seguridad alimentaria) no incurrir en pagos de beneficios hacia el sistema.



Implementos necesarios

- Una bata de laboratorio para protección (delantal de cocina limpio)
- Un juego de herramientas (bisturís y pinzas largas y medianas)
- Un mechero de alcohol (ver como se hace más adelante)
- Un pedazo de gasa para limpiar
- Una baldosa de cerámica de baño o un pedazo de vidrio 4 mm de 20x20 cm
- Hojas de papel reciclado o periódico recortadas a 22x14 cm (la mitad de una hoja)
- Una botella de boca ancha (tipo conserva)
- Una botella plástica de refresco con dispensador (tipo tetero)

Nota: Los papeles recortados se acomodan en paquetes y luego se esterilizan durante 30–45 minutos en la autoclave.





¿Cómo se procede a propagar una planta bajo condiciones in vitro?

Una vez se tiene el medio de cultivo, frío y madurado por 3 días (es decir que no presenta contaminantes y esta apto para su uso), así como las plantas certificadas provenientes del banco de germoplasma del CIAT, se puede dar inicio al proceso de la propagación. Éste se hace al interior de una cámara de flujo laminar (equipo que ayuda a mantener la asepsia durante el proceso) y que se ubica en el cuarto de propagación.

En el Programa “La Biotecnología en el Salón de Clases”, Escobar et al. (2004) mostraron el diseño de una cámara de flujo de bajo costo que puede ser fácilmente ensamblada por un carpintero con conocimientos básicos de electricidad. Este tipo de equipos permite reducir los costos de implementación de un laboratorio a pequeña escala.

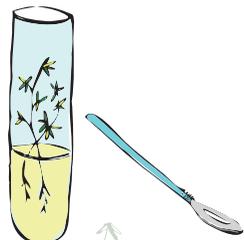
Antes de iniciar a propagar se debe asear muy bien el cuarto (esto se debe hacer todos los días), limpiar el interior con una gasa humedecida con alcohol antiséptico (alcohol al 70%, del que se usa para limpiar cortaduras, y que se ha colocado en una botella plástica de refresco tipo tetero). Repita 2–3 veces, limpiando con la gasa y dejando secar entre una y otra, teniendo cuidado de no aplicar alcohol directamente sobre el filtro. El operario debe mantener limpias y cortas las uñas y lavar sus manos con jabón azul antes de iniciar cada proceso de manipulación de tejido en la cámara.

En un frasco de boca ancha (tipo conserva) se coloca un pedazo de gasa en la base y se llena con alcohol antiséptico. Luego se introduce el juego de herramientas, lo cual incluye un par de bisturís (un cuchillo con mucho filo) y un juego de pinzas (una larga y dos medianas).

Con la ayuda de un mechero se queman varias veces cada una de las herramientas para eliminar los contaminantes (proceso conocido como flamear). Recuerde que las herramientas se calientan bastante y hay peligro de quemarse; por lo tanto, se debe estar atento a lo que está haciendo para evitar accidentes que lamentar.

El mechero de alcohol (quemador o lámpara de alcohol) se puede hacer con un frasco de mayonesa, al cual se le hace un hueco pequeño en la tapa metálica con una puntilla y se le pasa a través de éste una mecha para estufa a gasolina/queroseno. Ésta debe quedar bien asegurada para evitar fugas de alcohol. Recuerde estar atento en su manipulación para evitar accidentes.

Sobre una mesa coloque frascos con medio de cultivo reposado o madurado y los frascos con las plantas que quiere multiplicar (recuerde que, antes de ingresarlo al laboratorio, debe limpiar el frasco con una gasa, alcohol y una solución de jabón e hipoclorito diluido). Tome un frasco con las plantas e introdúzcalo en la cámara de flujo. Limpie la superficie con una gasa limpia humedecida con alcohol. Aquí se tiene que tener mucho cuidado porque el alcohol borra lo que se tenga escrito en el frasco, es decir que debe estar muy concentrado en lo que hace para evitar confusiones y pérdidas del material. Ante una confusión o la posibilidad de haber mezclado o confundido variedades (se descuidó de lo que estaba haciendo y no recuerda cómo se llama el material que está propagando) es mejor descartar el material que mantener la duda o el error en su sistema. Pero recuerde que lo que está haciendo es un proceso delicado y no puede estar arrojando material valioso por descuido.





Dentro de la cámara de flujo, quite la cinta plástica que cubre la tapa del frasco con las plantas; con la ayuda de la pinza grande (recuerde que debe esperarse a que se enfríe para tomar el tejido), retire y lleve suavemente sobre un par de hojas de papeles recortados y previamente esterilizados que han sido puestos sobre la baldosa o vidrio de 20x20 (sirven de base/soporte para realizar los cortes. Estas baldosas o vidrios deben limpiarse varias veces antes de iniciar el proceso con alcohol al 70%). El tejido nunca debe ser manipulado directamente con la mano, pues como se dijo anteriormente el operario es fuente de contaminación.

Una vez sobre el papel, con la ayuda del bisturí y una pinza mediana, haga cortes finos (el corte se hace con la ayuda del filo de la hoja de bisturí, tal como cuando se corta carne, no machacando el tejido) en la punta de la planta (ápice o cogollo) y en cada una de las yemas o nudos (donde quedan las hojas). Al final, una planta produce 1 ápice y 2-3 nudos. La parte donde están las raíces se descarta.

Una vez se cortan, el tamaño final del tejido es de aproximadamente 1,5-2 cm. Los ápices crecen más rápido que los nudos pues estos últimos están dormidos y deben despertarse antes de iniciar a crecer.

Cuando se ha cortado una planta (propagado) en ápices y nudos, con la ayuda de una pinza larga se procede a sembrarlos (transferirlos del plato/vidrio al frasco con el medio de cultivo) en un medio estéril nuevo. La boca del frasco a sembrar se quema (flamea) antes y después de ser sembrado. Se tapa, se le coloca cinta plástica y se marca con el nombre de la variedad, la fecha y el nombre de la persona que realizó la siembra.



Una vez se termina de propagar todas las plantas, los frascos marcados y sellados se trasladan a las mesas o estanterías del patio (30–35 °C). Se debe implementar un sistema de control e inventario que permita conocer cómo van creciendo las plantas, cuántas están disponibles para el próximo ciclo y cuántas se pierden por la contaminación.

Los frascos contaminados deben ser retirados a la mayor brevedad y ser autoclavados durante al menos 1 hora y proceder a su lavado posterior (agua jabón y límpido al 2%). No se debe dejar acumular material contaminado en el laboratorio, en el patio de crecimiento, ni en la cocina.

Pasados 30–45 días los tejidos sembrados crecen y forman de nuevo una planta completa (es decir con tallo y raíces), que puede ser objeto de un nuevo ciclo de propagación. Ciclos continuos de propagación permiten que el número de plantas aumente rápidamente en el laboratorio. De acuerdo con la programación del laboratorio (esquema de producción y compromisos de entrega a la zona de transferencia al suelo) se debe programar la fase de enraizamiento y trasplante a estas condiciones.





Una planta propagada genera 3–4 nuevas plantas cada 30–45 días (esto representa la tasa de propagación) y se puede repetir, es decir que una planta se convierte en 3–4 nuevos explantes; luego éstas se convierten en 9–16 (pasados 30–45 días); posteriormente 27–64 (pasados 30–45 días), etc.

Al final de un año de propagación *in vitro*, teóricamente una planta podría producir entre 6.000–500.000 plantas nuevas (tasa de propagación 1:3 cada 45–30 días respectivamente) siempre y cuando la tasa de pérdida por contaminación entre ciclos sea cero. Este cálculo entonces permite demostrar el potencial de la técnica de propagación clonal *in vitro* siempre y cuando la contaminación se mantenga en el nivel mínimo.

Ahora desde el punto de vista práctico no se puede mantener por siempre las plantas bajo condiciones *in vitro* (encerradas en los frascos), pues el agricultor las necesita en el campo para trabajarlas, cosecharlas y vender el producto de su esfuerzo. Para esto es necesario pasar a la fase final del proceso de producción de material de siembra: la fase de endurecimiento y enraizamiento en suelo.



Cómo salir del frasco y volver al suelo: La fase de endurecimiento

Una vez se llega al punto de tener un número de plantas que cumplen los requerimientos de producción del laboratorio, es necesario comenzar a sacar a condiciones de suelo en el vivero (ordeñar el sistema). Esto permite que se maneje un número básico de plantas acorde con la capacidad de manejo del laboratorio (punto de equilibrio) sin que se sature el laboratorio y el personal. El punto ideal es aquel en que hay un número tal de plantas en el laboratorio que puede mantener un flujo constante hacia la fase de endurecimiento, cubrir la demanda de plantas de los compradores en la zona y mantener un número base que soporte el esquema de producción *in vitro* (punto de equilibrio).

Lo primero es observar que las plantas estén bien conformadas (con tallo, raíces y hojas), retirar el plástico que cubre el frasco y aflojar un poco la tapa, sin quitarla por completo. Esto permite que las plantas comiencen a controlar mejor el trabajo de sus hojas, pues antes, al estar encerradas en un frasco se encuentran a pleno confort y las hojas no regulan el agua como se debe. Estas condiciones se mantienen por una semana aproximadamente.

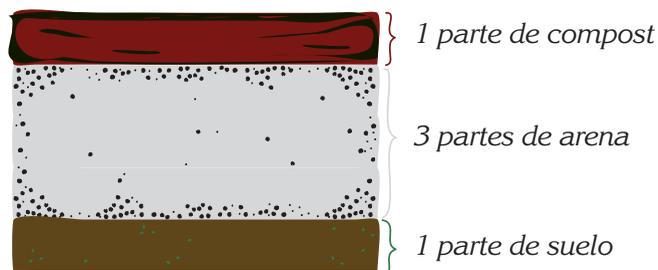
Mientras tanto, en la zona de endurecimiento, que es externa al laboratorio, se debe ir preparando el suelo (sustrato) que va a recibir a las plantas. Éste se prepara mezclando las materias primas que se encuentren disponibles en la zona; normalmente se usa suelo, arena gruesa de río (la que se usa para pegar ladrillo en construcción pero antes de usarse debe lavarse muy bien), algunas veces cascarilla de arroz, capacho de coco molido, bagazo de caña de azúcar, restos de poda de césped o turba (esta última es muy cara y normalmente los pequeños agricultores no la usan, pero da buenos resultados).





En el CIAT se usa una mezcla que contiene 1 parte de suelo, 3 de arena y 1 de compost realizado en la finca. Todas estas partes se mezclan y se procede a su esterilización. Aquí hay diferentes opciones, las cuales dependen de la visión del agricultor:

1. Para aquellos de tendencia orgánica y ambientalista se recomienda el uso de la solarización (uso del sol: para ello se coloca la mezcla del suelo preparado humedecido dentro de una bolsa plástica gruesa, se cierra la bolsa y se pone durante 30–45 días a plena exposición del sol).
2. Otros prefieren el uso de vapor de agua y tapar para aumentar la temperatura (preparar bloques de suelo no mayores a 10 cm de alto, regar con agua hirviendo y tapar con un plástico).
3. Otros, de tendencia de uso de productos químicos, optan por el uso de algún fungicida de amplio espectro (el Mancozeb ha mostrado buenos resultados en manejos de yuca y banano a una dosis de 2–3 mL/L. La solución se aplica al suelo, se mezcla y se tapa de un día para otro).



En el CIAT se han diseñado equipos de bajo costo que hacen la función de esterilizador de sustrato, el cual consiste en 2 canecas metálicas conectadas a través de una tubería que permita el paso del vapor de agua generado en una hacia la otra que contiene el sustrato. Por tanto, queda abierta una gama de opciones para la esterilización del sustrato de acuerdo con las ventajas que se vean y a las prácticas culturales de cada agricultor; su escogencia depende del volumen de sustrato a esterilizar, de las facilidades técnicas para el manejo y del dinero con que se cuenta para implementar la opción escogida.

Una vez desinfectado el sustrato, se airea (para recuperar la textura) con una pala y se distribuye en bolsas perforadas para semilleros. Se organizan en una mesa y se riega bien con agua, evitando que se encharque.

Con la ayuda de una pinza grande se toman las plantas y se sacan del frasco con cuidado de no romperlas (separar las raíces del tallo), y se colocan en una bandeja con agua limpia. Luego se toman con la mano humedecida (éste es un truco clave, siempre se deben manejar las plantas con las manos húmedas) y se les aplica agua a presión para quitar los restos del medio de cultivo de las raíces (para ello tape un poco la llave o la manguera y permita que salga más fuerte el agua). Este paso es muy importante pues, como se vio anteriormente, el medio de cultivo tiene azúcar y si se le deja se convierte en foco de contaminación y le llegan las hormigas.

Cada planta lavada, sin medio en las raíces, se coloca en una bolsa con suelo. Para ello, con un pedazo de madera ahusado (pedazo de palo de escoba con punta como un lápiz) se hace un hoyo en el centro del suelo en cada bolsa y se deposita en él la planta. Con el pedazo de madera se mueve el suelo alrededor para cubrir (tapar) el hueco o se le adiciona un poco más sin compactarlo.





Ahora, aquí está el segundo truco que puede determinar si la planta vive o muere en esta fase. Se debe asegurar que la planta quede bien puesta en el hueco y que éste quede bien sellado, pues si queda aire en la base la planta está destinada a perderse.

Cuando termine de sembrar la planta riegue bien (no encharque) y cubra con un vaso de icopor con 4–5 hoyos hechos con la punta de un lápiz en su base, para que funcione a manera de cámara húmeda. Si se quiere se puede aprovechar y hacer un primer riego con una solución de un fungicida para reforzar el control en esta fase. Para aquellos que no prefieren el uso de químicos, existen mezclas de flores de la manzanilla (*Matricaria chamomilla*) y unos dientes de ajo (*Allium sativum L.*) que pueden ayudar a controlar los hongos. La aplicación de un extracto de la flor de muerto (*Tagetes erecta*) ayuda también al control de hongos oportunistas.

El vaso se deja por 3–5 días, pero día a día se va moviendo/aflojando para que se vaya adaptando la planta a menos humedad al interior del vaso y vayan siendo más funcionales las hojas.

Pasados los 5 primeros días se retiran los vasos en horas de la tarde, y se continúa con los cuidados normales de una planta en el vivero. Pasados 15–20 días se puede hacer la primera fertilización con un fertilizante rico en fósforo o uno completo (2 g/L). El riego se aplica en forma normal, salvo que las plantas no deben recibir demasiada agua, puesto que la yuca no tolera condiciones de encharque. Solo se deben regar aquellas plantas que lo necesitan, pues excesos de agua causan la aparición de hongos en las hojas y pérdidas por pudrición de raíces. Se deben retirar las hojas caídas pues se convierten en fuente de contaminación por hongos.

Transcurridos 40–60 días del transplante, las plantas están listas para ser llevadas al sitio final en el campo.

De vuelta al campo, del banco genético al campo de los agricultores

Esta es la razón máxima de haber hecho este esfuerzo: Que los agricultores reciban material limpio, certificado libre de virus de aquellos clones de su interés y que les permitan recibir el justo pago a sus esfuerzos durante un ciclo de producción.

Para el trasplante final al campo del material de yuca producido bajo condiciones *in vitro*, se recomienda preparar el lote según el tipo de suelo. Dicha actividad se realiza mediante el uso de arado (mecánico o de bueyes de acuerdo con la pendiente del terreno y a la capacidad económica del agricultor) a una profundidad aproximada de 25 y 40 cm.

En regiones muy húmedas, con suelos pesados-arcillosos, se aconseja preparar el lote en caballones (montículos de tierra) para prevenir el encharcamiento, mejorar el drenaje y facilitar el manejo del mismo; sin embargo, ensayos realizados en diferentes regiones de Colombia específicamente en suelos livianos, demuestran que la práctica de la conformación de los caballones, no es recomendable para este tipo de suelos (F. Calle, 2012, com. pers.).

Previo al trasplante del material se debe acondicionar el lote, con aplicación de herbicida para el control de malezas o arvenses (pre y postemergentes) y asegurar el control de éstas durante la implantación del material.

Con la ayuda de un ahoyador, hacer huecos a distancia de 1 m entre ellos para que dentro de éstos se aloje una planta. Idealmente, el traslado del material se debe realizar en épocas de lluvias (primero porque abarata costos de manejo y se evita el pago de jornales de riego, y es el mejor riego que se puede dar en la agricultura). Ahora, si esto no es posible se debe asegurar que el día anterior se riegue a capacidad de campo el lote (es decir, que quede bien húmedo).

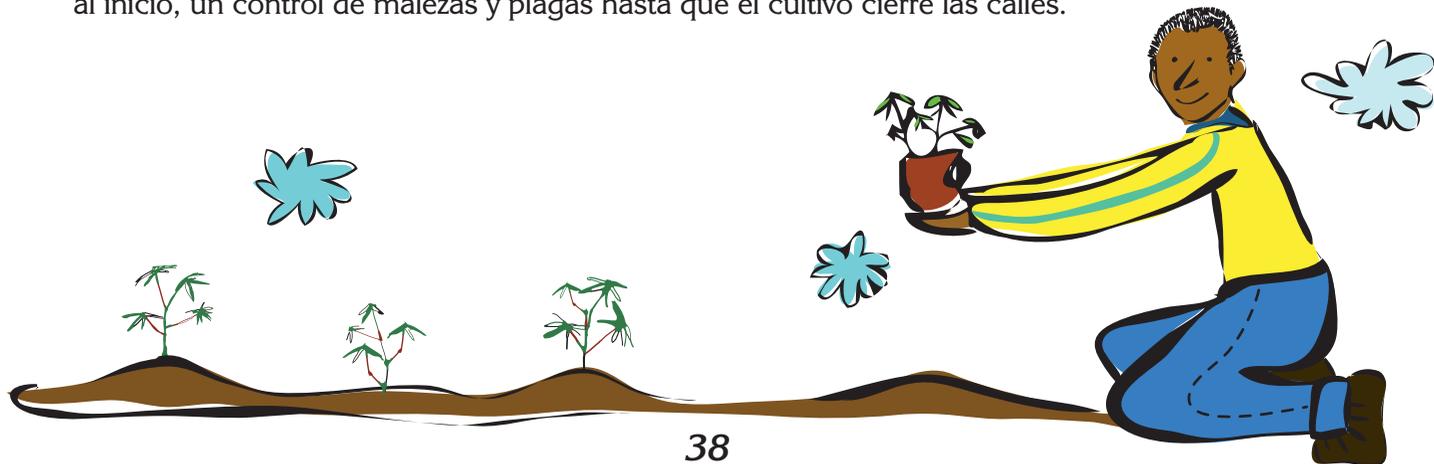




Lleve a cada hueco una planta en su bolsa, rómpala con cuidado y traslade suavemente el cepellón (tierra agrupada alrededor de la raíz de la planta) al hueco y aprisione bien (recuerde que si queda aire en la base de la planta ésta muy probablemente va a morir). Estas plantas son más fuertes, así que pueden resistir que se pise el suelo a su alrededor para compactarlo y asegurar que hay buen contacto del lote al cepellón.

Riegue nuevamente planta a planta con un regadera y siga controlando en el lote la aparición de arvenses (malezas) e insectos trozadores (grillos y hormigas). Estas plantas necesitan un riego aproximadamente en el primer mes, con frecuencia de día de por medio, al menos la primera semana (por esto es mejor hacerlo en épocas de lluvias natural) hasta su total prendimiento.

Una vez la planta ha pegado bien en el campo, se comienza a manejar como una planta propagada por estacas. Establezca un plan de manejo del lote donde se incluya una fertilización al inicio, un control de malezas y plagas hasta que el cultivo cierre las calles.



Referencias Bibliográficas

- Escobar, R.H.; Hernández, C.M.; Larrahondo, N.; Ospina, G.; Restrepo, J.; Muñoz, L.; Tohme, J.; Roca, W.M. 2006. Tissue culture for farmers: Participatory adaptation of low-input cassava propagation in Colombia. *Exp. Agric.* 42:103–120.
- Escobar-Pérez, R.H.; Escobar, F.; Gallego, G.J.; Cortés, D.F.; Chávez, A.L.; Bohórquez, A.; Caicedo, A.L.; Soto, M.; Narváez, A.S.; Lozano, E.; Lugo, J.; Tohme, J. 2004. La biotecnología en el salón de clases: Documento de trabajo para docentes de secundaria. Versión 1 [CD-ROM]. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. 1 CD.
- Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Roca, W.M. 1984. Cassava. In: Sharp, W.R.; Evans, D.A.; Ammirato, P.; Yamada, Y. (eds.) *Handbook of plant cell culture crop: species.* Macmillan Publishing Co, Nueva York. v.2, p 269–301.
- Roca, W.M.; Rodríguez, J.A.; Mafla, G.; Roa, J. 1984. Procedures for recovering cassava clones distributed *in vitro*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. 8 p.





Anexo 1. Composición de medio basal de cultivo MS (1962) y ajuste para la preparación de soluciones concentradas de trabajo.

Solución No. 1	Cantidad (g)
NH_4NO_3	16,5
KNO_3	19
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3,7
KH_2PO_4	1,7
Disolver en	200 mL

Solución No. 2	Cantidad (g)
H_3BO_3	0,62
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,69
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,86
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,0025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,0025
KI	0,083
Disolver en	100 mL

Solución No. 3	Cantidad (g)
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	14,667
Disolver en	100 mL

Solución No. 4	Cantidad (g)
Na_2EDTA	1,492
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,114
Disolver en	200 mL

Para la preparación de cada solución, pese cada uno de los productos y, en conjunto, disuélvalos bien en la cantidad de agua indicada para cada caso: 200, 100, 100 y 200 mL, respectivamente. Almacenar las soluciones en una nevera a 4 °C.

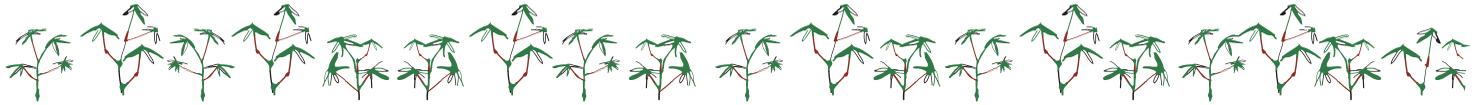
La **solución No. 4** debe almacenarse en un recipiente oscuro o cubrirse con papel aluminio. Para su preparación deben disolverse por separado cada uno de los componentes, calentarlos un poco y al final mezclarlos.

Anexo 1A. Cantidad de solución (mL) necesaria para preparar 1 L de medio de cultivo MS.

Solución (No.)	Volumen (mL)
1	20
2	1
3	3
4	5



El cultivo in vitro: Otra manera de propagar la yuca



Y ahora, a seguir trabajando el lote hasta
obtener una buena cosecha!

Publicación CIAT No. 376
Área de Investigación en Agrobiodiversidad
y
Comunicaciones Corporativas

Edición técnica: Eduardo Figueroa

Edición de producción: Claudia Marcela Calderón

Diseño y diagramación: Paola Gómez

ISBN 978-958-694-111-2