



Genebank - propagación *in vitro* de papa y camote

CIP – SOP056

Procedimientos operativos estandar

Febrero 2020

Reference: Vollmer, R.; Panta, A.; Solis, R; Manrique, N. and Anglin, N.L. 2020. Propagación *in vitro* de papa y camote.

CIP – SOP056 V 3.0 - 14 p.

Febrero 6, 2020

No para distribución general.

Para la versión más actual, por favor contacte a Rainer Vollmer (r.vollmer@cgiar.org)

El CIP agradece a los donantes y organizaciones que apoyan globalmente su trabajo a través de sus contribuciones al Fondo Fiduciario del CGIAR:
www.cgiar.org/funders



Esta publicación está registrada por el Centro Internacional de la Papa (CIP). Está licenciada para su uso bajo la Licencia Internacional de Atribución 4.0 de Creative Commons

Contenido

Introducción.....	4
Alcance.....	4
Seguridad.....	4
Materiales.....	5
Procedimiento.....	6
Control de calidad interno.....	12
Historial de revision.....	13
Referencias.....	13

Introducción

El banco de germoplasma del Centro Internacional de la Papa (CIP) conserva la diversidad de papa, camote y nueve especies cultivadas de raíces y tubérculos Andinos (RTA). La mayoría de estas especies generalmente son alógamas, lo que significa que los rasgos específicos de cada accesión solo pueden mantenerse si el banco de germoplasma conserva un clon en lugar de semillas. El proceso de eliminar patógenos del material vegetal es bastante laborioso y costoso; por lo tanto, la conservación *in vitro* permite que el banco de germoplasma garantice que una vez que el material esté limpio de enfermedades, se mantenga en ese estado a largo plazo. Debido a que distribuimos germoplasma a nivel mundial, es fundamental que el banco de germoplasma solo distribuya material vegetal libre de enfermedades. El cultivo de tejidos ofrece la única alternativa segura para la conservación del material clonal. Usando técnicas de cultivo de tejidos, las plantas se cultivan en condiciones estériles y controladas. El siguiente protocolo explica la técnica de propagación de plantas *in vitro*, también conocida como micropropagación, que se basa en el principio de que las condiciones de cultivo apropiadas inducen el crecimiento de yemas terminales o axilares preexistentes, lo que resulta en una nueva plántula. Las condiciones nutricionales y hormonales del medio de cultivo rompen la latencia de la yema y promueven su rápido crecimiento. Se debe evitar la formación de callos, seguida de la regeneración de brotes, ya que puede afectar la integridad genética del clon al producir mutaciones somaclonales. Siguiendo el protocolo operativo estándar (SOP056) descrito a continuación, las plántulas en crecimiento activo se multiplican aproximadamente cada 3-6 semanas. Este protocolo se aplica en diferentes áreas del banco de germoplasma del CIP, como la distribución de material *in vitro*, la conservación *in vitro*, la crioconservación y las actividades fitosanitarias.

Alcance

Este procedimiento describe la multiplicación de germoplasma *in vitro* de papa y camote para la distribución internacional, nacional y dentro del CIP, así como para actividades de conservación *in vitro*, fitosanidad y crioconservación.

Seguridad

1. Siga las buenas prácticas de laboratorio durante las actividades *in vitro*, incluyendo la preparación y esterilización del material, limpieza y desinfección del área de trabajo, así como otras acciones de control (como se describe en **RD017**).
2. Siga las pautas estándar de Salud y Seguridad.
3. Se debe vestir una bata de laboratorio limpia durante todas las actividades dentro del laboratorio *in vitro*.
4. Vestir lentes de seguridad, gorro y mascarilla quirúrgicos cuando trabaje en la cámara de flujo laminar.
5. Esterilice las herramientas por 20-30 segundos en el esterilizador de perlas de vidrio para evitar quemaduras en los dedos.
6. Para evitar accidentes de corte, el filo del bisturí debe orientarse en la dirección opuesta de la persona durante su instalación y desinstalación. La manipulación debe hacerse suavemente, sin aplicar mucha fuerza o presión.

Materiales

Equipos	
Autoclave	Esterilizador de perlas de vidrio
Cámara de flujo laminar	Impresora para códigos de barra
Carro de laboratorio	Máquina de termosellado
Computadora de escritorio	Refrigeradora
Computadora Personal de Bolsillo (pocket PC en inglés)	Registrador de datos para el monitoreo de condiciones ambientales (HOBO®)
Cuartos de crecimiento para plantas: (Papa: 20±2 °C, Camote: 24±2 °C)	Sistema de control ambiental (SITRAD®)
Escáner para códigos de barra	Termómetro Max/Min
Otros materiales	
Alcohol en gel	Mangas de esterilización (ancho: 30 cm)
Cuchilla No. 10	Mango de bisturí
Envoltura de plástico (Saran wrap)	Mascarilla quirúrgica
Etiquetas de código de barra	Pinzas para cultivo de tejido (de punta fina, 23 cm)
Gorro quirúrgico	Piseta con alcohol (70%)
Gradillas para tubos de ensayo / magentas GA7	Portaherramientas esterilizado
Hojas de papel esterilizadas (tamaño: A5)	Tapas para tubos de ensayo
Lentes de seguridad	Toallitas antibacteriales
Magentas GA7	Tubos de ensayo de vidrio (13x100 mm, 16x125 mm, 18x150 mm y 25x150 mm)
Mandil de laboratorio	
Químicos	
Alcohol (70%)	Medios de cultivo (MSA, MPB, MRB) (Tablas 1a, b)

Procedimiento

1. Encienda la cámara de flujo laminar y el esterilizador de perlas de vidrio. Espere 15-30 minutos hasta que el esterilizador haya alcanzado su temperatura de funcionamiento correcta de 250 °C. Con una toallita antibacteriana humedecida con alcohol (70%), limpie la superficie de trabajo y las paredes laterales y de fondo de la cámara de flujo (ver **RD017**). Coloque los siguientes materiales dentro de la cámara de flujo laminar: porta herramientas esterilizado (*), hojas de papel esterilizadas (tamaño: A5) (*), mango de bisturí con cuchilla No.10, pinzas largas de cultivo de tejidos (23 cm) y una piseta con alcohol (70%). Esterilizar pinzas y mango de bisturí. Monte las cuchillas en los mangos de bisturí.

(*) Los portaherramientas y las hojas de papel se esterilizan en autoclave dentro de fundas de esterilización (que se sellaron antes de esterilizar en autoclave). Seleccione el programa de esterilización por calor seco de la autoclave para esterilizar este material.

2. Usando un carro de laboratorio, transfiera la gradilla que contiene las accesiones a multiplicar desde el cuarto de crecimiento activo al cuarto de transferencia. Usando una computadora de escritorio, obtenga la lista de accesiones a procesar de la base de datos de cultivo de tejidos e imprima el número requerido de etiquetas usando la impresora de código de barras. (El propósito de la propagación determina el número de envases que se necesita propagar). La información que debe registrarse en la base de datos y que figura en la etiqueta del código de barras(**) varía según las actividades. Para registrar información en la base de datos, lea la etiqueta de la accesión con un escáner de código de barras o una computadora de bolsillo (pocket PC).

(**) Por ejemplo: identificadores de accesión (número CIP o código de laboratorio), fecha de propagación, estado de sanidad, nombre de la persona que ha propagado las plantas, identificador de objeto digital de la accesión (DOI), nombre del cultivar, etc.

3. Procese las accesiones *in vitro* por separado, propagando solo una accesión a la vez. Con unas pinzas esterilizadas, saque las plántulas del recipiente *in vitro* y colóquelas encima de una pila de 3 a 5 hojas de papel estériles (tamaño A5) (**Fig. 1a, b**).

4. Usando un mango de bisturí esterilizado con cuchilla No. 10, retire el ápice, las hojas y las raíces de las plantas (**Fig. 1c**) y corte el tallo en varios segmentos (o explantes) de aproximadamente 1-1.5 cm cada uno, con una a dos yemas por segmento (**Fig. 1d**). Si la distancia entre los nudos es muy corta o si se desea un crecimiento más rápido, es recomendable cortar segmentos del tallo con dos yemas. La distancia internodal varía según el genotipo y la edad de la planta.

5. El número de segmentos de tallo que se colocan por envase depende de la especie vegetal, y el tipo y tamaño del envase (**Fig. 2**).

- **Papa:** Coloque dos explantes por tubo de ensayo de 13x100 mm (para distribución nacional e internacional), cuatro explantes por tubo de 16x125 mm (para subcultivo para conservación *in vitro*), cuatro a seis explantes por tubo de 25x150 y 16-25 explantes por magenta GA7 (para multiplicación *in vitro*). Coloque los explantes en medio de propagación MSA esterilizado (**Tabla 1a**), con la yema dirigida hacia arriba (**Fig. 1e, f**).
- **Camote:** Coloque un explante por tubo de ensayo de 13x100 mm (para distribución nacional e internacional), dos explantes por tubo de 18x150 mm (para subcultivo para conservación *in vitro*), uno a dos explantes por tubo de 25x150 mm y cinco a seis explantes por magenta GA7 (para multiplicación *in vitro*). Coloque los explantes en medio de propagación MPB o MRB esterilizado (**Tabla 1b**).

Para mayores detalles sobre la preparación de medios de cultivo, ver **RD008 - Preparación de medios de cultivo**.

6. Tape y selle los tubos o magentas GA7 con envoltura plástica (Saran wrap®) y etiquete correctamente (**). Si se requiere lograr un crecimiento acelerado de la planta *in vitro*, selle los recipientes con una sola

capa de película plástica (para un mejor intercambio de gases) o no selle en absoluto. Deseche la pila de hojas de papel y el tejido vegetal restante después de la multiplicación de cada accesión. Use una nueva pila de hojas de papel estéril para cada accesión. Después de la propagación de cada accesión, esterilice las pinzas y bisturís durante 20-30 segundos en el esterilizador de perlas de vidrio. Limpie las manos periódicamente con alcohol en gel. Después de cada accesión procesada, limpie la superficie de trabajo de la cámara de flujo laminar con una toallita antibacteriana humedecida con alcohol (70%).

(***) Para etiquetar los tubos de ensayo, primero pegue la etiqueta en la envoltura plástica y luego etiquete el recipiente con ella. Esto evita que la etiqueta se pegue directamente en el envase y su posterior eliminación es simple. Pegar la etiqueta del recipiente original en el tubo de ensayo al que se transfiere el material, como una etiqueta de control, junto con la etiqueta nueva recién impresa. Esto ayuda a rastrear el etiquetado correcto en cada ciclo de multiplicación.

7. Verifique que el etiquetado es correcto inmediatamente después de la propagación de cada accesión. Los tubos de la misma accesión deben etiquetarse con números de accesión idénticos (para conservación *in vitro*: actualice el número de envases propagados en la base de datos). Transfiera los cultivos propagados *in vitro* al cuarto de crecimiento activo de plantas. Las condiciones ambientales difieren entre las cámaras de crecimiento dependiendo de la especie:

- Papa: temperatura de 20 ± 2 °C (****), fotoperíodo de 16h/8h (luz/oscuridad), intensidad de luz de 85 ± 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{seg}^{-1}$, proporcionada por tubos fluorescente de luz fría.
- Camote: temperatura de 24 ± 2 °C (****), fotoperíodo de 16h/8h (luz/oscuridad), intensidad de luz de 85 ± 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{seg}^{-1}$, proporcionada por tubos fluorescente de luz fría.

(****) La temperatura de los cuartos de crecimiento se monitorea utilizando tres métodos independientes: (a) Sistema de monitoreo ambiental (SITRAD®) (registrado automáticamente), (b) registrador de datos (HOBO®) (registrado automáticamente), (c) Termómetro Max/Min (registrado manualmente). Para detalles sobre el monitoreo de las condiciones ambientales, ver **RD003 - Monitoreo del medio ambiente**.

8. Cinco a ocho días después de la propagación, evalúe las plántulas visualmente. Registre y/o actualice los datos de evaluación en la base de datos. Si una accesión muestra signos de contaminación, se descarta, se esteriliza en autoclave y se vuelve a procesar.

9. 12-16 días después de la propagación, evalúe visualmente el enraizamiento y el crecimiento de las plántulas, y registre los resultados en la base de datos. Las accesiones con crecimiento y/o enraizamiento pobre o malo se descartan, se esterilizan en la autoclave y se procesan nuevamente.

10. Distribución de germoplasma: el día del embalaje del material para su entrega a un cliente, realice un control de calidad visual de las plantas. Registre los datos de evaluación en la base de datos. Las plántulas *in vitro* de papa y camote que muestran un crecimiento “bueno” son enviadas a la oficina de distribución (para distribución nacional e internacional) o directamente al cliente (distribución interna del CIP). Las plántulas de papa y camote se empaquetan para la entrega de tres a cinco y cuatro a seis semanas después de su propagación, respectivamente. Ocasionalmente, se envían plantas *in vitro* de seis a ocho semanas de edad a los solicitantes. Para conservación *in vitro* seguir los flujos de trabajo de los procedimientos operacionales estándar CIP – SOP025 (papa) y CIP- SOP026 (camote). Para mayores detalles sobre la distribución de material *in vitro*, consulte SOP072 - Distribución de Recursos Genéticos del CIP y SOP068 - Distribución de material *in vitro*.

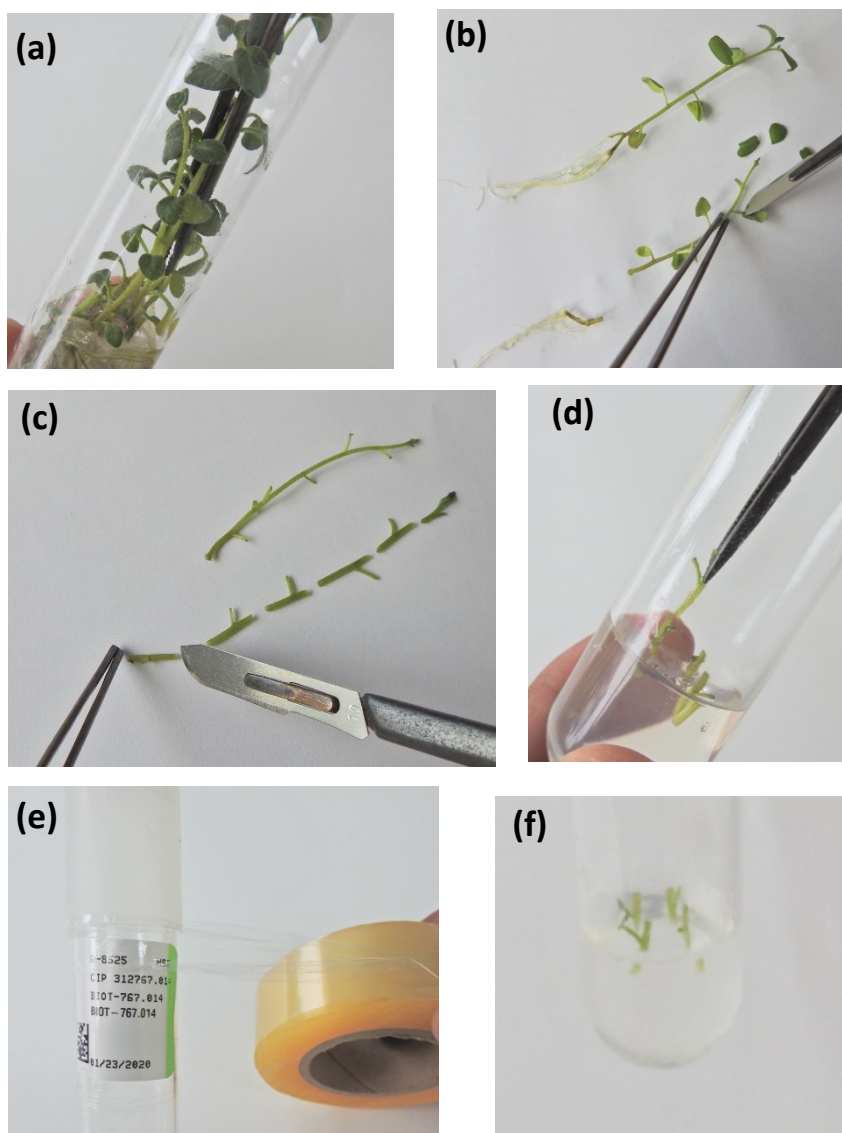


Fig. 1 Propagación *in vitro* de papa y camote. **(a)** Retire las plantas madre del tubo de ensayo (usando pinzas largas de cultivo de tejidos); **(b)** retire el ápice, las hojas y las raíces usando cuchilla No.10 y pinzas (trabajando encima de una pila de 3-5 hojas de papel esterilizado) y; **(c)** corte el tallo en segmentos (con uno a dos yemas por segmento ¹); **(d)** coloque los segmentos en medio de cultivo esterilizado [papa: medio MSA, camote: MPB (para distribución) o medio MRB (para conservación *in vitro*)]; para distribución coloque dos (camote) o cuatro a seis (papa) segmentos por tubo de ensayo de 25x150 mm; para conservación *in vitro* coloque dos explantes por tubo de ensayo de 18x150 mm (camote) y cuatro explantes por tubo de ensayo de 16x125 (papa); **(e)** tape el tubo de ensayo, selle con una envoltura de plástico y etiquete, utilizando tanto la etiqueta de código de barra original como la nueva; **(f)** cultivo en tubo de ensayo de 25x150 mm recientemente propagado, conteniendo cuatro explantes (papa).

¹ Si la distancia entre nudos es muy corta, o si se desea obtener un crecimiento más rápido, es recomendable cortar los segmentos del tallo con dos yemas.

Tipo de envase	Número de explantes por envase	
	Papa	Camote
 <p>Tubo de ensayo de 25x150 mm (distribución)</p>	4-6	1-2
 <p>Tubo de ensayo de 13x100 mm (distribución)</p>	2	1
 <p>Tubo de ensayo de 16x125 mm (conservación <i>in vitro</i>)</p>	4	-
 <p>Tubo de ensayo de 18x150 mm (conservación <i>in vitro</i>)</p>	-	2
 <p>Magenta GA7[®] (distribución)</p>	16-25	5-6

Fig. 2. Propagación *in vitro* de papa y camote. Tipos de envases y número de plántulas por envase.

Tabla 1a. Composición del medio de cultivo MSA para la propagación *in vitro* de papa

Componentes	Proveedor	Número de catálogo	Cantidad	Condiciones de almacenamiento ⁽²⁾
Sales MS ⁽¹⁾	CAISSON	MSP01	4.33 g/l	Almacenar en una refrigeradora a 5±3 °C. Higroscópico.
Ácido giberélico	SIGMA	G7645	0.1 mg/l	Almacenar a temperatura ambiental (22±3 °C). Conservar contenedor bien cerrado en un lugar seco y bien ventilado.
Glicina-HCl	SIGMA	G2879	2 mg/l	Almacenar a temperatura ambiental (22±3 °C). Conservar contenedor bien cerrado en un lugar seco y bien ventilado.
Mio-inositol	SIGMA	I5125	100 mg/l	Almacenar a temperatura ambiental (22±3 °C). Conservar contenedor bien cerrado en un lugar seco y bien ventilado.
Ácido nicotínico	SIGMA	N0765	0.5 mg/l	Almacenar a temperatura ambiental (22±3 °C). Conservar contenedor bien cerrado en un lugar seco y bien ventilado. Sensible a la luz.
Piridoxina-HCl	SIGMA	P8666	0.5 mg/l	Almacenar a temperatura ambiental (22±3 °C). Conservar contenedor bien cerrado en un lugar seco y bien ventilado.
Tiamina-HCl	SIGMA	T4625	0.1 mg/l	Almacenar a temperatura ambiental (22±3 °C). Conservar contenedor bien cerrado en un lugar seco y bien ventilado. Higroscópico. Sensible a la luz.
Sacarosa	SIGMA	S8501	25 g/l	Almacenar a temperatura ambiental (22±3 °C). Conservar contenedor bien cerrado en un lugar seco y bien ventilado.
Agar	SIGMA	A7002	6.5 g/l	Almacenar a temperatura ambiental (22±3 °C). Conservar contenedor bien cerrado en un lugar seco y bien ventilado. Sensible a la humedad.
pH = 5.60 ± 0.02				

⁽¹⁾ Sales Basales de Murashige y Skoog (1962)

⁽²⁾ De acuerdo con lo indicado en la ficha de datos de seguridad (MSDS sigla en inglés)

Tabla 1b. Composición de medios de cultivo de propagación *in vitro* de camote (distribución: medio MPB; conservación *in vitro*: medio MRB).

Componentes	Proveedor	Número de catálogo	Cantidad (MPB ⁽¹⁾)	Cantidad (MRB ⁽²⁾)	Condiciones de almacenamiento ⁽³⁾
Sales MS ⁽⁴⁾	CAISSON	MSP01	4.33 g/l	4.33 g/l	Almacenar en una refrigeradora a 5±3 °C. Higroscópico.
Ácido giberélico	SIGMA	G7645	10 mg/l	-	Almacenar a temperatura ambiental (22±3 °C). Conservar contenedor bien cerrado en un lugar seco y bien ventilado.
Ácido ascórbico	SIGMA	A7506	200 mg/l	200 mg/l	Almacenar a temperatura ambiental (22±3 °C). Conservar contenedor bien cerrado en un lugar seco y bien ventilado. Sensible a la luz.
Nitrato de calcio	FISHER	C109	100 mg/l	100 mg/l	Almacenar a temperatura ambiental (22±3 °C). No almacenar cerca de materiales combustibles. Conservar contenedor bien cerrado en un lugar seco y bien ventilado. Altamente sensible a la humedad.
Pantotenato de calcio	SIGMA	P5155	2 mg/l	2 mg/l	Almacenar en una refrigeradora a 5±3 °C. Conservar contenedor bien cerrado. Sensible al calor.
L-Arginina	SIGMA	A8094	100 mg/l	100 mg/l	Almacenar a temperatura ambiental (22±3 °C). Conservar contenedor bien cerrado en un lugar seco y bien ventilado.
Putrescina-HCl	SIGMA	P5780	20 mg/l	20 mg/l	Almacenar a temperatura ambiental (22±3 °C). Conservar contenedor bien cerrado en un lugar seco y bien ventilado. Almacenar bajo gas inerte.
Sacarosa	SIGMA	S8501	30 g/l	30 g/l	Almacenar a temperatura ambiental (22±3 °C). Conservar contenedor bien cerrado en un lugar seco y bien ventilado.
Agar	SIGMA	A7002	6.0 g/l	3.5 g/l	Almacenar a temperatura ambiental (22±3 °C). Conservar contenedor bien cerrado en un lugar seco y bien ventilado. Sensible a la humedad.
Phytigel	SIGMA	P8169	-	1.5 g/l	Almacenar a temperatura ambiental (22±3 °C). Conservar contenedor bien cerrado en un lugar seco y bien ventilado. Sensible a la humedad.
pH = 5.70 ± 0.02					

⁽¹⁾ Para distribución⁽²⁾ Para conservación *in vitro*⁽³⁾ De acuerdo con lo indicado en la ficha de datos de seguridad (MSDS)⁽⁴⁾ Sales Basales de Murashige y Skoog (1962)

Control de calidad interno

- 1.** Para cada distribución nacional / internacional / interna del CIP, antes de la entrega, se llena una lista de verificación de calidad. El documento contiene información sobre la identificación y el etiquetado correctos de las accesiones, el crecimiento, el enraizamiento y el aspecto general de las plantas, y la ausencia de contaminación.
- 2.** Los tubos de ensayo se identifican con etiquetas de código de barras. Para garantizar que los tubos de ensayo de una misma accesión estén etiquetados de manera idéntica, la coincidencia entre las etiquetas originales y las nuevas se valida en la actividad de conservación *in vitro* utilizando una PC de bolsillo (en cada ciclo de propagación).
- 3.** El material propagado se inspecciona visualmente para confirmar la ausencia de signos de contaminación microbiana: una semana después de la propagación e inmediatamente antes del empaque y entrega (para distribución), y una y tres semanas después de la propagación (para conservación *in vitro*).
- 4.** Notificación automática por correo electrónico, siete días antes de que las accesiones estén listas para ser entregadas a la oficina de distribución o al cliente (solamente para la distribución interna del CIP).
- 5.** Distribución internacional y nacional: preparación de un tubo de respaldo para las accesiones solicitadas. Los tubos de respaldo se almacenan por tres a cuatro meses o hasta que se soliciten las accesiones en una nueva orden.
- 6.** Para distribución internacional, las plántulas *in vitro* son inspeccionadas por un representante del Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA) antes de su envío, para que se pueda emitir un certificado fitosanitario.
- 7.** La fecha de caducidad de los reactivos se verifica antes de preparar los medios de cultivo.
- 8.** Para verificar que se cumple el estándar de acreditación ISO-17025, el protocolo se audita al menos dos veces al año, tanto por auditores internos como externos (UKAS).

Historial de revision

Fecha	Versión #	Descripción	Editor
2008	V1 para papa y camote	Primera versión, dos SOPs separados (SOP056: papa, SOP059: camote) publicado en la página web del ISO en el primer año de la acreditación ISO 17025.	
2015	V2	Segunda versión, SOP056 y SOP059 se juntaron en un solo procedimiento (SOP056). El documento nuevo ha sido revisado y aprobado por el líder del banco de germoplasma.	
2020	V3	Versión actual. La calidad del protocolo ha sido enriquecida sustancialmente con información adicional y fotos.	
Este documento se revisa y actualiza anualmente.			

Referencias

Murashige T & Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-97

Documentos internos del Banco de germoplasma del CIP, identificados como RD y procedimientos operacionales estándar (actualmente no disponibles al público general) RD003, RD008, RD017, SOP025, SOP026, SOP068 and SOP072.

El CIP es una organización de investigación para el desarrollo dedicada a la papa, el camote y las raíces y tubérculos andinos. Ofrece soluciones científicas innovadoras para mejorar el acceso a alimentos nutritivos asequibles, fomentar el crecimiento sostenible e inclusivo de empresas y empleos, e impulsar la resiliencia climática de los sistemas agroalimentarios de raíces y tubérculos. Con sede en Lima, Perú, el CIP realiza investigación en más de 20 países en África, Asia y América Latina.

www.cipotato.org

El CIP es un centro de investigación del CGIAR.

El CGIAR es una asociación mundial de investigación para un futuro con seguridad alimentaria. Su ciencia es llevada a la práctica por 15 centros de investigación en estrecha colaboración con cientos de socios en todo el mundo.

www.cgiar.org

Para más información, por favor contactar la sede principal del CIP. Av. La Molina 1895, La Molina. Apartado 1558, Lima 12, Perú.

 +51 1 3496017  cip-cpad@cgiar.org  www.cipotato.org |  [@cipotato](https://www.facebook.com/cipotato)  [@Cipotato](https://twitter.com/Cipotato)  [@cip_cipotato](https://www.instagram.com/cip_cipotato)
