



**CIP**  
INTERNATIONAL  
POTATO CENTER



**KoLFACI**  
KOREA - LATIN AMERICA  
FOOD & AGRICULTURE  
COOPERATION INITIATIVE



CURSO DE CAPACITACIÓN:

# MANEJO INTEGRADO DEL CULTIVO DE LA PAPA

## Propagación *in vitro* de papa

M.Sc. Rainer Vollmer

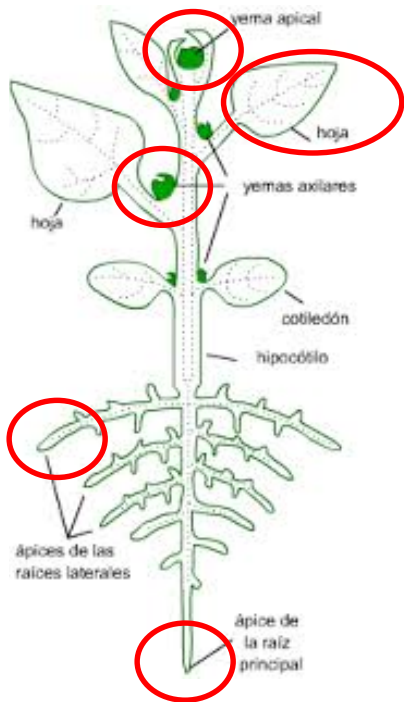
Lima, Perú Fecha Abril 2019

# Contenido

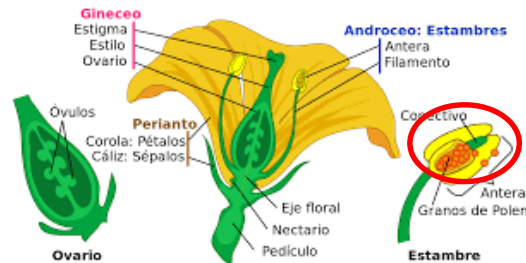
1. Principios
2. Medios de cultivo
3. Técnica de propagación in vitro
4. Aplicaciones

# 1. Principios

La propagación in vitro consiste en tomar una porción de una planta y colocarla en un medio nutritivo estéril donde se regenerará una o muchas plantas.



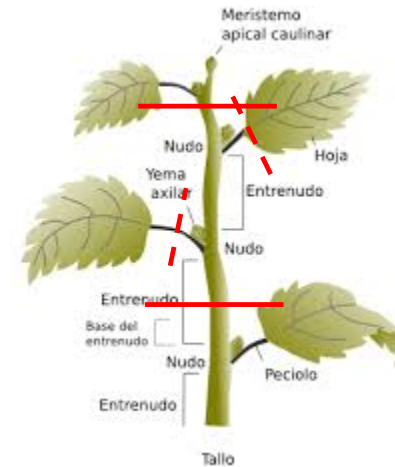
<http://www.biologia.edu.ar/botanica/tema10/10-2mprimario.htm>



<https://es.wikipedia.org/wiki/Androceo>



[http://www7.uc.cl/sw\\_educ/cultivos/papa/frutos.htm](http://www7.uc.cl/sw_educ/cultivos/papa/frutos.htm)



<https://www.educaycrea.com/2014/06/el-tallopartesclasificacion-y-funciones/>

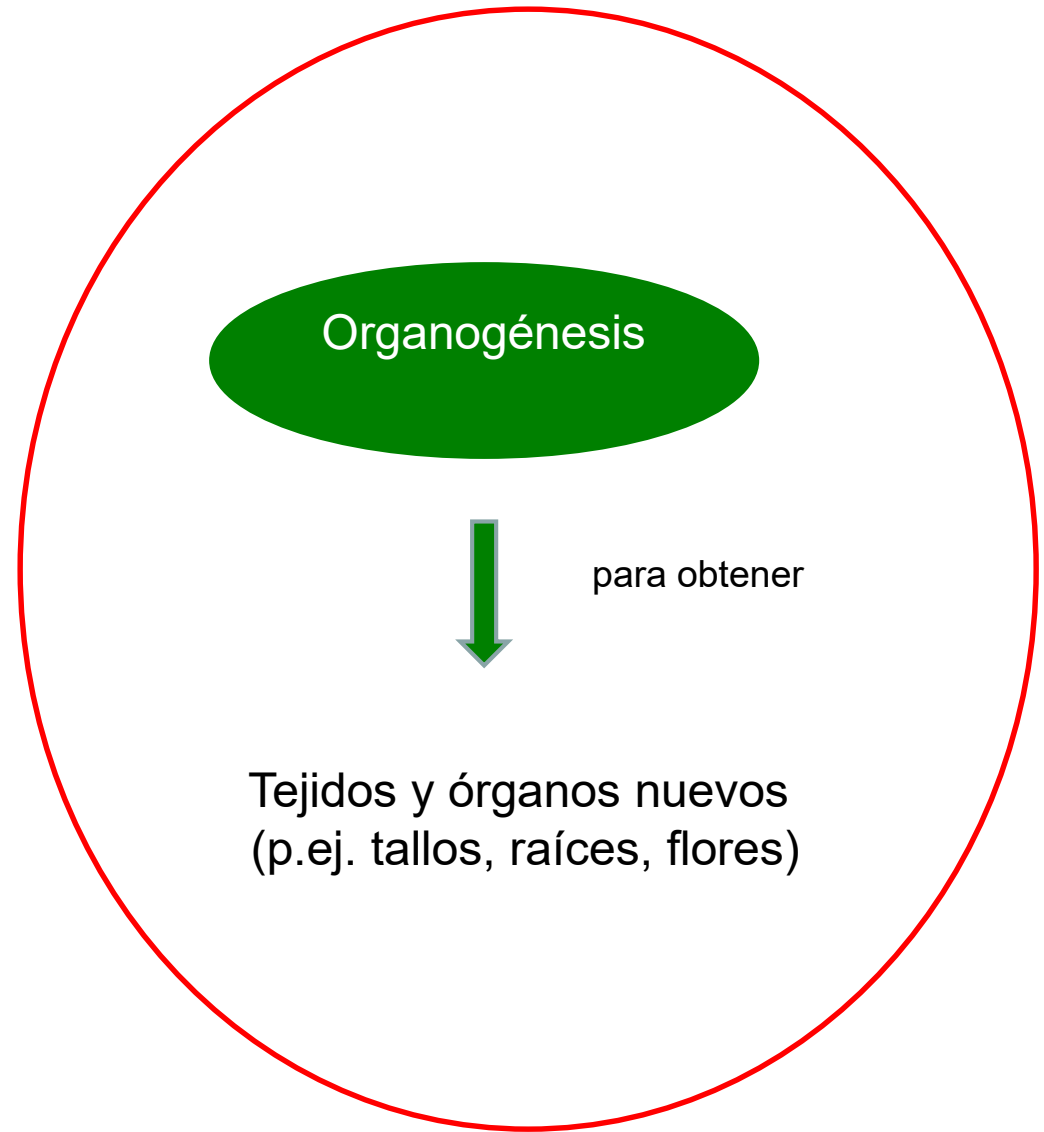
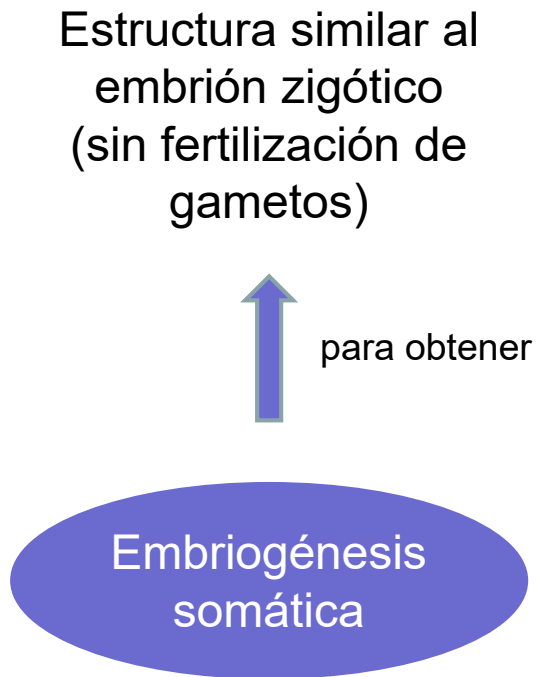
# 1. Principios

La totipotencialidad celular fue enunciada como teoría por **Gottlieb Haberlandt en 1902**, quien propuso que todas las células vegetales tienen la capacidad de regenerar plantas completas.

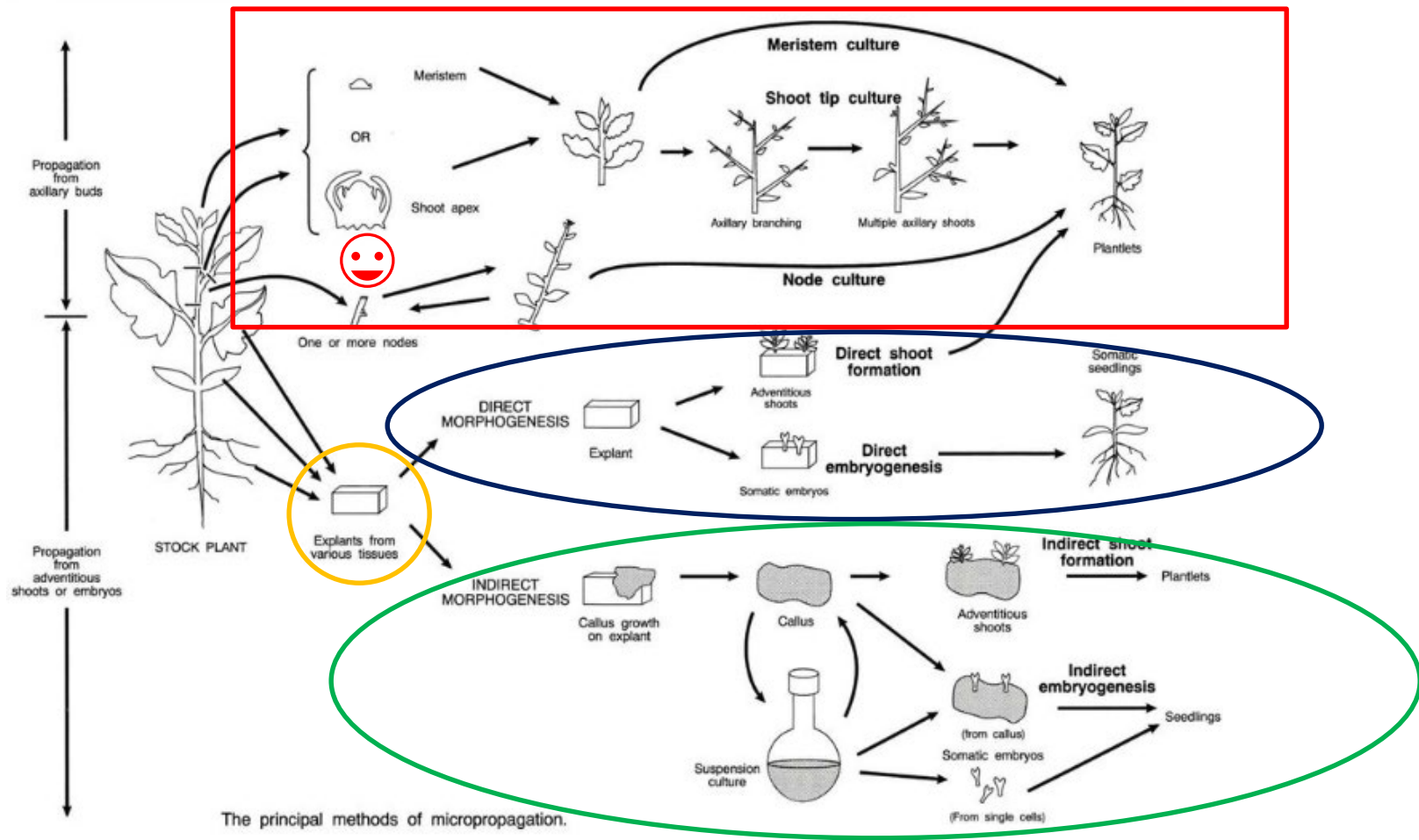


<http://cv.udl.cat/cursos/76304/t1/t1.htm>

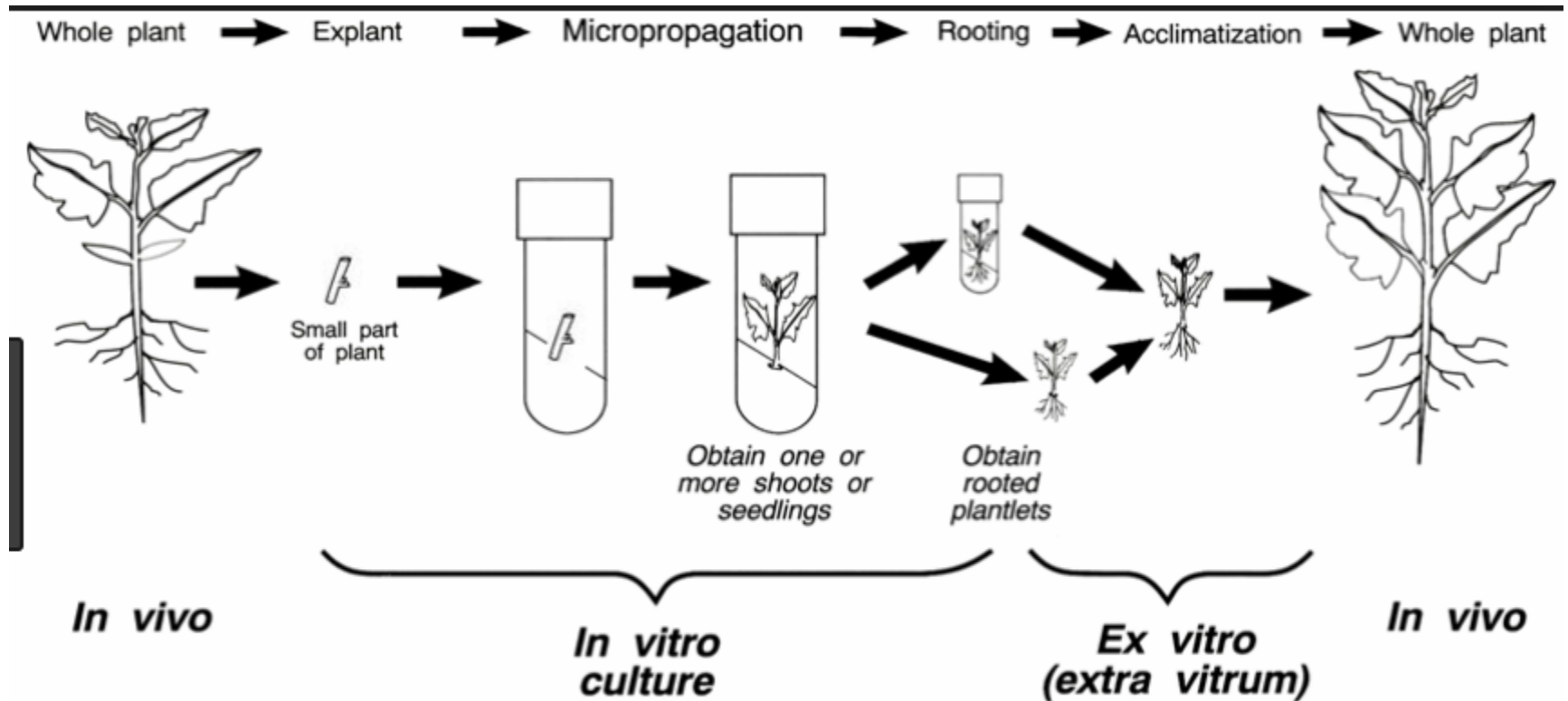
# 1. Principios



# 1. Principios



# 1. Principios



Fuente: Lindsey & Jones (1989). Plant Biotechnology in Agriculture.

# 1. Principios

Etapa	Descripción
0	Desinfección de las yemas / semillas de la planta
I	Introducción a in vitro
II	Multiplicación
III	Enraizamiento
IV	Aclimatación

Pero “echamos un pequeño vistazo”

Objetivo de la presentación

# 1. Principios

Etapa	Descripción
0	Desinfección de las yemas / semillas de la planta
I	Introducción a in vitro



Paso	Descripción
1	Cortar segmentos de tallo de papa (con 2 nudos) y tratar con una mezcla de fungicida y acaricida (+3 gotas de Tween) por 10 min.
2	Enjuagar 3 veces con agua de caño.
3	Enjuagar con alcohol (70%) por 30-60 segundos.
4	Tratar con solución de hipoclorito de sodio (2 a 2.5%) por 10-15 minutos.
5	Enjuagar 5 veces con agua estéril (agitar fuertemente).
6	Añadir solución estéril de MS + ácido ascórbico (10 mg/L).
7	Remover tejido blanqueado .
8	Colocar segmentos de tallo en medio de cultivo de introducción.

## 2. Medios de cultivo

Es una solución líquida o gelatinosa que contiene los nutrientes necesarios para permitir, en condiciones favorables de pH, temperatura y fotoperiodo, el crecimiento de tejidos vegetales y pequeñas plantas.

Fuente de carbono

Nutrientes minerales

Vitaminas

Agente gelificante  
(en caso de medios semisólidos)

Sustancias reguladoras del crecimiento

Otros compuestos

Macronutrientes

Micronutrientes

## 2. Medios de cultivo



T. Murashige



F. Skoog

Medio MS  
(Murashige & Skoog, 1962)

- Funciona bien con miles de especies
- Medio de cultivo más utilizado



Medio B5  
(Gamborg et al., 1968)



Medio White  
(White, 1943)

# 2. Medios de cultivo

Cuadro 2.2. Composición de cuatro medios básicos (MB) para el cultivo in vitro de tejidos.

Componentes	Contenidos en cada medio (mg/ litro) <sup>a</sup>			
	MS	B5	N6	Wh
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	—	—	—
KNO <sub>3</sub>	1900	2500	2830	80
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	—	400	—
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	440	150	166	—
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370	250	185	737
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	—	134	463	—
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	—	—	—	288
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	—	150	—	19
KCl	—	—	—	65
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	—	—	—	200
KI	0.83	0.75	0.80	0.75
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.20	3.00	1.60	1.50
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	—	10.00	—	—
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	22.30	—	4.40	6.65
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8.60	2.00	1.50	2.67
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.25	0.25	—	—
H <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	—	—	—	0.001
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.025	0.025	—	0.01
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	—	—	—	2.50
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27.80	27.80	27.85	—
Na <sub>2</sub> EDTA	37.30	37.30	37.25	—
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.025	0.025	—	—
Glicina	2.00	—	2.00	3.00
Tiamina-HCl	0.10	10.00	1.00	0.10
Piridoxina-HCl	0.50	1.00	0.50	0.10
Acido nicotínico	0.50	1.00	0.50	0.50
Mioinositol	100.00	100.00	—	100.00
Sacarosa	30,000	20,000	50,000	20,000
pH	5.7	5.5	5.8	5.5

Macronutrientes

Micronutrientes

Agente quelante

Aminoácido

Vitamina B1

Vitamina B6

Vitamina B3

Alcohol de azúcar

Fuente de Carbono: papa → 25 g

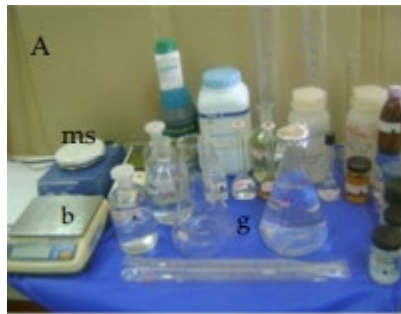
papa → pH: 5.6

+ Phytigel: 3 g/l (gelificante)

# 2. Medios de cultivo

## ANTES

Soluciones Stock

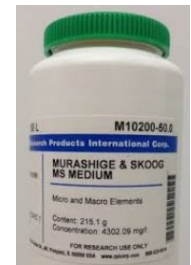


Fuente:

[http://cdn.intechopen.com/pdfs/40181/InTech-Plant\\_tissue\\_culture\\_media.pdf](http://cdn.intechopen.com/pdfs/40181/InTech-Plant_tissue_culture_media.pdf)

## AHORA

Todo en un solo frasco / sobre



Fuentes:

<https://www.caissonlabs.com>

<https://www.rpicorp.com>

<https://phytotechlab.com/home>

## 2. Medios de cultivo

Qué es más difícil?



vs.



# 2. Medios de cultivo

## Equipos críticos



Autoclave



Agitador magnético



Microonda



pH metro



Balanza analítica



Refrigeradora

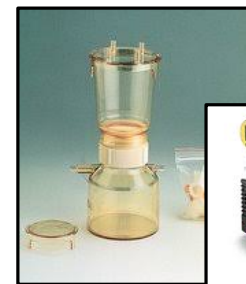


Destilador de agua

## Equipos opcionales



Bombas dispensadoras



Sistema de filtración en vacío

## 2. Medios de cultivo

Disolver 4.43 g de sales MS comerciales con vitaminas (CAISSON) en aprox. 600 mL de agua destilada-desionizada.

Agregar 25 g de sacarosa. Remover hasta el azúcar se ha disuelto completamente.

Enrasar a un volume de 1000 mL con agua destilada-desionizada.

Ajustar el pH con HCl (1N) y NaOH (1N) a  $5.60 \pm 0.02$ .

Agregar 3.0 g de Phytigel (SIGMA) y calentar en microonda por 10 minutos. Después de 7 minutos hacer una pausa y remover el medio.

Dispensar 9 mL de medio de cultivo por tubo de ensayo de 25x150 mm. Tapar tubos. Autoclavar por 20 minutos a  $121^\circ\text{C}$  (15 psi).

Dejar enfriar el medio de cultivo. Conservar bajo refrigeración a  $5 \pm 3^\circ\text{C}$  por un periodo máximo de 2 semanas

## 2. Medios de cultivo

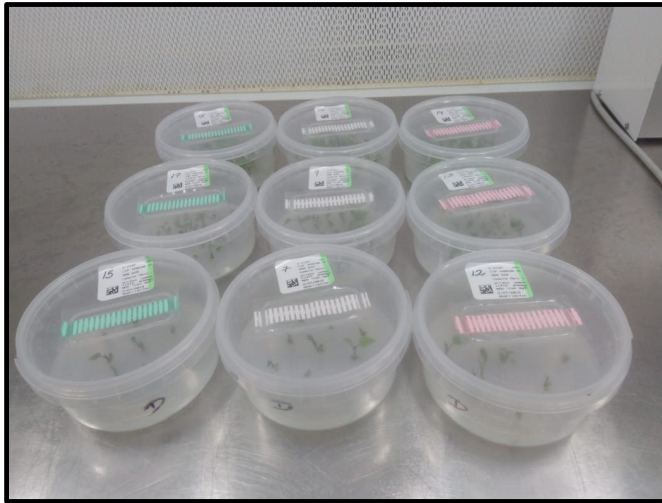
En el caso de magentas:

1. Limpiar magentas y tapas interna- y externamente con papel toalla antibacteriano, humedecido con alcohol (70%).
2. Autoclavar magentas tapadas (vacías) por 20 minutos a 121 °C (15 psi).
3. Preparar medio de cultivo y dispensar en botellas autoclavables (de 1 ó 2 litros).
4. Autoclavar medio de cultivo por 20 minutos a 121 °C (15 psi). Durante el proceso de autoclavado, la tapa de la botella colocar encima de la abertura, sin cerrar la tapa (para permitir el escape de vapor durante el autoclavado, de lo contrario podría explotar la botella).
5. Cuando ha terminado el proceso de autoclavado cerrar la tapa de la botella dentro de la autoclave (usando guantes protectoras y protector facial)
6. Transferir botella hacia la cámara de flujo laminar y dejar enfriar el medio de cultivo a una temperatura de aprox 35-40 °C.
7. Dispensar 45-50 mL de medio de cultivo por magenta. Tapar magentas.
8. Conservar bajo refrigeración a  $5 \pm 3$  °C por un periodo máximo de 2 semanas



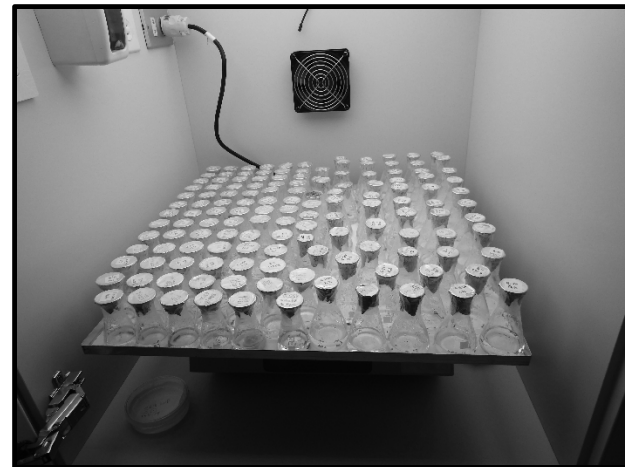
## 2. Medios de cultivo

Otros tipos de envases / medios de cultivo que utilizamos (en trabajos de investigación)



Envases con filtros HEPA  
que permiten variables tasas  
de intercambio gaseoso  
(Microbox de SacO<sub>2</sub>)

Medio líquido en agitación  
(80 rpm)

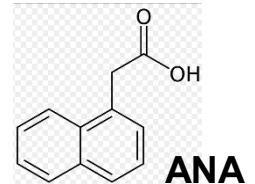
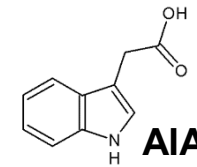
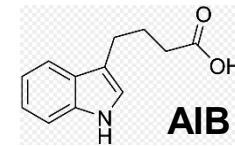


# 2. Medios de cultivo

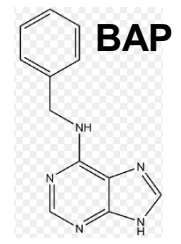
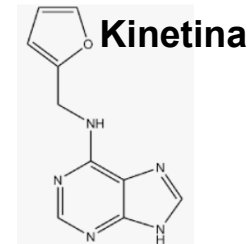
Algunos otros compuestos que pueden formar parte de los medios de cultivo:

## 1. Reguladores de crecimiento (Fitohormonas)

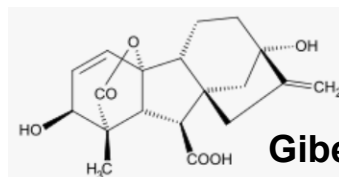
- Auxinas {
  - **AIB** (Ácido indolbutírico)
  - **AIA** (Ácido indolacético)
  - **ANA** (Ácido 1-naftalenacético)



- Citoquininas {
  - **BAP** (6-Bencilaminopurina)
  - **Kinetina**
  - **Zeatina**



- Giberelinas

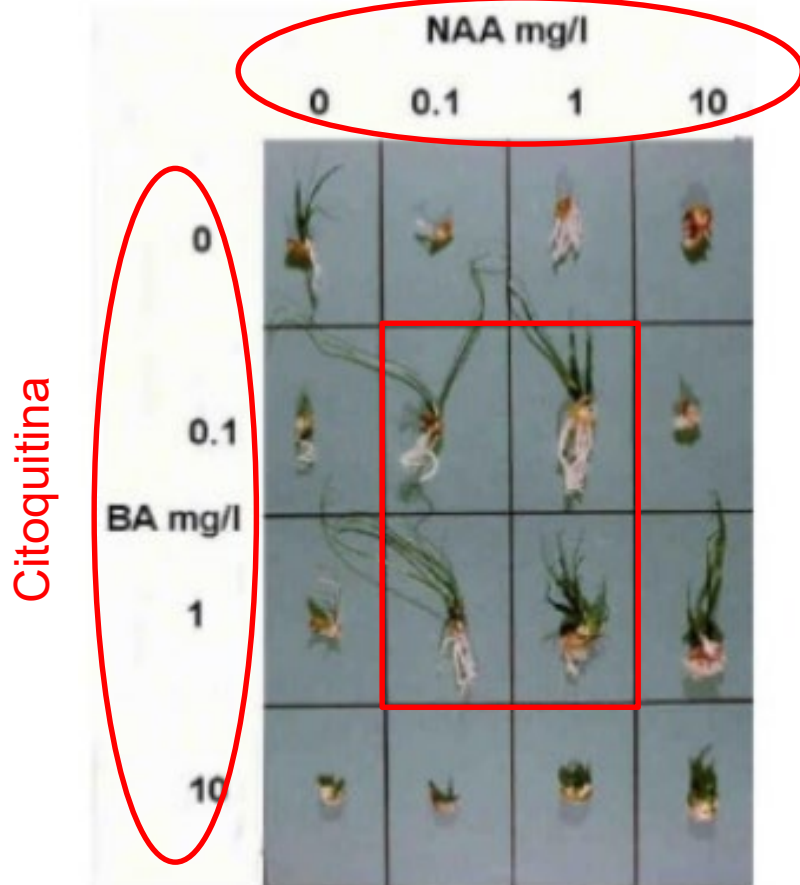


**Giberelina 3 (GA3)**



**Zeatina**

## Auxina



Relación óptima entre auxinas/citoquitinas depende de:

- Especie
- Genotipo
- Tipo de explante
- Propósito
- Edad de planta madre
- Condiciones ambientales

### LO BUENO:

Para la propagación in vitro de papa no necesitamos fitohormonas

## 2. Agua de coco

Cuadro 3.2. Algunos componentes orgánicos del agua de coco (AC).

Aminoácidos	Vitaminas
Aspártico, glutámico	Acido nicotínico
Serina, aminobutírico	Acido pantoténico
Asparagina, Glicina	Biotina, Riboflavina
β-Alanina, Treonina	Acido fólico
Histidina, Glutamina	Tiamina
Arginina, Lisina	Piridoxina
Valina, Metionina	Acido ascórbico
Tirosina, Prolina	
Homoserina	Sustancias de crecimiento
Fenilalanina	
Hidroxiprolina	Auxina
	Giberelina
Otros compuestos nitrogenados	1,3-Difenilurea
	Zeatina
Amonio, Etanolamina	Glucósido de zeatina
Dihidroxifenilalanina	Ribósido de zeatina
Acidos orgánicos	Otros
Shikímico, quínico	ARN-Polimerasa
Pirrolidona-carboxílico	Uracilo, Adenina
Succínico, málico	Leucoantocianinas
Cítrico y desconocidos	Fosfatasa ácida
Azúcares	Diastasa
	Deshidrogenasa
Sacarosa, Glucosa	Peroxidasa
Fructuosa	Catalasa
Alcoholes de azúcar	
Sorbitol	
m-Inositol	
Siloinositol	

Medio muy complejo con una amplia gama de componentes orgánicos e inorgánicos (SIGMA C5915)

Util p.ej. en el caso de:

- Baja viabilidad
- Cultivo de meristemos

### 3. Otras vitaminas

- Acido ascórbico (Vitamina C) → Reduce oxidación en los explantes
- Biotina (Vitamina H)
- Riboflavina (Vitamina B2)
- Pantotenato (Vitamina B5)

### 4. Alcoholes de azucar

- Sorbitol → Crecimiento lento → forma parte del medio de cultivo de conservación in vitro del CIP (se puede mantener las plantas por 2 a 4 años en el mismo tubo de ensayo).

# 3. Técnica de propagación *in vitro*



Cámara de flujo laminar horizontal



Esterilizador de perlas de vidrio



Mango de bisturí

Hojas de bisturí No. 10

Pinza de 23 cm

Antes:



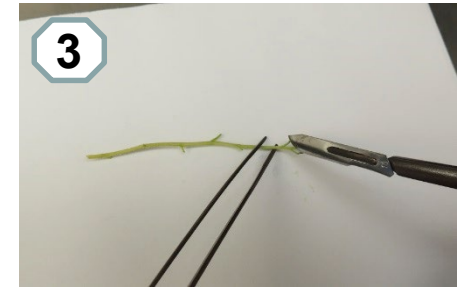
# 3. Técnica de propagación *in vitro*



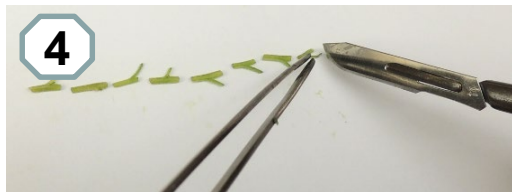
1  
Retirar las plantas madre del tubo de ensayo



2  
Colocar las plantas encima de una pila de 3-5 pliegues de papel estéril



3  
Retirar ápice, hojas y raíces de la planta



4  
Cortar tallo en segmentos con 1-3 yemas por segmento

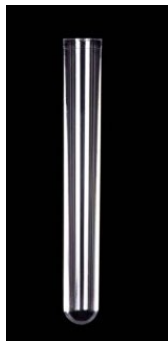


5  
Sembrar los segmentos en medio de cultivo fresco



6  
Tapar y etiquetar tubo de ensayo / magenta.

### 3. Técnica de propagación *in vitro*



- **Tubo de ensayo de 13x100 mm**
- Medio de cultivo: 2 mL / tubo
- 2 plantas de papa por tubo
- Propósito: Distribución / cultivo de meristemos



- **Tubo de ensayo de 25x150 mm**
- Medio de cultivo: 9 mL / tubo
- 4-6 plantas de papa por tubo
- Propósito: Propagación



- **Magenta GA7**
- Medio de cultivo: 45-50 mL / magenta
- 16-25 plantas de papa por magenta
- Propósito: Distribución / Propagación

# 3. Técnica de propagación *in vitro*

De preferencia solamente utilizar la mitad superior de la planta para la obtención de los segmentos de tallo.

Esterilizar la pinza (23 cm) suficientemente, para que pueda chocar las paredes internas del recipiente durante la sembra sin causar contaminación.

IMPORTANTE

Evaluar visualmente signos de contaminación bacteriana y fúngica 5-8 después de la propagación.

Las plántulas están listas para un nuevo ciclo de propagación o trasplante a invernadero, 3-5 semanas después de su propagación

Evaluar visualmente el proceso de enraizamiento y crecimiento 12-16 días después de la propagación

# 3. Técnica de propagación *in vitro*

## Condiciones ambientales para la incubación (papa):

- ✓ Temperatura:  $20 \pm 2$  °C
- ✓ Intensidad de luz:  $85 \pm 20$   $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{seg}^{-1}$
- ✓ Fotoperiodo: 16h luz / 8h oscuridad
- ✓ Fuente de luz: Tubos fluorescentes 36W (luz fría del día)



### 3. Técnica de propagación *in vitro*

Inicio:  
5 plantas  
adultas

Después  
de 1 mes:  
30 plantas

Después  
de 2  
meses:  
120  
plantas

Después  
de 3  
meses:  
480  
plantas

Después  
de 4  
meses:  
1920  
plantas

Después  
de 5  
meses:  
7680  
plantas

Después  
de 6  
meses:  
30720  
plantas

**OJO:** Las plantas pierden vigor en múltiples y subsiguientes ciclos de propagación.

# 4. Aplicaciones

- 1 • Obtención de plantas en cualquier época del año.
- 2 • Producción de gran número de plantas.
- 3 • Producción de plantas libres de enfermedades (p.ej. virus).
- 4 • Clonación de individuos “elite”.
- 5 • Conservación y distribución de germoplasma.
- 6 • Germinación de semillas.
- 7 • Producción de nuevos híbridos, haploides y dobles haploides.
- 8 • Obtención de metabolitos secundarios.
- 9 • Estudios fisiológicos.
- 10 • Semillas sintéticas.

**Gracias !**



**The International Potato Center** (known by its Spanish acronym CIP) is a research-for-development organization with a focus on potato, sweetpotato, and Andean roots and tubers. CIP is dedicated to delivering sustainable science-based solutions to the pressing world issues of hunger, poverty, gender equity, climate change and the preservation of our Earth's fragile biodiversity and natural resources.

[www.cipotato.org](http://www.cipotato.org)



### **CIP is a member of CGIAR**

CGIAR is a global agriculture research partnership for a food secure future. Its science is carried out by the 15 research centers who are members of the CGIAR Consortium in collaboration with hundreds of partner organizations.

[www.cgiar.org](http://www.cgiar.org)



CIP is a research-for-development organization with a focus on potato, sweetpotato and Andean roots and tubers. It delivers innovative science-based solutions to enhance access to affordable nutritious food, foster inclusive sustainable business and employment growth, and drive the climate resilience of root and tuber agri-food systems. Headquartered in Lima, Peru, CIP has a research presence in more than 20 countries in Africa, Asia and Latin America.

[www.cipotato.org](http://www.cipotato.org)



#### **CIP is a CGIAR research center**

CGIAR is a global research partnership for a food-secure future. Its science is carried out by 15 research centers in close collaboration with hundreds of partners across the globe.

[www.cgiar.org](http://www.cgiar.org)

CIP thanks all donors and organizations that globally support its work through their contributions to the CGIAR Trust Fund: [www.cgiar.org/funders](http://www.cgiar.org/funders)



This publication is copyrighted by the International Potato Center (CIP). It is licensed for use under the Creative Commons Attribution 4.0 International License