

# MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA LA CONSERVACIÓN *IN VITRO* DEL GERMOPLASMA DEL GÉNERO *Manihot*



Graciela Mafla B.  
Julio C. Roa E.  
Ericson Aranzales R.  
Daniel G. Debouck

2010

## TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. INSTALACIONES .....	3
2.1 Área de lavado.....	5
2.2 Área de neveras y autoclave .....	5
2.3 Área de preparación de medios .....	6
2.4 Área de subcultivo.....	7
2.5 Cuarto de crecimiento.....	8
2.6 Cuarto de conservación.....	10
3. DESCRIPCIÓN DE ACTIVIDADES .....	11
3.1 Introducción de germoplasma .....	11
3.2 Protocolo para el rescate de embriones de semillas de especies silvestres de Manihot..	14
3.3 Cuarentena .....	15
3.4 Eliminación de patógenos .....	18
3.4.1 Pasos a partir de estacas.....	19
3.4.2 Pasos a partir de material in vitro.....	23
3.5 Micropropagación .....	25
3.6 Indización.....	26
3.7 Conservación <i>in vitro</i> .....	27
3.7.1 Labores de introducción .....	27
3.7.2 Mantenimiento .....	29
3.8 Caracterización .....	34
3.9 Distribución .....	35
3.10 Duplicados de seguridad .....	39
4. CONTROL DE CALIDAD.....	40
5. ANEXOS.....	45
6. BIBLIOGRAFÍA .....	52

# MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA LA CONSERVACIÓN *IN VITRO* DEL GERMOPLASMA DEL GÉNERO *Manihot*

## 1. INTRODUCCIÓN

El Programa de Recursos Genéticos (PRG) del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) conserva y distribuye germoplasma *in vitro* del género *Manihot*. Regulaciones cuarentenarias para *Manihot* han sido aplicadas desde 1980 cuando se estipuló que solamente plantas *in vitro* podrían ser utilizadas para el intercambio a través de todo el mundo, y guías técnicas para el movimiento seguro de germoplasma fueron desarrolladas (Frison & Feliu, 1991). Las técnicas *in vitro* han sido utilizadas con un doble propósito: 1) para introducir al CIAT un gran número de materiales colectados en los principales centros de variabilidad y conservarlos *in vitro*, y 2) para distribuir germoplasma seleccionado desde el CIAT a los programas nacionales y demás usuarios. Esta colección se encuentra actualmente representada por 6.592 materiales y está constituida por tres categorías: 5.301 materiales de yuca cultivada (*Manihot esculenta*) procedentes de 28 países, 883 materiales de las especies silvestres del género *Manihot* (33 especies) y 408 materiales mejorados por el CIAT. Desde 1994 estos materiales han sido designados a la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) dentro del marco del acuerdo FAO-CGIAR. Desde Octubre 2006 han sido registrados en el Sistema Multilateral de Acceso y Distribución de Beneficios del Tratado Internacional sobre Recursos Filogenéticos para la Alimentación y la Agricultura dentro del marco del acuerdo entre el Órgano Rector del Tratado y el CIAT, y cumple con los estándares para bancos de germoplasma. Desde 1979 cuando el CIAT aceptó el mandato mundial para el cultivo, se ha distribuido hasta el año 2009 un total de 32.616 muestras (6.110 materiales) a 67 países a través de las técnicas *in vitro*.

Las diferentes etapas definidas en el Diagrama de flujo de actividades para el manejo del germoplasma de *Manihot* son: a) Introducción, b) Cuarentena, c) Eliminación de patógenos, d) Indización, e) Micropropagación, f) Conservación, g) Caracterización, h) Distribución, y i) Duplicados de seguridad. Estos procedimientos se han desarrollados para el mejor manejo de la colección *in vitro* teniendo como objetivo principal la utilización de este germoplasma de parte de los diferentes usuarios que lo solicitan (Fig. 1).

Un total de cinco medios de cultivo han sido desarrollados para los diferentes propósitos implicados en el manejo de la colección: 1) medio de cultivo para el desarrollo de meristemos y propagación de nudos (4E) (Roca et al., 1991), 2) medio de cultivo para el desarrollo de raíces y mejor desarrollo de las plantas que van a ser llevadas a condiciones de invernadero (17N) y luego a campo (CIAT, 1982), 3) medio de cultivo para la conservación (8S) (CIAT, 1984), 4) medio de cultivo para el crecimiento mínimo (NP) (Mafla et al., 2000), y 5) medio de cultivo para las especies silvestres (12A<sub>3</sub>) (Velásquez & Mafla, 1999) (ver Anexos).

La colección es manejada por un grupo de trabajo constituido por dos profesionales y cinco técnicos quienes se encargan de todas las labores que se explican a continuación en éste manual.

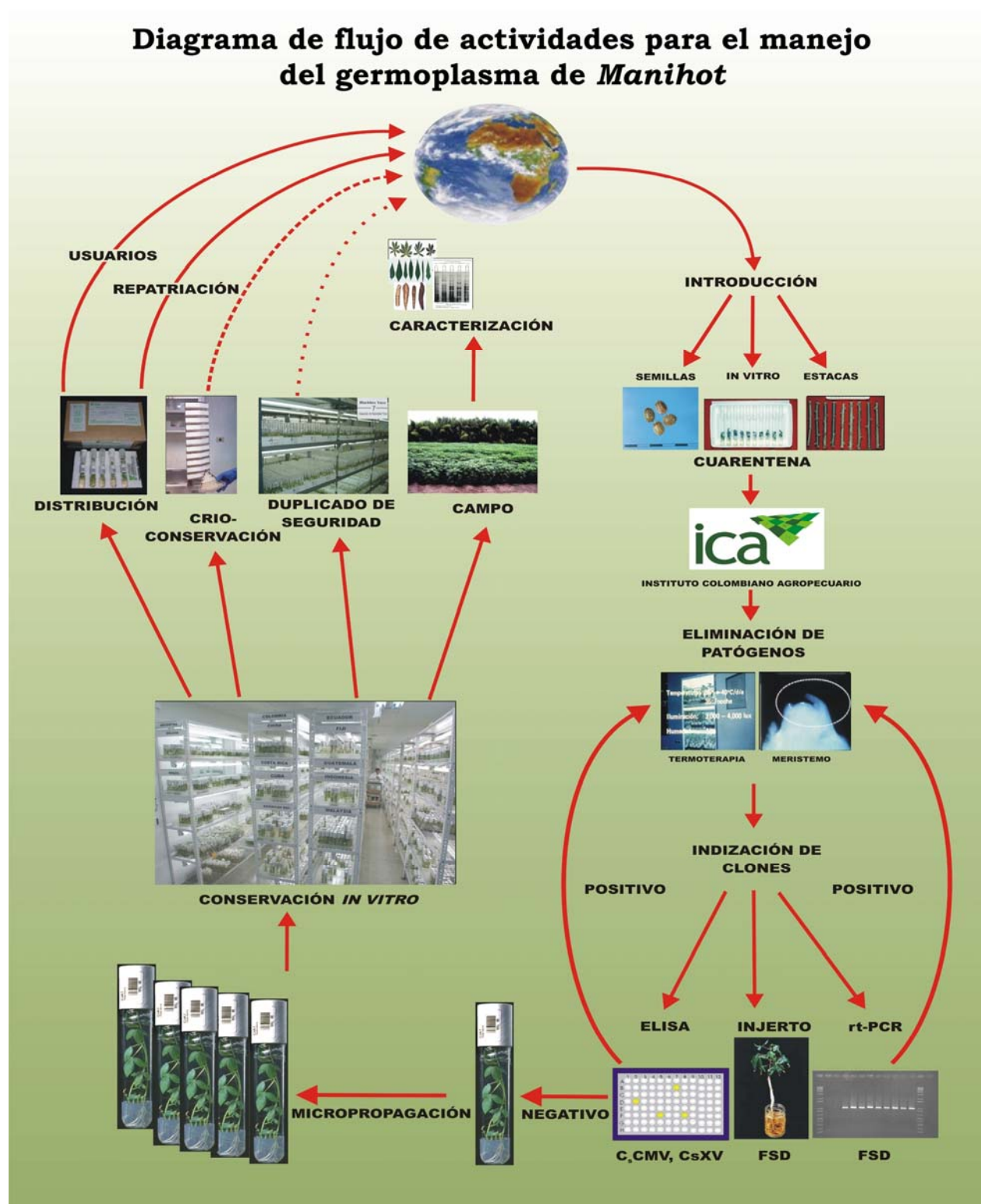
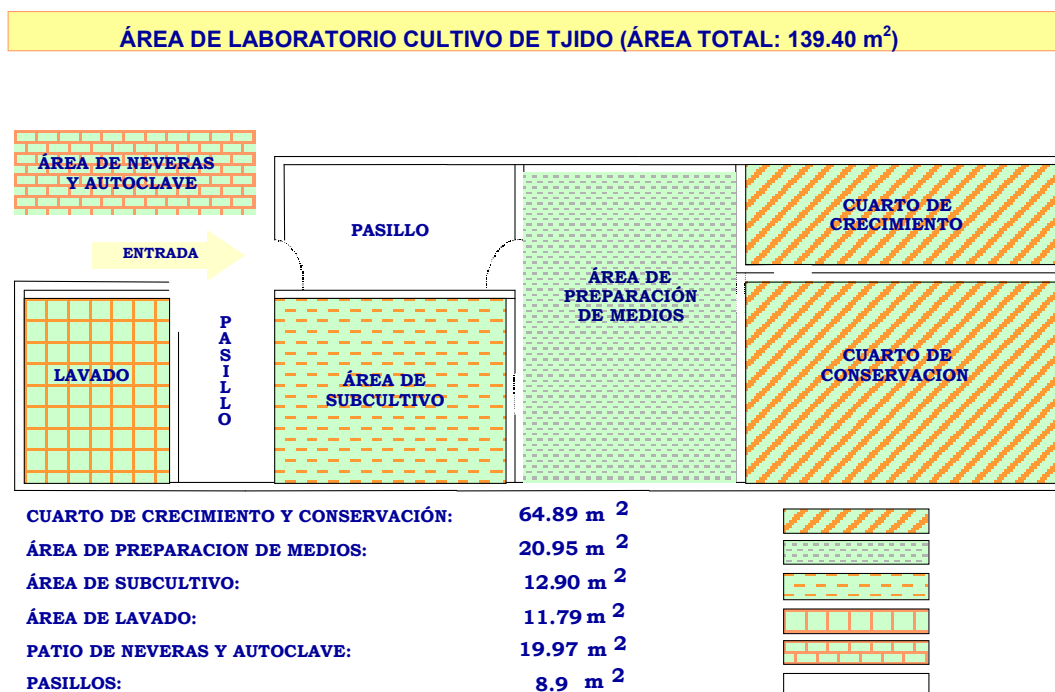


Figura 1. Diagrama de flujo de actividades para el manejo del germoplasma de *Manihot*.

## 2. INSTALACIONES

El cultivo de tejidos como técnica consiste esencialmente en aislar y cultivar una porción de la planta (explante), proporcionándole artificialmente las condiciones físicas y químicas apropiadas para que las células expresen su potencial intrínseco o inducido. Además, es necesario adoptar procedimientos de asepsia para mantener los cultivos libres de contaminación.

Basados en este concepto, el diseño del laboratorio de cultivo de tejidos puede presentar variaciones en magnitud y complejidad, dependiendo de los objetivos del laboratorio. Teniendo en cuenta esto, a continuación se presenta una descripción del laboratorio de cultivo de tejidos en el Programa de Recursos Genéticos presentando las áreas, equipos y otros suministros requeridos para el adecuado desarrollo de las actividades adscritas al mantenimiento *in vitro* de la colección de *Manihot* (Fig. 2) (Tabla 1).



**Figura 2. Diferentes áreas del laboratorio de cultivo de tejidos del PRG del CIAT.**

**Tabla 1. Equipos requeridos en cada una de las áreas del laboratorio.**

Área	Equipos	Propósito
Lavado	Autoclave pequeña (1) Horno de secado (1) Vitrinas (2)	Esterilizar herramientas Secado de vidriería Almacenar vidriería
Neveras y autoclave	Neveras (5) Autoclave (1) Destilador (1) Incubadora (1)	Almacenar medios de cultivo Esterilizar medios de cultivo Proporcionar agua bidestilada Investigación
Preparación de medios de cultivo	Dispensador (1) Planchas eléctricas con agitadores magnéticos (2) pHmetro (1) Balanza analítica (1)  Computador Sistema purificación aire	Llenado de tubos con el medio Calentar y agitar medios (agar)  Ajustar pH del medio de cultivo Pesar diferentes componentes del medio Labores de gestión –base de datos Mejorar calidad del aire
Pasillo	Extintor (1) Cortina de aire	Elemento de seguridad Elemento de asepsia
Subcultivo	Cámaras de flujo laminar (6) Deshumificador (1) Unidad de aire acondicionado Sistema purificación del aire	Proceso de subcultivo Controlar humedad relativa Refrigerar Mejorar calidad de aire
Cuarto de crecimiento	Estantería (16) Higrotermógrafo (1)	Ubicar material vegetal Registrar temperatura y humedad
Cuarto de conservación	Estantería (41) Deshumificador (1) Higrotermógrafo (1) Extintor, sensor de humo y temperatura (1) Controlador fotoperiodo (1)  Unidad de aire acondicionado (1) Sistema purificación del aire	Ubicar material vegetal Controlar humedad relativa Registrar temperatura y humedad Elementos de seguridad  Regular encendido y apagado de luces Refrigerar Mejorar calidad del aire
Cuarto de duplicado de seguridad	Estantetería (10 ) Deshumificador (1) Higrotermógrafo (1) Extintor, sensor de humo y temperatura (1) Unidad de aire acondicionado (1)	Ubicar duplicado de seguridad. Controlar humedad relativa Registrar temperatura y humedad Elemento de seguridad  Refrigerar



**Advertencia: Se recomienda que el extintor no sea muy pesado para que pueda ser manejado fácilmente por cualquier persona.**



**Advertencia: Antes de abrir la autoclave se debe asegurar que la presión esté en cero y la temperatura haya bajado.**

## 2.1 Área de lavado

Todo el proceso de lavado y almacenamiento de material de vidrio, material estéril y diferentes tipos de aguas (ionizada, destilada, bidestilada y bidestilada estéril) necesarios en las actividades cotidianas del laboratorio se realizan en este sitio.

Esta área cuenta con un lavadero grande con tres fuentes de agua: fría, caliente y agua doblemente bidestilada usada para el enjuague final en el lavado de material de vidrio (Fig. 3).

Así mismo se dispone en esta área de estantería para el almacenamiento del material de vidrio y agua estéril bidestilada que va a ser utilizada en los procesos de desinfección.



**Figura 3. Actividad desarrollada en el área de lavado.**

## 2.2 Área de neveras y autoclave

En esta área se encuentran localizadas las neveras donde se almacenan los reactivos, soluciones stock y los diferentes medios de cultivos utilizados en el laboratorio. La autoclave empleada para la esterilización de los medios de cultivo se encuentra ubicada también en esta área e igualmente el destilador de agua y una cámara de incubación utilizada con fines de investigación (Fig. 4).



**Figura 4. Área de neveras y autoclave. Las neveras son utilizadas para el almacenamiento de los medios de cultivo.**

### **2.3 Área de preparación de medios**

Como su nombre lo indica, en esta área se realiza la preparación de medios de cultivo y provee un espacio para el almacenamiento de material de vidrio y de plástico, reactivos químicos, agua bidestilada, balanza analítica, pHmetro, agitadores magnéticos y dispensadores de medios, entre otros (Fig. 5). También se encuentra ubicado en esta área un computador que sirve para toda la gestión gerencial del banco de germoplasma.



**Figura 5. Área de preparación de medios en donde se pueden observar las diferentes soluciones y equipos utilizados para este propósito.**

## 2.4 Área de subcultivo

En esta área se realiza el trabajo de escisión, inoculación y transferencia de los explantes a los medios de cultivo

Debido al alto nivel de asepsia que debe mantener esta área, se cuenta con un sistema de purificación de aire (Fig. 6). Este sistema de purificación proporciona una reducción de las bacterias, moho, olores y compuestos orgánicos volátiles (olores químicos), y emplea la tecnología photohydroionization, que utiliza iones ozónido; los iones superóxido y la luz UV desarrollan una oxidación avanzada.

Las operaciones de siembra en medios de cultivo se realizan en cámara de flujo laminar con la presencia de un mechero de alcohol industrial (alcohol metílico) y las herramientas estériles necesarias para esta actividad. Un total de seis cámaras de flujo laminar se encuentran ubicadas en esta área (Fig. 7).

Se dispone también de carros transportadores para la ubicación de los medios de cultivo, material vegetal, dispensadores de alcohol al 70% y otros implementos requeridos en las actividades del subcultivo. Así mismo, se dispone de recipientes de plástico para el material vegetal, el material inorgánico y de vidrio que se descarta.



**Figura 6. Sistema de purificación del aire ubicado en el área de transferencia.**



**Figura 7. Área de subcultivo en donde se encuentran ubicadas las cámaras de flujo laminar.**

## **2.5 Cuarto de crecimiento**

Las condiciones de incubación o crecimiento de material *in vitro* de yuca son (Roca et al., 1991):

Temperatura	: 27-28 <sup>0</sup> C
Iluminación	:18.5 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$
Fotoperiodo	: 12 horas
Calidad de luz	: Lámparas fluorescentes, tipo luz día
Humedad relativa	: 50-70%

El cuarto cuenta con un total de 16 estanterías metálicas pintadas de blanco. Cada estantería está constituida por 5 pisos y cada piso permite la ubicación de ocho gradillas; cada gradilla está ocupada por 6 materiales (5 tubos/material) para una capacidad de 3,840 materiales.

Cada piso de la estantería contiene una plataforma con perforaciones para facilitar una mejor aireación, y su dimensión es de 124 cm x 39 cm. La altura entre cada piso es de una 39 cm permitiendo una buena iluminación. Cada piso está provisto, por debajo, de una lámpara fluorescente luz día (los balastos son instalados en la parte externa del laboratorio con el fin de evitar un aumento en la temperatura del cuarto). El espacio entre el suelo y el primer piso debe ser entre 10 y 20 cm para facilitar las labores de limpieza (Fig. 8). La regulación de la temperatura se realiza a través de un sistema de refrigeración, el cual está conectado a sensores de temperatura que permiten detectar alteraciones de la misma. En esta área se encuentran también ubicados sensores de humo (Fig. 9). La humedad relativa es controlada con el uso de un deshumificador (Fig. 10).



**Figura 8. Estantes utilizados en el cuarto de crecimiento.**



**Figura 9. Sistemas de seguridad para censar presencia de humo y aumento de temperatura en los cuartos de crecimiento y conservación.**



**Figura 10. Deshumificador utilizado para el control de humedad relativa en los cuartos de crecimiento y conservación.**

## 2.6 Cuarto de conservación

Las condiciones físicas para la conservación *in vitro* de germoplasma de yuca están dadas por las siguientes condiciones (Roca et al., 1989):

Temperatura	: 23-24 <sup>0</sup> C
Iluminación	: 18.5 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$
Fotoperíodo	: 12 horas
Calidad de luz	: Lámparas fluorescentes, tipo luz día
Humedad relativa	: 50-70%

Este cuarto cuenta con un total de 41 estanterías metálicas. Cada estantería está constituida por 5 pisos y cada piso permite la ubicación de ocho gradillas. Cada gradilla está ocupada por 6 materiales (5 tubos/material) para un potencial de conservación de 9,840 materiales (Fig. 11). En el cuarto de conservación se emplean sistemas de seguridad, iguales a los empleados en el cuarto de crecimiento (sensor de temperatura y de humo). En esta misma zona se cuenta con un espacio para la evaluación y observación periódica de los cultivos, para lo cual se emplean lámparas, lupas y esteromicroscopio, entre otros.

La evaluación se realiza “*in situ*” para limitar los movimientos de los materiales que se conservan en el banco y disminuir así los diferentes riesgos que puedan afectarlos.

Las unidades de refrigeración usadas para la regulación de las condiciones de temperatura, requeridas en los cuartos de crecimiento y conservación, están dadas por un sistema interno e independiente que permite minimizar los riesgos de contaminación.



Figura 11. Cuarto de conservación y gradillas conteniendo materiales *in vitro* de yuca.

### 3. DESCRIPCIÓN DE ACTIVIDADES

#### 3.1 Introducción de germoplasma

La introducción de los materiales para el inicio del proceso de conservación se hace generalmente de tres formas:

1. A partir de material vegetativo (estacas): proveniente de centros experimentales o colectas realizadas en el país anfitrión.
2. En forma *in vitro*: proveniente de países donantes.
3. En forma de semilla botánica y posterior rescate de embriones, específicamente para las especies silvestres.

Cualquiera que sea la forma de introducción se asigna un número único al material, conservando siempre los datos originales de los materiales los cuales quedan consignados en la base de datos como sinónimos. En el caso de: a) *Manihot esculenta* se identifica con las tres primeras letras del país de procedencia y posteriormente un número consecutivo de acuerdo al orden de entrada (Ejemplo: ARG 2, material procedente de Argentina), b) materiales de especies silvestres se identifican con las iniciales de cada una de las especies seguido por el número de población y posteriormente el número de genotipo (Ejemplo: PER 411-1, pertenece a la especie *Manihot peruviana*, población 411 y genotipo número 1), y c) materiales procedentes de mejoramiento van identificados con dos letras que indican el tipo de cruzamiento (CG, CM, SG, SM), luego el número de cruzamiento y posteriormente el genotipo seleccionado (Ejemplo: CG 1141-1). A continuación se hace un registro de información básica que permite una documentación eficiente de la misma, conocida como datos de pasaporte. Esta información se almacena en la base de datos del PRG (ORACLE V.7.0). Para cada introducción quedan registrados los datos característicos de las muestras. Estos describen el

país de origen y las características geográficas de las variedades según los descriptores desarrollados para un mejor manejo de la información (Gulick et al., 1983).

Los datos básicos proporcionan información general de latitud, longitud y altitud que nos permite conocer el sitio donde fue colectada la muestra, nombre del colector del germoplasma e información de la institución que hace la donación (Fig. 12). Los datos de pasaporte se encuentran disponibles en estos sitios de Internet ([www.ciat.cgiar.org/urg](http://www.ciat.cgiar.org/urg), [www.singer.cgiar.org](http://www.singer.cgiar.org)).

Developer/2000 Forms Runtime for Windows 95 / NT - [INTRODUCCION YUCA]

Acción Edición Consulta Bloque Registro Campo Ayuda

Accesión GUA 79 Género MANIHOT Especie ESCULENTA

Características Geográficas Pre Registro Pasaporte Básico Colectores

Accesión GUA 79 Código C 03248 Recolección 11/07/1984

Origen GTM País GUATEMALA Fuente FARMER'S FIELD

Depto ESCUINTLA Municipio LA GOMERA Sitio Próximo

Latitud 14.0000 Longitud -91.0833 Altitud 20.00

Ubicación PARC. LOS CHATOS KMS: 2

Hábitat Topografía PANTANOSO T Sitio PLANO

Textura ARCILLOSA Drenaje BUENO TSuelo

Hábito Lluvia Meses Secos

**FUENTE DE COLECCIÓN:**

Hábitat silvestre	Mercado rural
Campo agrícola	Mercado comercial
Almacén de agricultor	Institutos
Jardín hortícola	Plantación
Bordes campo	No aplica
No conocida	Otros (especificar)

**TIPO DE SITIO**

Plano	Pendiente
Cima	Depresión
Pendiente moderada	
Pendiente empinada	
Otro	

**HABITAT**

- Bosque lluvioso
- Bosque húmedo
- Bosque semi-húmedo
- Bosque seco
- Bosque muy seco
- Bosque espinoso
- Matorral desértico
- Desierto
- Otro

**HÁBITO**

- Árbol
- Arbusto
- Enredadero
- Postrado
- Erecto
- Semirrecto
- Postrado Estolonifero
- Enredadero Estolonifero
- Otro

**TEXTURA DE SUELO**

- Arenosa
- Intermedia
- Arcillosa
- Pedregosa
- Orgánica
- Franco arenoso
- Franco arcilloso
- Franco, Otra.

**DRENAJE DE SUELO**

- Excesivo
- Bueno
- Moderado
- Pobre
- Pantanosos
- Otro

**TOPOGRAFÍA**

- Serranía
- Plana
- Ondulada
- Pie de monte
- Montaña
- Colinas
- Pantanosos
- Vega
- Otros

Figura 12. Información de pasaporte registrada en la base de datos.

La introducción de materiales a partir de 1) material vegetativo (estacas), y 2) a partir de material *in vitro* se explica en el punto 3.3 de este manual. A continuación se explica el procedimiento cuando la introducción es a partir de semilla botánica.

### **3.2 Protocolo para el rescate de embriones de semillas de especies silvestres de Manihot**

El cultivo *in vitro* de embriones cigóticos ha sido utilizado para la introducción de las especies silvestres del género *Manihot*. El cultivo de embriones provee una técnica simple para el rompimiento de la dormancia de la semilla asegurando una tasa de germinación bastante uniforme (Biggs et al., 1986).

Esta técnica comprende la escisión aséptica del embrión de la semilla y la siembra en un medio de cultivo estéril (Hoded, 1977), proporcionando potenciales alternativas en la investigación de plantas. Su uso es frecuente para salvar embriones que no alcanzan a desarrollarse naturalmente en semillas y frutos, embriones procedentes de semillas de cruces interespecíficos donde los endospermos defectuosos son comunes y en la reducción de los largos períodos de dormancia y en la eliminación de las barreras físicas y químicas presentes en frutos y semillas.

Desinfección de semillas:

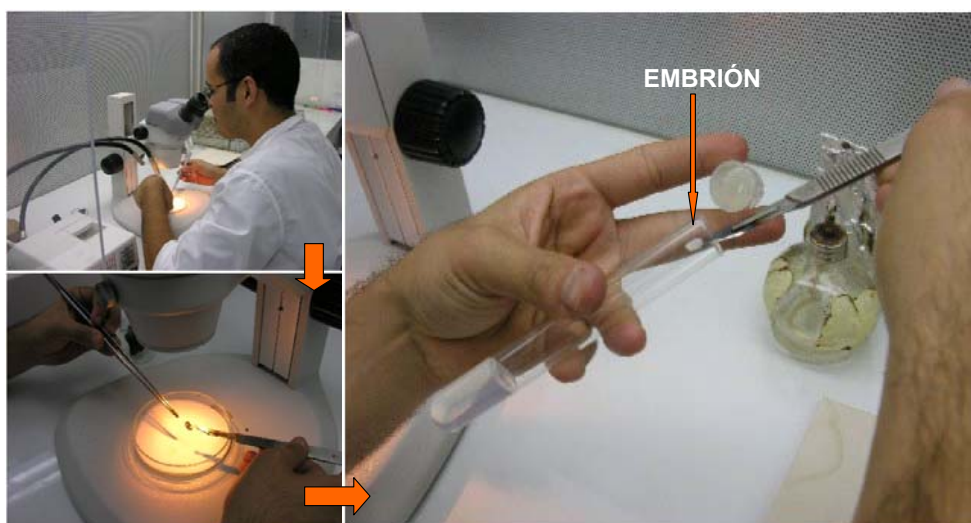
Las semillas son superficialmente desinfectadas siguiendo el protocolo descrito a continuación:

4. Lavado con alcohol 70% durante 1 minuto, seguido de
5. Benlate<sup>®</sup> 0.5 g/l por 15 minutos,
6. Hipoclorito de sodio al 2.5% por 15 minutos, finalmente se realizan tres enjuagues con agua destilada estéril, en cámara de flujo laminar.

Una vez se ha llevado a cabo el protocolo de desinfección las semillas, éstas son dejadas en una solución estéril de 200 p.p.m de Ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) durante 12 horas a temperatura ambiente.

Posteriormente, se retira la solución y se procede a realizar el rescate de embriones, para lo cual las semillas son quebradas transversalmente empleando pinzas. Una vez identificado el embrión, éste es removido empleando un bisturí y plantado en el medio de cultivo (17N) (Fig. 13). Los tubos son rotulados, sellados e incubados a 27 °C en oscuridad durante 7 días, posteriormente son transferidos a condiciones normales de crecimiento (temperatura 26-28 °C, iluminación 18.5  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  y fotoperíodo de 12 horas).

Transcurridos 15 días se espera la diferenciación morfológica del embrión en planta normal. Posteriormente, se procede a iniciar la etapa de micropropagación y conservación de las mismas utilizando los medios de cultivo desarrollados para tal fin.



**Figura 13. Proceso de escisión y siembra en el medio de cultivo desarrollado para embriones cigóticos.**

### 3.3 Cuarentena

Para el caso de la yuca, la reproducción alógama y su constitución genética altamente heterocigótica constituyen la principal razón para propagarla por estacas y no por semilla sexual (Ceballos & De la Cruz, 2002). Sin embargo, la distribución de materiales a través de estacas puede dar lugar a la distribución de plagas, enfermedades bacterianas y, sobretodo, a enfermedades virales (Tabla 2).

El intercambio de material puede conllevar a problemas serios para la agricultura de un país, ya que muchos de los patógenos que afectan los cultivos se diseminan a través de órganos como semillas y tubérculos, entre otros, y estos son el medio de introducir razas diferentes a las áreas de producción (Huertas, 1992).

**Tabla 2. Lista de diferentes plagas y enfermedades de la yuca (Frison & Feliu 1991).**

	<b>Agente Causal</b>
<b>Plagas</b>	Gusano cachón ( <i>Erynnis ello</i> )
	Ácaro verde-manchado ( <i>Tetranychus urticae</i> )
	Ácaro verde ( <i>Mononychellus tanajoa</i> )
	Ácaro rojo ( <i>Tetranychus cinnabarinus</i> )
	Ácaro plano ( <i>Olygonichus peruvianus</i> )
	Mosca blanca ( <i>Aleurotrachelus socialis</i> )
	Piojos harinosos ( <i>Phenacoccus herreni</i> , <i>P. granadensis</i> y <i>P. manihoti</i> )
	Trips ( <i>Frankliniella williams</i> y <i>Scirtothrips manihoti</i> )
	Chinche subterránea de la viruela ( <i>Cyrtomensus bergi</i> )
	Chinche del encaje ( <i>Vatiga manihotae</i> y <i>V. illudens</i> )
	Barrenadores del tallo ( <i>Chilomina clarkei</i> , <i>Lagochirus araneiformis</i> y <i>Coelosternus</i> spp.)
Chisas ( <i>Phyllophaga</i> spp. y <i>Leucopholis rorida</i> )	
<b>Enfermedades</b>	Superalargamiento ( <i>Sphaceloma manihoticola</i> )
	Mancha parda de la hoja ( <i>Cercosporidium henningsii</i> )
	Mancha anillos circulares de la hoja ( <i>Phoma</i> spp.)
	Mancha angular de la hoja ( <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>cassavae</i> )
	Antracnosis de la yuca ( <i>Glomerella manihotis</i> )
	Ceniza de la yuca ( <i>Oidium manihotis</i> )
	Roya de la yuca ( <i>Uromyces</i> spp.)
	Añublo pardo fungoso ( <i>Cercospora vicosae</i> )
	Añublo bacteriano ( <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> )
	Necrosamiento del tallo ( <i>Glomerella cingulata</i> )
	Pudrición seca de tallo y raíz ( <i>Diplodia manihotis</i> )
Pudrición bacteriana del tallo ( <i>Erwinia carotovora</i> p.v. <i>carotovora</i> )	
Pudrición radical ( <i>Phytophthora</i> sp., <i>Rosellinia</i> spp. y <i>Pythium</i> spp.)	
<b>Enfermedades Virales</b>	Mosaico común de la yuca, (Potexvirus)
	Cuero de sapo, FSD (virus) (Calvert et al., 2008)
	Virus X de la yuca (CsXV)
	Virus del Mosaico Africano de la Yuca (ACMV)
	Virus del Mosaico de las nervaduras de la yuca (CVMV)
	Virus del Mosaico de la India (ICMV)
	Virus de la raya parda de la Yuca (CBSV)

La mayoría de los países han establecido regulaciones cuarentenarias y toma de medidas especiales para que plagas y enfermedades no entren a su territorio nacional. En Colombia se regulan las normas para la importación y exportación de material vegetal a través del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA).

De común acuerdo entre el ICA y el CIAT se han diseñado los procedimientos que permiten manejar el germoplasma que es introducido a la colección *in vitro* de *Manihot*:

- (i) Revisión de la documentación con la cual debe llegar el germoplasma:
  1. Permiso de importación expedido por el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA).
  2. Certificado Fitosanitario expedido por la entidad oficial fitosanitaria del país donante.
  3. Lista de variedades enviadas.
- (ii) Inspección de las plantas para determinar si existe algún problema fitosanitario (hongos y bacterias). Si hay presencia de estos patógenos, los materiales deben ser autoclavados para su eliminación. Ningún material puede ser distribuido hasta no completar todo el proceso de eliminación de patógenos e indización.

La actividad de cuarentena cuenta también con un sistema de documentación que nos permite un mejor manejo de la información de parte del ICA-CIAT (Fig. 14). En el sistema se registra toda la información relacionada con la introducción de los materiales.

The screenshot shows a software interface for recording quarantine data. The window title is "Developer/2000 Forms Runtime for Windows 95 / NT - [CUARENTENA YUCA]". The menu bar includes "Acción", "Edición", "Consulta", "Bloque", "Registro", "Campo", and "Ayuda". The toolbar contains various icons for file operations and navigation. The main form is divided into two tabs: "Cuarentena" (selected) and "Variedades". The "Cuarentena" tab contains two sections: "CIAT" and "ICA".

**CIAT Section:**

- Introduccion #:
- # Acciones:
- F Entrada:
- Inst Donante:  Nombre:
- Apellido:  Pais\_Iso:  Pais:
- Responsable:  Observacion:

**ICA Section:**

- Permiso Impor:  F Nacional:  Certificado Fito:
- Certificado Movil:  Responsable:
- Observación:

On the left sidebar, there are icons for "Pasaporte" and "Terminar". The status bar at the bottom displays "Identificador del Material en INTRODUCCION" and "Record: 1/1".

**Figura 14. Registro de información de cuarentena en la base de datos del PRG.**

### 3.4 Eliminación de patógenos

Las enfermedades causadas por virus afectan significativamente el rendimiento y la calidad de la yuca en las principales regiones cultivadoras de esta raíz en el mundo. En África, el virus más importante es el que causa la enfermedad del mosaico africano de la yuca (ACMD), responsable de pérdidas de rendimiento hasta del 90% (Bock, 1976). En América Latina existen diversos virus y organismos similares a los virus. La enfermedad cuero de sapo (FSD) reduce el rendimiento en un 80% a 100% (Lozano et al., 1983a); el virus mosaico común de la yuca (CsCMV), ampliamente difundido en América Latina, reduce el rendimiento hasta en un 60% (Costa, 1972), el virus X de la yuca (CsXV) y el que causa la enfermedad del virus latente, ambos de considerable importancia (CIAT, 1986).

La utilización de la técnica de cultivo de meristemas ofrece la oportunidad de eliminar los virus existentes en un cultivo (Roca et al., 1991). El meristemo es un pequeño tejido (0.2-0.3 mm) localizado en la parte apical de la yema. El meristemo apical es formado durante el desarrollo embrionario y, excepto por periodos de dormancia, permanece activo a través de la vida de la planta. Los reportes muestran como la técnica de cultivo de meristemas ha eliminado exitosamente en otras especies, virus S de la papa (Brown et al., 1988) y el virus del amarillamiento en el camote (Green & Lo, 1989) entre otros. La técnica consiste en aislar asépticamente la región meristemática de la yema vegetativa apical o axilar, juntamente con 1-2 de los primordios foliares más jóvenes, e implantarla en un medio de cultivo estéril.

Para explicar la sanidad o limpieza de los meristemas se han formulado varias hipótesis. Una de ellas plantea que, debido a la ausencia de tejido vascular en la proximidad del meristemo apical y a que las conexiones plasmodesmáticas en las células de este tejido son muy pequeñas, el virus se desplaza muy lentamente hacia el meristemo. Esta característica morfológica, unida a la activa multiplicación celular que allí ocurre, puede explicar la baja concentración o la ausencia de virus en ese tejido (Wu et al., 1960).

Las técnicas de cultivo de meristemas relacionadas con la termoterapia se desarrollaron en el CIAT; el propósito era eliminar los virus de las variedades de yuca infectadas. El desarrollo de esta técnica ha contribuido enormemente a la producción de clones de yuca en que se ha comprobado la ausencia de organismos patógenos (Roca et al., 1991).

El principio básico de la termoterapia a los tejidos infectados es que puede alterar la síntesis viral y retardar la translocación de los virus en la planta, de tal forma que la región libre de virus del meristema apical aumenta de tamaño y, por lo tanto, se hace más factible la limpieza (Roca et al., 1991).

La termoterapia, al afectar el metabolismo celular, parece que altera la síntesis del virus; por lo tanto, el éxito de la termoterapia depende de la capacidad que tenga el tejido de soportar periodos largos de alta temperatura que inactiven el virus sin afectar significativamente el crecimiento del tejido (CIAT, 1982; Roca et al., 1991).

Los métodos para el saneamiento de clones infectados por virus se pueden aplicar:

- 1) a las estacas (*in vivo*) o,
- 2) a los materiales *in vitro*

### 3.4.1 Pasos a partir de estacas

#### Fuente de material:

- Tomar estacas de 15-20 cm conteniendo yemas vigorosas.
- Desinfestar las estacas superficialmente sumergiéndolas por cinco minutos en una solución de Dimetoato al 0.3%, posteriormente dejar secar por 1-2 horas bajo la sombra.
- Sembrar las estacas tratadas en pots que contengan sustrato esterilizado (suelo: arena 1:2), regarlas con agua (Fig. 15).



**Figura 15. Proceso de desinfección y siembra de estacas para el inicio del tratamiento de termoterapia.**

#### Tratamiento de termoterapia

- Colocar los pots con las estacas a crecer en la cámara de termoterapia a una temperatura de 40 °C día/35 °C noche, 3000-4000 lux, humedad relativa alta (Fig. 16).
- Mantener los pots con las estacas en éste ambiente por 3 semanas, al cabo de este tiempo las yemas han brotado y puede iniciarse el cultivo de meristemas; se pueden cortar 2-3 yemas por estacas.
- Las yemas que se cortan deben ser las más vigorosas y las que han tenido una mayor elongación. Es importante desinfectar la cuchilla, con un detergente, cada vez que se cortan yemas de una planta a otra.



Figura 16. Cámara y condiciones requeridas para el proceso de termoterapia a las estacas.

### Preparación del tejido estéril

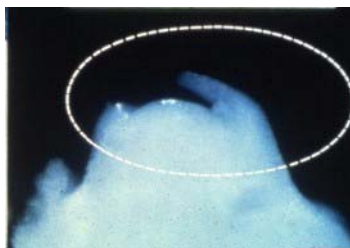
- Remover las yemas terminales de las estacas y colocarlas en un vaso precipitado con una malla que facilita el manejo de éstas en el laboratorio.
- En el laboratorio bajo una cámara de flujo laminar se desinfectan las yemas recolectadas siguiendo el siguiente protocolo:
  - a) Sumergir rápidamente las yemas en 70% alcohol y enjuagar con agua estéril.
  - b) Pasar a hipoclorito de sodio al 0.5% por 5 minutos (blanqueador comercial, con 5.25% de ingrediente activo de hipoclorito de sodio).
  - c) Hacer 3 enjuagues con agua bidestilada estéril (Fig. 17).



Figura 17. Materiales requeridos para el proceso de desinfección de las yemas.

## Aislamiento y siembra de los meristemos

Esta etapa del proceso consiste en el aislamiento aséptico del meristemo (estructura de 0.3-0.5 mm, estructura que comprende la región meristemática de la yema vegetativa, acompañada de 1 ó 2 de sus primordios más jóvenes) y su siembra en un medio de cultivo nutritivo y estéril (4E) (Fig. 18).



**Figura 18. Meristemo de yuca utilizado para el proceso de eliminación de virus.**

a) Herramientas para el aislamiento (Fig. 19).

- Un estereoscopio ( 10X ) con lámpara de luz fría (de fibra óptica).
- Dos bisturís (cuchillas No. 11).
- Dos pinzas pequeñas.



**Figura 19. Estereoscopio y herramientas requeridas para el aislamiento de los meristemos.**

b) Esterilización de las herramientas

- Las herramientas se sumergen en alcohol al 96% y se flamea varias veces o se esteriliza en autoclave por 15 minutos.
- Dejar enfriar las herramientas e introducirlas en un papel cartulina estéril.

El material vegetal se puede resentir y deteriorar cuando se maneja las herramientas en presencia de alcohol o cuando están demasiado calientes.

### **Aislamiento**

- Bajo el campo visual del esteroscopio (10-40X) se toma con la pinza la yema apical y se van removiendo con el bisturí los apéndices (hojas y estipulas) que cubren el ápice hasta observar una estructura brillante de 0.3-0.5 mm con 1 ó 2 primordios foliares. Se realiza un corte fino. Esta operación debe hacerse en una forma muy rápida y cuidadosa para evitar la deshidratación excesiva del meristemo que puede ocasionar la muerte del mismo (Fig. 20).



**Figura 20. Proceso de disección de los meristemas utilizando el esteroscopio.**

- Colocar el explante en el medio de cultivo para su crecimiento y desarrollo (Medio 4E, ver Anexos).
- La ubicación del explante en el medio de cultivo es muy importante. Debe quedar la parte basal sobre la superficie del medio, si queda de lado sobre uno de los primordios no va a permitir un desarrollo uniforme del meristemo y se va a ver beneficiado el desarrollo del primordio foliar.

### **Incubación del cultivo**

Los tubos son debidamente sellados y rotulados indicando el nombre de la accesión y fecha de siembra. Posteriormente, son ubicados en gradillas y llevados al cuarto de crecimiento el cual se encuentra bajo las siguientes condiciones:

Temperatura	: 26-28 °C
Iluminación	: 18.5 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$
Fotoperíodo	: 12 horas
Calidad de luz	: Lámparas fluorescentes, tipo luz día
Humedad relativa	: 50-70%

## Desarrollo del cultivo

- Durante la primera semana del cultivo poca diferenciación morfológica puede ser observada. Se presenta un leve incremento en el volumen del tejido. El desarrollo de una pigmentación verde clara puede ser evidente, siendo ésta la primera indicación de supervivencia del tejido. Si, por el contrario, el explante tiene una apariencia blanquizca esto es un indicativo de que ocurrió un daño en el momento de la escisión.
- Durante las próximas 3-4 semanas, se observa un incremento en el crecimiento pero se hace necesario pasar nuevamente el tejido al medio 4E, con un corte previo en su base para eliminar el posible callo que se forma.
- Después de tres semanas de haberse transferido nuevamente a un medio de cultivo se comienza a observar un crecimiento de los explantes, hay emisión de raíces y una planta completamente desarrollada es formada (Fig. 21). Con el desarrollo de esa planta se puede continuar con las pruebas de indización (ver protocolos del Laboratorio de Sanidad de Germoplasma).



Figura 21. Planta *in vitro* de yuca para dar inicio al proceso de indización.

### 3.4.2 Pasos a partir de material *in vitro*

#### Fuente de material

Los materiales que han sido introducidos *in vitro* (procedentes de países diferentes a Colombia) deben inicialmente ser registrados incluyendo los siguientes datos: lugar de

origen, fecha de introducción, número de tubos, identificación de las variedades, estado fisiológico (clorosis, muerte y otros síntomas), estado fitosanitario del cultivo (hongos y bacterias), y condiciones del medio (fenolización y estado de solidificación). Estos datos suministran información para la evaluación y el reporte del estado de llegada de los mismos.

Una vez inventariados los materiales estos deben someterse a una fase de establecimiento y recuperación la cual se lleva a cabo en el cuarto de crecimiento durante dos semanas. Transcurrido este tiempo se espera un reverdecimiento de las plántulas y se procede a realizar una nueva evaluación del estado fisiológico y fitosanitario del cultivo. Esta información es reportada al funcionario del ICA quien se encarga de realizar la nacionalización de los materiales y dar la aprobación para continuar con el proceso de micropropagación.

Logrado el establecimiento y recuperación de los materiales, viene posteriormente la etapa de micropropagación, la cual se lleva a cabo tomando como explantes los ápices de 0.5 cms (los cuales son utilizados para realizar el tratamiento de termoterapia explicada a continuación) y los nudos de 0.5 cms (que van a servir de respaldo hasta el momento en que se finaliza el proceso de termoterapia e indización), los ápices son sembrados en el medio de cultivo 17N y los nudos son sembrados en el medio de cultivo 4E.

#### **Tratamiento de termoterapia *in vitro***

- Los tubos de ensayo conteniendo los ápices son transferidos a la cámara de termoterapia la cual se encuentra a una temperatura de 37 °C día/35 °C noche, iluminación de 18.5  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  y fotoperíodo de 12 h (Fig. 22).
- Bajo esas condiciones se mantienen por un periodo de 12 días, al término de ese periodo se extrae nuevamente los ápices y se siembran en el medio 17N. Este proceso se realiza 3 veces y con una duración de 12 días cada uno.
- Al término del tercer ciclo se establece el material en condiciones del cuarto de crecimiento, se micropropaga y se entrega una o dos plantas al laboratorio de sanidad de germoplasma para que se realicen las pruebas de indización.

Con el desarrollo de estas actividades se ha logrado el saneamiento de clones de las enfermedades de restricción cuarentenaria (CsCMV, CsXV y FSD), mostrando que la eficiencia del control depende no sólo del tratamiento previo con calor (intensidad y duración) de las estacas infectadas, sino también, y significativamente, del tamaño del meristemo que se cultiva posteriormente (Roca et al., 1991).



**Figura 22. Cámara de termoterapia para realizar los tratamientos de limpieza de virus *in vitro*.**

### **3.5 Micropropagación**

La micropropagación es la multiplicación masiva de una especie a partir de tejidos u órganos, bajo condiciones *in vitro* para obtener, mantener y multiplicar los materiales genéticos. En cada uno de los casos se espera la formación de ramas axilares que puedan separarse y enraizarse; teóricamente los brotes axilares o laterales pueden a su vez producir ramas axilares adicionales a perpetuidad, a medida que se subcultiva cada brote recién formado o cada explante de nudo (Krikorian, 1991).

La técnica de micropropagación es importante donde pocos materiales son disponibles, donde material clonal es requerido, donde grandes cantidades de material para sembrar son necesarias. Los materiales que han resultado negativos en las diferentes pruebas de indización necesitan ser micropropagados con el fin de incrementar el número de explantes por cada clon y poder obtener posteriormente los 5 tubos por clon que se requieren para introducirlos al Banco de Germoplasma *in vitro*.

#### **El procedimiento es el siguiente:**

- La planta *in vitro* negativa es llevada a la cámara de flujo laminar. Ésta se extrae del tubo de ensayo y se procede a multiplicarla cortando los ápices y respectivos nudos con yemas axilares los cuales son sembrados posteriormente en el medio 4E (Fig. 23).
- Los tubos son sellados y llevados a las condiciones ya descritas del cuarto de crecimiento.
- Al cabo de 4-5 semanas se tienen plantas desarrolladas para ser sembradas en el medio de conservación (8S) (ver Anexos).

Cuando los materiales han resultado positivos para alguno de los virus se reinicia el procedimiento de eliminación de patógenos y posteriormente se realizan nuevamente las pruebas de indización.



**Figura 23. Proceso de micropropagación. Las fotografías a), b) y c) muestran el proceso de corte para la obtención de los explantes (ápices y yemas axilares), d) muestra la selección y siembra de los explantes en el medio, e) pueden verse el tubo rotulado y sellado, finalmente f) y g) los cuarto de crecimiento y conservación respectivamente a donde finalmente son llevados.**

### 3.6 Indización

Las plantas establecidas que han sido obtenidas después de haber sido sometidas al tratamiento de termoterapia, bien sea a partir de estacas o termoterapia *in Vitro*, deben ser evaluadas para los diferentes virus de importancia cuarentenaria como son el Mosaico Común de la yuca (CsCMV), Virus X de la yuca (CsXV) y la enfermedad del Cuero de Sapo (FSD) (Frison & Feliu, 1991).

Las plantas *in vitro* que han sido sometidas a los tratamientos de termoterapia deben ser propagadas de la siguiente manera:

- El ápice proveniente de la planta *in vitro* con tratamiento de termoterapia es sembrado en el medio de cultivo 17N (ver Anexo) y ubicado a continuación por un periodo de 4-5 semanas en el cuarto de crecimiento. Los nudos de la misma planta son sembrados en el medio de cultivo 4E y permanecen en el cuarto de crecimiento hasta la obtención de los resultados.
- La planta que ha sido sembrada en el medio de cultivo 17N después de 4 semanas en la que cumple el periodo de crecimiento y desarrollo es entregada al Laboratorio de Sanidad de Germoplasma (ver Manual de procedimiento Laboratorio de Sanidad de Germoplasma) con el propósito de que realicen las respectivas pruebas de indización.

### 3.7 Conservación *in vitro*

La necesidad de mantener clones seleccionados e híbridos promisorios para su distribución, en condiciones sanas, a programas nacionales de investigación agrícola estimuló algunos de los primeros estudios sobre el mantenimiento *in vitro* del germoplasma de yuca (Roca et al., 1989).

El método de conservación *in vitro* consiste en mantener los cultivos en condiciones físicas o químicas que permiten extender al máximo el intervalo de transferencia a medios frescos sin que ello afecte la viabilidad y estabilidad de los cultivos (CIAT, 1984), además desarrollar metodología que permita reducir los costos del mantenimiento de los mismos (Koo et al., 2004).

La tasa de crecimiento de los cultivos *in vitro* puede ser controlada empleando principalmente factores como temperatura, nutrientes orgánicos e inorgánicos, intensidad de la luz y fotoperiodo, reguladores de crecimiento, reguladores osmóticos e inhibidores de etileno.

El procedimiento del crecimiento controlado desarrollado en el CIAT para el cultivo de la yuca (medio NP) ha permitido que el material permanezca por un período entre 18-24 meses y el método tradicional (medio 8S) ha permitido que permanezca en un promedio de 11 meses.

El procedimiento establecido para el manejo de la colección *in vitro* es la siguiente:

#### 3.7.1 Labores de introducción

- El material micropropagado se siembra en el medio de conservación 8S (3 tubos) y en el medio de crecimiento mínimo NP (2 tubos) (ver Anexos). El explante utilizado son ápices y nudos, colocando 2 ó 3 explantes por tubo. Las dimensiones del tubo de vidrio empleado para la conservación es de 25 x 150 mm y el papel aluminio es utilizado para cubrir los tubos que son sellados inmediatamente con una cinta extensible.

Tres de los cinco tubos mantenidos por clon han sido sembrados en medio 8S con el fin de tener disponibilidad de material en el momento de preparar un envío y los dos restantes han sido sembrados en medio NP en el que la tasa de crecimiento ha sido menor y por lo tanto constituyen la reserva de material.

El número mínimo de tubos *in vitro* de yuca que se pueden mantener conservados bajo mínimo crecimiento es obviamente uno, pero como medida de seguridad y respaldo y para permitir una rápida recuperación y disponibilidad para la distribución y pruebas prácticas, es de 3-5 tubos por material (IPGRI-CIAT, 1994).

- Posteriormente, se coloca en el tubo de ensayo un anillo de cartón que tiene adherido la identificación del clon con código de barras y se ubican los tubos en una gradilla. El uso del código de barras nos ayuda a minimizar el problema de una incorrecta

identificación de los materiales y para facilitar la entrada de información a la base de datos (Fig. 24).



**Figura 24. Sistema de identificación de las accesiones utilizando códigos de barras.**

- Se registra en el colector de datos, mediante código de barras, la información de entrada, la cual consiste en los datos relacionados a la fecha en que entra el material a las condiciones de conservación, medio de cultivo en que ha sido sembrado el material y la persona responsable del subcultivo, posteriormente esta información se traslada al final del día a la base de datos (Fig. 25).



**Figura 25. Proceso de documentación en la base de datos del PRG.**

- Se ubican las gradillas en el cuarto de crecimiento por un periodo de 2-3 semanas, al final de este periodo se evalúa el estado de desarrollo y la sanidad de las plantas (observando si hay presencia de hongos y bacterias).
- Los materiales son ubicados posteriormente en el cuarto de conservación bajo las condiciones ya descritas para este cuarto (Fig. 26).



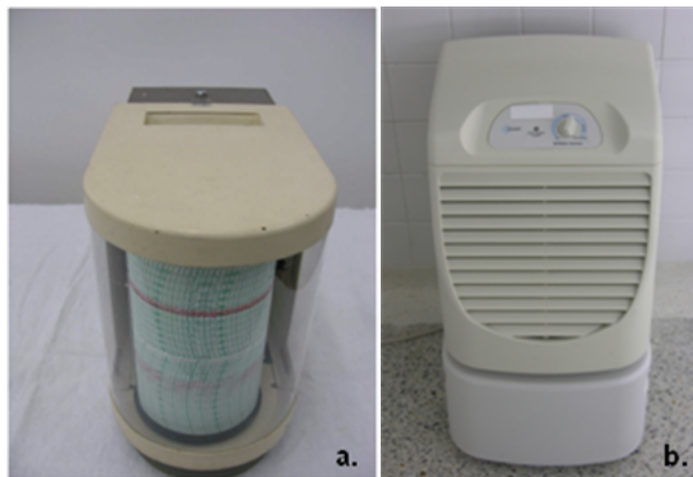
**Figura 26. Disposición de las estanterías en el cuarto de conservación del germoplasma de *Manihot*.**

El éxito de la conservación *in vitro* radica en las labores cotidianas que se llevan a cabo para su buen funcionamiento. Una de las labores principales es la supervisión de las condiciones físicas del cuarto de conservación (temperatura, luz, humedad relativa, asepsia, etc.) como también realizar las revisiones periódicas del estado fisiológico y fitosanitario de los materiales que se están conservando.

### 3.7.2 Mantenimiento

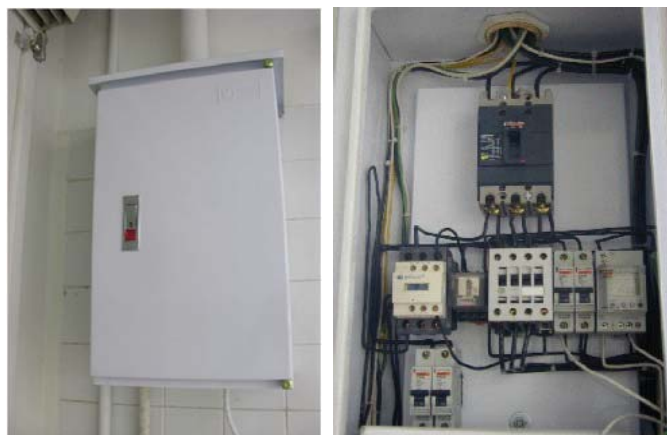
Factores como temperatura, humedad relativa e iluminación deben ser controlados en una forma regular debido a que son parte esencial en el esquema de conservación. Este control es realizado todos los días teniendo en cuenta lo siguiente:

- **Temperatura y humedad**  
En el cuarto de conservación se tiene ubicado un higrotermógrafo (Fig. 27a), que permite monitorear día y noche la temperatura y humedad relativa del cuarto según lo establecido para mantener unas tasas de crecimiento reducido. Una alteración en la temperatura conlleva a la revisión de la unidad de refrigeración. Si la humedad relativa es mayor al 70%, condición que puede propiciar el desarrollo de microorganismos y aumentar el riesgo de contaminación, es necesario en este caso utilizar el deshumificador que permiten regular este factor (Fig. 27b).



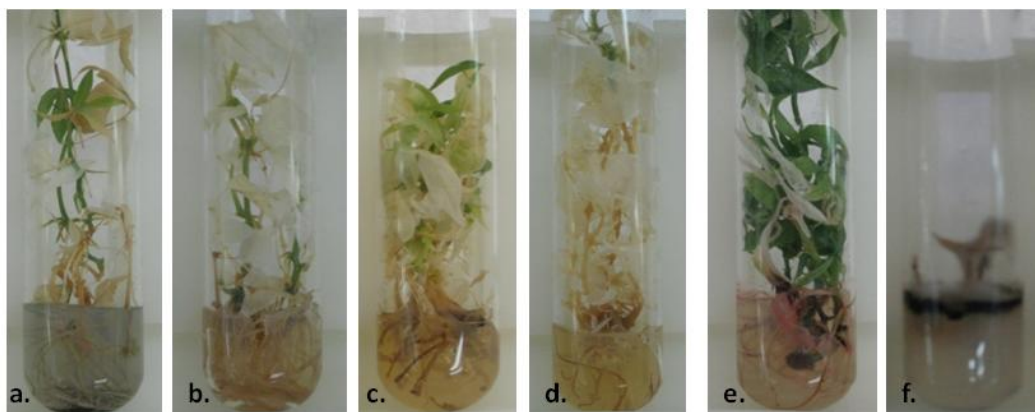
**Figura 27. Equipos para el monitoreo de las condiciones ambientales en el cuarto de Conservación: a) higrotermografo y b) deshumificador.**

- Iluminación  
Contar con una adecuada intensidad lumínica depende del buen funcionamiento de las lámparas fluorescentes. Por lo tanto, las lámparas dañadas deben ser reemplazadas oportunamente. Con relación al fotoperiodo es controlado con un reloj que funciona con una batería, que sustituye la energía eléctrica en caso de que ésta sea interrumpida (Fig. 28).



**Figura 28. Equipos requeridos para el control del fotoperíodo en los respectivos cuartos.**

- Los cultivos  
Se debe tener en cuenta que los cultivos tengan hojas y tallos verdes y que las raíces presenten crecimiento normal. Los cultivos deben renovarse antes de que presenten una total defoliación o presentan una zona necrótica entre la raíz y el tallo. Un color amarillento en los cultivos nos indica que es necesario proceder a realizar el subcultivo y sembrar nuevamente en un medio de cultivo fresco (Fig. 29).



**Figura 29. Estado fisiológico de las plantas para salir al proceso de subcultivo. Las fotografías a), b), c) y d) muestran diferentes estados de deterioro y defoliación. En e) y f) se observan contaminación bacteriana y fúngica respectivamente.**

- Medio nutritivo

Cuando el medio de cultivo está fresco o en buenas condiciones se ve cristalino, pero con el tiempo se torna más oscuro y esto puede ser debido a la secreción de metabolitos de las raíces, especialmente de tipo fenólico. El uso de carbón activado disminuye notablemente este efecto. Cuando el medio presenta estas características unidas al deterioro del cultivo es necesario proceder a la resiembra en un medio nuevo.

- Tubos de ensayo

Es importante revisar el estado del tubo de ensayo y observar que el vidrio no tenga fisuras, igualmente se debe verificar que la tapa y el plástico estén en buenas condiciones, esto con el fin de prevenir la entrada de contaminantes y evitar la deshidratación del medio de cultivo.

- Asepsia

Se debe tener limitado el acceso de personal que labore en el campo e invernaderos, al área de transferencia, cuarto de crecimiento y cuarto de conservación. Es importante utilizar en estos espacios blusas de laboratorio exclusivas para laborar en estas áreas de trabajo.

## Renovación

Además de las labores descritas anteriormente para el mantenimiento del cuarto de conservación deben realizarse labores de renovación del material que ha cumplido su ciclo de conservación. El procedimiento es el siguiente:

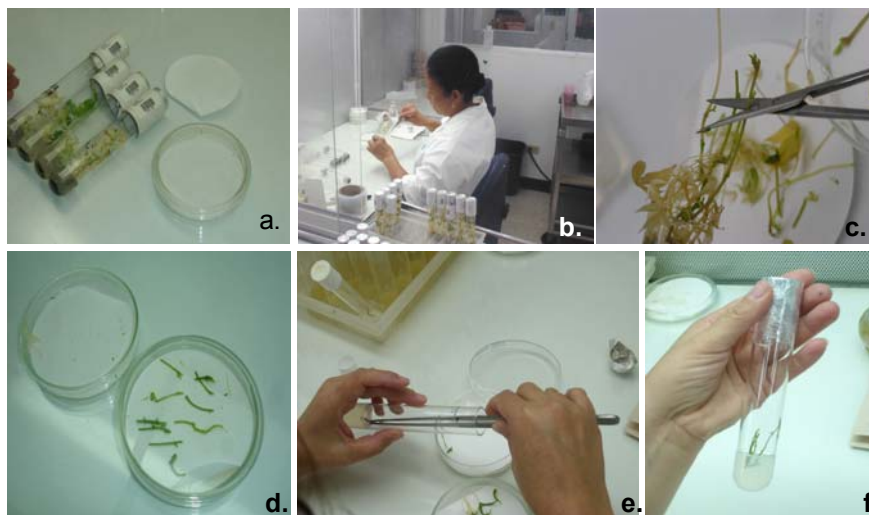
- Cada semana se realiza una revisión a cada una de las variedades que se encuentran en el banco de germoplasma *in vitro*. Se observa el estado fitosanitario y fisiológico del material. Existen diferentes causas que requieren la salida de una variedad a subcultivo:

- a) Aquel que presente contaminación con hongos se elimina en el caso de que sea un solo tubo, y si por algún motivo los 5 tubos presentan este tipo de contaminación se puede aplicar la metodología de desinfección con hipoclorito de sodio.
- b) Si la causa de la contaminación son bacterias se utiliza antibióticos (vancomicina) a una concentración de 20- 40 mg/l (ver Anexos) o se pueden utilizar medios líquidos como el 8S con un pH de 3.5 o ampicilina a una concentración de 100 mg/l.
- c) Aquel que presente defoliación, medio de cultivo que comienza a tornarse amarillento y muerte del tallo es necesario proceder a realizar el subcultivo (Fig. 30).



**Figura 30. Revisión semanal de las plantas para determinar la renovación o subcultivo de las mismas.**

- Los materiales que salen a subcultivo son registrados en el colector de datos. La información que se registra es la siguiente: Nombre de la variedad, fecha del subcultivo, nombre de la persona responsable de hacer la transferencia y causa del subcultivo.
- Los materiales son llevados al cuarto de subcultivo y se procede a su renovación nuevamente en el medio 8S (3 tubos) y NP (2 tubos). Se procede de igual manera como en el manejo de introducción a conservación (Fig. 31).



**Figura 31. Proceso del subcultivo o renovación de materiales en el cuarto de subcultivo. Las fotografías muestran a) estado del material a renovar, b) y c) muestran el proceso de selección y corte para la obtención de los explantes (ápices y yemas axilares), d) y e) muestra explantes y siembra de los explantes en el medio y en f) pueden verse el tubo sellado.**

- Una vez sembrados en el medio de cultivo (8S, o NP, o 12A) se registra la entrada en el colector de datos y se hace un registro de los siguientes parámetros: Nombre de la variedad, fecha de entrada, medio de cultivo y responsable.
- Se ubican los tubos nuevamente en el cuarto de crecimiento (2-3 semanas), posteriormente, después de ese tiempo se revisa su estado fisiológico y fitosanitario, son ubicados en el cuarto de conservación permaneciendo en ese lugar hasta el momento que se requiera nuevamente el subcultivo.
- Al finalizar el día los registros acumulados en el colector de datos se colocan en la base de datos central.

El registro de entrada y salida de una variedad nos permite determinar cual es el tiempo que puede permanecer una variedad conservada *in vitro* y con esta información también podemos determinar el momento que una variedad debe salir a subcultivo (Fig. 32).

Accesión: BRA 65    Género: MANIHOT    Especie: ESCULENTA

Conservación    Ubicación    Indexación    Cambio de Med

Variedad: BRA 65

Fecha Entrada	Medio Cultivo	Fecha Salida	Causa Salida
1 12/12/2006	8S MEDIO DE CONSERVACIO	15/08/2007	S SUBCULTIVO
2 12/12/2006	8S MEDIO DE CONSERVACIO	15/08/2007	S SUBCULTIVO
3 12/12/2006	8S MEDIO DE CONSERVACIO	15/08/2007	S SUBCULTIVO
4 12/12/2006	8S MEDIO DE CONSERVACIO	15/08/2007	S SUBCULTIVO
5 12/12/2006	8S MEDIO DE CONSERVACIO	15/08/2007	S SUBCULTIVO

Responsable\_Entrada: A.MONTOYA    Responsable\_Salida: N.P.ESCOBAR

Bonsal: 1    Designada: 1    Core: 0    Disponibles: 1    Enter

Accesión CIAT Record: 2/?

**Figura 32. Registro en la base de datos de la información de salida y entrada de las accesiones a subcultivo.**

### 3.8 Caracterización

Resulta importante para una colección *ex situ* que sus materiales estén bien caracterizados, esto puede ser alcanzado utilizando una serie de técnicas como: a) descriptores morfológicos y agronómicos, b) marcadores bioquímicos, incluyendo análisis de isoenzimas, y c) marcadores moleculares incluyendo RFLPs, RAPDs y microsatélites.

Para un efectivo manejo de la colección de yuca el uso de las metodologías mencionadas han sido utilizadas para las siguientes etapas:

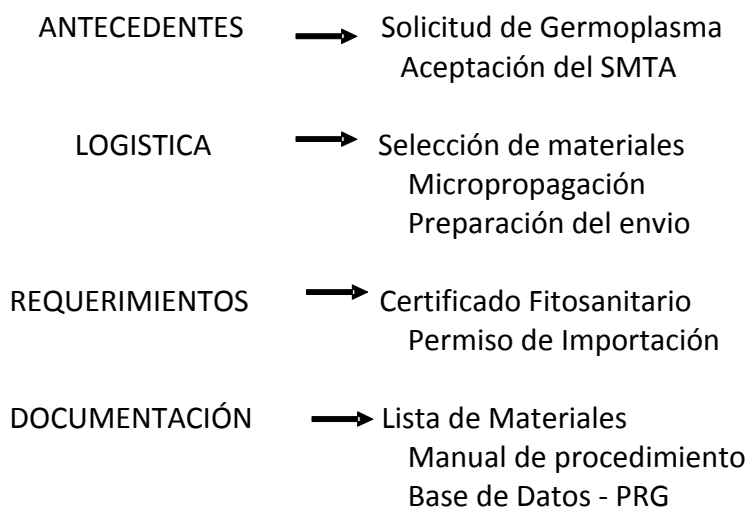
- 1) Verificar la integridad genética de los materiales mantenidos bajo la técnica de conservación *in vitro* (después de varios años de conservación).
- 2) Detectar mezclas de los materiales.
- 3) Identificar los duplicados genéticos (redundancia de los materiales).

Los detalles de esta actividad de caracterización se presentan en el Manual de Procedimientos del Laboratorio de Calidad Genética.

### 3.9 Distribución

Otra función importante del banco de germoplasma *in vitro* es la distribución de germoplasma a los diferentes usuarios. Esta actividad se ejecuta bajo la normatividad establecida en el Tratado Internacional sobre Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura aprobado por la Conferencia de la FAO en su 31<sup>o</sup> período de sesiones, el 3 de noviembre de 2001, y que está en vigor desde el 29 de junio de 2004. El artículo 12.4 del Tratado establece que deberá facilitarse el acceso al amparo del Sistema Multilateral con arreglo de un Acuerdo Normalizado de Transferencia de Material (SMTA).

El proceso de distribución de germoplasma *in vitro* comprende las etapas descritas a continuación:



Solicitud de germoplasma: los diferentes usuarios pueden realizar las solicitudes por diferentes medios: correo físico, correo electrónico o por la página Web del Programa de Recursos Genéticos ( <http://www.ciat.cgiar.org/urg> ).

Se debe contar con la aceptación al Acuerdo Normalizado de Transferencia de Material (SMTA). Para lo cual puede elegirse entre tres métodos de aceptación:

- Firma del documento de aceptación del acuerdo normalizado de transferencia de material.
- Acuerdos normalizados de transferencia de material en envíos sellados. El material se suministra previa aceptación expresa de los términos del Acuerdo. El suministro del material y su retención por el receptor entrañan la aceptación de los términos del acuerdo.
- Acuerdos normalizados de transferencia de material electrónicos. A través del correo electrónico se aceptan las condiciones establecidas *supra*. Si esta forma es elegida, el material deberá ir también acompañado de una copia escrita del Acuerdo normalizado de transferencia de material.

Selección de las accesiones y micropropagación. Los materiales para la distribución son elegidos por los usuarios según los objetivos y necesidades de la investigación que estén desarrollando. Una vez identificadas las accesiones solicitadas por el usuario se procede a la micropropagación de las mismas a partir de los materiales conservados en el banco *in vitro*. Los materiales son transferidos al medio de multiplicación o enraizamiento (4E o 17N) los cuales favorecen el crecimiento tanto de la parte aérea como de de las raíces facilitando el proceso de transferencia y aclimatización al invernadero o la posterior multiplicación *in vitro* por parte del solicitante del material.

Después de 4 a 6 semanas se tendrán plántulas enraizadas, que es la forma más adecuada, desde el punto de vista de su manejo, para el intercambio de germoplasma clonal (CIAT, 1982).

Preparación del envío. Las plántulas *in vitro* micropropagadas son cuidadosamente revisadas antes de proceder a su empaque. Se observa el estado general de la planta, el medio de cultivo, la ausencia de contaminación bacteriana y/o fúngica, el sellado y la adecuada rotulación de los materiales, la cual se realiza empleando marcador de tinta permanente de color negro, indicando en letra y números claros y legibles, la respectiva identificación de los materiales. Todo esto con el propósito de asegurarse de que estén en adecuadas condiciones.

Los tubos se colocan en bandejas acanaladas de cartón o preferiblemente de poliestireno, se sujetan a ellas con cinta adhesiva. Las bandejas se van colocando una encima de otra y el conjunto es asegurado con cinta adhesiva, posteriormente se empacan en cajas de cartón, rotuladas con información acerca del contenido, manejo cuidadoso, destinatario y remitente.

La distribución incluye el respectivo certificado fitosanitario expedido por el ICA, en el cual se explican los tratamientos y pruebas de detección de enfermedades aplicadas al material vegetativo. Previamente, el solicitante debe enviar el respectivo permiso de importación expedido por la autoridad competente del lugar de destino del material o la respectiva comunicación escrita en la que se informa la ausencia de requerimiento de éste para el ingreso del material vegetal al país de destino (Fig. 33).



**Tabla 3. Diferentes categorías de usuarios y propósitos empleados en la distribución de materiales *in vitro*.**

Categorías de Distribución	
Tipos de Usuario	Propósitos
1. Centros del CGIAR	1. Mejoramiento
2. Compañías comerciales	2. Agronomía
3. Agricultores	3. Investigación Aplicada
4. Bancos de germoplasma	4. Investigación Básica
5. Instituciones nacionales	5. Entrenamiento y capacitación
6. Organizaciones no gubernamentales ONGs	6. Otros
7. Organizaciones regionales	7. Conservación
8. Universidades	

The screenshot shows a Windows 95/NT application window titled "Developer/2000 Forms Runtime for Windows 95 / NT - [DISTRIBUCION YUCA]". The window has a menu bar with "Acción", "Edición", "Consulta", "Bloque", "Registro", "Campo", and "Ayuda". Below the menu bar is a toolbar with icons for file operations and navigation. The main area contains a form with the following fields and values:

- Accessión:
- Género:
- Especie:
- Nuevo Envío:
- Composicion del envío:
- Destinatarios:
- Material\_enviado:
- Material Por Institucion:
- Datos Básicos**
  - Npedido: C20070024
  - F Solicitud: 13/11/2006
  - F Envío: 29/05/2007
  - N Acciones: 100
  - Tipo Material: INVITRO
  - Cooperador: CIATCAS-8951
  - Institución: CHINESE ACADEMY OF TROPICAL AGRICULTU
  - Sigla: CATAS
  - País ISO: CHN | CHINA
  - Estación:
  - Apellido: WENQUAN
  - Nombre: WANG
  - T Usuario: 8. UNIVERSITY
  - Propósito: 1. MEJORAMIENTO
  - Responsable: URG5
  - Mta Número: 18
  - Certificado Fitosanitario: 299221
- Más Información
- Enter

At the bottom of the window, there is a status bar with the text: "Identificador del pedido: inicial del cultivo [C] cuatro números del año y un consecutivo" and "Record: 1/1".

Npedido	Accesión	Procedencia	Cant Plantas	Cant Sem	Gramos	F Actualización
C20070024	CG 354- 2	PAL1999	3			26/09/2007
	CG 1231- 3	PAL1999	2			26/09/2007
	CM 6173- 8	PAL1999	3			26/09/2007
	SG 427- 87	PAL1999	2			26/09/2007
	SG 629- 4	PAL1999	2			26/09/2007
	SG 638- 6	PAL1999	3			26/09/2007
	SG 702- 11	PAL1999	2			26/09/2007
	SG 702- 19	PAL1999	3			26/09/2007
	SM 523- 2	PAL1999	3			26/09/2007
	SM 707- 17	PAL1999	2			26/09/2007
	SM 853- 21	PAL1999	2			26/09/2007
	ARG 6	PAL1999	2			26/09/2007

Figura 34. Registro de la información básica y composición del envío en la base de datos.

### 3.10 Duplicados de seguridad

Si la colección *in vitro* es la única fuente de material ésta debe ser duplicada por lo menos en dos sitios como medida de seguridad. A partir del 2005, se firmó un acuerdo con el Centro Internacional de la Papa (CIP) en Perú para mantener el “Black box” de yuca (un duplicado no activo). Un total de 3 tubos por material son enviados (en el medio de crecimiento mínimo, NP) (Fig. 35).

La colección núcleo de yuca (630 accesiones) es también conservada como duplicado de seguridad en nitrógeno líquido.



Figura 35. Forma de empaque del duplicado de seguridad de yuca para ser enviado al CIP.

#### 4. CONTROL DE CALIDAD

La totalidad de las actividades desarrolladas por el laboratorio de cultivo de tejidos para el mantenimiento de la colección *in vitro* de yuca exigen un cuidadoso manejo, algunos de los posibles riesgos y sus mecanismos de control se indican a continuación:

**MEZCLA MECÁNICA.** Existe la posibilidad de la mezcla mecánica, este riesgo se ha logrado reducir con el etiquetado de las accesiones con su respectivo código de barras, esto es aplicado a cada uno de los 5 tubos mantenidos en el banco. Posibles dudas son despejadas con la ayuda de la información registrada en la base de datos en el momento de salida y de ingreso al banco, previo y posterior al subcultivo, respectivamente. Algunas características morfológicas desarrolladas *in vitro* pueden brindar información adicional. En el mejor de los casos, cuando no ha sido posible determinar con claridad y certeza el nombre de la accesión, se recomienda descartar el material y realizar la propagación empleando el tubo que se mantiene como reserva en el banco.

Las actividades de subcultivo se realizan de manera individual (por accesión) es decir una vez se ha terminado completamente el subcultivo de un material se procede a empezar el siguiente. El personal que realiza las actividades de subcultivo ha sido instruido en el manejo cuidadoso para evitar confusiones.

**PREPARACIÓN DE SOLUCIONES STOCK Y MEDIOS DE CULTIVO.** Para una correcta preparación de las soluciones stock es importante:

- El uso de una balanza analítica para el pesaje de los componentes.
- Asegurarse de que los materiales empleados en la preparación y almacenamiento de la misma se encuentren limpios y secos. Estos deben haberse lavado y enjuagados con agua destilada para retirar los restos de sales del agua corriente.
- La mezcla de los componentes debe hacerse con la ayuda de un agitador magnético.
- Una vez finalizada la preparación se debe rotular el recipiente en que se almacenará indicando el nombre de la solución, concentración, fecha de preparación y responsable de la misma.

El adecuado marcado y rotulado de los recipientes de vidrio permite la identificación, facilita su manejo y ubicación en el momento de ser empleados en la preparación de medios de cultivo.

Para facilitar y reducir los riesgos de error en la preparación de medios de cultivo se han establecido formatos con las formulaciones indicando las cantidades y el orden en que deben agregarse las soluciones stock. También debe tenerse en cuenta:

- Ubicar en la mesa de trabajo las soluciones stock en el orden establecido en la formulación. Una vez agregada al medio estas soluciones deben retirarse para evitar confusiones o dudas en el momento de continuar con la preparación.
- Cada solución debe agregarse empleando una pipeta limpia, no deben reutilizarse en la adición de otra solución ya que podría contaminarse y mezclarse las soluciones.

- Una vez terminada la preparación del medio de cultivo éste debe ser rápidamente dispensado en los tubos o recipientes donde serán dispuestos, seguidamente se tapan. Cabe resaltar que los tubos, recipientes y tapas empleados deben estar limpios.
- Posteriormente las gradillas son cubiertas con papel el cual se rotula con el nombre del medio y la fecha de preparación.

**PROCEDIMIENTO DE ESTERILIZACIÓN.** La esterilización es el proceso mediante el cual cualquier material, sitio o superficie se libera completamente de cualquier microorganismo vivo o espora. Se dice que tales materiales o sitios son estériles o se han esterilizado. En la terminología médica se utiliza generalmente la palabra asepsia para designar la condición en la que están ausentes los microorganismos patógenos; quienes trabajan en el cultivo de tejidos de plantas utilizan la palabra *aséptico* como sinónimo de estéril.

La desinfección se limita generalmente al proceso de destrucción de los microorganismos mediante métodos químicos; la esterilización se refiere a menudo al método físico para la destrucción de microorganismos.

Existen tres métodos de esterilización: esterilización con calor seco (horno eléctrico), esterilización química (en frío), y esterilización con vapor a presión (autoclave o calor húmedo con presión). Este último es el método usado en el laboratorio de cultivo de tejidos para la esterilización de medios de cultivo, agua y material seco. Algunos aspectos a tener en cuenta en la fase de esterilización son:

- Es importante conocer el manual de instrucciones específicas para el manejo de la autoclave. Seguir las instrucciones del fabricante siempre que sea posible garantizan un adecuado uso y funcionamiento del mismo.
- Envolver los elementos (herramientas, cajas de petri entre otros) y medios de cultivo antes de la esterilización, esto ayuda a evitar y disminuir la probabilidad de que se contaminen antes de usarlos.
- Los elementos y gradillas deben acomodarse de manera que permita la circulación libre de vapor.
- En general, esterilice durante 45 minutos material seco (cajas de petri, botellas con agua, cartulinas, erlenmeyers y herramientas), para los medios de cultivo, durante 15 minutos a 121 °C (250 °F) y una presión de 15 libras por pulgada cuadrada. El tiempo se empieza a contar cuando la autoclave alcanza la presión y la temperatura requerida.
- Si la autoclave es automática, el calor se interrumpirá y la presión comenzará a bajar una vez se completa el ciclo de esterilización. Si la autoclave no es automática, se debe apagar la fuente calorífica y esperar hasta que el manómetro marque “cero” para abrir la autoclave. Posteriormente, se abre lentamente la tapa o puerta para permitir la salida del vapor restante – durante un periodo de por lo menos 10 minutos, finalmente se procede a sacar los paquetes (Fig. 36).



**Figura 36. Proceso de la esterilización de medios de cultivo.**

- Tener en cuenta el tiempo necesario para esterilizar líquidos en autoclave depende de muchos factores, el más importante es el volumen de líquido que se está esterilizando. En general es la siguiente:

Rango de volumen (ml)	Tiempo (minutos)
< 75	15
75- 100	20
250-500	25
1000	30
1500	35
2000	40

- Posterior al autoclavado los elementos deben almacenarse en condiciones óptimas. Los medios de cultivo, una vez fríos, son empacados en bolsas plásticas y refrigerados. El material seco (cajas de petri, cartulinas y herramientas) es mantenido en el horno de secado. Erlenmeyers y agua bidestilada estéril son colocados en la respectiva estantería.
- Existen tres formas para vigilar la efectividad de la esterilización que son: indicadores mecánicos, químicos y biológicos. El más usado en nuestro laboratorio son las cintas indicadoras con líneas que cambian de color cuando se alcanza la combinación esperada de temperatura, vapor a presión y tiempo. Se debe colocar a cada paquete o elemento a esterilizar un pequeño pedazo de cinta indicadora.

- Hay que tener en cuenta que algunas sustancias químicas (hormonas y antibióticos) son termolábiles a las temperaturas de esterilización con autoclave. En esos casos es preciso utilizar otros sistemas de esterilización, como el filtrado.

**CONDICIONES AMBIENTALES.** Las condiciones de los cuartos de crecimiento y conservación son monitoreadas diariamente. Una vez son detectadas por los sistemas de seguridad se toman medidas correctivas para evitar que estas alteraciones puedan causar daños significativos en los materiales. El mantenimiento periódico de los sistemas de refrigeración e iluminación es realizado por el personal especializado en este tema.

**CONTAMINACIÓN Y PÉRDIDA DE MATERIALES.** La revisión periódica del estado de conservación de los materiales en el banco previene pérdidas por deterioro de los materiales. La base de datos y la inspección visual constituyen las principales herramientas en el momento de determinar el cumplimiento del periodo de conservación.

La evaluación de la presencia de contaminación bacteriana o fúngica se realiza por inspección visual, una vez determinado el número de tubos contaminados y el agente causal, se decide el proceso a seguir. Si la contaminación es bacteriana se emplea antibiótico o medios con pH de 3.5, y si la contaminación es fúngica se realiza desinfección empleando diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio. De ser posible a partir de los tubos no contaminados puede realizarse la recuperación del material y el posterior retorno a las condiciones de conservación.

A continuación se describen los puntos críticos de control que se han identificado para prevenir la contaminación:

Al iniciar la jornada de trabajo es importante lavarse las manos con agua y jabón y posteriormente enjuagar con alcohol al 70% antes de iniciar la sesión de siembra. Es indispensable el uso de la bata de laboratorio la cual solo debe emplearse dentro de las instalaciones del laboratorio.

Al iniciar la jornada de trabajo en la cámara de flujo laminar, el primer paso es el encendido del flujo y la luz, posteriormente se realiza la limpieza usando algodón y alcohol al 96%. Igualmente debe limpiarse la parte externa de los recipientes que entran del exterior al área de trabajo con alcohol al 70% y flamear la boca de cada tubo antes y después de sembrar el explante.

Las labores de siembra y disección deben realizarse lo más cerca posible a la llama del mechero evitando la exposición prolongada al ambiente de los explantes y los medios de cultivo. La manipulación de los explantes debe ser del centro hacia el interior de la cámara de flujo laminar.

Cada vez que las manos salgan de la cámara de flujo, se deben rociar con alcohol al 70% antes de introducirlos nuevamente en la cámara. Debe evitarse hablar durante la realización de las actividades de subcultivo.

Se recomienda utilizar varios juegos de herramientas esterilizadas con el propósito de evitar sobreexposición al calor de los explantes en el momento del corte y siembra de los mismos.

La limpieza y aseo del laboratorio se realiza diariamente. Ésta limpieza incluye aspirado de pisos y trapeado con una solución de hipoclorito de sodio al 5.25%. De igual forma mensualmente se programa una limpieza y desinfección general que incluye lavado de pisos, mesones y paredes con detergente, aspirado de superficies y estanterías, desinfección y limpieza de sillas, cámaras de flujo laminar, carros de laboratorio, ventanas en todas las áreas de trabajo empleando alcohol al 70%, seguido de una solución al 0.5% de hipoclorito de sodio. En algunos casos en la limpieza de mesones se emplea esencia de menta.

## 5. ANEXOS

## Anexo 1. Soluciones stock (MS) para preparación de medio

Stock	Sustancia	Cantidad	Volumen de Stock por litro
1	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> KNO <sub>3</sub> MgSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	82.5 gr 95.0 18.5 8.5	en 1000 ml de H <sub>2</sub> O bidestilada  VS <sub>1L</sub> = 20 ml
2	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O Na <sub>2</sub> MO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	620 mg 2176 mg 860 mg 25 mg 2.5 mg 2.5 mg	en 100ml de H <sub>2</sub> O bidestilada  VS <sub>1L</sub> = 1 ml
3	KI	75 mg	en 100ml de H <sub>2</sub> O bidestilada VS <sub>1L</sub> = 1 ml
4	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	15000 mg	en 100ml de H <sub>2</sub> O bidestilada VS <sub>1L</sub> = 3 ml
5 <sup>b</sup>	a) Na <sub>2</sub> EDTA b) FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1492 mg 1114 mg	en 200ml de H <sub>2</sub> O bidestilada VS <sub>1L</sub> = 5ml
6	Thiamina-HCl	20 mg	en 200ml de H <sub>2</sub> O bidestilada VS <sub>1L</sub> = 5ml
7	M-inositol	1600 mg	en 200ml de H <sub>2</sub> O bidestilada VS <sub>1L</sub> = 6.25 ml

a. Las soluciones stock 2 y 6 deben ser guardadas en el congelador, las restantes a 8-10 °C. El stock 5 debe almacenarse protegido de la luz.

b. Separadamente se disuelve *a* y *b* en 50 ml de agua cada uno, la *b* es calentada en baño de maría, se mezclan bien ambas soluciones, se deja enfriar y se completa con agua hasta 200 ml.

Fuente: Roca, W.M., Rodríguez, J.A., Mafla, G., & Roa, J.C. 1984. Procedures for recovering cassava clones distributed *in vitro*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia, 8 p.

## Anexo 2. MEDIO DE PROPAGACION (4E)

MS (2% sacarosa) + 0.04 mg/l BAP + 0.05 mg/l GA + 0.02 mg/l ANA  
AGAR 0.7%.

### Preparación:

En un volúmen de aprox. 200 ml de H<sub>2</sub>O bidestilada agregar:

- |     |   |         |
|-----|---|---------|
| 1.  | Solc. stock 1 (MS)  | 20.0 ml |
| 2.  | Solc. stock 2 (MS)  | 1.0 ml  |
| 3.  | Solc. stock 3 (MS)  | 1.0 ml  |
| 4.  | Solc. stock 4 (MS)  | 2.9 ml  |
| 5.  | Solc. stock 5 (MS)  | 5.0 ml  |
| 6.  | Tiamina HCl (stock 100 ppm)   | 10.0 ml |
| 7.  | Inositol (stock 8000 ppm)   | 12.5 ml |
| 8.  | Sacarosa  | 20.0 g  |
| 9.  | BAP (stock 10 ppm)  | 4.0 ml  |
| 10. | GA (stock 10 ppm)   | 5.0 ml  |
| 11. | ANA (stock 10 ppm)  | 2.0 ml  |
| 12. | Carbón activado   | 0.5 g   |
| 13. | Completar a 500 ml con H <sub>2</sub> O bidestilada                           |         |
| 14. | Ajustar pm 5.7-5.8  |         |
| 15. | Disolver por calentamiento 7 g AGAR en 500 ml de H <sub>2</sub> O bidestilada |         |
| 16. | Mezclar bien el medio con la solución de agar                                 |         |
| 17. | Ajustar el volúmen final a 1000 ml.   |         |

\* Para preparar el medio de Murashige y Skoog a partir de soluciones stock (ver anexo 1).

Fuente: Roca, W.M., Nolt, B., Mafla, G., Roa, J.C., & Reyes, R. 1991. Eliminación de virus y propagación de clones en la yuca (*Manihot esculenta* Crantz) In: 'Roca, W.M., Mroginski, L.A., Fundamentos y Aplicaciones', pp. 403-421.

### Anexo 3. MEDIO DE ENRAIZAMIENTO (17N)

1/3 MS (2% sucrosa) + 0.01 mg/l ANA + 0.01 mg/l GA + 25 mg/l (fertilizante 10-52-10).

#### Preparación:

En un volúmen aprox. de 200 ml de H<sub>2</sub>O bidestilada agregar:

- |     |  |         |
|-----|--|---------|
| 1.  | Solc. stock 1 (MS)   | 6.7 ml  |
| 2.  | Solc. stock 2 (MS)   | 0.3 ml  |
| 3.  | Solc. stock 3 (MS)   | 0.3 ml  |
| 4.  | Solc. stock 4 (MS)   | 1.0 ml  |
| 5.  | Solc. stock 5 (MS)   | 1.7 ml  |
| 6.  | Tiamina HCl (stock 100 ppm)  | 10.0 ml |
| 7.  | Inositol (stock 8000 ppm)  | 12.5 ml |
| 8.  | Sacarosa   | 20.0 g  |
| 9.  | ANA (stock 1 ppm)  | 10.0 ml |
| 10. | GA (stock 1 ppm)   | 10.0 ml |
| 11. | P.P. (Fertilizante 10-52-10)   | 25.0 mg |
| 12. | Completar a 500 ml con H <sub>2</sub> O bidestilada                    |         |
| 13. | Ajustar pH 5.7-5.8   |         |
| 14. | Disolver por calentamiento 7 g agar en 500 ml de H <sub>2</sub> O bid. |         |
| 15. | Mezclar bien el medio con la solución de agar                          |         |
| 16. | Ajustar el volúmen final a 1000 ml.                                    |         |

Fuente: CIAT, 1982. El cultivo de meristemas para el saneamiento de clones de yuca. Guía de estudio. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia, 45pp.

#### Anexo 4. MEDIO DE CONSERVACION ( 8S )

MS (2% Sucrose) + 0.02 mg/l BAP + 0.1 mg/l GA + 0.01 mg/lANA.

AGAR 0.7%: 7 g en 500 ml de H<sub>2</sub>O bidestilada

##### Preparación:

Disolver en 200 ml de H<sub>2</sub>O bidestilada:

- |     |   |         |
|-----|---|---------|
| 1.  | Solc. stock 1 (MS)  | 20.0 ml |
| 2.  | Solc. stock 2 (MS)  | 1.0 ml  |
| 3.  | Solc. stock 3 (MS)  | 1.0 ml  |
| 4.  | Solc. stock 4 (MS)  | 2.9 ml  |
| 5.  | Solc. stock 5 (MS)  | 5.0 ml  |
| 6.  | Tiamina HCl (stock 100 ppm)   | 10.0 ml |
| 7.  | Inositol (stock 8000 ppm)   | 12.5 ml |
| 8.  | Sacarosa  | 20.0 g  |
| 9.  | BAP (stock 10 ppm)  | 2.0 ml  |
| 10. | GA (stock 10 ppm)   | 10.0 ml |
| 11. | ANA (stock 10 ppm)  | 1.0 ml  |
| 12. | Carbón activado   | 0.5 g   |
| 13. | Completar con 500 ml de H <sub>2</sub> O bidestilada                          |         |
| 14. | Ajustar el pH 5.7-5.8   |         |
| 15. | Disolver por calentamiento 7 g agar en 500 ml de H <sub>2</sub> O bidestilada |         |
| 16. | Mezclar bien el medio con la solución de agar                                 |         |
| 17. | Ajustar el volúmen final a 1000 ml.   |         |

Fuente: CIAT, 1984. El cultivo de meristemas para la conservación de germoplasma de yuca *in vitro*. Guía de estudio. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia, 41pp.

### Anexo 5. MEDIO DE CRECIMIENTO MINIMO (NP)

MS (2% Sucrose) + 0.02 mg/l BAP + 0.1 mg/l GA + 0.01 mg/l ANA + 10 mg/l Nitrato de plata

AGAR 0.7%: 7 g en 500 ml de H<sub>2</sub>O bidestilada.

#### Preparación:

Disolver en 200 ml of H<sub>2</sub>O bidestilada:

- |     |  |         |
|-----|--|---------|
| 1.  | Solc. stock 1 (MS)   | 20.0 ml |
| 2.  | Solc. stock 2 (MS)   | 1.0 ml  |
| 3.  | Solc. stock 3 (MS)   | 1.0 ml  |
| 4.  | Solc. stock 4 (MS)   | 2.9 ml  |
| 5.  | Solc. stock 5 (MS)   | 5.0 ml  |
| 6.  | Tiamina HCl (stock 100 ppm)  | 10.0 ml |
| 7.  | Inositol (stock 8000 ppm)  | 12.5 ml |
| 8.  | Sacarosa   | 20.0 g  |
| 9.  | BAP (stock 10 ppm)   | 2.0 ml  |
| 10. | GA (stock 10 ppm)  | 10.0 ml |
| 11. | ANA (stock 10 ppm)   | 1.0 ml  |
| 12. | Nitrato de Plata (NP)  | 10.0 mg |
| 13. | Completar con 500 ml de H <sub>2</sub> O bidestilada                           |         |
| 14. | Ajustar el pH 5.7-5.8  |         |
| 15. | Disolver por calentamiento 7 g agar en 500 ml de H <sub>2</sub> O bidestilada. |         |
| 16. | Mezclar bien el medio con la solución de agar                                  |         |
| 17. | Ajustar el volúmen final a 1000 ml.  |         |

Fuente: Mafla, G., Roa J.C. & Guevara C.L. 2000. Advances on the in vitro growth control of cassava, using silver nitrate. In: 'Cassava Biotechnology', Carvalho, L., Thro, A.M., Vilarinhos, A. D. (eds.), Empresas Brasileiras de Pesquisa Agropecuaria, Brasilia, Brasil, pp. 439-446.

**Anexo 6. MEDIO DE SILVESTRES  
(12A<sub>3</sub>)**

MS (3% sucrosa) + 0.2 mg/lit Kinetin + Vitaminas + 1.0 g/l carbón activado

Preparación:

Disolver en 200 ml of H<sub>2</sub>O bidestilada:

- |     |  |         |
|-----|--|---------|
| 1.  | Solc. stock 1 (MS)   | 20.0 ml |
| 2.  | Solc. stock 2 (MS)   | 1.0 ml  |
| 3.  | Solc. stock 3 (MS)   | 1.0 ml  |
| 4.  | Solc. stock 4 (MS)   | 3.0 ml  |
| 5.  | Solc. stock 5 (MS)   | 5.0 ml  |
| 6.  | Tiamina HCl (stock 100 ppm)  | 10.0 ml |
| 7.  | Inositol (stock 8000 ppm)  | 12.5 ml |
| 8.  | Sacarosa   | 30.0 gr |
| 9.  | Kinetin (100ppm)   | 2.0 ml  |
| 10. | CuSO <sub>4</sub> (100ppm)   | 4.8 ml  |
| 11. | Carbón activado  | 1.0 gr  |
| 12. | Completar a 500 ml con H <sub>2</sub> O bidestilada                            |         |
| 13. | Ajustar pH 5.7-5.8   |         |
| 14. | Disolver por calentamiento 7 g agar en 500 ml de H <sub>2</sub> O bidestilada. |         |
| 15. | Mezclar bien el medio con la solución de agar                                  |         |
| 16. | Ajustar el volúmen final a 1000 ml.  |         |

Fuente: Velásquez, E. & Mafla, G. 1999. Conservación in vitro: Una alternativa segura para preservar especies silvestres de *Manihot* spp (Euphorbiaceae). In: Congreso Nacional de Conservación de la Biodiversidad (2, 1999, Bogotá, Colombia). [Memorias]. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, DC, CO, pp. 1-14.

### **Anexo 7. PREPARACIÓN DE ANTIBIÓTICO**

1. Cortar pequeños cuadrados de papel filtro (0.5 cm X 0.5 cms)
2. Colocarlos en una caja petri, envolver la caja con papel y esterilizarlos por un periodo de 45 minutos.
3. En la cámara de flujo laminar separar uno de otro cada papel.
4. Pesar 75 mgs de Vancomicina directamente en la cámara de flujo laminar y disolver en 15 ml de agua destilada estéril.
5. Colocar 1 ó 2 gotas del antibiótico con una micropipeta en cada cuadrado.
6. Dejar que el antibiótico se seque.
7. Con una pinza esteril tome un papel conteniendo el antibiótico e introdúzcalo en el tubo de ensayo.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

Biggs, B.J., Smith, M.K. & Scout, K.J. 1986. The use of embryo culture for the recovery of plants from cassava (*Manihot esculenta* Crantz) seeds. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 6: 229-232.

Bock, K.R. & Guthrie, E.J. 1976. Recent advances in research on cassava viruses in East Africa. *En: African cassava mosaic workshop. Memorias, International Development Research Centre (IDRC), Ottawa, Canada, 11p.*

Brown, C.R., Kwiatkowski, S., Martin, M.W. & Thomas, P.E. 1988. Eradication of PVS from potato clones through excision of meristems from in vitro, heat treated shoot tips. *Am. Potato J.* 65: 633-638.

Calvert, L. A., Cuervo, C., Lozano, I., Villareal, N. & Arroyave, J. 2008. Identification of Three Strains of a Virus Associated with Cassava Plants Affected by Frogskin Disease. *Journal of Phytopathology.* 156(11-12): 647-653.

Ceballos, H. & de la Cruz, G.A. 2002. Taxonomía y Morfología de la Yuca. Capítulo 2. *En: Ospina, B. y Ceballos, H. (Eds.) La yuca en el Tercer Milenio. Sistemas Modernos de Producción, Procesamiento, Utilización y Comercialización. Centro Internacional de Agricultura Tropical. (CIAT publicación nº 327). Cali, Colombia, 586 p.*

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1982. Intercambio internacional de clones de yuca *in vitro*. Guía de estudio para ser usada como complemento de la Unidad Audiotutorial sobre el mismo tema. Contenido científico: William Roca M. Producción: Fernández O. Fernando. Cali, Colombia, CIAT, 30 p. (Serie 04SC-05.02)

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1984. El cultivo de meristemas para la conservación de germoplasma de yuca *in vitro*. Guía de estudio. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia, 41 p.

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1982. El cultivo de meristemas para el saneamiento de clones de yuca. Guía de estudio. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia, 45 p.

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1986. Cassava Program annual report 1985. Cali, Colombia, pp. 264-282.

Costa, A.S. & Kitajima, E.W. 1972. Studies on virus and mycoplasma diseases of the cassava plant in Brazil. *En: Cassava mosaic workshop. Memorias. International Institute of Tropical Agriculture (IITA), Ibadan, Nigeria, pp. 1-8.*

Frison, E.A. & Feliu, E. 1991. FAO/IBP GR technical guidelines for the safe movement of cassava germplasm. Food and Agriculture Organization of the United Nations-FAO and International Board for Plant Genetic Resources, Rome, Italy.

Green, S.K. & Lo, C.Y. 1989. Elimination of sweet potato yellow dwarf virus (SPYDV) by meristem tip culture and by heat treatment. *J. Plant. Dis. Protection* 96: 464-469.

Gulick, P., Hershey, C., Esquinas-Alcazar, J. 1983. Genetic Resources of cassava and wild relatives. IBPGR report 82/III, International Board for plant genetic resource, Rome Italy.

Hoded, D. 1977: Notes on embryo culture of palms. *Principes*. 2: 103-108.

Huertas, C.A. 1992. Aspectos fitosanitarios relacionados con el intercambio de Germoplasma. En: *Memorias Curso Internacional de Recursos Fitogenéticos*. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Palmira, Colombia. Noviembre 9, diciembre 4. Vol. 1.

IPGRI/CIAT, 1994. Establishment and operation of a pilot in vitro active genebank. Report of a CIAT-IBPGR collaborative project using cassava (*Manihot esculenta* Crantz) as a model. International Plant Genetic Resources Institute and Centro Internacional de Agricultura Tropical, Italia, 59 p.

Koo, K., Pardey, P.G & Debouck, D.G. 2004. CIAT genebank. In: Koo, B.; Pardey, P.G.; Wright, B.D.; Bramel, P.; Debouck, D.G.; Van D., M.E.; Jackson, M.T.; Taba, S.; Valkoun, J. *Saving seeds: The economics of conserving crop genetic resources ex situ in the future harvest centres of the CGIAR*. CABI Publishing, Wallingford, GB, pp. 105-125.

Krikorian, A.D. 1991. Propagación clonal *in vitro*. In: Roca, W.M., Mroginski, L.A. (eds.), *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y Aplicaciones*, pp. 95-126.

Lozano, J.C., Jayasinghe, U. & Pineda, B. 1983a. Viral diseases affecting cassava in the Americas. *Cassava Newsletter (CIAT)* 7: 1-4.

Mafla, G., Roa, J.C. & Guevara, C.L. 2000. Advances on the *in vitro* growth control of Cassava, using silver nitrate. In: Carvalho, L.; Thro, A. M.; Duarte, A. (eds). *Cassava Biotechnology: International Scientific Meeting-CBN (IV, 1998, Salvador, Bahia, Brazil)*. Proceedings. EMBRAPA-Recursos Genéticos e Biotecnología. Brasilia, Brazil, pp. 439-446.

Roca, W.M., Chaves, R., Marin, M.L., Arias, D.I., Mafla, G. & Reyes, R. 1989. In vitro methods of germplasm conservation. *Genome* 31 (2): 813-817.

Roca, W.M., Nolt, B., Mafla, G., Roa, J.C. & Reyes, R. 1991. Eliminación de virus y propagación de clones en la yuca (*Manihot esculenta* Crantz) In: Roca, W.M., Mroginski, L.A. (eds.), *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y Aplicaciones*, pp. 403-421.

Roca, W.M., Rodríguez, J.A., Mafla, G., & Roa, J.C. 1984. Procedures for recovering cassava clones distributed *in vitro*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia, 8 p.

Velásquez, E. & Mafla, G. 1999. Conservación in vitro: Una alternativa segura para preservar especies silvestres de *Manihot* spp (Euphorbiaceae). In: *Congreso Nacional de Conservación*

de la Biodiversidad (2, 1999, Bogotá, Colombia). [Memorias]. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, DC, CO, pp. 1-14.

Wu, J. N., Hildebrandt, A.C. & Riker, A.J. 1960. Virus-host relationship in plant tissue culture. *Phytopathology*, 50: 587-594.

Withers, L.A. & Williams. 1985. *in vitro* conservation. IBPGR Research Highlights. Rome, Italia.