

Manual de //



Conservación *inVitro*

en el Banco de Germoplasma del INIA



2019



PERÚ

Ministerio
de Agricultura y Riego



Instituto Nacional de Innovación Agraria

Manual de Conservación
in Vitro
en el Banco de Germoplasma del INIA

Proyecto PNIA 082_PI
“Conservación y análisis de diversidad genética de la oca (*Oxalis* *tuberosa*) en el Perú”

Manual de conservación *in vitro* en el Banco de Germoplasma del INIA

© Instituto Nacional de Innovación Agraria-INIA
Dirección de Recursos Genéticos y Biotecnología

Proyecto PNIA 082_PI:
"Conservación y análisis de diversidad genética de la oca (*Oxalis tuberosa*) en el Perú"

Autores:

Elizabeth Fernandez
Cinthya Zorrilla
Anait García
Carlos Alberto Amasifuen

Revisor de contenido:

Flor Rodríguez

Fotografía:

Olegario Robles
Anait García
Elizabeth Fernandez

Editado por:

Instituto Nacional de Innovación Agraria - INIA
Equipo Técnico de Edición y Publicaciones
Av. la Molina 1981, Lima- Perú
Teléfono: (511) 2402100 - 2402350
www.inia.gob.pe

Diseño y diagramación:

Abner Fernando Mio Torrejón
Luis Carlos Arévalo Mercado
Jeams López Acaro

Citación correcta:

Fernandez E., Zorrilla C., García A y Amasifuen C. 2019. Manual de Conservación *in vitro* en el Banco Nacional de Germoplasma del INIA. Instituto Nacional de innovación Agraria (INIA). Lima, Perú.

Publicado:

Diciembre, 2019
Primera edición:
Diciembre, 2019
Tiraje:
150 ejemplares

Impreso en:

Nombre de la imprenta: Chimac SAC
RUC: 20554037756
Teléfono: 01 3260981
Dirección: Av Prolong. Mariscal Nieto Nro 229 Urb. Los Sauces - Ate - Lima
E-mail: esotot@chimac.com.pe / proyectos@chimac.com.pe

ISBN: 978-9972-44-039-7

Hecho el Depósito Legal en la Biblioteca Nacional del Perú N° 2019-18755

Prohibida la reproducción de este libro por cualquier medio, total o parcialmente, sin permiso expreso.

Tabla de CONTENIDO

Presentación	5	
1	Introducción al cultivo de tejidos <i>in vitro</i>	7
1.1.	Importancia del cultivo de tejidos para la conservación <i>in vitro</i> de recursos genéticos	7
1.2.	Etapas de la regeneración de plantas <i>in vitro</i> en el banco de germoplasma del INIA.....	8
1.3.	Conservación <i>in vitro</i> a corto plazo en el banco de germoplasma del INIA	9
1.4.	Conservación <i>in vitro</i> a mediano plazo en el banco de germoplasma del INIA	11
2	Monitoreo de viabilidad en el banco de germoplasma del INIA	12
2.1.	Evaluación de Viabilidad	12
2.1.1.	Estado de la Accesión	12
2.1.2.	Estado de la planta	12
2.1.2.1.	Necrosis	13
2.1.2.2.	Defoliación	14
2.1.2.3.	Enraizamiento	14
2.1.2.4.	Fenolización	15
2.1.2.5.	Clorosis	15
2.1.2.6.	Vitrificación	16
3	Evaluación del estado fitosanitario	17
4	Formulaciones para las preparaciones de medios de cultivo	18
4.1.	Oca: Medio de Conservación a Corto Plazo (OCP) y Medio de Conservación a Mediano Plazo (OMP)	18
4.2.	Ulluco: Medio de Conservación a Corto Plazo (UCP) y Medio de Conservación a Mediano Plazo (UMP)	20
4.3.	Mashua: Medio de Conservación a Corto Plazo (MCP)	22
4.4.	Yacón: Medio de Conservación a Corto Plazo (YCP)	24
4.5.	Tomate de árbol: Medio de Conservación a Corto Plazo (TACP)	26
5	Procedimientos para la identificación de microorganismos contaminadores ...	28
5.1.	Introducción	28
5.2.	Microorganismos más comunes en el cultivo de tejidos <i>in vitro</i>	28
6	Procedimientos adicionales	30
6.1.	Desinfección de cámara de flujo laminar y herramientas para el cultivo <i>in vitro</i>	30
6.2.	Procedimiento para realizar subcultivo de material vegetal	30
6.3.	Lavado de material de vidrio con plántulas <i>in vitro</i> no contaminadas y contaminadas	31
6.4.	Descarte de material contaminado con microorganismos	32
6.5.	Limpieza y desinfección de los cuartos de incubación y conservación del banco <i>in vitro</i>	32
6.6.	Tratamiento de explantes contaminados con bacterias	33
	Referencias	34



PRESENTACIÓN

La conservación de germoplasma en condiciones *in vitro* es de gran utilidad en la conservación de especies vegetales que se propagan vegetativamente y que tienen ciclos de vida largos y/o producen semillas no ortodoxas. Esta estrategia permite el manejo de manera costo-efectiva, en comparación con la conservación en campo, ofreciendo ventajas adicionales para la distribución de germoplasma en términos de disponibilidad y sanidad.

El Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) posee una colección de germoplasma *in vitro*, la cual se viene fortaleciendo e incrementando en cuanto al número de accesiones que conserva. Las formulaciones y procedimientos estandarizados que se han establecido se presentan en este documento de manera que puedan ser de conocimiento de la comunidad científica.

Aún existen múltiples temas de investigación para optimizar la conservación del germoplasma en condiciones *in vitro* y este manual, pretende motivar a los investigadores a adoptar esta línea de investigación.



I. Introducción al cultivo de tejidos *in vitro*

El cultivo *in vitro* es una técnica que se basa en el aislamiento de órganos, tejidos o células vegetales en condiciones asépticas, en un medio de composición química determinado e incubados en condiciones controladas (Roca y Mroginski, 1991). A partir de la micropropagación de explantes (tallos, hojas, raíces y/o yemas axilares), de una única planta, se puede conseguir un gran número de plántulas debido al principio de totipotencia, capacidad que tiene una célula de regenerar una planta completa (Muñoz, 2006). Por ello, las plantas que resultan de la propagación asexual o vegetativa, son idénticas a la planta madre e idénticas entre sí, es decir que son clones (Figura 1).

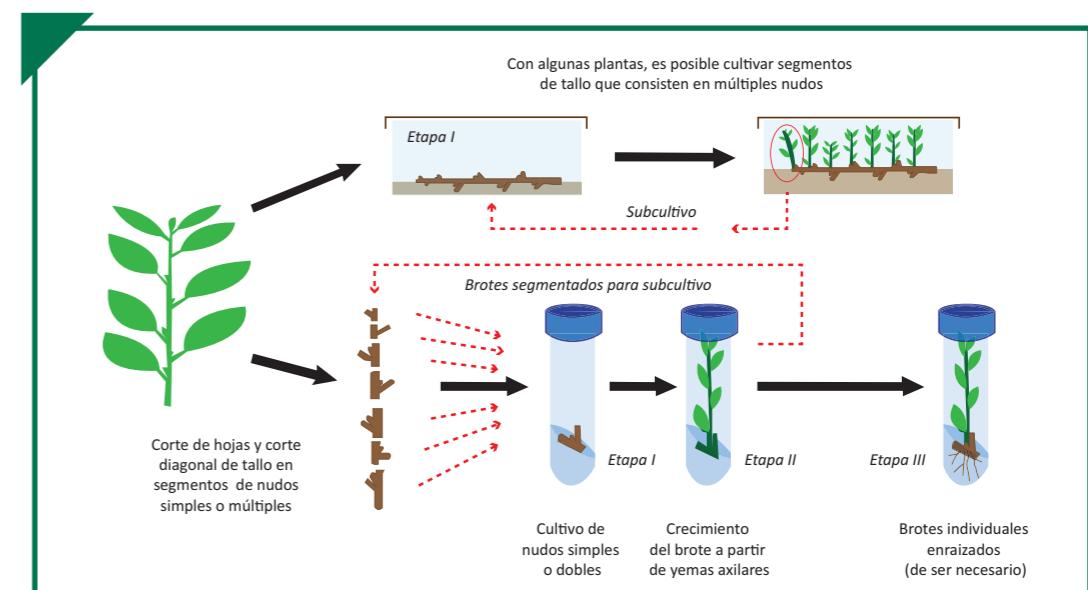


Figura 1. Micropagación vegetal. George, Hall and Jan De Klerk (2008).

1.1. Importancia del cultivo de tejidos para la conservación *in vitro* de recursos genéticos

Los recursos fitogenéticos son la base de la seguridad alimentaria mundial, por tal motivo, es de gran importancia conservar y mantener la diversidad genética de las especies silvestres, cultivares locales tradicionales y variedades mejoradas (Sánchez-Chiang y Jiménez, 2010). Una de las formas de conservarlas es haciendo uso del cultivo de tejidos vegetales, que permite el crecimiento y desarrollo del material vegetal en recipientes que los separan del ambiente y los mantienen en condiciones controladas y asépticas, garantizando la sanidad del material. El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* ofrece la posibilidad de almacenar un elevado número y variedad de muestras en un área reducida, facilitando su acceso para la evaluación y el estudio (Rao, 2004). La conservación *in vitro* es parte de la estrategia de conservación de los recursos fitogenéticos que se realiza en los Bancos de Germoplasma.

Esta técnica tiene múltiples ventajas:

- Permite sanear plantas con virus, mediante el cultivo de meristemos y termoterapia.
- Las plántulas se mantienen libres de plagas y enfermedades, por ser una técnica que requiere de mucha asepsia.
- Facilita la elaboración de una propagación clonal masiva de plantas idénticas en un corto tiempo, en cualquier época del año.
- El costo de la conservación *in vitro* es mucho menor que la conservación en campo. Evita el riesgo de pérdidas por factores climáticos (presencia de heladas, sequías prolongadas, granizadas o temperaturas elevadas) y disminuye el riesgo de pérdidas debido a factores bióticos.
- Permite realizar un tamizado para estrés biótico y abiótico a un alto número de muestras bajo condiciones controladas.
- Admite la distribución segura de germoplasma libre de patógenos cuarentenarios.

1.2. Etapas de la regeneración de plantas *in vitro* en el banco de germoplasma del INIA

a) Etapa 1: establecimiento del cultivo en condiciones de asepsia

El objetivo de esta etapa es establecer cultivos viables y asépticos. El éxito de esta etapa está determinado por la edad de la planta madre, la edad fisiológica, el estado de desarrollo y el tamaño del explante. Los principales procesos a controlar son: la selección, el aislamiento y la esterilización de los explantes (Sánchez-Chiang y Jiménez, 2010). Los materiales vegetales que demuestran tener mayor capacidad regenerativa son obtenidos de tejidos meristemáticos jóvenes, sean yemas axilares o adventicias. Esta etapa se inicia con la desinfección superficial del explante con varios lavados con etanol (70 %) o hipoclorito de sodio (0.5 % – 2 %) durante 3 minutos a 30 minutos, dependiendo de la naturaleza del explante; seguido de lavados con agua destilada estéril (Ramos, 2012). El lavado previo de los explantes, realizado con agua corriente, detergentes y un agente tensoactivo Tween - 20 (0.01 % – 0.1 %), ayuda a obtener una mejor desinfección (Sharry, Adema y Abedini, 2015). Después de la desinfección superficial, se retiran las partes oxidadas de cada explante y se cortan segmentos nodales, dejando solo una yema con alguna porción del tallo. Cada entrenudo es colocado en un tubo de cultivo (150 mm x 25 mm) que contiene 10 mL de medio de cultivo base MS (Murashige y Skoog) u otro, dependiendo del cultivo. Los tubos de cultivo con el material vegetal son transferidos a una cámara de crecimiento con 21 °C y fotoperiodo 16:08 (luz:oscuridad). Durante su permanencia se realizan evaluaciones periódicas a los explantes sembrados.

b) Etapa 2: multiplicación

El objetivo de esta etapa es mantener e incrementar el número de brotes para los nuevos ciclos de multiplicación, esta actividad es también denominada subcultivo. Para ello, se

realizan cortes en diagonal, entre nudo y nudo, para aislar las yemas principales de modo que este tipo de explante mantenga la fidelidad genética de la planta madre a lo largo de todo el proceso de micropropagación. El medio de cultivo tiene un papel fundamental debido a que brinda todos los nutrientes esenciales para el crecimiento y el medio de soporte. Sus componentes principales son básicamente agua, sales minerales y la fuente de carbono (azúcares). Además, se utilizan vitaminas, reguladores del crecimiento y agentes gelificantes como el agar (Sharry et al., 2015). Si bien la proporción de sus componentes depende de cada especie, la formulación base más utilizada fue propuesta por Murashige y Skoog (1962), que tiene agar como medio de soporte. En esta etapa generalmente se emplean los reguladores de crecimiento como citoquininas y el ácido giberélico. Los tubos de cultivo con el material vegetal, son transferidos a una cámara de crecimiento en las condiciones climáticas de acuerdo al habitat de la especie.

c) Etapa 3: enraizamiento y elongación

En esta etapa se induce al desarrollo del sistema radicular y como consecuencia la elongación del explante. Para el enraizamiento pueden emplearse varios tipos de sustratos como medio solidificado, tales como agar (6 g/L – 8 g/L) o almidón (8 g/L) en adecuadas concentraciones (Sharry et al., 2015). Para promover la rizogénesis, se utilizan hormonas del tipo auxinas, como por ejemplo el ácido indolacético (AIA), que es la única auxina natural que se localiza en las zonas de crecimiento, también se utiliza el ácido naftalenacético (ANA), que es una auxina sintetizada químicamente.

La elongación o alargamiento consiste en el crecimiento y desarrollo de brotes vigorosos debido a la división celular, el cual es estimulado por la presencia de citoquininas. Dentro de las citoquininas naturales se encuentra la zearina (ZEA), mientras que dentro de las citoquininas sintéticas, están la bencilaminopurina (6 BAP) y la kinetina (KIN). El establecimiento *in vitro* comprende el enraizamiento, elongación y desarrollo del explante, así como la ausencia de microorganismos contaminantes (George et al., 2008).

1.3. Conservación *in vitro* a corto plazo en el banco de germoplasma del INIA

En este tipo de conservación, los explantes permanecen viables en el cultivo *in vitro* por un máximo de 6 meses (Bonilla, Mancipe y Aguirre, 2015). El INIA tiene implementados y establecidos medios de cultivo para fines de conservación a corto plazo para *Tropaeolum tuberosum* (mashua), *Manihot esculenta* (yuca), *Smallanthus sonchifolius* (yacón), *Cyphomandra betacea* (tomate de árbol), *Ullucus tuberosa* (ulluco) y *Oxalis tuberosa* (oca). Las condiciones de conservación son mostradas en la tabla 1. El material vegetal con el que se inicia este tipo de conservación, proviene de plántulas vigorosas, introducidas a cultivo *in vitro*.

Tabla 1
Cultivos y condiciones *in vitro* a corto plazo

Cultivo	Parámetros	Corto plazo
Yacón	Temperatura	15 °C
	Nº de tubos	6
	Nº de plántulas/tubo	1
	Unidad de conservación (plántula)	6
	Tiempo máximo de permanencia (meses)	4
Yuca	Temperatura	21 °C
	Nº de tubos	4
	Nº de plántulas/tubo	3
	Unidad de conservación (plántula)	12
	Tiempo máximo de permanencia (meses)	5
Tomate de árbol	Temperatura	15 °C
	Nº de tubos	6
	Nº de plántulas/tubo	1
	Unidad de conservación (plántula)	6
	Tiempo máximo de permanencia (meses)	3
Mashua	Temperatura	15 °C
	Nº de tubos	3
	Nº de plántulas/tubo	4
	Unidad de conservación (plántula)	12
	Tiempo máximo de permanencias (meses)	5
Ulluco	Temperatura	21 °C
	Nº de tubos	2
	Nº de plántulas/tubo	4
	Unidad de conservación (plántula)	8
	Tiempo máximo de permanencia (meses)	1
Oca	Temperatura	21 °C
	Nº de tubos	2
	Nº de plántulas/tubo	4
	Unidad de conservación (plántula)	8
	Tiempo máximo de permanencia (meses)	1

Fotoperiodo de 16:08 (luz/oscuridad) con lámparas fluorescentes intensidad de 3 000 Lux.

1.4. Conservación *in vitro* a mediano plazo en el banco de germoplasma del INIA

En este tipo de conservación, los explantes permanecen viables por más de 6 meses en cultivo *in vitro*. Para lograr el objetivo de disminuir la tasa de crecimiento de los explantes y aumentar los intervalos entre subcultivos, se emplea una serie de estrategias: reducir la temperatura de los cuartos de crecimiento y modificar la composición de los medios de cultivo. La disminución de la temperatura produce una reducción en la actividad metabólica y en consecuencia, en el crecimiento de los explantes (esta temperatura depende de los requerimientos de cada especie). La modificación de la composición del medio de cultivo, así como la adición de agentes osmóticos (sucrosa, sorbitol o manitol en concentraciones elevadas), o el uso de concentraciones mayores de gelificantes (agar), reducen la absorción de nutrientes por los explantes y por tanto, se retarda el crecimiento (Bonilla et al., 2015).

El INIA tiene implementado y optimizado medios de cultivo para fines de conservación a mediano plazo de *Ullucus tuberosa* (ulluco) y *Oxalis tuberosa* (oca) (ver capítulo V) y sus condiciones de conservación son mostradas en la tabla 2.

Cabe mencionar, que el material vegetal para dar inicio a la conservación a mediano plazo, siempre debe provenir de plántulas madre que se encuentran en medios de conservación a corto plazo, con la finalidad de desestresar las plántulas y contar con explantes de mayor vigor.

Tabla 2
Cultivos y condiciones *in vitro* a mediano plazo

Cultivo	Parámetros	Corto plazo
Ulluco	Temperatura	15 °C
	Nº de tubos	4
	Nº de plántulas/tubo	4
	Unidad de conservación (plántulas)	16
	Tiempo máximo de permanencia (meses)	12
Oca	Temperatura	15 °C
	Nº de tubos	4
	Nº de plántulas/tubo	4
	Unidad de conservación (plántulas)	16
	Tiempo máximo de permanencia (meses)	6

Fotoperiodo de 16:08 (luz/oscuridad) con lámparas fluorescentes intensidad de 3 000 Lux.

2. Monitoreo de viabilidad en el banco de germoplasma del INIA

Para asegurar la viabilidad de los subcultivos se debe realizar evaluaciones periódicas y sistemáticas, las cuales además deben ser documentadas. Existen dos tipos de evaluaciones que se realizan rutinariamente, estos incluyen: evaluaciones de la viabilidad (verificación del estado fisiológico de los explantes) y la evaluación del estado fitosanitario de los explantes subcultivados (contaminación microbiana).

2.1. Evaluación de viabilidad

En esta evaluación se revisa el normal crecimiento de las plántulas, así como la presencia de hojas, tallos y raíces en buen estado. La evaluación de la viabilidad se realiza en forma visual por lote (número total de tubos por accesión) o por planta, utilizando los descriptores de las tablas 3 y 4 respectivamente. La primera evaluación de viabilidad se realiza a los 5 días y 25 días. El seguimiento a la viabilidad de los explantes se realiza mensualmente, para determinar el estado de atención, para refrescar el material vegetal, antes de que se presente una total defoliación o zonas necróticas y/o muerte del explante.

2.1.1. Estado de la accesión

La evaluación visual se realiza con la totalidad del número de tubos por accesión y es de acuerdo a la presencia de síntomas de deterioro fisiológico (senescencia) (Tabla 3).

Tabla 3
Porcentaje asignado a cada estado de accesión

Estado de la accesión *	Porcentaje (%)
Bueno	80 – 100
Medio	60 - 80
Regular	40 - 60
Malo	Menor a 40

*Estado de la Accesión= Porcentaje de tubos buenos/total de tubos (%)

2.1.2. Estado de la planta

Existen 6 indicadores o descriptores utilizados en la evaluación visual de viabilidad de los explantes subcultivados. Se evalúa la viabilidad del explante de acuerdo a los niveles de los indicadores mostrados en la tabla 4.

Tabla 4
Indicadores usados en la evaluación visual de viabilidad

Necrosis (%)	Defoliación (%)	Enraizamiento	Fenolización	Clorosis (%)	Vitrificación (%)
Bueno (0 – 10)	Bueno (0 – 10)	Bueno	No	No (0 – 10)	No
Medio (10 – 40)	Medio (10 - 40)	Medio	Leve	Leve (10 – 40)	Leve (6 – 40)
Regular (40 – 70)	Regular (40 – 70)	Escaso	Media	Media (40 – 70)	Media (40 – 70)
Malo (70 – 100)	Malo (70 – 100)	Malo	Alta	Alta (70 – 100)	Alta (70 – 100)

2.1.2.1. Necrosis

Son lesiones oscuras que aparecen en la yema y tallo debido a la presencia de células muertas, así como por la oxidación de compuestos fenólicos, catalizados por la enzima polifenol oxidasa para producir quinonas, las cuales son especies químicas muy reactivas y propensas a reaccionar generando daño e incluso la muerte celular (se visualiza la oxidación u oscurecimiento de los tejidos) (Figura 2) (Bray, Bailey-Serre y Weretilnyk, 2000).



Figura 2. Estadios del indicador necrosis en el cultivo de yacón de acuerdo a la tabla 4. Progresivo oscurecimiento en la base del tallo.

2.1.2.2. Defoliación

Este descriptor mide el porcentaje de amarillamiento y caída de hojas. Este efecto es producido por diversos factores como: enfermedades, agentes químicos o por falta de hierro en los medios de cultivo. Los cultivos deben renovarse antes de que presenten una total defoliación (Mafla, Roa, Aranzales y Debouck, 2010) (Figura 3).



Figura 3. Diferentes estadios del indicador defoliación en el cultivo de tomate de árbol. Desprendimiento progresivo de las hojas.

2.1.2.3. Enraizamiento

El proceso de enraizamiento es la capacidad del material vegetal de formar raíz en el medio de cultivo *in vitro*. La formación del sistema radical y el crecimiento de las raíces de los brotes propagados *in vitro*, tiene como objetivo producir plantas con buenas características fisiológicas y morfológicas para que puedan sobrevivir a condiciones de trasplante (Quintero, Polo, Jarma y Espitia, 2003) (Figura 4).



Figura 4. Estadios del indicador enraizamiento en la yuca. De derecha a izquierda: bueno, medio, escaso y malo.

2.1.2.4. Fenolización

La fenolización se refiere a la oxidación de compuestos fenólicos que son liberadas por las células dañadas con el corte. Las extremidades cortadas se tornan oscuras rápidamente. Los productos de la oxidación son tóxicos para el resto del explante y se difunden en el medio de cultivo oscureciéndolo (Aguirre, Baudoin y Leigue, 2016), esto debido a la excreción de sustancias como polifenoles y taninos (Villamizar, 2005).



Figura 5. Estadios del indicador de fenolización en tomate de árbol conservado en condiciones *in vitro*.

2.1.2.5. Clorosis

Es una condición fisiológica anormal en la que el follaje produce insuficiente clorofila. Cuando esto ocurre, las hojas no tienen la coloración verde normal, presentan un color verde pálido, amarillo o amarillo blanquecino. Las plantas afectadas tienen disminuida la capacidad de formar carbohidratos y pueden morir si la causa de su insuficiencia clorofílica no es tratada. El exceso de calcio y/o deficiencias específicas de nutrientes (frecuentemente agravadas por un alto nivel de pH) también producen clorosis (Figura 6). El color amarillento en los cultivos nos indica que es necesario proceder a realizar el subcultivo y sembrar nuevamente en un medio de cultivo fresco (Mafla et al., 2010).



Figura 6. Estado de clorosis para el cultivo de yuca en condiciones *in vitro*.

2.1.2.6. Vitrificación

Es una principal anomalía asociada con la propagación *in vitro* de un gran número de especies (Casas y Lasa, 1986). Esta terminología se refiere a los desarreglos morfológicos y fisiológicos que se describen como cambios en las hojas, tallos y raíces que les dan una apariencia cristalina, acuosa, húmeda y translúcida (Figura 7). Este problema va a impedir el normal establecimiento de plantas micropropagadas a condiciones *ex vitro*. Existen posibles causas de estas malformaciones, como elevadas dosis de reguladores de crecimiento, una baja luminosidad durante la incubación, la humedad relativa y al potencial hídrico.



Figura 7. Plántula de *Smallanthus sonchifolius* (yacón) vitrificada. Obsérvese los cristales formados alrededor del tallo.

3. Evaluación del estado fitosanitario

Una vez realizado los subcultivos, estos son ingresados al cuarto de conservación de 21 °C para su establecimiento y monitoreo fitosanitario. Esta temperatura permite el crecimiento de ciertos patógenos como hongos y bacterias. Se debe evaluar de forma visual a los 5, 15 y 25 días la aparición de microorganismos, como se muestra en la figura 8.

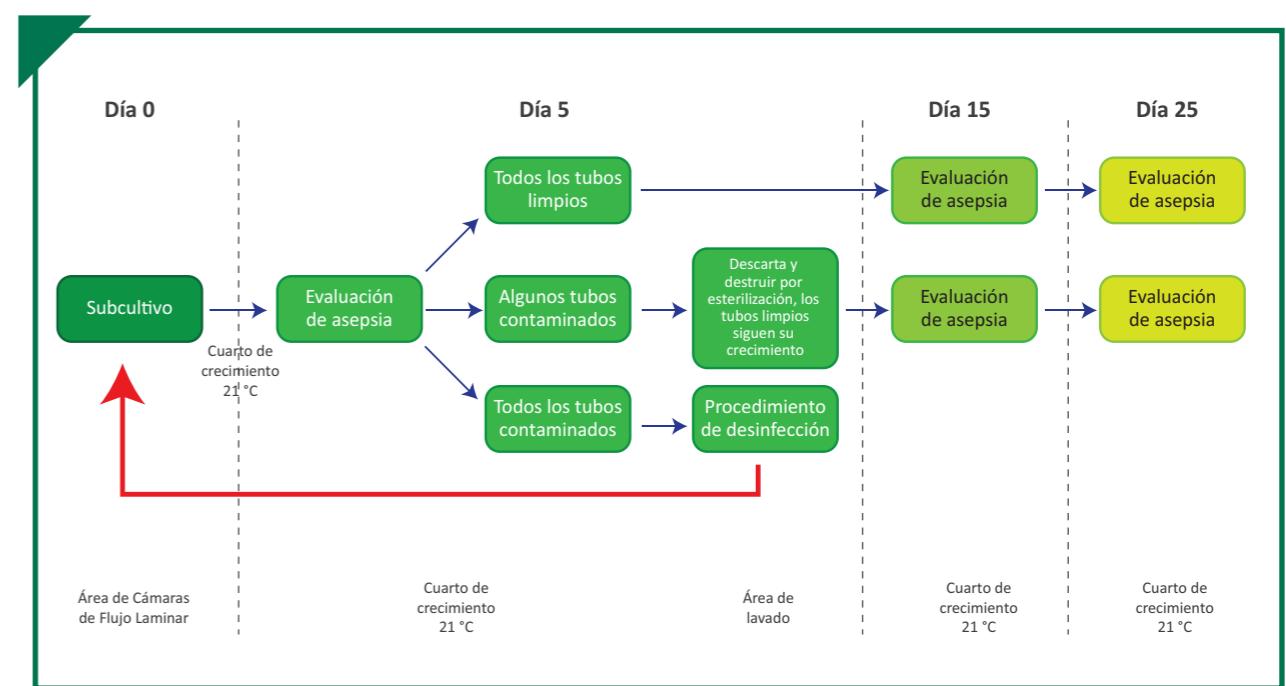


Figura 8. Flujoograma de la evaluación y monitoreo del estado fitosanitario.

La primera evaluación fitosanitaria (a los 5 días) tiene como objetivo la detección de signos de crecimiento microbiano en todos los clones (réplicas) de una accesión. Se evalúa la presencia de hongos, bacterias o ambas. Si se encontrara algún tubo contaminado se debe realizar el descarte del material, esterilización en autoclave y repetir el proceso de subcultivo; si la accesión contaminada es única, realizar los procedimientos para desinfección y limpieza del material vegetal. Caso contrario, si el explante está visiblemente limpio, este sigue su crecimiento hasta realizar las siguientes evaluaciones fitosanitarias a los 15 y 25 días. Se recomienda realizar una supervisión cada 30 días.

4. Formulaciones para las preparaciones de medios de cultivo

Para el cultivo *in vitro* es fundamental definir los medios de cultivo adecuados, ya que son la base para el desarrollo de las plantas. El medio de cultivo es una solución acuosa que está formada por compuestos inorgánicos, compuestos orgánicos, complejos naturales, agentes de soporte y gelificación, requeridos para la nutrición. La composición del medio de cultivo depende de la necesidad de cada especie. El crecimiento y la diferenciación celular se controlan modificando la proporción entre hormonas y reguladores de crecimiento (Muñoz, 2006). Para el cultivo *in vitro* de plantas se ha utilizado el medio Murashige y Skoog (MS), desarrollado por los científicos Toshio Murashige y Folke K. Skoog en 1962, durante sus investigaciones de nuevos reguladores del desarrollo vegetal usado en el cultivo *in vitro* de tejidos de tabaco. En el INIA se utiliza el medio basal MS (no contiene fuente de carbono, hormonas vegetales, ni vitaminas), como fuente de carbono se utiliza la sucrosa y se agrega diferentes combinaciones hormonales de auxinas y citoquininas dependiendo del cultivo. Las formulaciones de los medios de cultivo de RTA's (Raíces Tuberosas Andinas) se elaboraron en base al manual “Conservación *in vitro* de raíces y tubérculos andinos, publicado por el Centro Internacional de la papa” (Panta, Sánchez, Gonzales, Manrique, Barkley y Ellis, 2016).

4.1. Oca: Medio de Conservación a Corto Plazo (OCP) y Medio de Conservación a Mediano Plazo (OMP)

Materiales antes de la preparación del medio:

- Tubos de ensayo de 25 mm x 150 mm con sus respectivas tapas de polipropileno (verificar que estos materiales se encuentren íntegros y sin rajaduras)
- Gradillas para tubos de 25 mm x 150 mm
- Vaso de precipitado de 2 L
- Probeta de 1 mL
- Jeringas de 1 mL, 5 mL y 10 mL
- Micropipeta de 1 mL y puntas estériles
- Magnetos
- Pipetas Pasteur
- Bandejas de poliestireno para pesar
- pH-metro
- Balanza
- Soluciones de NaOH (0.1 N) y HCl (0.1 N)

Preparación del medio de cultivo (1 L):

1. Antes de la preparación de los medios de cultivo es necesario disponer de materiales estériles y de recipientes dosificadores adecuados.
2. Medir 1 L de agua destilada en una probeta y transferir aproximadamente 700 mL en el vaso de precipitado. Colocar un magneto y ponerlo sobre el agitador magnético y encender.
3. Utilizar una bandeja para pesar 4.43 g de la sal MS y agregarlo al vaso de precipitado (tabla 5).
4. Utilizar una bandeja para pesar 20 g de sucrosa y agregarlo al vaso de precipitado.
5. Pesar 0.1 g de Myo-inositol y 0.1 g de pantotenato de calcio y transferirlos al vaso de precipitado. Con la ayuda de una micropipeta medir 1 mL de tiamina a 1 000 ppm, 0.25 mL de AG₃ (ácido giberélico) y agregarlo al vaso de precipitado.
6. Con una jeringa de 5 mL de capacidad medir 5 mL de AIA (ácido indolacético) y agregarlo al vaso precipitado.
7. Llevar a un volumen final de 1 L (con los 300 mL de agua destilada de la probeta).
8. Ajustar el pH a 5.7 con la ayuda de las soluciones de HCl (0.1 N) o NaOH (0.1 N).
9. Añadir 6.5 g de agente gelificante (agar), agregar todo el contenido y asegurarse de hacerlo muy cerca del vaso de precipitado pues el aire puede difuminar parte del contenido.
10. Disolver el gelificante con ayuda del calor, para ello colocar el vaso de precipitado en el horno microondas por aproximadamente 5 minutos. Una vez licuado el agar, usar guantes para sacarlo fuera del microondas.
11. Usando un dosificador, dispensar 10 mL del medio en los tubos, colocar las tapas, poner un pedazo de cinta indicadora de autoclave y rotular adecuadamente poniendo el nombre del medio de cultivo y la fecha de preparación.
12. Esterilizar en autoclave los tubos con medio de cultivo a 121 °C durante 15 minutos.
13. Dejar enfriar los tubos a temperatura ambiente.
14. Guardar el material esterilizado a 4 °C hasta el momento de su uso.

Tabla 5
Concentración de los componentes para medios de oca (volumen final 1 L)

Orden	Componente	OCP	OMP
1	Sales MS	4.43 g	4.43 g
2	Tiamina HCl 1 000 ppm	1 mL	1 mL
3	Myo-inositol	0.1 g	0.1 g
4	Pantotenato de calcio	0.1 g	0.1 g
5	AG ₃ 100 ppm	0.25 mL	---
6	AIA 100 ppm	5 mL	---
7	Sorbitol	---	20 g
8	Sucrosa	20 g	20 g
9	Agar	6.5 g	6.5 g

pH= 5.7, esterilizar

4.2. Ulluco: Medio de Conservación a Corto Plazo (UCP) y Medio de Conservación a Mediano Plazo (UMP)

Materiales antes de la preparación del medio:

- Tubos de ensayo de 20 mm x 150 mm con sus respectivas tapas de polipropileno (verificar que estos materiales se encuentren íntegros y sin rajaduras)
- Gradillas para tubos de 25 mm x 150 mm
- Vaso de precipitado de 2 L
- Probeta de 1 mL
- Jeringas de 1 mL, 5 mL y 10 mL
- Micropipeta de 1 mL y puntas estériles
- Magnetos
- Pipetas Pasteur
- Bandejas de poliestireno para pesar
- pH-metro
- Balanza
- Soluciones de NaOH (0.1 N) y HCl (0.1 N)

Preparación del medio de cultivo (1 L):

1. Antes de la preparación de los medios de cultivo es necesario disponer de materiales estériles y de recipientes dosificadores adecuados.
2. Medir 1 L de agua destilada en una probeta y transferir aproximadamente 700 mL en el vaso de precipitado. Colocar un magneto y ponerlo sobre el agitador magnético y encender.
3. Utilizar una bandeja de poliestireno para pesar 4.43 g de la sal MS y agregarlo al vaso de precipitado (Tabla 6).
4. Pesar 20 g de sucrosa y agregarlo al vaso de precipitado.
5. Medir con la ayuda de una micropipeta 1 mL de Base RTA (Raíces Tuberosas Andinas), 0.25 mL de AG₃ (ácido giberélico) y agregarlo al vaso de precipitado.
6. Con una jeringa de 5 mL de capacidad medir 2 mL de pantotenato de calcio y 5 mL de AIA (ácido indolacético) y agregarlo al vaso de precipitado.
15. Llevar a volumen final de 1 L y ajustar el pH a 5.6 con la ayuda de soluciones de HCl (0.1 N) o NaOH (0.1 N).
16. Añadir 6 g de agente gelificante (agar), agregar todo el contenido y asegurarse de hacerlo muy cerca del vaso de precipitado, pues el aire puede difuminar parte del contenido.
17. Disolver el gelificante con ayuda del calor, para ello colocar el vaso de precipitado en el horno microondas aproximadamente 5 minutos. Una vez licuado el agar, usar guantes para sacarlo fuera del microondas.
18. Usando un dosificador, dispensar 6 mL del medio en los tubos, colocar las tapas, poner un pedazo de cinta indicadora de autoclave y rotular adecuadamente poniendo el nombre del medio de cultivo y la fecha de preparación.
19. Esterilizar en autoclave los tubos con medio de cultivo a 121 °C durante 15 minutos.
20. Dejar enfriar los tubos a temperatura ambiente.
21. Guardar el material esterilizado a 4 °C hasta el momento de su uso.

Tabla 6

Concentración de los componentes en los medios para ulluco (volumen final 1 L)

Componente	UCP	UMP
Sal MS	4.43 g	4.43 g
Base RTA	1 mL	1 mL
Pantotenato de calcio 2 000 ppm	2 mL	2 mL
AG ₃ 100 ppm	0.25 mL	---
AIA 100 ppm	5 mL	---
Sorbitol	---	20 g
Sucrosa	20 g	20 g
Agar	6 g	6 g

pH= 5.6, esterilizar

4.3. Mashua: Medio de Conservación a Corto Plazo (MCP)

Materiales antes de la preparación del medio:

- Tubos de ensayo de 25 mm x 150 mm con sus respectivas tapas de polipropileno (verificar que estos materiales se encuentren íntegros y sin rajaduras)
- Gradillas para tubos de 25 mm x 150 mm
- Vaso de precipitado de 2 L
- Probeta de 1 mL
- Jeringas de 1 mL, 5 mL y 10 mL
- Micropipeta de 1 mL y puntas estériles
- Magnetos
- Pipetas Pasteur
- Bandejas de poliestireno para pesar
- pH-metro
- Balanza
- Soluciones de NaOH (0.1 N) y HCl (0.1 N)

Preparación del medio de cultivo (1L):

1. Antes de la preparación de los medios de cultivo es necesario disponer de materiales estériles y de recipientes dosificadores adecuados.
2. Medir 1 L de agua destilada en una probeta, y transferir aproximadamente 700 mL en el vaso de precipitado. Colocar un magneto y ponerlo sobre el agitador magnético y encender.
3. Utilizar una bandeja para pesar 4.43 g de la sal MS y agregarlo al vaso de precipitado (Tabla 7).
4. Utilizar una bandeja de poliestireno para pesar 20 g de sucrosa y agregarlo al vaso de precipitado.
5. Medir con la ayuda de una micropipeta 1 mL de Base RTA (Raíces Tuberosas Andinas), 0.25 mL de AG₃ (ácido giberélico) y agregarlo al vaso de precipitado.
6. Con una jeringa de 5 mL medir 2 mL de pantotenato de calcio y agregarlo al vaso de precipitado.
7. Llevar a volumen final de 1 L (con los 300 mL de agua destilada de la probeta).
8. Ajustar el pH a 5.6 con la ayuda de las soluciones de HCl (0.1 N) o NaOH (0.1 N).
9. Añadir 6 g de agente gelificante (agar), agregar todo el contenido y asegurarse de hacerlo muy cerca del vaso de precipitado, pues el aire puede difuminar parte del contenido.
10. Disolver el gelificante con ayuda del calor, para ello colocar el vaso de precipitado en el horno microondas por aproximadamente 5 minutos. Una vez licuado el agar, usar guantes para sacarlo fuera del microondas.
11. Usando un dosificador, dispensar 10 mL del medio en los tubos, colocar las tapas, poner un pedazo de cinta indicadora de autoclave y rotular adecuadamente poniendo el nombre del medio de cultivo y la fecha de preparación.
12. Esterilizar en autoclave los tubos con medio de cultivo a 121 °C durante 15 minutos.
13. Dejar enfriar los tubos a temperatura ambiente.
14. Guardar el material esterilizado a 4 °C hasta el momento de su uso.

Tabla 7

Concentración de los componentes en el medio para mashua (volumen final 1 L)

Componente	1 L
Sal MS	4.43 g
Base RTA's	1 mL
Pantotenato de calcio 2 000 ppm	2 mL
AG ₃ 100 ppm	0.25 mL
Sucrosa	20 g
Agar	6 g

pH= 5.6, esterilizar

4.4. Yacón: Medio de Conservación a Corto Plazo (YCP)

Materiales antes de la preparación del medio:

- Tubos de ensayo de 25 mm x 150 mm con sus respectivas tapas de polipropileno (verificar que estos materiales se encuentren íntegros y sin rajaduras)
- Gradillas para tubos de 25 mm x 150 mm
- Vaso de precipitado de 2 L
- Probeta de 1 mL
- Jeringas de 1 mL, 5 mL y 10 mL
- Micropipeta de 1 mL y puntas estériles
- Magnetos
- Pipetas Pasteur
- Bandejas de poliestireno para pesar
- pH-metro
- Balanza
- Soluciones de NaOH (0.1 N) y HCl (0.1 N)

Preparación del medio de cultivo (1L):

1. Antes de la preparación de los medios de cultivo es necesario disponer de materiales estériles y de recipientes dosificadores adecuados.
2. Medir 1 L de agua destilada en una probeta, y transferir aproximadamente 700 mL en el vaso de precipitado. Colocar un magneto y ponerlo sobre el agitador magnético y encender.
3. Utilizar una bandeja para pesar 4.43 g de la sal MS y agregarlo al vaso de precipitado (Tabla 8).
4. Utilizar una bandeja para pesar 20 g de sucrosa y agregarlo al vaso de precipitado.
5. Medir con la ayuda de una micropipeta 1 mL de Base RTA (Raíces Tuberosas Andinas), 1 mL de pantotenato de calcio, 0.5 mL de AG₃ (ácido giberélico) y agregarlo al vaso de precipitado.
6. Llevar a un volumen final de 1 L (con los 300 mL de agua destilada de la probeta).
7. Ajustar el pH a 5.7 con la ayuda de las soluciones de HCl (0.1 N) o NaOH (0.1 N).
8. Añadir 6.5 g de agente gelificante (agar), agregar todo el contenido y asegurarse de hacerlo muy cerca del vaso de precipitado pues el aire puede difuminar parte del contenido.
9. Disolver el gelificante con ayuda del calor, para ello colocar el vaso de precipitado en el horno microondas por aproximadamente 5 minutos. Una vez licuado el agar, usar guantes para sacarlo fuera del microondas.
10. Usando un dosificador, dispensar 10 mL del medio en los tubos, colocar las tapas, poner un pedazo de cinta indicadora de autoclave y rotular adecuadamente poniendo el nombre del medio de cultivo y la fecha de preparación.
11. Esterilizar en autoclave los tubos con medio de cultivo a 121 °C durante 15 minutos.
12. Dejar enfriar los tubos a temperatura ambiente.
13. Guardar el material esterilizado a 4 °C hasta el momento de su uso.

Tabla 8

Concentración de los componentes en el medio para yacón (volumen final 1 L)

Componente	1 L
Sal MS	4.43 g
Base RTA's	1 mL
Pantotenato de calcio 2 000 ppm	1 mL
AG ₃ 100 ppm	0.5 mL
Sucrosa	20 g
Agar	6.5 g

pH= 5.7, esterilizar

4.5. Tomate de árbol: Medio de Conservación a Corto Plazo (TACP)

Materiales antes de la preparación del medio:

- Tubos de ensayo de 25 mm x 150 mm con sus respectivas tapas de polipropileno (verificar que estos materiales se encuentren íntegros y sin rajaduras)
- Gradillas para tubos de 25 mm x 150 mm
- Vaso de precipitado de 2 L
- Probeta de 1 mL
- Jeringas de 1 mL, 5 mL y 10 mL
- Micropipeta de 1 mL y puntas estériles
- Magnetos
- Pipetas Pasteur
- Bandejas de poliestireno para pesar
- pH-metro
- Balanza
- Soluciones de NaOH (0.1 N) y HCl (0.1 N)

Preparación del medio de cultivo (1 L)

1. Antes de la preparación de los medios de cultivo es necesario disponer de materiales estériles y de recipientes dosificadores adecuados.
2. Medir 1 L de agua destilada en una probeta, y transferir aproximadamente 700 mL en el vaso de precipitado. Colocar un magneto y ponerlo sobre el agitador magnético y encender.
3. Utilizar una bandeja de poliestireno para pesar 4.43 g de la sal MS y agregarlo al vaso de precipitado (Tabla 9).
4. Utilizar una bandeja para pesar 20 g de sucrosa y agregarlo al vaso de precipitado.
5. Pesar 0.1 g de Myo-inositol y agregar al vaso precipitado.
6. Medir con la ayuda de una micropipeta 1 mL de tiamina 1 000 ppm y agregarlo al vaso de precipitado. Llevar a volumen final de 1 L (con los 300 mL de agua destilada de la probeta).
7. Ajustar el pH a 5.7 con la ayuda de las soluciones e HCl (0.1 N) o NaOH (0.1 N).

8. Añadir 7.5 g de agente gelificante (agar), agregar todo el contenido y asegurarse de hacerlo muy cerca del vaso de precipitado pues el aire puede difuminar parte del contenido.
9. Disolver el gelificante con ayuda del calor, para ello colocar el vaso de precipitado en el horno microondas por aproximadamente 5 minutos. Una vez licuado el agar, usar guantes para sacarlo fuera del microondas.
10. Usando un dosificador, dispensar 10 mL del medio en los tubos, colocar las tapas, poner un pedazo de cinta indicadora de autoclave y rotular adecuadamente poniendo el nombre del medio de cultivo y la fecha de preparación.
11. Esterilizar en autoclave los tubos con medio de cultivo a 121 °C durante 15 minutos.
12. Dejar enfriar los tubos a temperatura ambiente.
13. Guardar el material esterilizado a 4 °C hasta el momento de su uso.

Tabla 9

Concentración de los componentes en el medio para tomate de árbol (volumen final 1 L)

Componente	1L
Sal MS	4.43 g
Tiamina HCl 1 000pm	1 ml
Myo-inositol	0.1 g
Sucrosa	20 g
Agar	7.5 g

pH= 5.7, esterilizar

5. Procedimientos para la identificación de microorganismos contaminadores

5.1. Introducción

Las medidas preventivas de contaminación en condiciones *in vitro* es una actividad fundamental para garantizar el éxito del cultivo de tejidos *in vitro*. Por tanto, es necesario mantener a los cultivos libres de microorganismos contaminadores. Un amplio rango de microorganismos (hongos, bacterias, levaduras y virus) se ha identificado como contaminantes en el cultivo de tejidos vegetales. Estos microorganismos pueden provenir entre otros de los tejidos vegetales (endófitos), del área de trabajo, de los instrumentos de trabajo, de los recipientes y de las personas (Pérez, Leyva, Magallanes, Arce y Méndez, 2016).

Como contaminantes *in vitro* de plantas se han aislado especies de bacterias pertenecientes a los géneros: *Micrococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Xanthomonas*, *Erwinia*, *Agrobacterium*, entre otros; mientras que los hongos más comúnmente introducidos al cultivo de tejidos *in vitro* se encuentran los géneros *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, entre otros (Hernández y Gonzales, 2010).

La limpieza consiste en la eliminación de suciedad, material grueso, materia orgánica y manchas en pisos, muebles y repisas usando desinfectantes. Este proceso incluye una limpieza preliminar, mediante la aspiración, desempolvado en seco, lavado o fregado con un paño y agua con jabón o detergente. La limpieza preliminar permite lograr una correcta desinfección ya que las partículas de tierra o materia orgánica pueden contener microorganismos que interferirían con la acción de los desinfectantes.

5.2. Microorganismos más comunes en los cultivo de tejidos *in vitro*

Dentro de las evaluaciones fitosanitarias se encontraron microorganismos como bacterias y hongos, estos aún no han sido identificados, sin embargo, a continuación se muestran las fotos de las muestras halladas. Se observó la presencia de un hongo de color negro, semejante al género *Penicillium* (Figura 9).



Figura 9. Bacterias contaminantes en el cultivo *in vitro*. Izquierda: hongo color negro en yacón. Derecha: hongo color negro en oca.

En cuanto a bacterias, existen especies de bacterias color amarillo y rosado alrededor del algunos explantes de yacón; además, se ha detectado visualmente dos tipos de bacterias en explantes de oca (Figura 10).



Figura 10. Bacteria color crema (derecha) y rosada (izquierda) infectando al cultivo de oca.

6. Procedimientos adicionales

6.1 Desinfección de cámara de flujo laminar y herramientas para el cultivo *in vitro*

Al iniciar actividades de cultivo *in vitro* se debe seguir los siguientes pasos:

- Encender la luz blanca de la cámara de flujo laminar.
- Encender el esterilizador de perlas y dejar hasta que alcance una temperatura de 250 °C.
- Desinfectar todas las superficies internas de la cámara con un papel toalla embebido en etanol de 70 °C.
- Limpiar las herramientas con papel toalla con etanol (70 %) para retirar los residuos.
- Colocar dentro de la cámara todos los materiales necesarios para la propagación: papel estéril, 2 placas petri grandes estériles, 4 pinzas, 4 navajas bisturí nuevos estériles, 4 mangos de bisturí, papel toalla, pizeta conteniendo etanol (70 %), un frasco de vidrio con etanol (70 %) para la desinfección y 1 mechero (con alcohol al 96 %).
- Encender el UV durante 15 minutos, luego encender la cámara de flujo y dejar operar al menos 15 minutos.

6.2 Procedimiento para realizar subcultivo de material vegetal

- En un coche multiusos colocar una gradilla con las accesiones a subcultivar, una gradilla con nuevo medio de cultivo, etiquetas nuevas, una bandeja para descartar los tubos, y una bolsa para descartar los desechos vegetales producto de la propagación.
- Desinfectarse las manos con alcohol (70 %), colocarse una mascarilla y un gorro descartable.
- Dentro de la cabina coger con la pinza un bloque de papel estéril para soporte (Figura 11A). Escoger un tubo por accesión, retirar el film de polietileno y con ayuda de una pinza retirar la plántula y colocarla sobre el papel (Figura 11B). Con el bisturí cortar las hojas y dejar solo el tallo; realizar cortes en diagonal entre nudo y nudo (Figura 11C).
- Con la ayuda de una pinza coger los entrenudos e introducirlos en un nuevo medio de cultivo (Figura 11D). Dependiendo del cultivar, colocar cuatro entrenudos (oca, ulluco y mashua), tres entrenudos (yuca) o un entrenudo (yacón y tomate de árbol).

Nota: Después de cada subcultivo se debe esterilizar las pinzas y el bisturí que se hayan utilizado y dejarlos enfriar.

- Etiquetar los tubos y colocar la fecha de realización del subcultivo. Colocar la etiqueta sobre el tubo y sellar con film de polietileno. Continuar los subcultivos para las demás accesiones.
- Terminado el subcultivo, llevar las accesiones renovadas al cuarto de conservación a 20 °C para su establecimiento y monitoreo de viabilidad.

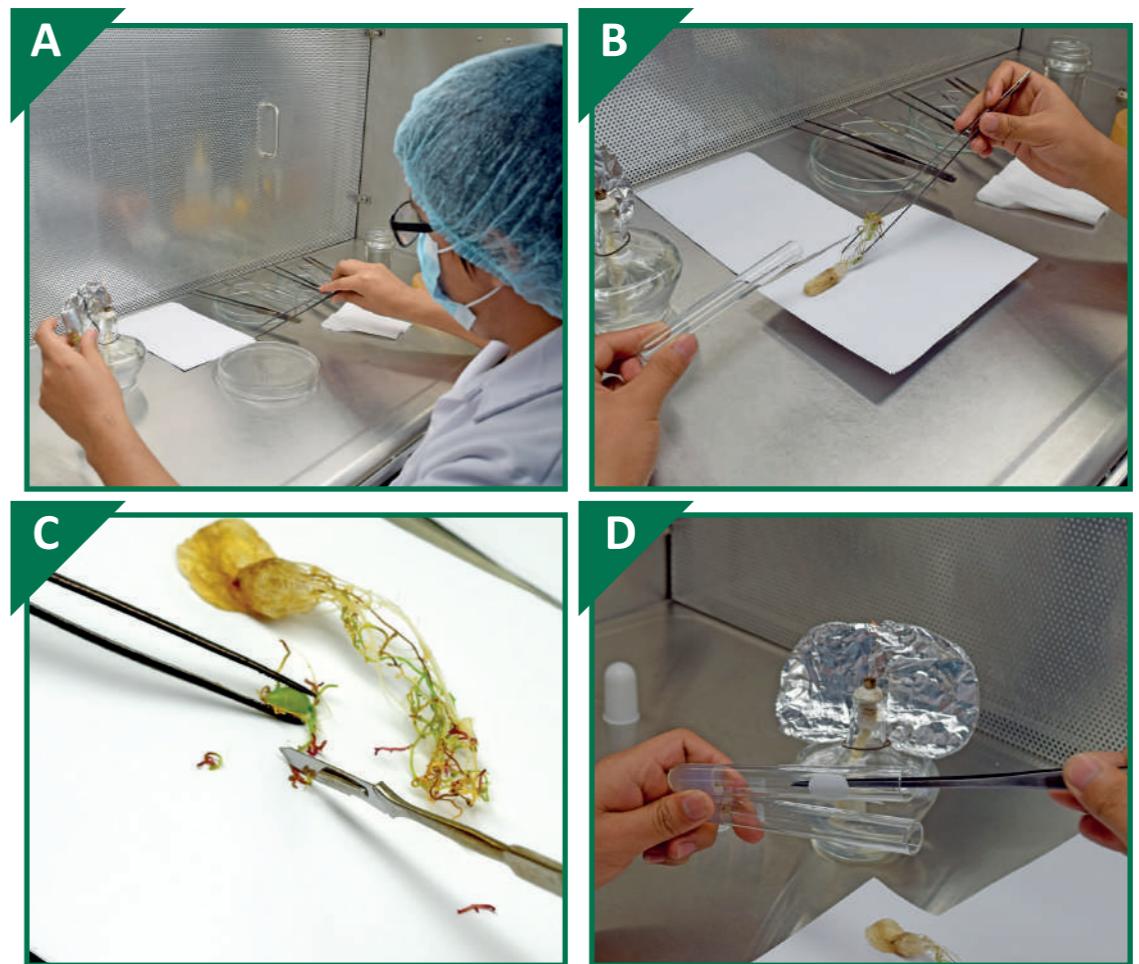


Figura 11. Procedimiento para subcultivo. A) Manipulación del bloque de papel estéril. B) Retiro del film de polietileno y retiro de la plántula. C) Corte de las hojas y cortes en diagonal entre nudo y nudo. D) Introducción de los entrenudos en un nuevo medio de cultivo.

6.3 Lavado de material de vidrio con plántulas *in vitro* no contaminadas y contaminadas

- Por material en contacto con plántulas *in vitro*, se entiende todo recipiente (tubo de ensayo, bolsa o frasco) que ha contenido o contiene plántulas *in vitro*.
- Retirar los restos de etiqueta y sellador plástico de los recipientes.
- Colocar los tubos boca arriba en ollas. No retirar las tapas de los tubos.
- Colocar las ollas con tubos y/o frascos en la autoclave y esterilizar.
- Después de la esterilización, usando guantes, retirar los residuos vegetales y/o de medio de cultivo de los recipientes aprovechando que el medio con agar se encuentra líquido. Colocar estos restos en una bolsa que será recogida y eliminada por el personal encargado de la actividad.

- f. Sumergir separadamente en agua las tapas y los recipientes.
- g. Lavar los recipientes y tapas con agua, detergente y con escobillas. Emplear detergentes suaves de fácil enjuague que no se adhieran a los recipientes. Enjuagar de dos a tres veces y escurrir. Realizar el lavado final con agua destilada y dejar secar en estantes.

6.4 Descarte de material contaminado con microorganismos

- a. Todo material contaminado con microorganismos se entiende como todo recipiente que ha contenido, contiene o haya estado en contacto con microorganismos visibles (hongos y bacterias).
- b. Colocar los recipientes en bolsas autoclavables. Los tubos de ensayo y frascos se colocan tapados.
- c. Se lleva al área de lavado para esterilizar en el autoclave.
- d. Despues de la esterilización, retirar las tapas de los tubos de ensayo y envases descontaminados. Retirar el film de polietileno (plástico) utilizando un bisturí de descarte (proveniente del contenedor de bisturí usados), seguido, retirar los residuos vegetales y/o de medio de cultivo de los recipientes. Colocar estos restos en una bolsa que será recogida y eliminada por el personal encargado por la actividad.
- e. Sumergir en agua las tapas y los recipientes separadamente.
- f. Lavar los recipientes y tapas con agua, detergente y escobillas. Emplear detergentes suaves de fácil enjuague que no se adhieran a los recipientes. Enjuagar de dos a tres veces, escurrir y secar en estantes.
- g. Guardar los recipientes y tapas secos en cajas y bolsas, respectivamente.

6.5 Limpieza y desinfección de los cuartos de incubación y conservación del banco *in vitro*

- a. La actividad debe ser realizada semanalmente por el personal técnico encargado.
- b. Para la limpieza de los pisos de los cuartos de incubación se utiliza 15 mL/L de desinfectante y 50 mL/L de lejía.
- c. Cada mes, realizar la limpieza de anaqueles, puertas y paredes de los cuartos de cultivo. Retirar el polvo con una franela y utilizar papel toalla sumergido en alcohol (96 %) para su desinfección.

6.6 Tratamiento de explantes contaminados con bacterias

- a. Preparar cefotaxima (20 %), pesando 2 g del antibiótico y disolver en 10 mL de agua destilada. Esterilizar por filtración y almacenar a - 20 °C.

- b. Cortar 1 cm² de papel filtro y colocarlos en placa de Petri para esterilizar (Figura 12A).
- c. Agregar al papel filtro el antibiótico preparado, sellar y guardar hasta su uso.
- d. Abrir el tubo en la cámara de flujo laminar y con una pinza estéril coger un papel filtro con antibiótico e introducirlo en el medio de cultivo nuevo (Figura 12B).
- e. Identificar los tubos que contienen bacterias, subcultivar en los tubos con papel filtro, sellar el tubo y dejar crecer a 21 °C (Figura 12C).

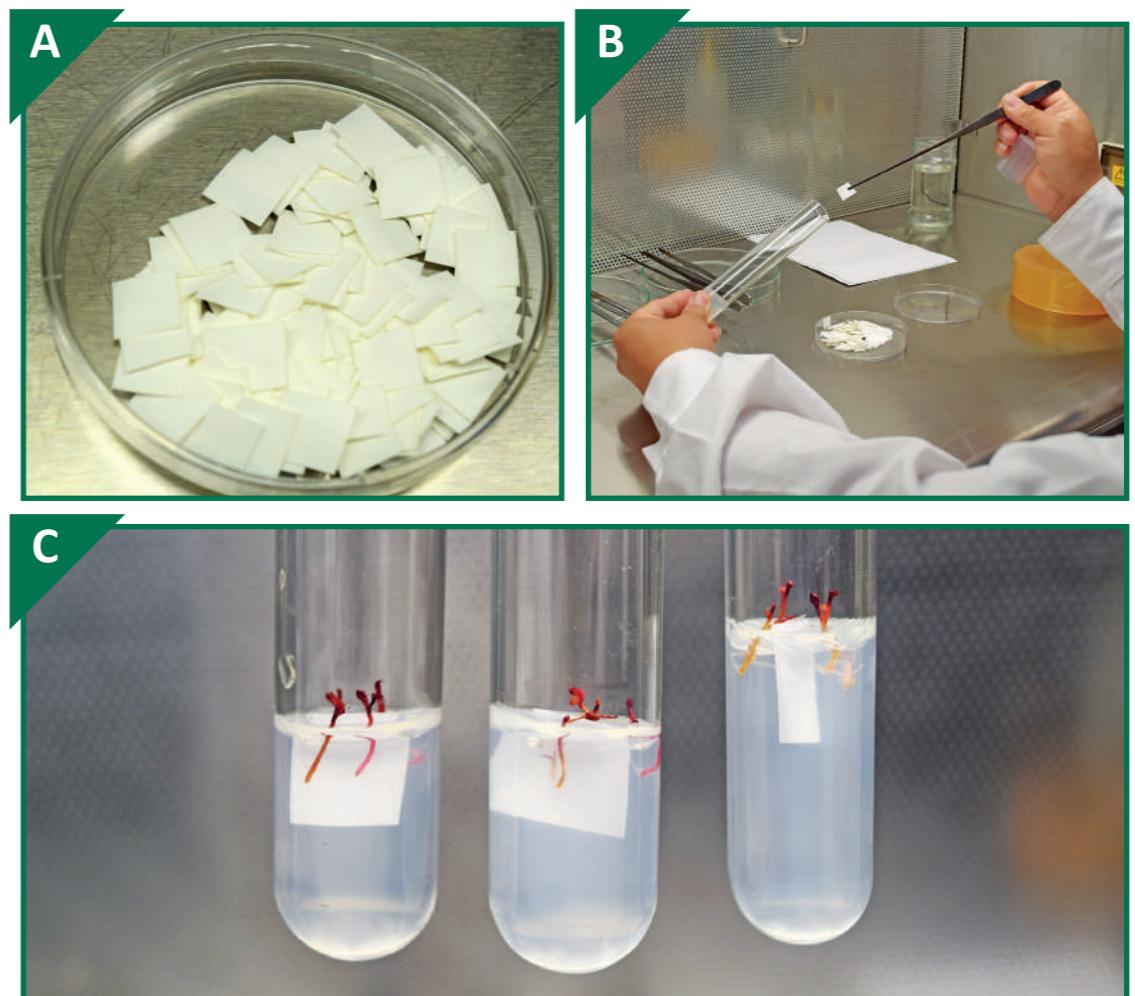


Figura 12. Tratamiento con antibiótico para desinfección. A) Papel filtro estéril con antibiótico. B) Papel filtro dentro de los tubos estériles. C) Siembra de explantes dentro de los tubos con papel estéril con filtro.

REFERENCIAS

- Aguirre, G., Baudoin, J. y Leigue, L. (2016). Aplicación del Cultivo de Tejidos en la Multiplicación y Conservación de los Recursos Fitogenéticos. Comisión Universitaria para el Desarrollo (CUD) y Consejo Interuniversitario de la Comunidad Francesa de Bélgica (CIUF). Bolivia. Recuperado de <https://orbi.uliege.be/bitstream/2268/212904/1/Aguirre%20Baudoin%20Leigue%20UMSS%202016.pdf>
- Bonilla, M., Mancipe, C. y Aguirre, A. (2015). Conservación *in vitro*: una perspectiva para el manejo de los recursos fitogenéticos. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 6(1), 67-82.
- Bray, E., Bailey-Serres, J. y Weretilnyk, E. (2000). Responses to abiotic stresses. In: Buchanan B., Gruissem W., y Jones R. *Biochemistry and molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologists, Rockville*, 1250-1318.
- Casas, A. y Lasa, J.M. (1986). Multiplicación *in vitro* en remolacha azucarera (*Beta vulgaris L.*). I. Tipo de explante y sistema de esterilización. II. Vitrificación del material. In *Anales de la Estación Experimental de Aula Dei*, 18(1-2), 51-63.
- Encina, C. L. (1996). Vitrificación de plantas cultivadas *in vitro*. *Encuentros en la Biología*, (28), 2.
- George, E. F., Hall, M. y De Klerk, G. J. (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition, The Background. Exegetic Basingstone*. UK.
- Hernández, Y. y González, M. (2010). Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento *in vitro* de frutales perennes. *Cultivos Tropicales*, 31(4).
- Mafla, B., Roa, E., Aranzales, R. y Debouck, G. (2010). Manual de procedimientos para la conservación *in vitro* del germoplasma del Genero *Manihot*. Programa de Recursos Genéticos. CIAT. Recuperado de <http://biotecnologia.biologia.ucr.ac.cr/wp-content/uploads/2017/06/03-Procedimientos-in-vitro-germplasma.pdf>
- Muñoz, M. A. (2006). *Biología*. Editorial Universidad Nacional de Quilmes.
- Murasnige, T. y Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tohaco Tissue Cultures. *Physiologia plantarum*, 15, 473-497.
- Panta A., Sánchez J., Gonzales R., Manrique I., Barkley N. y Ellis, D. (2016). Conservación *in vitro* de raíces y tubérculos andinos. Recuperado de http://www.fao.org/tempref/GI/Reserved/FTP_FaoRlc/old/prior/segalim/prodalim/prodveg/cdrom/contenido/libro10/cap03.htm
- Pérez, S., Leyva, N., Magallanes, M., Arce, A. y Méndez, A. (2016). Hongos contaminantes en el establecimiento *in vitro* de ápices de papa. *Cultivos Tropicales*, 37(4), 84-88.
- Quintero, I., Polo, J., Jarma, A. y Espitia, A. (2003). Enraizamiento *in vitro* de *Dioscoreas* sp. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 5(2), 51-56. Recuperado de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/575/1112>
- Ramos, J. (2012). *Avances de la Micropropagación in vitro de plantas leñosas* (Tesis de maestría). Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD). Bogotá, Colombia. Recuperado de <https://repository.unad.edu.co/bitstream/handle/10596/2515/17127974.pdf;jsessionid=2D6F7B20320BA090CC49DC8EB88DA72D.jvm1?sequence=1>
- Rao, N. (2004). Plant genetic resources: Advancing conservation and use through biotechnology. *African Journal of Biotechnology*, 3, 136-145.
- Roca, W. y Mroginski, L. (1991). Establecimiento de un laboratorio de cultivo de tejidos vegetales. En *Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones*. CIAT (*Centro internacional de agricultura tropical*), 151, 2-17.
- Sánchez-Chiang, N. y Jiménez, V. (2010). Técnicas de conservación *in vitro* para el establecimiento de bancos de germoplasma en cultivos tropicales. *Agronomía Mesoamericana*, 21(1), 193-205.
- Sharry S., Adema, M. y Abedini, W. (2015). *Plantas de Probeta: Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro*. Editorial de la Universidad Nacional de la Plata.
- Villamizar, E. (2005). Estandarización del protocolo *in vitro* para el establecimiento de encenillo (*Weinmannia tomentosa* h.b. & k.) y de rodamonte (*Escallonia myrtilloides* l.f.) en el laboratorio de cultivos de tejidos del jardín botánico José Celestino Mutis (tesis de pregrado). Universidad Francisco de Paula Santander, San José de Cúcuta, Colombia.

El Perú Primero



Av. La Molina 1981, La Molina
(51 1) 240-2100 / 240-2350
www.inia.gob.pe



ISBN: 978-9972-44-039-7

A standard 1D barcode representing the ISBN 978-9972-44-039-7.