

Genebank: In vitro conservation of potato - OP025

Date : September 02nd, 2016

Reference : Panta, A.; Cruzado, J.; Silvestre, R.; Franco, N.; Barkley, N.A.; Ellis, D. 2015. Genebank: In vitro conservation of potato. CIP-OP025. v.181:15 pps. 1-26 pp.

Not for general distribution.

For most current version, please contact Ana Panta (a.panta@cgiar.org)



Genebank: In vitro conservation of potato, v.181. CIP-OP025 by International Potato Center (CIP) is licensed under a Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0 International License. Permissions beyond the scope of this license may be available at <http://www.cipotato.org/>

Table of Contents

| | |
|----------------------------|----|
| ENGLISH VERSION | 4 |
| INTRODUCTION | 4 |
| SCOPE | 4 |
| SAFETY | 4 |
| MATERIALS | 4 |
| PROCEDURE | 5 |
| INTERNAL QUALITY CONTROL | 12 |
| REFERENCES | 12 |
| ANNEX 1 | 13 |
| ANNEX 2 | 14 |
| VERSION EN ESPAÑOL | 15 |
| INTRODUCCIÓN | 15 |
| ALCANCE | 15 |
| SEGURIDAD | 15 |
| MATERIALES | 15 |
| PROCEDIMIENTO | 16 |
| CONTROL INTERNO DE CALIDAD | 24 |
| REFERENCIAS | 24 |
| ANEXO 1 | 25 |
| ANEXO 2 | 26 |

| | |
|------------------------------------|---|
| TITLE | Genebank: In vitro conservation of potato - OP025 |
| OWNER * | In vitro Conservation Curator |
| APPROVER * | Head Genebank |
| APPROVAL DATE * | Sep 14, 2012 |
| LAST REVIEW DATE * | September 02nd, 2016 |
| REVIEW FREQUENCY * | 12 Months |
| ISSUE DATE | Sep 05, 2016 23:36 |
| CONTRIBUTORS * | Panta, Ana (CIP), Silvestre, Rocio (CIP), Franco, Nataly Elizabeth (CIP) |
| KEYWORDS | accredited, procedure, invitro-conservation |
| DOCUMENT ID * | OP025 |
| VERSION NUMBER | v.181 |
| COMPETENT PERSONNEL * | A.Panta; R.Silvestre; N.E.Franco; C.M.Ramirez; M.Yupa; J.Cruzado; J.Sanchez; M. Marin; A.Alvarado; V.Mallma;I.Espinoza; R.Serrato |
| RELATED CLAUSES | 5.8 |
| RELATED DOCUMENTS | RD017;RD013;RD029 |
| CITATION OF THIS DOCUMENT * | Panta, A.; Cruzado, J.; Silvestre, R.; Franco, N.; Barkley, N.A.; Ellis, D. 2015. Genebank: In vitro conservation of potato. CIP-OP025. v.181:15 pps. |
| CONTACT | For most current version, please contact Ana Panta (a.panta@cgiar.org) |

- All fields marked with * are required

ENGLISH VERSION

INTRODUCTION

In vitro potato germplasm conservation utilizes tissue culture techniques reducing plantlets' growth. This is done applying osmotic stress treatments and incubation at low temperature. The methods described below allow the medium-term conservation of about 8,700 potato genotypes, following subcultures approximately every two years.

SCOPE

The scope of this procedure covers the conservation of all *in vitro* potato germplasm material in the genebank.

SAFETY

Specific requirements above laboratory safety procedures are described in the document "Good practices during in vitro bank activities", item 2.3.

Each member of staff is obligated to read, learn and applied safety rules following the above document. It is mandatory that during labor inside the cold culture chamber ($7\pm 1^{\circ}\text{C}$) the staff wear warm protecting coat, and the labor must be realized in 30 min periods, after each 30 min period the staff must leaf from the chamber at least 15 min.

MATERIALS

| EQUIPMENT | |
|--------------------------------------|-----------------------|
| Autoclave | Medium dispenser |
| pHmeter | Analytical balance |
| Laminar flow chamber | Magnetic Stirrer |
| Refrigerator | Glass bead sterilizer |
| Pocket Personal Computer (Pocket PC) | Bar coding scanner |
| Desk Computer | Tools sterilizer |
| Freezer (-20°C) | Precision balance |

| EQUIPMENT | |
|--|---------------------------------|
| Water deionizer | Destillator |
| Microwave oven | Sterilizing oven |
| Environmental monitoring device (HOBO data-logger) | Incubator Chamber (20° ±2°C) |
| Thermal printer for bar-code labelling | Cold Chamber (7° ±1°C) |
| Drying oven | |
| OTHER MATERIALS | |
| Glass test tubes (25x150 mm, 16x125 mmm) | Cotton |
| Test tube caps | Labels |
| Forceps | Wash bottle with alcohol (70%) |
| Scalpels | Burner with alcohol (96%) |
| Blades No. 10 | Sterile paper sheets |
| Saran Wrap | Test tube racks |
| Alcohol Gel | Tool sterilizing box |
| Tool support | Glass vessel with alcohol (96%) |
| Culture media (see table 3) | Parafilm |

PROCEDURE

General rules:

- Conservation can be long- or transitory-term according to scientists' request and material type. Germplasm (G) and pathogen tested materials (PT), as well as some accessions of research material (R) , are conserved long-term. However most research material is conserved for a transitory-term. The name of the responsible scientist and the storage period for each accession have to be recorded in the Tissue Culture Laboratory database (TCL-DB).

- Accessions are grouped by health status: HS0, HS1, or HS2, based on the germplasm health status CIP's categorization (RD013); and HS2R, comprising materials HS2 requiring health status re-check. Each group comprises three material types:
 - (a) **'Germplasm'**, containing native cultivars, and wild genotypes from accessions requiring clonal propagation (non-producing botanical seed); these accessions are identified with the letter "G" in their corresponding laboratory code (Labcode).
 - (b) **'Pathogen tested'**, containing improved varieties and cultivars representing the crop diversity (core collection), made pathogen tested until 1999; they are identified by the letters "PT" in the Labcode.
 - (c) **'Research material'** comprises all material in trust not corresponding to any group described before; they are mainly breeding materials and are identified with the letter "R" in their Labcode.

1. Storage:

1.1. *In vitro* cultures are stored in a chamber under controlled conditions: temperature of $7 \pm 1^\circ\text{C}$, light intensity of $5\text{-}20 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}$ with a 16h/8h photoperiod of light and darkness (Fluorescent lamp COOL DAYLIGHT, 36W) (*). Under these conditions, *in vitro* cultures can be viable for approximately two years.

1.2. Three tubes per accession are conserved, with four plantlets per tube. Each tube must be labeled indicating the barcode and the following passport identification data: CIP's accession number, labcode, cultivar name, type and lot of culture medium, health status (HS0, HS1, or HS2), and subculture date.

1.3. Thirty accessions are stored in each test tube rack. Place three to four test tube racks per shelf section. Each test tube rack should be labeled indicating its location. Each shelf section has a number. The location of the accessions has to be recorded in the TCL-DB.

* Illuminance is constantly checked using an environmental monitoring device (HOBO logger). Fluorescents of low illuminance capacity, are replaced by new ones after approximately 3,000 h of use.

2. Evaluation of viability:

2.1. Evaluate the *in vitro* cultures every 3-4 months.

2.2. Transfer the *in vitro* cultures from the conservation chamber at $7 \pm 1^\circ\text{C}$ to the active collection chamber at $20 \pm 2^\circ\text{C}$. The test tube racks containing the accessions should be transported by laboratory cart.

2.3. Using a pocket PC record in the TCL-DB the accessions contained in each test tube rack (following the Data record and monitoring guide of the *in vitro* Genebank - point 3).

2.4. Verify that accessions location is recorded correctly in the TCL-DB. Verify that missing accessions and those with only one test tube in stock are in subculture process. The *in vitro* cultures of these accessions should be stored in the active collection chamber. Locate the accessions using a pocket PC (following the Data record and monitoring guide of the in vitro Genebank - point 2).

2.5. Evaluate the accessions being in subculture. This has to be done for:

- (a) Routine renewal
- (b) Vigor increasing treatments (see Annex 1)
- (c) Microbial contaminant elimination treatments (see Annex 1)

The evaluation is done visually according to the indicators specified in Table 1. When the *in vitro* cultures continue to have low viability and/or microbial contamination, repeat the specific treatments.

2.6. Continue evaluating all the other accessions of the test tube rack. Accessions classified as 'regular', as well as those of the 'medium' category with only two test tubes in storage, have to be sub-cultured for their renewal. For this purpose, one of the test tubes with 'medium' vigor status is transferred to a new test tube rack and placed in a transitory location. For all cases, using a pocket PC record the evaluation results, the new transitory location, and the next activity to follow (urgent renewal, renewal, conservation) in the TCL-DB (following the Data record and monitoring guide of the in vitro Genebank - point 2).

2.7. Return the test tube rack containing the evaluated accessions to the cold chamber. Using a pocket PC, verify that its location is correctly recorded in the TCL-DB.

2.8. Place the transitory test tube rack in the cold chamber in the corresponding site, according to the health status (HS0, HS1, HS2 or HS2R). Identify the test tube rack with a plate indicating the corresponding rack and shelf number.

2.9. The number of stocks and the location of all accessions contained in the transitory test tube rack are recorded in the TCL-DB.

2.10. Sub-culture the accessions in fresh medium no longer than one week after its evaluation.

3. Sub-culturing for renewal:

3.1. List and labeling:

3.1.1. Each test tube rack to process is assigned to an operator. Transfer the test tube rack, containing the accessions to be processed, to the transferring area.

3.1.2. Generate the list of accessions to be processed following the Data Monitoring Manual.

3.1.3. Record the culture medium to be used (i.e. MSA) in the TCL-DB.

3.1.4. Only generate labels for the accessions that can be processed during one day. DO NOT print additional labels for any reason. The operator has to process the accessions on the day the labels were printed. Print three labels per accession. Prepare labels following the Data record and monitoring guide of the in vitro Genebank - points 6 and 7

3.2. Sub-culture:

3.2.1. At least 30 minutes before starting the subculture, turn on and disinfect the laminar flow chamber, turn on the tools sterilizer, and prepare all required materials and tools following the protocol of Good practices during in vitro activities

3.2.2. Under aseptic conditions process accessions one by one; each accession in process is placed in one rack inside the laminar flow chamber. Use one tube per accession as original material for the subculture process. Each original tube contains four plantlets. Locate and separate the three labels corresponding to the specific accession to be sub-cultured.

3.2.3. Using a scalpel remove the tube's sealing tape (i.e. parafilm) and the label. Keep this old label beside the new labels of the accession. This label will be placed as a control on one of the new tubes.

3.2.4. Subculture the plantlets following the In vitro multiplication of potato - OP056 protocol. Use 16 x 125 mm test tubes with MSA medium (3 ml/tube) for the subculture. Four stem segments are placed into each test tube. Each stem segment contains 1-2 nodes. Subculture three tubes per accession.

3.2.5. Label the tubes. Verify that the old label (coming from the test tube that contained the mother plants) has the same identifications as the new labels.

3.2.6. Attach a saran wrap tape to each tube. Attach the labels on the saran wrap tape. The old label has to be attached to one of the three tubes, in the cap. Seal each tube around the cap with saran wrap tape.

3.2.7. After processing all accessions from one test tube rack, place the rack in its corresponding location in the active collection chamber. Incubation conditions are: temperature of $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, light intensity of $50\text{-}95 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ with a 16h/8h photoperiod of light and darkness (Fluorescent lamp COOL DAYLIGHT, 36W) (*)

3.2.8. Asepsia monitoring:

(a) 5-7 days after the sub-culture, evaluate the *in vitro* cultures visually for verifying the absence of microbial contamination signs (fungi, bacteria).

(b) Using the Computer generate the accession list. Evaluate visually each accession and record the evaluation results in the TCL-DB (using the pocket PC), following the Data record and monitoring guide of the in vitro Genebank- points 5.1 and 5.2

(c) Contaminated cultures are removed from the test tube rack and placed inside a bag for autoclaving. The bag is transferred to the washing area for its sterilization.

(d) If all the tubes from one accession are contaminated, repeat the subculture process using a new stock tube from the conservation chamber. When all stocks are showing bacteria contamination, the accession must be transferred to the phytosanitary area where will be processed for bacteria elimination.

(e) Accessions with no signs of contamination will continue their incubation in the active collection chamber.

3.2.9. Viability monitoring:

(a) 20-25 after the subculture evaluate the viability of the *in vitro* cultures according to the indicators of Table 2. Using the Computer generate the accession list. Evaluate visually each accession and record the evaluation results in the TCL-DB (using the pocket PC), following the Data record and monitoring guide of the in vitro Genebank - points 5.1. and 5.3

(b) Accessions classified as 'medium' or 'good' are transferred to a new test tube rack and placed in a transitory location in the chamber $20^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$. These accessions are ready for next subculture in MSA (when more material is required for safety copies) or on conservation medium (MSA + Sorbitol).

3.2.10. Using the pocket PC record in the TCL-DB the location of the test tube rack which contains the accessions that are ready for its sub-culture on conservation medium; and should be processed as soon as possible.

* Luminance is recorded by a environment conditions data logger (HOBO). Fluorescents of low luminance capacity are replaced by new ones after approximately 3,000 h of use.

3.3. Transfer to conservation medium:

3.3.1. Accessions that are ready for its subculture on conservation medium were placed in test tube racks in the active collection chamber (see point 3.2.1 to 3.2.10). Each test tube rack to be processed is assigned to an operator. Move the test tube rack, containing the accessions to be processed, from the active collection chamber to the transferring area. Each rack will contain only 5 accession; accessions are placed on rack cells keeping 2 empty rows between each accession, this practice minimize risk or errors in mixing tubes.

3.3.2. Generate the accession list following the manual of data monitoring.

3.3.3. Record the medium change, ie. from MSA to the corresponding conservation media (S42, S32 o S22), in the TCL-DB following the Data record and monitoring guide of the in vitro Genebank - point 4

3.3.4. The conservation medium to be utilized is defined according to the viability of the accession on MSA medium. The utilized culture media contain different concentrations of sorbitol, which is a growth retardant (see Table 3). Accessions can be subcultured in three ways:

(a) Accessions evaluated as 'good': all tubes are transferred to S-42 medium.

(b) Accessions evaluated as 'medium': all tubes are transferred to S-32.

(c) Accessions of wild species evaluated as 'medium': all tubes are transferred to S-22.

3.3.5. Only generate labels for the test tube rack that is processed. DO NOT print additional labels for any reason. The operator has to process the accessions on the day the labels were printed. Print three labels per accession. Prepare labels following Data record and monitoring guide of the in vitro Genebank - points 6 and 7

3.3.6. Under aseptic conditions process accessions one by one; each accession in process is placed in one rack inside the laminar flow chamber. Separate the labels corresponding to the accession to be sub-cultured in conservation medium. Using a scalpel remove the tube's sealing tape (i.e. saran wrap) and the label. Keep the old labels (subculture on MSA medium) beside the new labels of the accession. These labels will be placed as control on the new tubes, in the caps.

3.3.7. Subculture the plantlets following the *In vitro* multiplication of potato - OP056 protocol. Use 25 x 150 mm test tubes with S-22, S-32 or S-42 medium (10ml / tube) according to the evaluation results (see point 3.3.4.). Four apical stem segments are placed into each test tube. Each apical stem segment contains 1-2 nodes. Subculture three tubes per accession. Always prefer apical buds; exceptionally, axillary buds can be used.

3.3.8. Label the tubes. In order to avoid any mislabeling risk, it is mandatory to verify that the all old labels (coming from the tubes containing the mother cultures) has the same identifications as the new labels.

3.3.9. Attach a Parafilm tape to each tube. Attach the labels on the saran wrap tape. The label from one of the tubes that contained the mother cultures must be attached to one of the new tubes; this label is used as identification witness. Seal the tubes with Saran wrap tape.

3.3.10. Asepsia monitoring:

(a) 5-7 days after the subculture, evaluate the *in vitro* cultures visually for verifying the absence of microbial contamination signs (fungi, bacteria).

(b) Using the Computer generate the accession list. Evaluate visually each accession and record the evaluation results in the Genebank-database (using the pocket PC), following the Data record and monitoring guide of the in vitro Genebank - points 5.1 and 5.2

(c) Contaminated *in vitro* cultures are removed from the test tube rack and placed inside a bag for autoclaving. The bag is transferred to the washing area for its sterilization.

(d) If all the tubes from one accession are contaminated, repeat the subculture process using a new stock tube from the conservation chamber.

(e) Accessions with no signs of contamination will continue their incubation in the active collection chamber.

3.3.11. Viability monitoring:

(a) 15-20 days after the subculture evaluate the viability indicators according to Table 2. Using the Computer generate the accession list. Evaluate visually each accession and record the evaluation results in the TCL-DB (using the pocket PC), following the Data record and monitoring guide of the in vitro Genebank- points 5.1 and 5.3

(b) Accessions classified as 'medium' or 'good' are transferred to a new test tube rack and placed in a transitory location in the active collection chamber. These accessions are ready for its transfer to the cold chamber.

3.3.12. Using the pocket PC, record in the TCL-DB the accessions ready to be transfered from the active collection chamber to the conservation chamber.

(a) Using the pocket PC, select the option "Save" (down site)

(b) Select the option "Move accessions to CF" (cold chamber)

3.3.13. Transfer the accessions to the conservation chamber and place them in its corresponding location. Using the PC, verify that the transfer date, stock numbers, and locations have been correctly recorded in the TCL-DB.

3.3.14. Evaluate the viability every 3-4 months following points 2.1 to 2.10) see Data record and monitoring guide of the in vitro Genebank - points 5.1 and 5.4. Additionally, evaluate the cultures monthly for verifying absence of vessels with microbial contamination.

Table 1. Indicators utilized in the visual viability evaluation of potato accessions for medium-term conservation (culture media S22, S32 or S42)

| Viability category | Stem necrosis | Chlorosis | Hyper-hydration | Etiolation |
|--------------------|---------------|-------------|-----------------|-----------------|
| Good | 0-10% | No | No | No |
| Medium | 10-30% | Slight | No | Slight |
| Regular 1 | 30-70% | No, slight | No-slight | No |
| Regular 2 | 0-30% | Slight-high | Slight-high | No, Slight-high |
| Dead | 100% | - | - | - |

Table 2. Categories utilized in the visual viability evaluation of sub-cultured potato accessions (culture medium MSA)

| Viability category* | *Chlorosis * | *Rooting * | Necrosis | Hyper-hydration | Shoot growing |
|---------------------|--------------|------------|----------|-----------------|---------------|
| Good | No | Good | 0-10% | No | Good |
| Medium | Slight | Medium | 10-30% | No-slight | Medium |
| Regular 1 | Slight-high | Poor | | Slight-high | Poor |
| Dead | - | - | 100% | - | - |

Table 3. Conservation media composition for potato *in vitro* culture (S22, S32, S42)

| Components | S22 | S32 | S42 |
|-----------------------|------|------|------|
| MS salts* (g/l) | 4.33 | 4.33 | 4.33 |
| Glycine-HCl (mg/l) | 2 | 2 | 2 |
| myo-inositol (mg/l) | 100 | 100 | 100 |
| Nicotinic acid (mg/l) | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| Pyridoxine-HCl (mg/l) | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| Thiamine-HCl (mg/l) | 0.1 | 0.1 | 0.1 |
| Sucrose (g/l) | 20 | 20 | 20 |
| Sorbitol (g/l) | 20 | 30 | 40 |
| Agar (g/l) | 6.5 | 6.5 | 6.5 |

| | | | |
|----|-----|-----|-----|
| pH | 5.6 | 5.6 | 5.6 |
|----|-----|-----|-----|

Murashige and Skoog basal Salts (1962). Provider: CAISSON.

INTERNAL QUALITY CONTROL

1. Test tubes are identified with labels with bar and bi-dimensional coding .
2. Racks containing *in vitro* cultures are identified with labels with bar coding.
3. *In vitro* material is evaluated for verifying absence of bacteria and fungi contamination.
4. Environmental conditions, temperature and light intensity, are monitored using Data logger (HOBO), and temperature is monitored using a remote system (SITRAD) .
5. For the stocks renewal of each accession, one label from the former *in vitro* cultures is attached to one of the new cultures.
6. There is a CIP's internal alarm system for supporting security of the personnel who works inside cold ($7\pm 1^{\circ}\text{C}$) culture chamber.
7. Internal audits and workshops on techniques and procedures revising are performed at least once per year.
8. Procedures are applied following validated methods and international standards (<http://www.biodiversityinternational.org/publications/search/results.html>).
9. Before starting the culture media preparation, verify that all reagents have not expired.

REFERENCES

1. Benson EE, Harding K, Debouck D, Dumet D, Escobar R, Mafla G, Panis B, Panta A, Tay D, Van den houwe I, Roux N. 2011. Refinement and standardization of storage procedures for clonal crops - Global Public Goods Phase 2: Part I. Project landscape and general status of clonal crop in vitro conservation technologies. System-wide Genetic Resources Programme, Rome, Italy.

<http://www.biodiversityinternational.org/publications/search/results.html>

2. Benson EE, Harding K, Debouck D, Dumet D, Escobar R, Mafla G, Panis B, Panta A, Tay D, Van denhouwe I, Roux N. 2011. Refinement and standardization of storage procedures for clonal crops Global Public Goods Phase 2: Part II. Status of in vitro conservation technologies for: Andean root and tuber crops, cassava, Musa, potato, sweetpotato and yam. System-wide Genetic Resources Programme, Rome, Italy.

<http://www.biodiversityinternational.org/publications/search/results.html>

3. Benson EE, Harding K, Debouck D, Dumet D, Escobar R, Mafla G, Panis B, Panta A, Tay D, Van den houwe I, Roux N. 2011. Refinement and standardization of storage procedures for clonal crops - Global Public Goods Phase 2: Part III. Multi-crop guidelines for developing in vitro conservation best practices for clonal crops. System-wide Genetic Resources Programme, Rome, Italy.

<http://www.biodiversityinternational.org/publications/search/results.html>

ANNEX 1

Treatments applied to increase vigour and to eliminate microbial contaminants

For all the accessions that require specific treatments transfer the stock with best healthy status to a transitory tube rack. The treatments are:

(a) Accessions showing poor growth and rooting are transferred to highly nutritive media (i.e. MPR, see table 4). The treatments applied to increase the vigour should be done as soon as possible.

(b) Accessions showing fungi with or without bacterial contaminants are disinfected using calcium hypochloride (2.5%) and transferred to fresh MSA medium.

(c) Accessions showing bacterial contaminants are transferred to MSA medium containing the antibiotic Cefotaxime (200 mg/l).

(d) Accessions showing bacterial contaminants resistant to Cefotaxime are disinfected with sodium hypochloride (2.5%) and transferred to MSA medium containing the antibiotic Rocephin (200 mg/l).

Processing of accessions with all stocks showing bacteria contamination are transferred to specific area dedicated to bacteria diagnosis, antibiotic treatment and cleaning. The processing steps "c" and "d" are performed in the phytosanitary area. The treatments for the elimination of microbial contaminants (fungal) should be applied in 1-2 days after detection.

Annex Table 1. Components of potato rapid propagation medium (MPR)

| MPR Components | Quantity |
|-----------------------------|-----------------|
| MS salts (g/l) * | 4.33 |
| Gibberellic acid (mg/l) | 0.1 |
| Glycine-HCl (mg/l) | 2 |
| Myo-inositol (mg/l) | 100 |
| Nicotinic acid (mg/l) | 0.5 |
| Pyridoxine-HCl (mg/l) | 0.5 |
| Thiamine-HCl (mg/l) | 0.1 |
| L-arginine (mg/l) | 4 |
| Calcium panthotenate (mg/l) | 2 |
| Putrescine HCl (mg/l) | 10 |
| Sucrose (g/l) | 30 |
| Coconut milk (ml/l) | 10 |
| Phytigel (g/l) | 3 |
| pH | 5.6 |

- Murashige and Skoog salts, 1962. Provider: CAISSON

ANNEX 2

Glossary of keywords:

*- *Culture medium: Substrate containing mainly the macro and micro-nutrients, vitamins and carbon sources (sugars) that are required for the optimal growth and development of any explant.

*- *Explant: Segment of piece from a plant organism. For example, protoplast, cell, tissue, organ, stem or leave segment.

- *In vitro* tissue culture: Techniques whereby an explant is grown aseptically in a chemically defined medium and incubated under controlled environmental conditions.

- Sub-culture: Process of *in vitro* tissue culture applied for the renewal of the *in vitro* cultures; explants from existing cultures (mother) are cultivated in fresh culture medium.

VERSION EN ESPAÑOL

INTRODUCCIÓN

La conservación *in vitro* de germoplasma de papa se realiza aplicando técnicas de cultivo de tejidos que permitan reducir el crecimiento de las plántulas. Esto se realiza aplicando tratamientos de estrés osmótico y de incubación a baja temperatura. Los métodos descritos a continuación permiten la conservación a mediano plazo de aproximadamente 8,700 genotipos de papa, los cuales requieren sub-cultivos periódicos cada 2 años aproximadamente.

ALCANCE

Se describe los procedimientos para la conservación *in vitro* de clones de papa en el banco de germoplasma.

SEGURIDAD

Los requerimientos específicos sobre procedimientos de seguridad en los laboratorios son descritos en el documento “Buenas prácticas durante las actividades en el Banco In vitro” ítem 2.3.

Cada miembro del personal está obligado a leer, aprender y aplicar las reglas de seguridad siguiendo el documento antes mencionado.

Es mandatorio que durante el trabajo dentro de la cámara fría de cultivo ($7 \pm 1^\circ\text{C}$) el personal vista casaca térmica protectora; y las labores deben realizarse en periodos de 30 min, al final de cada 30 min el trabajador debe salir de la cámara al menos 15 min.

MATERIALES

| EQUIPOS | |
|-------------------------|-----------------------------------|
| Autoclave | Dispensador de medios |
| pH-metro) | Balanza analítica |
| Cámara de flujo laminar | Agitador magnético |
| Refrigeradora | Esterilizador de perlas de vidrio |

| EQUIPOS | |
|---|------------------------------------|
| Computadora de bolsillo (Pocket PC) | Impresora de código de barras |
| Computadora de escritorio | Escáner de código de barras |
| Esterilizador de herramientas | Congelador (-20°C) |
| Balanza de precisión | Desionizador de agua |
| Cámara de incubación (20°±2°C) | Cámara fría (7°±1°C) |
| Registrador de datos ambientales (HOBO data logger) | Horno microondas |
| Horno esterilizador | Horno de secado |
| OTROS MATERIALES | |
| Tubos de ensayo (25x150mm, 16x125 mm) | Algodón |
| Tapas para tubos de ensayo | Etiquetas |
| Pinzas | Piseta (con alcohol 70%) |
| Mango de bisturí | Mechero de alcohol (96%) |
| Hojas de bisturí N° 10 | Hojas de papel estéril |
| Saran Wrap | Gradillas para tubos de ensayo |
| Soporte de herramientas | Vaso de vidrio con alcohol (96%) |
| Medio de cultivo (ver tabla 3) | Parafilm |
| Alcohol Gel | Caja para esterilizar herramientas |

PROCEDIMIENTO

Reglas generales:

- La conservación de las accesiones puede ser a largo plazo o de manera transitoria, según la solicitud de los científicos y el tipo de material. Los materiales de germoplasma (G) y "probados contra patógenos" (PT), así como algunas accesiones de "material de investigación" (R), son conservados a largo plazo. Sin embargo la mayoría del "material de investigación" es conservado en forma transitoria. El nombre del científico responsable y el periodo de conservación de cada accesión deben ser registrados en la base de datos del Banco de Germoplasma *In vitro* llamada TCL-DB, por sus siglas en inglés "Tissue Culture Laboratory-database".

- Las accesiones se agrupan por condición sanitaria: HS0, HS1, o HS2; en base a la categorización del estado sanitario del germoplasma del CIP (RD013); y HS2R que comprende materiales HS2 que requieren re-chequeo sanitario. Cada grupo comprende tres tipos de materiales:
 - (a) 'Germoplasma'**, contiene cultivares nativos, y genotipos de accesiones silvestres que requieren la propagación clonal (no producen semilla botánica). Estas accesiones están identificadas con la letra G en su código de laboratorio.
 - (b) 'Libre de patógenos'**, contiene variedades mejoradas y otros cultivares representantes de la diversidad genética (colección núcleo), llevados a la condición libre de virus hasta el año 1999. Se identifican con las letras PT en su código de laboratorio.
 - (c) 'Material de investigación'**, comprende todo material entregado en custodia que no pertenece a los grupos anteriores, principalmente son materiales de investigación en mejoramiento, y llevan la letra "R" en su código de laboratorio.

1. Almacenamiento:

1.1. Los cultivos *in vitro* son almacenados en una cámara bajo condiciones controladas: 7°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), intensidad luminosa de 5-20 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{seg})$, foto-periodo de 16h/8h de luz y oscuridad respectivamente (Lámpara fluorescente COOL DAYLIGHT, 36W). Bajo estas condiciones se mantienen los cultivos *in vitro* por aproximadamente 2 años viables.

1.2. Se conservan de cada accesión tres tubos, con cuatro plántulas por tubo. Cada tubo debe llevar una etiqueta con código de barras y los siguientes datos de pasaporte: número CIP de la accesión, código de laboratorio, nombre del cultivar, medio de cultivo, número del lote del medio de cultivo, estado sanitario (HS0, HS1, o HS2), y la fecha de subcultivo.

1.3. Se almacenan treinta accesiones por gradilla, con 3-4 gradillas por repisa. Cada gradilla debe estar identificada con una etiqueta indicando su ubicación. Cada repisa tiene un número. La ubicación de la accesión debe ser registrada en la base de datos del Banco *in vitro*.

- La iluminación es corroborada usando un dispositivo de monitoreo ambiental (HOBO data-logger). Fluorescentes de baja iluminación, son reemplazadas por uno nuevo después de aproximadamente 3,000 h de uso.

2. Evaluación de viabilidad:

2.1. Evaluar los cultivos *in vitro* cada 3-4 meses.

2.2. Transferir los cultivos *in vitro* a evaluar desde la cámara de conservación ($7 \pm 1^\circ\text{C}$) hacia la cámara de la colección activa ($20 \pm 2^\circ\text{C}$). Las gradillas deben ser transferidas utilizando un carrito de laboratorio.

2.3. Utilizando una computadora de bolsillo (pocket PC) registrar las accesiones presentes en la gradilla (siguiendo la Guía para el registro y monitoreo de datos en el banco de germoplasma *in vitro* - punto 3)

2.4. Verificar si la ubicación de las accesiones registradas en la TCL-DB es la correcta. Verificar que las accesiones ausentes y aquellas con un solo tubo en stock, se encuentran en sub-cultivo. Los cultivos *in vitro* de estas accesiones deben estar almacenados en la cámara activa. Localizar las accesiones utilizando una computadora de bolsillo (pocket PC) (siguiendo la Guía para el registro y monitoreo de datos en el banco de germoplasma in vitro - punto 2)

2.5. Evaluar las entradas en sub-cultivo. Eso se realiza para:

(a) Renovación rutinaria

(b) Tratamientos vigorizantes (ver Anexo 1)

(c) Tratamientos de eliminación de contaminantes microbianos (ver Anexo 1)

La evaluación se realiza en forma visual utilizando los indicadores especificados de la Tabla 1. Repetir los tratamientos específicos en caso que los stocks subcultivados continúen con baja viabilidad o contaminación microbiana.

2.6. Continuar la evaluación de las accesiones remanentes en la gradilla. Las entradas clasificadas como 'regular', así como aquellas de la categoría 'medio' con sólo dos tubos almacenados, deben ser subcultivadas para su renovación. Para ello, transferir en una gradilla nueva uno de los tubos clasificados con vigor 'inter-medio'. Colocar la gradilla en una ubicación transitoria. Para todos los casos, registrar los resultados de evaluación, la ubicación transitoria, y la actividad que continua (renovación urgente, renovación, conservación) en la TCL-DB utilizando una computadora de bolsillo (pocket PC) (siguiendo la Guía para el registro y monitoreo de datos en el banco de germoplasma in vitro - punto 2).

2.7. La gradilla con las accesiones evaluadas es retornada a la cámara fría. Usando una computadora de bolsillo (pocket PC), verificar que su ubicación se registró correctamente en la TCL-DB.

2.8. Ubicar la gradilla transitoria en la cámara de la colección activa, en el lugar correspondiente a su estado sanitario (HS0, HS1, HS2, HS2R). Identificar la gradilla con una placa que indica el número de gradilla y repisa correspondiente.

2.9. Registrar en la TCL-DB el número de stocks y la posición de todas las accesiones contenidas en la gradilla transitoria.

2.10. Sub-cultivar estas accesiones en medio de cultivo fresco, en un plazo no mayor de 1 semana después de la evaluación.

3. Subcultivo para la renovación:

3.1. Listado y etiquetado:

3.1.1. Cada gradilla a procesar es asignada a un operador. Trasladar las gradillas con las accesiones a procesar al área de transferencia.

3.1.2. Generar la lista de accesiones (siguiendo el Manual de Monitoreo de Datos).

3.1.3. Registrar el medio de cultivo a utilizar (ie. MSA) en la TCL-DB.

3.1.4. Imprimir etiquetas con código de barra solamente para aquellas accesiones que se procesan durante el mismo día. No debe imprimirse etiquetas adicionales. El operador está obligado a procesar en el mismo día todas las entradas para las cuales se imprimieron etiquetas. Imprimir tres etiquetas por entrada, siguiendo la Guía para el registro y monitoreo de datos en el banco de germoplasma in vitro - puntos 6 y 7 .

3.2. Sub-cultivo:

3.2.1. Encender y desinfectar la cámara de flujo laminar 30 minutos antes de empezar el sub-cultivo, encender el esterilizador de herramientas, y preparar todos los materiales y herramientas requeridos siguiendo al protocolo de Buenas practicas en el Banco de germoplasma in vitro

3.2.2. Bajo condiciones asépticas procesar las accesiones una por una; cada accesión en proceso se ubica en una gradilla dentro de la cámara de flujo laminar. Utilizar un solo tubo por entrada como material original para el sub-cultivo. Cada tubo original contiene cuatro plántulas. Ubicar y separar las tres etiquetas correspondientes de la entrada a sub-cultivar.

3.2.3. Con la ayuda de un bisturí retirar la cinta selladora (parafilm) y la etiqueta. Ubicar una etiqueta antigua junto con las nuevas etiquetas de la accesión. La etiqueta antigua se colocará, como control, junto con una etiqueta nueva encima de uno de los tubos sub-cultivados.

3.2.4. Sub-cultivar las plántulas siguiendo el protocolo de Multiplicacion in vitro de papa y camote - OP056 . Utilizar para el sub-cultivo tubos de 16 x 125 mm con medio MSA (conteniendo 3 ml). Colocar cuatro explantes de segmentos de tallo por tubo. Cada segmento contiene uno a dos yemas. Por accesion se sub-cultiva tres tubos.

3.2.5. Etiquetar los tubos. Verificar que la etiqueta del cultivo anterior (etiqueta testigo) contenga los identificadores idénticos a las nuevas etiquetas.

3.2.6. Colocar a cada tubo una cinta de Saran wrap. Adherir sobre esta cinta la nueva etiqueta. La etiqueta testigo debe ser adherida a uno de los tubos, sobre la tapa del tubo. Sellar los tubos con cinta permeable (Saran wrap).

3.2.7. Al finalizar el sub-cultivo de todas las accesiones de una gradilla, colocar la gradilla en su ubicación correspondiente en la cámara activa. Las condiciones de incubación son: temperatura de 20°C ± 2°C, intensidad luminosa de 50-95 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{seg})$ (lámpara fluorescente COOL DAYLIGHT, 36W) con un fotoperiodo de 16h/8h de luz y oscuridad respectivamente (*).

3.2.8. Monitoreo de asepsia:

- (a) 5 - 7 días después del sub-cultivo evaluar visualmente los cultivos *in vitro* para verificar la ausencia de signos de agentes contaminantes (hongos y bacterias).
- (b) Crear la lista de las accesiones a evaluar utilizando la computadora PC para luego evaluar con la "Pocket PC". Evaluar visualmente cada entrada y registrar los resultados de la evaluación en la base de datos del Banco de Germoplasma vía la computadora "Pocket PC" (siguiendo la Guía para el registro y monitoreo de datos en el banco de germoplasma in vitro - puntos 5.1 y 5.2)
- (c) Los cultivos *in vitro* contaminados son retirados de la gradilla y colocados dentro de una bolsa autoclavable. La bolsa es transferida al área de lavado para su esterilización.
- (d) Si todos los tubos de una accesión presentan contaminación, debe repetirse el proceso de sub-cultivo a partir de otro tubo del stock de la cámara fría. Si se comprueba que todos los tubos stocks están contaminados con bacteria, la accesión debe ser transferida al área fitosanitaria donde se someterá a tratamientos para eliminación de bacterias.
- (e) Los cultivos *in vitro* sin signos de contaminación continúan su incubación en la cámara activa.

3.2.9. Monitoreo de viabilidad:

- (a) 20 a 25 días después del sub-cultivo evaluar la viabilidad de los cultivos *in vitro* de acuerdo a los indicadores de la Tabla 2. Generar el listado de las accesiones utilizando la Base de datos del Banco *in vitro*. Evaluar visualmente cada accesión y registrar los resultados de la evaluación en la TCL-DB vía la computadora de bolsillo (siguiendo la Guía para el registro y monitoreo de datos en el banco de germoplasma in vitro - puntos 5.1 y 5.3)
- (b) Las accesiones con clasificación "medio" y "bueno" serán transferidas a una gradilla nueva y colocadas en una ubicación transitoria en la cámara de 20°±2°C. Estas accesiones están listas para el siguiente sub-cultivo en MSA (cuando es requerido preparar también tubos para las copias de seguridad) ó en medio de conservación(MSA + sorbitol)), el cual debe realizarse a la brevedad posible.

3.2.10. La ubicación de la gradilla que contiene las accesiones a transferir al medio de conservación debe ser registrada en la TCL-DB.

* La iluminación es corroborada usando un dispositivo de monitoreo ambiental (HOBO Data-logger). Fluorescentes de baja iluminación, son reemplazadas por uno nuevo después de aproximadamente 3,000 h de uso.

3.3. Transferencia a medio de conservación:

3.3.1. Las accesiones listas para sub-cultivo en medio de conservación se encontrarán en las gradillas de ubicación transitoria en la cámara activa (ver puntos 3.2.1 a 3.2.10). Cada gradilla a procesar se asigna a un operador. Trasladar la gradilla con las entradas a procesar desde la cámara activa hacia el área de transferencia. En cada gradilla se colocan solo 5 accesiones; entre cada 2 accesiones debe haber una distancia de dos filas de celdas, esto a fin de evitar riesgos de mezclas de tubos.

3.3.2. Generar el listado de entradas a procesar (siguiendo el Manual de monitoreo de Datos).

3.3.3. Registrar en la TCL-DB el cambio de medio, ie. de MSA a Medio de conservación (S42, S32, o S22) siguiendo la Guía para el registro y monitoreo de datos en el banco de germoplasma in vitro - puntos 4

| | |
|---|--|
| <p>3.3.4. Dependiendo del estado de la viabilidad observada en MSA se selecciona el medio de cultivo de conservación adecuado para cada entrada. Los medios a utilizar contienen diferentes concentraciones de sorbitol, el cual es un retardante de crecimiento (ver Tabla 3). Las entradas pueden ser sub-cultivadas de 3 maneras:</p> <p>(a) Accesiones clasificadas como "bueno": transferir todos los tubos a medio S-42.</p> <p>(b) Accesiones clasificadas como "medio": transferir a medio S-32</p> <p>(c) Entradas de especies silvestres clasificadas como "medio": transferir a S-22.</p> | |
| <p>3.3.5. Generar etiquetas solamente para la gradilla que se está procesando. NO IMPRIMIR etiquetas adicionales por ninguna razón. El operador está obligado a procesar en el mismo día todas las accesiones para las cuales ha emitido etiquetas. Imprimir tres etiquetas por accesión (siguiendo la Guía para el registro y monitoreo de datos en el banco de germoplasma in vitro - puntos 6 y 7).</p> | |
| <p>3.3.6. Bajo condiciones asépticas procesar las accesiones una por una; cada accesión en proceso se ubica en una gradilla dentro de la cámara de flujo laminar. Ubicar y separar las tres etiquetas de la entrada que se sub-cultivará en medio de conservación. Con la ayuda de un bisturí retirar la cinta selladora (i.e. saran wrap) y la etiqueta. Ubicar las etiquetas antiguas (sub-cultivo en medio MSA) junto con las nuevas etiquetas de la accesión en proceso. Las etiquetas antiguas se colocarán, como control, junto a las etiquetas nuevas de cada uno de los tubos sub-cultivados; se adherirán sobre la tapa de los tubos..</p> | |
| <p>3.3.7. Sub-cultivar las plántulas siguiendo el protocolo de Multiplicación in vitro de papa y camote - OP056. Utilizar tubos de ensayo de 25x150 mm con medio de cultivos S-22, S-32 o S-42 (10 ml / tubo) dependiendo de los resultados de evaluación (ver punto 3.3.4). Colocar por tubo 4 segmentos apicales de tallo. Cada segmento apical de tallo contiene 1 a 2 nudos. Sub-cultivar 3 tubos por entrada. Siempre preferir segmentos apicales para el sub-cultivo; excepcionalmente puede utilizarse yemas axilares.</p> | |
| <p>3.3.8. Etiquetar los tubos. Con el objeto de evitar cualquier riesgo de error de identificación, es mandatorio verificar que las etiqueta antiguas (proveniente de los tubos que contenían las plantas madres) tienen los mismos identificadores que las etiquetas nuevas.</p> | |
| <p>3.3.9. Colocar a cada tubo una cinta de Parafilm. Adherir sobre esta cinta la nueva etiqueta. Las etiquetas de los tubos que contenían las plantas madres deben ser adheridas a los tubos nuevos, estas etiquetas sirven de testigos de identificación. Sellar los tubos con cinta permeable (Saran Wrap).</p> | |

| | |
|--|--|
| <p>3.3.10. Monitoreo de asepsia:</p> <p>(a) 5 - 7 días después del sub-cultivo evaluar visualmente los cultivos <i>in vitro</i> para verificar la ausencia de agentes contaminantes (hongos y bacterias).</p> <p>(b) Crear la lista de las entradas de la gradilla utilizando la computadora. Evaluar visualmente cada entrada y registrar los resultados de la evaluación en la base de datos del Banco de Germoplasma vía la computadora de bolsillo (siguiendo la Guía para el registro y monitoreo de datos en el banco de germoplasma in vitro - puntos 5.1 y 5.2)</p> <p>(c) Los cultivos <i>in vitro</i> contaminados son retirados de la gradilla y colocados dentro de una bolsa autoclavable. La bolsa es transferida al área de lavado para su esterilización.</p> <p>(d) Si todos los tubos de una accesión presentan contaminación, debe repetirse el proceso de sub-cultivo a partir de otro tubo stock de la cámara fría.</p> <p>(e) Los cultivos <i>in vitro</i> sin signos de contaminación continúan su incubación en la cámara activa.</p> | |
| <p>3.3.11. Monitoreo de viabilidad:</p> <p>(a) 20 a 25 días después del sub-cultivo evaluar la viabilidad de los cultivos <i>in vitro</i> de acuerdo a los indicadores de la Tabla 2. Generar el listado de las accesiones utilizando la computadora personal y luego evaluar con la PC de bolsillo. Evaluar visualmente cada entrada y registrar los resultados de la evaluación en la TCL-DB vía la computadora de bolsillo (siguiendo la Guía para el registro y monitoreo de datos en el banco de germoplasma in vitro - puntos 5.1 y 5.3)</p> <p>(b) Entradas clasificadas como "medio" o "buena" son transferidas a una gradilla nueva colocándola en una ubicación transitoria en la cámara activa. Estas entradas están listas para su transferencia a la cámara de conservación (cámara fría).</p> | |
| <p>3.3.12. Utilizando la computadora de bolsillo (pocket PC) se registra en la TCL-DB las entradas que están listas para su transferencia desde la cámara activa hacia la cámara de conservación.</p> <p>(a) Seleccionar en la computadora de bolsillo de opción "Save" (down site).</p> <p>(b) Seleccionar la opción "Move accesiones to CF" (mover accesiones a la cámara fría).</p> | |
| <p>3.3.13. Transferir las entradas hacia la cámara de conservación y colocarlas en su ubicación correspondiente. Usando la PC verificar que la fecha de transferencia, el número de stock, y la ubicación han sido registrados correctamente en la TCL-DB.</p> | |
| <p>3.3.14. Evaluar la viabilidad cada 3-4 meses siguiendo lo indicado en los puntos 2.1 a 2.10. Adicionalmente se evalúan los cultivos mensualmente para verificar la ausencia de envases con signos de contaminación. (ver Guía para el registro y monitoreo de datos en el banco de germoplasma in vitro- puntos 5.1 y 5.4)</p> | |

Tabla 1. Indicadores utilizados en la evaluación visual de la viabilidad de accesiones de papa para la conservación a plazo mediano (medios de cultivos S22, S32 ó S42)

| Categoría de viabilidad | Necrosis de tallo | Clorosis | Hiper-hidratación | Etiolación |
|--------------------------------|--------------------------|-----------------|--------------------------|-------------------|
| Bueno | 0-10% | No | No | No |
| Medio | 10-30% | Leve | No | Leve |
| Regular 1 | 30-70% | No-Leve | No-Leve | No |

| | | | | |
|-----------|-------|-----------|-----------|---------------|
| Regular 2 | 0-30% | Leve-Alto | Leve-Alto | No, Leve-Alto |
| Muerto | 100% | - | - | - |

Tabla 2. Categorías utilizadas en la evaluación visual de viabilidad de las acesiones de papa sub-cultivadas (medio MSA)

| Categoría de viabilidad | Clorosis | Enraizamiento | Necrosis | Hiper-hidratación | Brotamiento |
|-------------------------|-----------|---------------|----------|-------------------|-------------|
| Bueno | No | Bueno | 0-10% | No | Bueno |
| Medio | Leve | Medio | 0-10% | No-leve | Medio |
| Regular | Leve-alto | Escaso | | Leve-alta | Débil |
| Muerto | - | - | 100% | - | - |

Tabla 3. Composición del medio de cultivo para la conservación *in vitro* de papa

| Componentes | S22 | S32 | S42 |
|-------------------------|------|------|------|
| Sales MS (g/l) * | 4.33 | 4.33 | 4.33 |
| Glicina-HCl (mg/l) | 2 | 2 | 2 |
| mio-inositol (mg/l) | 100 | 100 | 100 |
| Acido nicotínico (mg/l) | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| Piridoxina-HCl (mg/l) | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| Tiamina-HCl (mg/l) | 0.1 | 0.1 | 0.1 |
| Sacarosa (g/l) | 20 | 20 | 20 |
| Sorbitol (g/l) | 20 | 30 | 40 |
| Agar (g/l) | 6.5 | 6.5 | 6.5 |
| pH | 5.6 | 5.6 | 5.6 |

*Sales de Murashige y Skoog (1962). Proveedor: CAISSON.

CONTROL INTERNO DE CALIDAD

1. Los tubos de ensayo son identificados con etiquetas con código de barras y bi-dimensional.
2. Las gradillas conteniendo los materiales *in vitro* son identificadas con etiquetas con código de barras.
3. Los materiales *in vitro* son evaluados para verificar la ausencia de hongos y bacterias, constantemente.
4. Monitoreo de temperatura, intensidad luminosa de las cámaras de cultivo utilizando registrador de datos HOBO; adicionalmente la temperatura también es monitoreada por un sistema de control remoto SITRAD.
5. Para la renovación de los stocks *in vitro* de cada accesión, una etiqueta procedente del stock *in vitro* anterior es adherida a uno de los cultivos nuevos.
6. Existe sistema de alarma interna para apoyar la seguridad del personal que trabaja en la cámara de cultivo fría ($7\pm 1^{\circ}\text{C}$).
7. Se realizan auditorías internas y talleres de revisión de técnicas y procedimientos, al menos una vez al año.
8. Los procedimientos y técnicas son aplicados siguiendo métodos validados bajo estándares internacionales (<http://www.biodiversityinternational.org/publications/search/results.html>).
9. Antes de iniciar la preparación de medios de cultivo, se debe verificar que todos los reactivos no hayan expirado.

REFERENCIAS

1. Benson EE, Harding K, Debouck D, Dumet D, Escobar R, Mafla G, Panis B, Panta A, Tay D, Van den houwe I, Roux N. 2011. Refinement and standardization of storage procedures for clonal crops - Global Public Goods Phase 2: Part I. Project landscape and general status of clonal crop *in vitro* conservation technologies. System-wide Genetic Resources Programme, Rome, Italy. <http://www.biodiversityinternational.org/publications/search/results.html>
2. Benson EE, Harding K, Debouck D, Dumet D, Escobar R, Mafla G, Panis B, Panta A, Tay D, Van denhouwe I, Roux N. 2011. Refinement and standardization of storage procedures for clonal crops - Global Public Goods Phase 2: Part II. Status of *in vitro* conservation technologies for: Andean root and tuber crops, cassava, Musa, potato, sweetpotato and yam. System-wide Genetic Resources Programme, Rome, Italy. <http://www.biodiversityinternational.org/publications/search/results.html>
3. Benson EE, Harding K, Debouck D, Dumet D, Escobar R, Mafla G, Panis B, Panta A, Tay D, Van den houwe I, Roux N. 2011. Refinement and standardization of storage procedures for clonal crops - Global Public Goods Phase 2: Part III. Multi-crop guidelines for developing *in vitro* conservation best practices for clonal crops. System-wide Genetic Resources Programme, Rome, Italy. <http://www.biodiversityinternational.org/publications/search/results.html>

ANEXO 1

Tratamientos que se aplican para la vigorización y la eliminación de contaminantes microbianos

Para las accesiones que requieren tratamientos específicos transferir el stock con el mejor estado sanitario hacia una gradilla transitoria. Los tratamientos son:

- (a) Accesiones que muestran un desarrollo y enraizamiento pobres son transferidas a un medio de cultivo altamente nutritivo (ie. MPR, ver tabla 4). Los tratamientos de vigorización deben ser aplicados tan pronto como sea posible.
- (b) Accesiones que muestran contaminación fungosa con o sin bacterias son desinfectadas con hipoclorito de sodio (2.5%) y transferidas a medio MSA fresco
- (c) Accesiones que muestran signos de contaminación bacteriana son transferidas a medio MSA que contiene el antibiótico Cefotaxima (200 mg/l)
- (d) Accesiones con contaminación bacteriana resistente a Cefotaxima son desinfectadas con hipoclorito de calcio (2.5%) y transferidas a medio MSA que contiene el antibiótico Rocephin (200 mg/l).

Los procedimientos "c" y "d" a la fecha son realizados por responsables del area fitosanitaria. Los tratamientos controladores de contaminación por hongos deben ser aplicados inmediatamente ó 1 día despues que se detecta la contaminación.

Tabla 1 de Anexo: Composición del medio de propagación rápida de papa (MPR)

| Componentes | Cantidad |
|------------------------------|-----------------|
| Sales MS (g/l) * | 4.33 |
| Acido giberélico (mg/l) | 0.1 |
| Glicina-HCl (mg/l) | 2 |
| Mio-inositol (mg/l) | 100 |
| Acido nicotínico (mg/l) | 0.5 |
| Piridoxina-HCl (mg/l) | 0.5 |
| Tiamina-HCl (mg/l) | 0.1 |
| L-arginina (mg/l) | 4 |
| Pantotenato de Calcio (mg/l) | 2 |
| Putrescina HCl (mg/l) | 10 |
| Sacarosa (g/l) | 30 |
| Agua de coco (ml/l) | 10 |
| Phytigel (g/l) | 3 |
| pH | 5.6 |

- Sales Murashige y Skoog, 1962. Proveedor: CAISSON

ANEXO 2

Glossario de palabras claves:

- Cultivo de tejidos *in vitro*: _Técnicas mediante las cuales un explante se cultiva asepticamente en un medio de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas.
- Explante: Parte separada de un vegetal por ejemplo protoplasto, célula, tejido, órgano, segmento de tallo u hoja.
- Medio de cultivo: Sustrato que contiene principalmente los macro y micro-nutrientes, vitaminas y fuentes de carbono (azúcares) necesarios para el crecimiento y desarrollo óptimo de cualquier explante vegetal.
- Sub-cultivo: Proceso de cultivo de tejidos *in vitro* mediante el cual se logra la renovación de los cultivos *in vitro*, para ello explantes provenientes de los cultivos existentes (madre) son cultivados en medio de cultivo fresco.