

# Manual de micropropagación del yacón

(*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Robinson)



PERÚ

Ministerio  
de Agricultura y Riego



Instituto Nacional de Innovación Agraria

EL PERÚ PRIMERO

MINISTERIO DE AGRICULTURA Y RIEGO  
INSTITUTO NACIONAL DE INNOVACIÓN AGRARIA  
DIRECCIÓN DE RECURSOS GENÉTICOS Y BIOTECNOLOGÍA - DRGB

# Manual de micropropagación del yacón

(*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Robinson)

Proyecto 092\_PI

“Variación del contenido de fructooligosacáridos (FOS) en accesiones promisorias de yacón: caracterización, clonamiento y análisis funcional de un fragmento de ADN complementario de la hidrolasa responsable de su degradación”.

## Manual de micropropagación del yacón (*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Robinson)

### Ministerio de Agricultura y Riego

Ministro de Agricultura y Riego

**Ing. Jorge Luis Montenegro Chavesta**

Viceministro de Desarrollo e Infraestructura Agraria y Riego

**Econ. Carlos Alberto Ynga La Plata**

Viceministra de Políticas Agrarias

**Econ. Paula Rosa Carrión Tello**

Jefe del INIA

**Jorge Luis Maicelo Quintana, Ph. D.**

© Instituto Nacional de Innovación Agraria – INIA

### Proyecto 092\_PI

“Variación del contenido de fructooligosacáridos (FOS) en accesiones promisorias de yacón: caracterización, clonamiento y análisis funcional de un fragmento de ADN complementario de la hidrolasa responsable de su degradación”.

### Elaboración de contenido:

Blga. Rosa María Cabrera Pintado

Blga. Jérica Danae Aliaga Cóndor

### Equipo técnico:

Blga. Rosa María Cabrera Pintado

Blga. Delia Castro San Miguel

Blga. Jérica Danae Aliaga Cóndor

### Editado por:

Instituto Nacional de Innovación Agraria - INIA

Equipo Técnico de Edición y Publicaciones

Av. La Molina 1981, Lima - Perú

(51 1) 240-2100 / 240-2350

www.inia.gob.pe

### Editor general:

Eliana Alviárez Gutierrez, M.Sc.

### Revisión de contenido:

Betty Flores Gonzales

Heillen Calderón Castillo

Gabriela Salazar Alvarez

### Diseño y diagramación:

Abner Fernando Mio Torrejón

Luis Carlos Arévalo Mercado

Jeams López Acaro

### Publicado:

diciembre, 2019

### Primera Edición:

diciembre, 2019

### Tiraje:

2000 ejemplares

### Impreso en:

**Nombre de la imprenta:** Vayu advertising

& communications S.A.C.

**RUC:** 20604037361

**Teléfono:** 964389548

**Dirección:** De los ingenieros Nro. 110 Dpto. 102

Urb. Valle Hermoso Lima - Lima - Santiago de Surco

**E-mail:** ventas@vayucunicaciones.com

### ISBN:

978-9972-44-041-0

## Tabla de contenidos

1. Introducción	3
2. Fases de la micropropagación de yacón	6
2.1. FASE 0: Acondicionamiento de la planta madre	6
2.2. FASE 1: Establecimiento o Iniciación	8
2.3. FASE 2: Multiplicación	11
2.4. FASE 3: Enraizamiento	12
2.5. FASE 4: Aclimatación	13
3. Glosario	17
4. Referencias	18
5. Anexo	19



## 1. Introducción

El yacón (*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Robinson) es una especie de la familia Asteraceae originaria de la región andina (Robinson mencionado por Mansilla, et al., 2010). Su cultivo está registrado desde la época precolombina y ha permanecido por mucho tiempo restringido a áreas muy pequeñas por estar adaptada a las condiciones ecológicas de los Andes (Mansilla et al., 2010). El yacón ha generado interés mundial debido a sus propiedades promisorias (Seminario, Valderrama y Manrique, 2003), permitiendo aumentar su uso potencial en la agroindustria e industria farmacéutica; debido a la presencia de compuestos fenólicos y fructooligosacáridos (FOS), que se encuentran almacenados en la raíz y cuyos contenidos pueden variar dependiendo de la variedad, el ambiente y su interacción (Manrique, Gonzales, Valladolid, Blas y Lizárraga, 2014).

La propagación del yacón para fines de producción es únicamente vegetativa o asexual debido a que sus semillas sexuales presentan alta esterilidad (Manrique et al., 2014). Este tipo de propagación posibilita la transmisión de enfermedades, especialmente las causadas por virus y bacterias y a la vez limita las posibilidades de mejoramiento de la especie cultivada (Salvarrey, 2008).

Una alternativa para disponer de material vegetal de propagación para multiplicación es el uso de la técnica de micropropagación, que consiste en la propagación asexual de plantas a partir del cultivo de tejidos vegetales en un ambiente artificial controlado, empleando medios de cultivo adecuados para cada una de las fases desarrolladas en condiciones *in vitro*. Una de las ventajas de esta técnica es obtener plantas libres de bacterias, hongos, virus y nemátodos.

Como parte de los resultados del Proyecto 092\_Pi: *Variación del contenido de fructooligosacáridos (FOS) en accesiones promisorias de yacón: Caracterización, clonamiento y análisis funcional de un fragmento de ADN complementario de la hidrolasa responsable de su degradación*, se ha elaborado el presente manual que describe el protocolo para la micropropagación de yacón, obtenido como resultado de una de las investigaciones desarrolladas en el marco del proyecto.

## 2. Fases de la micropropagación de yacón

Para la micropropagación del yacón se requiere cumplir con las siguientes fases:

### 2.1. FASE 0: Acondicionamiento de la planta madre

Esta fase también es conocida como acondicionamiento de la planta stock. Se desarrolla en condiciones de invernadero o casa malla. Consiste en regenerar plantas provenientes de rizóforos (Figura 1), que son las estructuras de propagación convencional del yacón.



Figura 1. Rizóforos de yacón.

Las plantas madre (Figura 2) deben estar contenidas en macetas con sustrato Premix N° 8 y regadas de acuerdo a los requerimientos hídricos. El riego debe ser directamente al sustrato, a fin de evitar el desarrollo de hongos en el follaje cercano a las yemas que serán usadas como explantes.



Figura 2. Acondicionamiento de las plantas madres de yacón. (A) Brotación de rizóforos. (B) Crecimiento de las plantas madre. (C) Plantas madre de yacón mantenidas en invernadero.

Se recomienda aplicar un fungicida sistémico al sustrato una semana antes de la colecta de explantes, con el fin de disminuir la carga de patógenos endófitos.

## 2.2. FASE 1: Establecimiento o Iniciación

Una vez que las plantas regeneradas tienen un tamaño al menos de 15 cm de altura; extraer los explantes, que en este caso vienen a ser las yemas apicales y axilares (Figura 3). A partir de las yemas apicales se puede disectar posteriormente los meristemas para iniciar el cultivo *in vitro*.



Figura 3. Explantes para la introducción *in vitro*. (A) yema apical, (B) axilar y (C) meristema aislado.

Con tijeras estériles cortar las yemas, colocarlas en un frasco (Figura 4), luego llevarlas al laboratorio y lavarlas con abundante agua de grifo y jabón líquido (Figura 5).

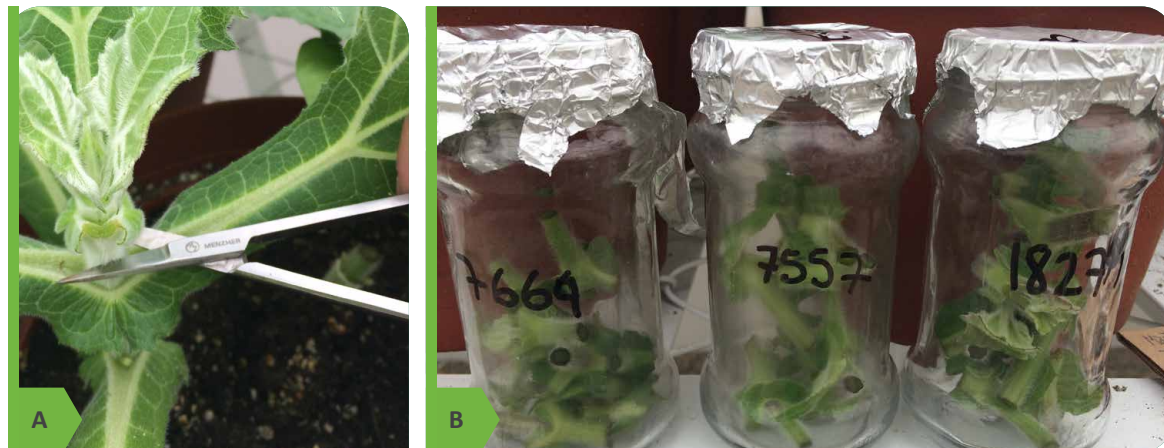


Figura 4. Procesamiento de yemas apicales. (A) Corte de yema apical. (B) Frascos de vidrio conteniendo yemas.



Figura 5. Lavado de muestras bajo agua de grifo.

Colocar las yemas en una solución de benomil al 0.1 % (P/V) durante una hora. Transcurrido ese tiempo proceder a enjuagar con agua de grifo hasta eliminar los restos de fungicida. Posteriormente realizar la desinfección superficial en condiciones estériles en cámara de flujo laminar (Figura 6).



Figura 6. Desinfección de yemas de yacón. (A) Muestras listas para la desinfección superficial. (B) Inicio del proceso de desinfección.

Pasos a seguir para la desinfección superficial:

- a. Sumergir las muestras en alcohol (70 %) por 1 minuto.
- b. Remojar las muestras en una solución de NaClO (1 %) más dos gotas de tween 20 durante 15 minutos.
- c. Finalmente, enjuagar tres veces con agua destilada estéril.

Luego de la desinfección disectar las yemas apicales (con 2-4 primordios foliares) usando pinzas y bisturí, bajo un microscopio estereoscópico (40X). Una vez aislada la yema, se siembra en tubos de ensayo conteniendo el medio de cultivo Murashige y Skoog–MS (1962) más carbón activado y agar a pH  $5.7 \pm 0.01$  (Anexo).

Si es de interés sembrar meristemas, se deberá continuar la disección de las yemas hasta dejar solo dos primordios foliares y el domo meristemático (Figura 7).



Figura 7. Aislamiento de meristema. (A) Disección de meristema usando microscopio estereoscópico. (B) Meristema de yacón (en círculo rojo).

Posteriormente, los meristemas y/o yemas deben ser incubados durante dos semanas a 21 °C bajo penumbra, seguido de exposición a luz con fotoperiodo de 16 horas durante dos semanas (Figura 8).

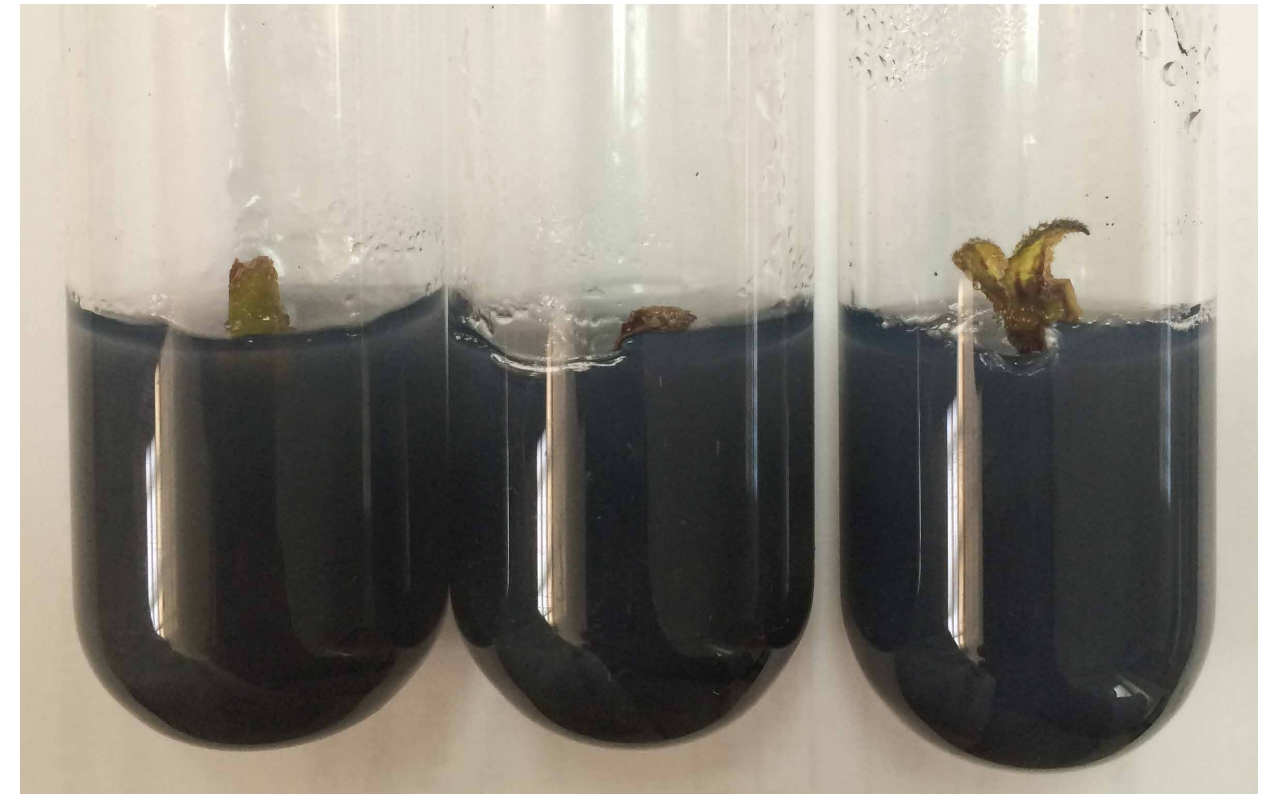


Figura 8. Yemas de yacón luego de dos semanas de la siembra.

### 2.3. FASE 2: Multiplicación

Transcurrido el periodo indicado para el establecimiento *in vitro*, las yemas regeneradas (Figura 9A) se subcultivan al medio MS más carbón activado y agar a pH  $5.7 \pm 0.01$  (Anexo) para la formación de brotes axilares, donde permanecerán durante 30 días, que es el periodo de tiempo para realizar los subcultivos.

En esta fase se deben usar microesquejes con las yemas apicales o axilares. Usando este protocolo la tasa de multiplicación promedio es de 3.1 microesquejes cada 30 días (Aliaga, 2017).



Figura 9. Desarrollo de la yema de yacón. (A) Yema regenerada luego de la etapa de establecimiento. (B) Yema en desarrollo durante la fase de multiplicación.

### 2.4. FASE 3: Enraizamiento

El yacón es una especie que no requiere la adición de ningún inductor de formación de raíces, por lo que se usa el medio de cultivo carente de auxinas.

Durante esta fase se inducirá la formación de raíces en microesquejes de mínimo 2 cm de longitud. Para esto, se deben seccionar los microesquejes apicales y sembrar en medio de cultivo MS más carbón activado y agar a pH  $5.7 \pm 0.01$  (Anexo).

Luego de 30 días se observará la formación de un adecuado número de raíces y las plántulas estarán listas para entrar al periodo de aclimatación (Figura 10).



Figura 10. Plántulas enraizadas listas para ingresar a la fase de aclimatación.

### 2.5. FASE 4: Aclimatación

Las vitroplantas deben retirarse de los tubos o frascos que las contienen y lavarse cuidadosamente con agua potable hasta quitar los residuos de agar, para luego sembrarlas en las pastillas jiffys #42H, las cuales deben hidratarse con agua destilada dos horas antes de su uso (Figura 11).

Para lograr la aclimatación de las plántulas regeneradas a condiciones *ex vitro*, se debe disminuir poco a poco la humedad relativa y aumentar la intensidad luminosa. En estas condiciones se logrará que las plántulas sean completamente autotróficas.

Esta fase se desarrolla en invernadero o en fitotrón, con una temperatura de  $21 \pm 2$  °C, fotoperiodo de 16 horas de luz y 70 % de humedad relativa.





Plántulas para aclimatar



Hidratar las pastillas jiffys  
2 horas antes de uso



a. Extraer las plántulas de los tubos.



b. Lavar las plántulas.



c. Sembrar las plántulas en los jiffys.



d. Colocar los jiffys con las plántulas en el fitotrón.

Figura 11. Proceso de aclimatación de plántulas de yacón.

Continuación del proceso de aclimatación de plántulas de yacón.

Las plántulas deben mantenerse en el fitotrón hasta terminar la fase de aclimatación.

En el caso del yacón esta fase es bastante corta, puesto que en 3 semanas se tendrán las plántulas de yacón totalmente aclimatadas a condiciones *ex vitro*.

Al terminar esta etapa, las plántulas están listas para su trasplante a bolsas o macetas y pasar a mantenimiento en condiciones de vivero, donde se desarrollarán hasta tener 15 cm de altura, para finalmente ser trasplantadas a campo (Figura 12).



Figura 12. Plántulas de yacón aclimatadas para su mantenimiento en vivero.

### 3. Glosario

- **Explante:** cualquier parte de la planta con la cual se inicia el cultivo *in vitro*.
- **Fitotrón:** cámara climática para crecimiento de plantas.
- **Penumbra:** condición donde se recibe poca luz.
- **Planta madre:** planta donadora de explantes para iniciar el cultivo *in vitro*.
- **Rizóforos:** estructuras de propagación vegetativa del yacón, conocidas comúnmente como cepas.
- **Vitroplantas:** plántulas obtenidas por cultivo de tejidos vegetales.

## 4. Referencias

- Aliaga, J.D. (2017). *Micropropagación de dos accesiones de yacón (Smallanthus sonchifolius (Poepp. & Endl.) H. Robinson) a partir de yemas apicales* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú.
- Mansilla, R., López, C., Flores, M. y Espejo, R. (2010). Estudios de la biología reproductiva en cinco accesiones de *Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl) Robinson. *Ecología Aplicada* (Perú), 9(2), 167-175.
- Manrique, I., Gonzales, R., Valladolid, A., Blas, R. y Lizárraga, L. (2014). Producción de semillas en yacón (*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl)) mediante técnicas de polinización controladas. *Ecología Aplicada* (Perú), 13(2), 135-145.
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-479.
- Salvarrey, M.J. (2008). *Evaluación de diferentes técnicas de propagación vegetativa en “guayabo del país” (Acca sellowiana (Berg.) Burret)* (Tesis de pregrado). Universidad de la República de Montevideo, Montevideo, Uruguay.
- Seminario, J., Valderrama, M. y Manrique, I. (2003). El yacón: Fundamentos para el aprovechamiento de un recurso promisorio. Lima, Perú: *Centro Internacional de la Papa (CIP), Universidad Nacional de Cajamarca, Agencia Suiza para el Desarrollo y Cooperación (COSUDE)*.

## 5. Anexo

### Composición del medio básico de Murashige y Skoog (1962) para la micropropagación de yacón

Compuestos	mg/l
<b>Macronutrientes</b>	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
KNO <sub>3</sub>	1900
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	440
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
<b>Micronutrientes</b>	
KI	0.83
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.20
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	22.30
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8.60
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.25
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.025
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.025
Na <sub>2</sub> EDTA	37.30
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27.80
Sacarosa	30000.00

Carbón activado: 100 mg/l  
Agar: 7 g/l

pH: 5.7 ± 0.01

PMR 003659  
153  
12/08/16





*Instituto Nacional de Innovación Agraria*

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



PERÚ

Ministerio  
de Agricultura y Riego

ISBN: 978-9972-44-041-0



9 789972 440410