

i Juntos por un San Martín que crece !



Instituto Nacional de Innovación Agraria



Laboratorio de Biotecnología Vegetal
Estación Experimental Agraria “El Porvenir San Martín”

▶ **MANUAL PRÁCTICO
DE PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE SACHA INCHI
(*Plukenetia volubilis* L.), UTILIZANDO BIORREACTORES DE INMERSIÓN TEMPORAL**

“MANUAL PRÁCTICO DE PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE SACHA INCHI (*Plukenetia volubilis* L.),
UTILIZANDO BIORREACTORES DE INMERSIÓN TEMPORAL”

Primera edición. Octubre, 2017.

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

© Dirección Regional de Agricultura San Martín
Jr. Ángel Delgado Morey S/N (Altura Cdra 15 Jr. Leguia) / Tarapoto, San Martín
Teléfono: 042-526700
www.drasam.gob.pe
Todos los derechos reservados.

Dr. Víctor Manuel Noriega Reátegui
Gobernador Regional de San Martín
Ing. José Reátegui Vega
Director Regional de Agricultura San Martín
Ing. Raúl Gonzales Alegría
Coordinador Proyecto: "Mejoramiento del Servicio de Competitividad de la Cadena de Valor de Sacha Inchi a los
Productores en cuatro provincias de la Región San Martín"

Equipo de Trabajo:
Ing. Mar Asunción Gárate Navarro
Ing. Henri Delgado Haya
Bach. Alexander Altamirano Salazar
Bach. Katerin Paola Amasifuén Alvarado

Fotografías, Diseño y Diagramación:
Qiqe Cisneros, para IDEAL Estudio Gráfico S.A.C.

Impresión:

Impreso en Perú / Printed in Peru

La Dirección Regional de Agricultura San Martín - DRASAM fomenta la reproducción y difusión de los datos incluidos en el presente producto informativo. Su uso para fines no comerciales se autorizará de forma gratuita previa solicitud. La reproducción para la reventa u otros fines comerciales, incluidos fines educativos, podría estar sujeta al pago de derechos o tarifas. Las solicitudes de autorización para reproducir o difundir material de cuyos derechos de autor sea titular Dirección Regional de Agricultura San Martín - DRASAM y toda consulta relativa a derechos y licencias deberán dirigirse por correo electrónico a drasasm2015@gmail.com, o por escrito al Área de Imagen Institucional.

Agradecimientos:

- *Al Gobierno Regional de San Martín, a través de la Dirección Regional de Agricultura San Martín.*
- *Al Instituto Nacional de Innovación Agraria – INIA*
- *Al equipo técnico del Proyecto “Mejoramiento del Servicio de Competitividad de la Cadena de Valor de Sacha Inchi a los Productores en cuatro Provincias de la Región San Martín”.*
- *Al equipo técnico del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la EEA El Porvenir San Martín.*

GLOSARIO DE TÉRMINOS

■ BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

Aplicación de la ciencia y la tecnología a las plantas, sus partes, productos y modelos, con el fin de acelerar sus procesos fisiológicos.

■ BIORREACTOR

Es un recipiente en el que se lleva a cabo un proceso químico y biológico que involucra células, tejidos, organismos o sustancias bioquímicamente activas para hacerlas crecer.

■ EXPLANTE

Es cualquier parte de un organismo vivo, como las células, los tejidos, o los órganos, que son transferidos a un medio artificial para cultivo.

■ *IN VITRO*

Se refiere a una técnica para realizar un determinado experimento en un tubo de ensayo u otro frasco, en un ambiente controlado fuera de microorganismos.

■ PROPAGACIÓN

Es la multiplicación de plantas por medios vegetativos (asexuales).

■ PROTOCOLO

Es conocido como un procedimiento estándar de operaciones, una lista de instrucciones para realizar un experimento.

■ SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL

Son sistemas semi automatizados en la propagación *in vitro*. Está basado en el contacto intermitente del medio de cultivo líquido con los explantes por un corto período de tiempo y la consecuente renovación de la atmósfera gaseosa, para evitar la hiperhidricidad de los tejidos y la acumulación de gases tóxicos.

ÍNDICE

PRESENTACIÓN	6
EQUIPAMIENTO	7
CONDICIONES DE CULTIVO	7
PROTOCOLOS	8
I. PROTOCOLO DE COLECTA Y PREPARACIÓN DE MATERIAL VEGETAL	8
1. Selección de Plantas Madres	8
2. Colecta de material vegetal	9
3. Preparación de material vegetal	9
II. PROTOCOLO DE ESTABLECIMIENTO, MULTIPLICACIÓN Y ENRAIZAMIENTO <i>IN VITRO</i>	10
1. Establecimiento <i>in vitro</i>	10
2. Germinación de embriones zigóticos	11
3. Multiplicación Convencional <i>in vitro</i> de explantes	12
4. Enraizamiento <i>in vitro</i>	12
5. Multiplicación de explantes utilizando Biorreactores	13
III. PROTOCOLO DE INSTALACIÓN DE BIORREACTORES	14
IV. PROTOCOLO DE ACLIMATACIÓN	15
ANEXOS	
Medios de cultivo para propagación <i>in vitro</i> de Sacha Inchi	17
Preparación de soluciones stock	17
Formulaciones de medios de cultivo	19
Bibliografía	22



PRESENTACIÓN

La presente publicación técnica da inicio a la optimización del proceso de propagación *in vitro* de sachá inchi mediante técnicas de micropropagación, como parte de la actividad-Biotecnología-Desarrollo de un protocolo de Propagación clonal *in vitro* de *Plukenetia volubilis* L. del proyecto "Mejoramiento del Servicio de Competitividad de la Cadena de Valor de Sachá Inchi a los Productores en cuatro Provincias de la Región San Martín", promovido por la Dirección Regional de Agricultura San Martín; para lo cual se ha venido aplicando procedimientos convencionales y de clonación en laboratorio, el cual representa una iniciativa para la obtención de material genético de alto valor que ayude a incrementar la productividad y la ampliación de nuevas áreas con el cultivo de Sachá Inchi en nuestra región.

Es por ello que consideramos importante la presente publicación y mostramos a continuación el siguiente manual como una guía básica para el establecimiento, multiplicación y enraizamiento *in vitro* de Sachá Inchi.



EQUIPAMIENTO



Equipos:

- Autoclave eléctrica a 121°C, cabina de flujo laminar horizontal, potenciómetro

Instalaciones:

- Área de preparación de medios de cultivo, lavado y esterilización de material equipados, área de siembras y transferencias equipado, área de incubación equipado con sistema de iluminación y aire acondicionado para control de temperatura.

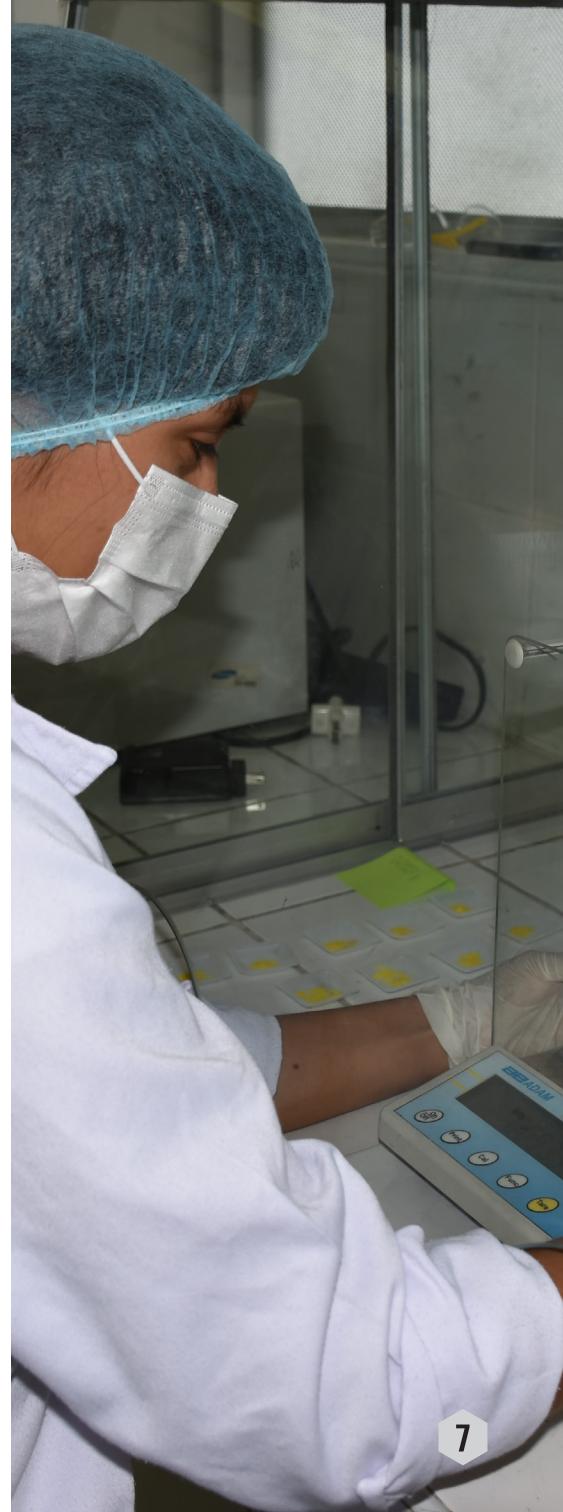
Materiales y Reactivos:

- Vidrio, metal, polipropileno
- Personal técnico capacitado
- Sales minerales y vitaminas M&S Murashige & Skoog, 1962, DKW Driver & Kuniyuki 1984.
- Vitaminas Gamborg o B5 y DKW
- Sistema de inmersión temporal: Sistema automático con control de frecuencia y tiempo

CONDICIONES DE CULTIVO



El ambiente de incubación debe presentar condiciones de temperatura de 24 +- 2°C, fotoperiodo de 16/8 (luz/oscuridad) graduable, cámara oscura y Sistema de Inmersión Temporal instalado.



PROTOS

I

PROCOLO DE COLECTA Y PREPARACIÓN DE MATERIAL VEGETAL

SELECCIÓN DE PLANTAS MADRES

Se seleccionan plantas madres las cuales serán donadoras de explantes (brotes terminales, axilares, segmentos nodales, semillas), teniendo en cuenta características morfológicas de alta productividad, resistencia o tolerancia a las principales enfermedades que afectan al cultivo de Sacha Inchi, entre otras. Realizar la aplicación de un calendario fisionutricional y sanitario, teniendo como tiempo mínimo 1 mes antes del inicio del cultivo *in vitro*.



COLECTA DE MATERIAL VEGETAL

En Campo o Vivero: La colecta de los explantes se realiza entre las 6-8 horas de la mañana (después de ello se considera crucial por el incremento de la temperatura ambiental), en frascos conteniendo papel toalla húmedo con agua destilada para evitar la deshidratación de los mismos. Tener en cuenta que si los explantes son brotes terminales deben tener un tamaño promedio de entre 2,5-3,0 cm de longitud, totalmente sanos. Realizar esta actividad con la ayuda de unas tijeras quirúrgicas para cortar el brote terminal (ápice terminal más segmentos nodales). La colecta de cápsulas de Sacha Inchi se realiza en bolsas de papel craft.



PREPARACIÓN DE MATERIAL VEGETAL

En Laboratorio: Los explantes son lavados previos a su ingreso a cabina de flujo laminar con una solución jabonosa a razón de 5 g l⁻¹, y dos enjuagues con agua destilada estéril. En el caso de semillas, éstas son descapsuladas del fruto seguido del retiro de la testa, las cuales son sumergidas en solución fungicida – bactericida Kasugamicina (10 ml/l), como tratamiento previo.

En cabina de flujo laminar: Realizar una inmersión en Hipoclorito de Sodio - NaOCl (Lejía -5% de Hipoclorito de Sodio), al 1,5% durante 15 minutos para esterilizar superficialmente; los restos del NaOCl se eliminan en varios enjuagues con agua destilada estéril. Después del lavado descartar toda el agua de los explantes para disminuir riesgos de contaminación.



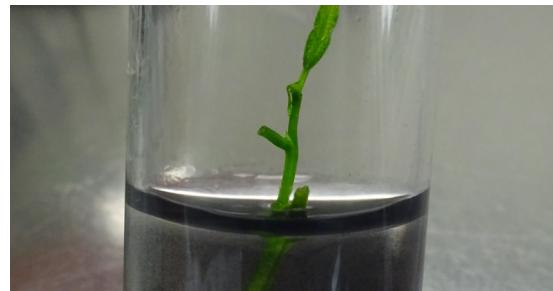
PROTOCOLO DE ESTABLECIMIENTO, MULTIPLICACIÓN Y ENRAIZAMIENTO *IN VITRO*

ESTABLECIMIENTO *IN VITRO*

Para la etapa de establecimiento *in vitro* de brotes terminales se utiliza el medio de cultivo DKW a concentración total, para el caso de embriones zigóticos se utiliza el medio de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962). Cabe resaltar que los explantes provenientes de plantas germinadas *in vitro* no es necesario realizar labores de esterilización superficial, ya que el material es aséptico. Una vez esterilizados los explantes se colocan en una placa petri estéril con una fina película de agua destilada estéril.

Retirar con la ayuda de una hoja de bisturí N° 10 los primordios foliares y zonas que estuvieron en mayor contacto con el NaOCl, dejando el ápice terminal y uno o dos segmentos nodales, según sea el caso.

Sembrar el explante en un tubo de prueba de 25x150 mm, colocándolos en el centro del recipiente conteniendo el medio de cultivo específico para establecimiento *in vitro*.



GERMINACIÓN DE EMBRIONES ZIGÓTICOS

Los embriones son retirados de sus cotiledones con bisturí N° 10 haciendo cortes en los extremos de la semilla y levantando suavemente un cotiledón del otro, con la hoja de bisturí retirar el embrión y sembrar la base en posición vertical dentro del medio de cultivo. El medio de cultivo es preparado a base de sales minerales Murashige & Skoog, 1962, a mitad de su concentración, (Ver Anexo Formulación de medios de cultivo).





MUPLICACIÓN CONVENCIONAL *IN VITRO*

Estacas de sachá inchi provenientes de plantas germinadas *in vitro* a partir de embriones zigóticos o explantes *ex vitro* (brotes terminales), se retira el ápice terminal y la raíz, estas son implantadas en un medio de cultivo conteniendo Bencil-aminopurine (BAP), para inducir brotamiento. Realizar la transferencia cada 15 días a un nuevo medio de cultivo de multiplicación para la activación y crecimiento de brotes. (Ver Anexo Formulación de medios de cultivo).



ENRAIZAMIENTO *IN VITRO*

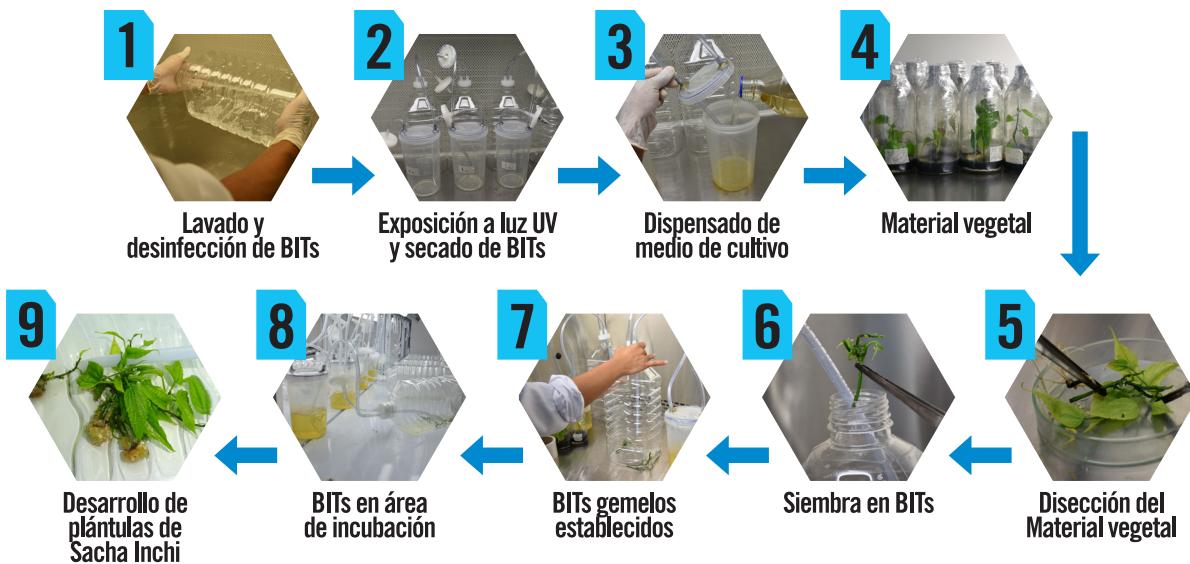
Estacas de Sacha Inchi provenientes de plantas germinadas *in vitro* a partir de embriones zigóticos o explantes *ex vitro* de sachá inchi, se le retira el ápice terminal y la raíz, estas son implantadas en un medio de cultivo conteniendo Ácido-indolbutírico (AIB), para inducir enraizamiento. Realizar la transferencia cada 15 días a un nuevo medio de cultivo de enraizamiento. (Ver Anexo Formulación de medios de cultivo).

MULTIPLICACIÓN DE EXPLANTES UTILIZANDO BIORREACTORES

Estacas de sachá inchi provenientes de plantas germinadas *in vitro* a partir de embriones zigóticos o brotes terminales de Sachá Inchi se le retira el ápice terminal y la raíz, éstas son implantadas en un medio de cultivo con una fuente de citicininina, con una frecuencia de inmersión cada 4 horas

y tiempo de inmersión de 3 minutos, conectados al Sistema de Inmersión Temporal, para la multiplicación masiva de plántulas de Sachá Inchi bajo este sistema. (Ver Anexo Formulación de medios de cultivo).

MULTIPLICACIÓN *IN VITRO* – SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL BIORREACTORES (BITS)



PROTOCOLO DE INSTALACIÓN DE BIORREACTORES - BITS

Materiales: *Botellas de polietileno tipo cristal de 5L, mangueras automotriz ¼", tapas para botellas tipo cristal, filtros de venteo 2 µm, papel aluminio.*

Esterilización de materiales

Se realizan diferentes procedimientos para asegurar que los recipientes estén limpios y evitar contaminación microbiana.

Esterilización química

Lavado y Desinfección de Bits

Preparar una solución de agua con detergente para el lavado de botellas tipo cristal de 5L, mangueras automotriz ¼", tapas para botellas tipo cristal.

Enjuagar con agua destilada.

Desinfectar con hipoclorito de sodio a 0.05% a las botellas de polietileno, mangueras automotriz ¼", tapas para botellas en cámara de flujo laminar, dejar reposar para secar.

Esterilización física

Luego de la esterilización química, se coloca todos los materiales mencionados en luz UV por 1 hora.

La esterilización de filtros de venteo se realiza en autoclave a 15 libras de presión, 121°C por 30 minutos.

Armado de biorreactores

Conectar las mangueras a los frascos y filtros de venteo para tener BITS gemelos: 1 frasco colector de medio de cultivo y 1 frasco contendidor de plantas.

Instalación en el Sistema de Inmersión Temporal

Transferir estacas de sachá inchi procedentes de subcultivos de medios de multiplicación o enraizamiento. Colocar 4 estacas por BIT contenedor de plantas, sellar y conectar con su Bit gemelo colector de medio de cultivo.

Conectar los biorreactores en el sistema de inmersión temporal en el área de incubación de laboratorio.





IV PROTOCOLO DE ACLIMATACIÓN

- 1** Realizar esta etapa en invernadero, cercano al laboratorio de propagación *in vitro*.
- 2** Colocar frascos con plantas *in vitro* en invernadero de 2 - 4 días antes de su aclimatación.
- 3** Extraer las plántulas contenidas en los frascos de cultivo *in vitro* con ayuda de pinzas.
- 4** Lavar las raíces para eliminar restos de agar.
- 5** Hacer una inmersión a las plantas en solución fungicida Benomyl (1 g l⁻¹) durante 10 minutos, dejar secar en papel toalla.
- 6** Remojar el sustrato (premix 3), previamente esterilizado en autoclave a 121°C, 15 libras de presión por 30 minutos.
- 7** Colocar el sustrato en bandejas de aclimatación con tubetes y colocar una planta por tubete.
- 8** Colocar las bandejas en cámara húmeda durante 15 días para evitar deshidratación, después retirar de la cámara húmeda, para que reciban gradualmente la luz solar.
- 9** Aplicar fertilizante 11-8-6 (NPK) en el agua de riego cada 2 días.
- 10** Realizar un Riego profundo 1 vez a la semana para evitar acumulación de sales de los fertilizantes.

ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE BROTES DE SACHA INCHI



MEDIOS DE CULTIVO PARA PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE SACHA INCHI

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES STOCK

Observaciones:

- Utilizar como agente solvente agua destilada estéril (ADE), Alcohol, Hidróxido de Potasio (KOH), Hidróxido de Sodio (NaOH) en el caso que fuera necesario.
- Las soluciones stock son almacenadas en frascos de vidrio con tapa rosca puestos en refrigeración a 4°C, debidamente rotulados.

**No almacenar las soluciones por más de 2 meses.*

Solución Stock Macronutrientes DKW A y B (10 X)

Solución A

Reactivos	Cantidad g l ⁻¹
	500 ml
NH ₄ NO ₃	7,080
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	9,845

Solución B

Reactivos	Cantidad g l ⁻¹
	500 ml
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,745
K ₂ SO ₄	7,795
MgSO ₄ .7H ₂ O	3,700
KH ₂ PO ₄	1,325

Soluciones Stock de Micronutrientes DKW (100 X)

Reactivos	Cantidad g l ⁻¹	
	500 ml	1,000 ml
Zn SO ₄ . 6 H ₂ O	0,850	1,700
MnSO ₄ . H ₂ O	1,670	3,340
CuSO ₄ . 5 H ₂ O	0,013	0,025
H ₃ BO ₃	0,240	0,480
Na ₂ MoO ₄ . 2 H ₂ O	0,020	0,039
FeSO ₄ . 7H ₂ O	1,690	3,380
Na-EDTA	2,270	4,540

Solución Stock Murashige Skoog (1962)

Item	Stock	Reactivo	Concentración Stock (g l ⁻¹)
Macro y micro nutrientes			
1	Stock A	NH ₄ NO ₃	82.5
2	Stock B	KNO ₃	95
3	Stock C	CaCl ₂ ·2H ₂ O	88
4	Stock D	KH ₂ PO ₄	34
5	Stock E	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.05
		CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.005
		KI	0.166
		H ₃ BO ₃	1.23
6	Stock F	MnSO ₄ ·4H ₂ O	3.38
		MgSO ₄ ·7H ₂ O	74
		ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1.725
		CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.005
7	Stock G	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	1.865
		FeSO ₄ ·7H ₂ O	1.39

Formulación según Murashige & Skoog (1962), Modificado.

Solución stock de vitaminas DKW (1000 X)

Reactivos	Cantidades	
	50 ml	100 ml
Myo-Inositol	5 g	10 g
Thiamina-HCL	0.1 g	0.2 g
Acido Nicotínico	0.05 g	0.1 g
Glicina	0.1 g	0.2 g

Solución stock de vitaminas B5 o Gamborg (1000 X)

Reactivos	Cantidades	
	25 ml	50 ml
Myo-Inositol	2.5 g	5 g
Acido Nicotínico	25 mg	50 mg
Pyridoxina	25 mg	50 mg
Thiamina	250 mg	500 mg

Formulación según Guiltinan y Maximova, 2010.

FORMULACIONES DE MEDIOS DE CULTIVO

Observaciones:

- Los medios de cultivo con pH inicial básico son ajustados con Ácido Clorhídrico (HCl)
- Los medios de cultivo con pH inicial ácido son ajustados con Hidróxido de Potasio (KOH).
- Los medios de cultivo se preparan 1 ó 2 días antes de su uso.

1. ESTABLECIMIENTO IN VITRO

Reactivos	Cantidades (litros)
	1,000 ml
Driver & Kuniyuki, 1984	
Macro DKW A (10X)	100 ml
Macro DKW B (10X)	100 ml
Micro DKW (100X)	10 ml
Vitaminas DKW (1000X)	1 ml
Sacarosa	20 g
Carbón activado	2 g
pH 5.4 (KOH – 1M)	
Agar	10 g
Esterilizar en Autoclave	15 min.

2. GERMINACIÓN DE EMBRIONES ZIGÓTICOS

Reactivos	Cantidades (litros)
	1,000 ml
Murashige & Skoog, 1962	
A,B,G	10 ml
C,D,E,F	2.5 ml
Thiamina	0.4ml
Ácido Nicotínico	0.5 ml
Sacarosa	20 g
ELC – Endospermo líquido de coco	100 ml
Carbón activado	2 g
pH 5.4 (KOH – 1M)	
Agar	10 g
Esterilizar en Autoclave	15 min.



3. MULTIPLICACIÓN IN VITRO

Reactivos	Cantidades (litros)
	1,000 ml
Driver & Kuniyuki, 1984	
Macro DKW A (10X)	100 ml
Macro DKW B (10X)	100 ml
Micro DKW (100X)	10 ml
Vitaminas DKW (1000X)	1 ml
Sacarosa	20 g
ELC – Endospermo líquido de coco	100 ml
ANA	0.1 ml
BAP – Bencil-aminopurine (1000 ppm)	1 ml
Sacarosa	20 g
Carbón activado	2 g
pH 5.4 (KOH – 1M)	
Agar	10 g
Esterilizar en Autoclave	15 min.





4. ENRAIZAMIENTO IN VITRO

Reactivos	Cantidades (litros)
	1,000 ml
Driver & Kuniyuki, 1984	
Macro DKW A (10X)	100 ml
Macro DKW B (10X)	100 ml
Micro DKW (100X)	10 ml
Vitaminas DKW (1000X)	1 ml
Sacarosa	20 g
ELC – Endospermo líquido de	100 ml
Carbón activado	2 g
AIB (1000 ppm)	10 ml
pH 5.4 (KOH – 1M)	
Agar	10 g
Esterilizar en Autoclave	15 min.



5. MULTIPLICACIÓN EN BIORREACTORES

Reactivos	Cantidades (litros)
	1,000 ml
Murashige & Skoog, 1962	
A,B,G	20 ml
C,D,E,F	5 ml
Thiamina	0.4 ml
Ácido Nicotínico	0.5 ml
Sacarosa	20 g
Ácido ascórbico (1000 ppm)	10 ml
Transzeatina	23.23 µM
pH 5.4 (KOH – 1M)	
Esterilizar en Autoclave	15 min

BIBLIOGRAFÍA

- Corazon Guivin, M., Castro Ruiz, D., Chota Macuyama, W., Rodríguez, Á., Cachique, D., Manco, E., . . . García Dávila, C. (2009). Caracterización genética de accesiones Sanmartinenses del Banco Nacional de Germplasma de Sacha Inchi *Plukenetia volubilis* L. (E.E. El Porvenir-INIA). Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana - IIAP.
- Driver D and Kuniyuki D. (1984). In vitro propagation of Paradox walnut rootstock. *HortScience*, 19: 507-509.
- Gárate Navarro, M. A. (2009). Efecto de cuatro dosis de ácido- 3- Indol Butírico en el enraizamiento de ápices y segmentos nodales de Sacha Inchi (*Plukenetia Volubilis* l.). Universidad Nacional de San Martín.
- Guerrero Abad, J. C., Solís, R., Cachique Huansi, D., Ruíz Solsol, H., & Ruíz Sanchés, M. E. (2010). Callogénesis embriogénica en hojas inmaduras de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.). Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana
- Gultinan M.J, Maximova S.N. (2010). College of Agricultural Sciences. Integrated System for Vegetative Propagation of Cacao. Protocol Book. Pennsylvania State University. Version 2.1 4-24pp. 2010 [7] D.
- Murashige T. and Skoog F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures, *Physiologia Plantarum*, Vol. 15, No.3, 1962, pp. 473-497. doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08051.x





**DIRECCIÓN
REGIONAL
DE AGRICULTURA**

¡ Juntos por un San Martín que crece !



Instituto Nacional de Innovación Agraria

La presente publicación fue elaborada en el marco del proyecto “Mejoramiento del Servicio de Competitividad de la Cadena de Valor de Sacha Inchi a los Productores en cuatro Provincias de la Región San Martín”, ejecutado por la Dirección Regional de Agricultura San Martín, en convenio con el Instituto Nacional de Innovación Agraria INIA.