


Preparation of Cultivation Media - OP74

TITLE	Preparation of Cultivation Media - OP74
OWNER	Head_IVU, R.Vollmer
APPROVER	Under revision and pending approval by Head Genebank
APPROVAL DATE	
ISSUE DATE	Sep 20, 2010 10:38
CONTRIBUTORS	R. Vollmer
CITATION	
KEYWORDS	head_genebank , head_ivu , non-accredited , procedure
NEXT REVISION	
DOCUMENT ID	OP74
VERSION NUMBER	51

INTERNATIONAL POTATO CENTER - CIP			
			
Version	Date	Author	Comment
51	Sep 20, 2010 10:38	Rainer Vollmer	translation work
50	Sep 16, 2010 14:53	Rainer Vollmer	
49	Sep 16, 2010 12:22	Rainer Vollmer	
48	Sep 15, 2010 12:18	Rainer Vollmer	
47	Sep 15, 2010 09:00	Rainer Vollmer	

INTRODUCTION

The use of an specific culture medium depends on the *in vitro* culture objective. In general, the media must contain a carbon source, minerals nutriments, vitamins, gelling agent (for semisolid media), growth regulators substances and other components as antioxidant substances for example.

The preparation of culture medium is a critical step for the success of the *in vitro* culture. It is therefore necessary to use reagents with a high quality of purity and bis-distill water or demineralized-distill water. The procedure for preparation the culture media depends on the type of medium (semi-solid or liquid) and the presence of thermo-labil components.

SCOPE

The procedure covers the preparation of culture media used by IVU for any *in vitro* culture activity for the conservation and distribution of potato and sweetpotato germplasm.

SAFETY

The operating personnel should know the following protocols:

- Good practices during *in vitro* bank activities

MATERIALS

Equipment	
Autoclave	Medium dispenser
pHmeter	Analytical balance
Laminar flow chamber	Magnetic stirrer
Refrigerator	Microwave oven
Water destillator unit	Vacuum pump
Filtration unit (for vacuum filtration)	
Materials	
Glass test tubes (13x10 mm, 16x25mm, 18x150mm, 25x150mm)	Weighting boats
Test tube caps	Racks
Spatula	Magenta vessels
Labels	Plastic beakers (1, 2 and 4 litres)
Autoclave indicator tape	Plastic vials
Glass bottles (1 litre)	Pipets (1, 5 and 10 ml)
Chemical compounds according to media formulation (Annex 1, 2 and 3)	Measuring cylinders (1 and 2 litre; 100 ml)
Milipore filters (for vacuum filtration)	Prefilters (for vacuum filtration)
Hydrochloric acid (12.1 N)	Sodium hydroxide
Glass stirring stick	Scissors
Plastic gloves	Security glasses
Mask	Volumetric flask (200 ml)

2. PROCEDURE

2.1 Find media components according to the formulation of the culture medium to be prepared.

- 2.2 In a clean heat-resistant, plastic beaker place a stirrer magnet and add distilled water to maximum 2/3 of the volume to be prepared. Put the beaker on a magnetic stirrer set at a speed about 50-100 rpm.
- 2.3 Weigh each of the ingredients, verifying that the balance is set to zero before each, and tare the weight of the container used for weighing ingredients.
- 2.4 Add ingredients that are not thermo-labile to the plastic beaker, except the gelling agent, and wait until all ingredients are dissolved.
- 2.5 Measure the water volume to the desired quantity using a measuring cylinder.
- 2.6 Verify that the pH meter is calibrated according to the procedure for measuring pH (Annex 5). Measure the pH and adjust with solutions of HCl 1N or NaOH 1N solutions to the required value (see Annex 4).
- 2.7 To prepare semi-solid media, add the gelling agent and place the container into the microwave oven with a high potency for 10 minutes per liter of culture medium, making a pause at 7 minutes so it could be stirred. If the media is going to be autoclaved in glass bottles (further aggregation of thermolabil substances), it is not necessary to dissolve the gelling agent in the microwave.
- 2.8 Culture medium does not contain thermolabil substances is placed in test tubes: 2-3 mL for 13x100 mm test tubes, 4-6 mL for 16x125 mm test tubes, 7-8 mL for 18x150 mm test tubes y 10 - 12 ml for 25x150 mm test tubes. Cover the test tubes with caps and autoclave at 121°C, 15 pounds pressure, 20 minutes. Stick a piece of autoclave tape (Sigmaware) on some test tube caps in order to verify the right function of the autoclave.
- 2.9 For culture media containing thermolabil substances, autoclave in heat-resistant glass bottles. Flasks must not be closed completely. Stick a piece of autoclave tape (Sigmaware) on some bottle caps in order to verify the right function of the autoclave. Place the flasks into a sterilized flow chamber and let them cool down until medium reaches 40-45°C of temperature. Add thermolabil substances previously sterilized by vacuum filtration. Shake and dispense aseptically in sterile culture vessels: 25-30 mL for petri dishes, 25 - 35 mL for magenta vessels.
- 2.10 Let the medium cool down till it reaches room temperature and store under refrigeration at 4°C (up to 1 month).
- 2.11 Label the vessels indicating medium type and preparation date.
- 2.12 Register data on medium preparation in the media preparation form.

Annex 1. Culture media formulation

1. Potato culture media

1.1 Micro - propagation medium (MSA)

Composition:

Components	Concentration
MS* Salts	4.33 g/l
Gibberelic acid	0.1 mg/l
Glycine-HCl	2 mg/l
Myo-inositol	100 mg/l
Nicotinic acid	0.5 mg/l
Pyridoxine-HCl	0.5 mg/l
Thiamine-HCl	0.1 mg/l
Sucrose	25 g/l
Agar	6 g/l
pH	5.6

* Basal Salts of Murashige & Skoog (1962)
Supplier: Caisson

Preparation:

1. To prepare 1 litre of culture medium weigh 4.33 g of commercial MS salts dissolving it in 600 ml of demineralized-distill water. If no commercial salts are disponibles, prepare them according to Annex 1.
2. Add 25 g of sucrose and dissolve by stirring.
3. Add 1 ml of MSA-BASE 1 stock solution (Annex 2) previously defrosted. Stir.
4. Add demineralized-distill water to a final volume of 1000 ml.
5. Measure the pH and adjust to 5.6.
6. Add 6 g of agar. Dissolve agar using a microwave oven (100% of intensity for 10 minutes, making a pause at 7 minutes in order to stir the medium).
7. Dispense the medium into test tubes. Cover test tubes with caps. Autoclave tubes for 20 minutes (at 121 °C, 15 pounds pressure). When magenta vessels or petri dishes are used, first autoclave the medium, then dispense it into vessels. Cover the vessels with sterile tops (in the flow chamber).
8. Store medium under refrigeration at 4°C (up to 1 month).

1.2 In vitro introduction medium (MSA-INT)

Composition:

Components	Concentration
MS* Salts	4.33 g/l
Gibberelic acid	0.1 mg/l
Glycine-HCl	2 mg/l
Myo-Inositol	100 mg/l
Nicotinic acid	0.5 mg/l
Pyridoxine-HCL	0.5 mg/l
Thiamine-HCl	0.1 mg/l
Sucrose	25 g/l
Phytigel	3 g/l
pH	5.6

* Basal Salts of Murashige & Skoog (1962)
Supplier: Caisson

Preparation:

1. To prepare 1 litre of culture medium weigh 4.33 g of commercial MS salts dissolving it in 600 ml of demineralized-distill water. If no commercial salts are disponibles, prepare them according to Annex 1.
2. Add 25 g of sucrose and dissolve by stirring.
3. Add 1 ml of MSA-BASE 1 stock solution (Annex 2) previously defrosted. Stir.
4. Add demineralized-distill water to a final volume of 1000 ml.
5. Measure the pH and adjust to 5.6.
6. Add 3 g of Phytigel. Dissolve phytigel using a microwave oven (100% of intensity for 10 minutes, making a pause at 7 minutes in order to stir the medium).
7. Dispense the medium into test tubes. Cover test tubes with caps. Autoclave tubes for 20 minutes (at 121 °C, 15 pounds pressure). When magenta vessels or petri dishes are used, first autoclave the medium, then dispense it into sterile vessels. Cover the vessels with sterile tops (in the flow chamber).
8. Store medium under refrigeration at 4°C (up to 1 month).

1.3 Conservation medium I (S22)

Composition:

Components	Concentration
MS* Salts	4.33 g/l
Glycine-HCl	2 mg/l
Myo-inositol	100 mg/l
Nicotinic acid	0.5 mg/l
Pyridoxine-HCl	0.5 mg/l
Thiamine-HCl	0.1 mg/l
Sucrose	20 g/l
Sorbitol	20 g/l
Agar	6.5 g/l
pH	5.6

* Basal Salts of Murashige & Skoog (1962)
Supplier: Caisson

Preparation:

1. To prepare 1 litre of culture medium weigh 4.33 g of commercial MS salts and dissolve in 600 ml of demineralized-distill water. If no commercial salts are disponibles, prepare them according to Annex 1.
2. Add 20 g of sucrose and 20 g of sorbitol, then dissolve by stirring.
3. Add 1 ml of MSA-BASE 2 stock solution (Annex 2) previously defrosted. Stir.
4. Add demineralized-distill water to a final volume of 1000 ml.
5. Measure the pH and adjust to 5.6.
6. Add 6.5 g of agar. Dissolve agar using a microwave oven (100% of intensity for 10 minutes, making a pause at 7 minutes in order to stir the medium)
7. Dispense the medium into test tubes. Cover test tubes with caps. Autoclave tubes for 20 minutes (at 121 °C, 15 pounds pressure). When magenta vessels or petri dishes are used, first autoclave the medium, then dispense it into sterile vessels. Cover the vessels with sterile tops (in the flow chamber).
8. Store medium under refrigeration at 4°C (up to 1 month).

1.4 Conservation medium II (S32)**Composition:**

Components	Concentration
MS* Salts	4.33 g/l
Glycine-HCl	2 mg/l
Myo-inositol	100 mg/l
Nicotinic acid	0.5 mg/l
Pyridoxine-HCl	0.5 mg/l
Thiamine-HCl	0.1 mg/l
Sucrose	20 g/l
Sorbitol	30 g/l
Agar	6.5 g/l
pH	5.6

* Basal Salts of Murashige & Skoog (1962)
Supplier: Caisson

Preparation:

1. To prepare 1 litre of culture medium weigh 4.33 g of commercial MS salts and dissolve in 600 ml of demineralized-distill water. If no commercial salts are disponibles, prepare them according to Annex 1.
2. Add 20 g of sucrose and 30 g of sorbitol, then dissolve by stirring.
3. Add 1 ml of MSA-BASE 2 stock solution (Annex 2) previously defrosted. Stir.
4. Add demineralized-distill water to a final volume of 1000 ml.
5. Measure the pH and adjust to 5.6.
6. Add 6.5 g of agar. Dissolve agar using a microwave oven (100% of intensity for 10 minutes, making a pause at 7 minutes in order to stir the medium)
7. Dispense the medium into test tubes. Cover test tubes with caps.
8. Autoclave tubes for 20 minutes (at 121 °C, 15 pounds pressure).
9. Store medium under refrigeration at 4°C (up to 1 month).

1.5 Conservation medium III (S42)**Composition:**

Components	Concentration
MS* Salts	4.33 g/l
Glycine-HCl	2 mg/l
Myo-inositol	100 mg/l
Nicotinic acid	0.5 mg/l
Pyridoxine-HCl	0.5 mg/l
Thiamine-HCl	0.1 mg/l
Sucrose	20 g/l
Sorbitol	40 g/l
Agar	6.5 g/l
pH	5.6

* Basal Salts of Murashige & Skoog (1962)
Supplier: Caisson

Preparation:

1. To prepare 1 litre of culture medium weigh 4.33 g of commercial MS salts and dissolve in 600 ml of demineralized-distill water. If no commercial salts are disponibles, prepare them according to Annex 1.
2. Add 20 g of sucrose and 40 g of sorbitol, then dissolve by stirring.
3. Add 1 ml of MSA-BASE 2 stock solution (Annex 2) previously defrosted. Stir.
4. Add demineralized-distill water to a final volume of 1000 ml.
5. Measure the pH and adjust to 5.6.
6. Add 6.5 g of agar. Dissolve agar using a microwave oven (100% of intensity for 10 minutes, making a pause at 7 minutes in order to stir the medium)
7. Dispense the medium into test tubes. Cover test tubes with caps.
8. Autoclave tubes for 20 minutes (at 121 °C, 15 pounds pressure).
9. Store medium under refrigeration at 4°C (up to 1 month).

1.6 Meristem culture media: MMP**Composition:**

Components	Concentration
MS* Salts	4.33 g/l
Glycine-HCl	2 mg/l
Myo-inositol	100 mg/l
Nicotinic acid	0.5 mg/l
Pyridoxine-HCl	0.5 mg/l

Thiamine-HCl	0.1 mg/l
Gibberellic acid	0.1 mg/l
Coconut water	20 ml/l
Sucrose	25 g/l
Phytigel	3 g/l
pH	5.6

* Basal Salts of Murashige & Skoog (1962)
Supplier: Caisson

Preparation:

1. To prepare 1 litre of culture medium weigh 4.33 g of commercial MS salts and dissolve in 600 ml of demineralized-distill water. If no commercial salts are disponibles, prepare them according to Annex 1.
2. Add 25 g of sucrose and dissolve by stirring.
3. Add 1 ml of MSA-BASE 1 stock solution (Annex 2) previously defrosted. Stir.
4. Add demineralized-distill water to a final volume of 980 ml.
5. Measure the pH and adjust to 5.6.
6. Add 3 g of phytigel into a heat resistant glass bottle. Pour the medium into the bottle.
7. Autoclave the medium for 20 minutes (at 121 °C, 15 pounds pressure).
8. Let the medium cool down to a temperature of 40-45°C (in the flow chamber). Add 20 ml of coconut water previously sterilized by vacuum filtration (in the flow chamber).
9. Dispense the medium into sterile test tubes. Cover test tubes with sterile caps (in the flow chamber).
10. Store medium under refrigeration at 4°C (up to 1 month).

1.7 Rapid propagation medium (MPR)

Composition:

Components	Concentration
MS* Salts	4.33 g/l
Gibberellic acid	0.1 mg/l
Glycine-HCl	2 mg/l
Myo-inositol	100 mg/l
Nicotinic acid	0.5 mg/l
Pyridoxine-HCl	0.5 mg/l
Thiamine-HCl	0.1 mg/l
L-arginine	4 mg/l
Calcium pantothenate	2 mg/l
Putrescine HCl	10 mg/l
Sucrose	30 g/l
Coconut water	10 ml/l
pH	5.6

* Basal Salts of Murashige & Skoog (1962)
Supplier: Caisson

Preparation:

1. To prepare 1 litre of culture medium weigh 4.33 g of commercial MS salts and dissolve in 600 ml of demineralized-distill water. If no commercial salts are disponibles, prepare them according to Annex 1.
2. Add 30 g of sucrose and dissolve by stirring.
3. Add 1 ml of MSA-BASE 1 stock solution (Annex 2) previously defrosted, 4 mg of L-arginine, 2 mg of calcium pantothenate and 10 mg of putrescine HCl. Stir.
4. Add demineralized-distill water to a final volume of 990 ml.

5. Measure the pH and adjust to 5.6.
6. Add 3 g of phytigel into a heat resistant glass bottle. Pour the medium into the bottle.
7. Autoclave the medium for 20 minutes (at 121 °C, 15 pounds pressure).
8. Let the medium cool down to a temperature of 40-45°C (in the flow chamber). Add 10 ml of coconut water previously sterilized by vacuum filtration (in the flow chamber).
9. Dispense the medium into sterile test tubes or petri dishes. Cover test tubes with sterile caps (in the flow chamber).
10. Store medium under refrigeration at 4°C (up to 1 month).

1.8 Microtuberization medium (PTM)

Composition:

Components	Concentration
MS* Salts	4.33 g/l
Benzylaminopurine	5 mg/l
Chlorocholine chloride	500 mg/l
Thiamine-HCl	0.4 mg/l
Sucrose	80 g/l
pH	5.6

* Basal Salts of Murashige & Skoog (1962)
Supplier: Caisson

Preparation:

1. To prepare 1 litre of culture medium weigh 4.33 g of commercial MS salts and dissolve in 600 ml of demineralized-distill water. If no commercial salts are disponibles, prepare them according to Annex 1.
2. Add 80 g of sucrose and dissolve by stirring.
3. Add 0.4 mg of thiamine-HCl, 5 mg of benzylaminopurine (BAP) and 500 mg of Chlorocholine Chloride (CCC). Stir.
4. Add demineralized-distill water to a final volume of 1000 ml.
5. Measure the pH and adjust to 5.6.
6. Pour the medium into a heat resistant glass bottle.
7. Autoclave the medium for 20 minutes (at 121 °C, 15 pounds pressure).
8. Let the medium cool down to a temperature of 40-45°C (in the flow chamber).
9. Dispense 20 ml of medium per sterile vessel. Cover vessels with sterile tops (in the flow chamber).
10. Store medium under refrigeration at 4°C (up to 1 month).

2. Sweetpotato culture media

2.1 Medium for *in vitro* introduction and micropropagation (MPB)

Composition:

Components	Concentration
MS* Salts	4.33 g/l
Calcium pantothenate	2 mg/l
Calcium nitrate	100 mg/l
L-Arginine	100 mg/l
Ascorbic acid	200 mg/l
Putrescine HCl	20 mg/l
Gibberelic acid	10 mg/l
Sucrose	30 g/l

Phytigel	3 g/l
pH	5.7

* Basal salts of Murashige & Skoog (1962)
Supplier: Caisson

Preparation:

1. To prepare 1 litre of culture medium weigh 4.33 g of commercial MS salts and dissolve in 600 ml of demineralized-distill water. If no commercial salts disponibles, prepare them according to Annex 1.
2. Add 30 g of sucrose and dissolve by stirring.
3. Add 4 ml of MPB-BASE stock solution (Annex 2) previously defrosted. Stir.
4. Add 5 ml of stock solution of gibberelic acid (Annex 2) and stir constantly.
5. Add demineralized-distill water to a final volume of 1000 ml.
6. Measure the pH and adjust to 5.7.
7. Add 3 g of phytigel. Dissolve phytigel using a microwave oven (100% of intensity for 10 minutes, making a pause at 7 minutes in order to stir the medium).
8. Dispense the medium into test tubes. Cover test tubes with caps.
9. Autoclave tubes for 20 minutes (at 121 °C, 15 pounds pressure).
10. Store medium under refrigeration at 4°C (up to 1 month).

2.2 In vitro recovery medium for plantlets with low viability (MPB2)

Composition:

Components	Concentration
Salts MS*	4.33 g/l
Calcium Pantothenate	2 mg/l
Calcium Nitrate	100 mg/l
L-Arginine	100 mg/l
Ascorbic acid	200 mg/l
Putrescine HCl	20 mg/l
Gibberelic acid	20 mg/l
Coconut water	10 ml/l
Sucrose	30 g/l
Phytigel	3 g/l
pH	5.7

* Basal salts of Murashige & Skoog (1962)
Supplier: Caisson

Preparation:

1. To prepare 1 litre of culture medium weigh 4.33 g of commercial MS salts and dissolve in 600 ml of demineralized-distill water. If no commercial salts disponibles, prepare them according to Annex 1.
2. Add 30 g of sucrose and dissolve by stirring.
3. Add 4 ml of MPB-BASE stock solution (Annex 2) previously defrosted. Stir.
4. Add 10 ml of stock solution of gibberelic acid (Annex 2) and stir constantly.
5. Add demineralized-distill water to a final volume of 990 ml.
6. Measure the pH and adjust to 5.7.
7. Add 3 g of phytigel into a heat resistant glass bottle. Pour the medium into the bottle.
8. Autoclave the medium for 20 minutes (at 121 °C, 15 pounds pressure).
9. Let the medium cool down to a temperature of 40-45°C (in the flow chamber). Add 10 ml of coconut water previously sterilized by vacuum filtration (in the flow chamber).
10. Dispense the medium into sterile test tubes or petri dishes. Cover vessels with sterile tops (in the flow chamber).
11. Store medium under refrigeration at 4°C (up to 1 month).

2.3 Micropropagation (MCB) in vitro media

Composition:

Components	Concentration
MS* Salts	4.33 g/l
Calcium pantothenate	2 mg/l
Calcium Nitrate	100 mg/l
L-Arginine	100 mg/l
Ascorbic acid	200 mg/l
Putrescine HCl	20 mg/l
Sucrose	30 g/l
Phytigel	3 g/l
pH	5.7

* Basal salts of Murashige & Skoog (1962)
Supplier: Caisson

Preparation:

1. To prepare 1 litre of culture medium weigh 4.33 g of commercial MS salts dissolving it in 600 ml of demineralized-distill water. If no commercial salts are disponibles, prepare them according to Annex 1.
2. Add 30 g of sucrose and dissolve by stirring.
3. Add 4 ml of MPB-BASE stock solution (Annex 2) previously defrosted. Stir.
4. Add demineralized-distill water to a final volume of 1000 ml.
5. Measure the pH and adjust to 5.7.
6. Add 3 g of phytigel. Dissolve phytigel using a microwave oven (100% of intensity for 10 minutes, making a pause at 7 minutes in order to stir the medium).
7. Dispense the medium into test tubes. Cover test tubes with caps. Autoclave tubes for 20 minutes (at 121 °C, 15 pounds pressure). When magenta vessels or petri dishes are used, first autoclave the medium, then dispense it into sterile vessels. Cover vessels with sterile tops (in the flow chamber).
8. Store medium under refrigeration at 4°C (up to 1 month).

2.4 Meristem culture medium I: First Phase (MMB1)

Composition:

Components	Concentration
MS* Salts	4.33 g/l
Calcium pantothenate	2 mg/l
Calcium nitrate	100 mg/l
L-Arginine	100 mg/l
Ascorbic acid	100 mg/l
Putrescine HCl	20 mg/l
Gibberelic acid	20 mg/l
Coconut water	10 ml/l
Sucrose	30 g/l
Agar	6 g/l
pH	5.7

* Basal salts of Murashige & Skoog (1962)
Supplier: Caisson

Preparation:

1. To prepare 1 litre of culture medium weigh 4.33 g of commercial MS salts and dissolve in 600 ml of demineralized-distill water. If no commercial

salts disponibles, prepare them according to Annex 1.

2. Add 30 g of sucrose and dissolve by stirring.

3. Add 1 ml of the stock solutions of calcium pantothenate, calcium nitrate, L-Arginine and putrescine HCl. Add 0.5 ml of ascorbic acid stock solution (Annex 2). Stir constantly.

4. Add demineralized-distill water to a final volume of 980 ml.

5. Measure the pH and adjust to 5.7.

6. Add 6 g of agar into a heat resistant glass bottle. Pour the medium into the bottle.

7. Autoclave the medium for 20 minutes (at 121 °C, 15 pounds pressure).

8. Let the medium cool down to a temperature of 40-45°C (in the flow chamber). Add 10 ml of coconut water and 10 ml of gibberelic acid stock solution, both previously sterilized by vacuum filtration (in the flow chamber).

9. Dispense the medium into sterile test tubes. Cover test tubes with sterile caps (in the flow chamber).

10. Store medium under refrigeration at 4°C (up to 1 month).

2.5 Meristem culture medium II: Sub-culture (MMB2)

Composition:

Components	Concentration
MS* Salts	4.33 g/l
Calcium pantothenate	2 mg/l
Calcium nitrate	100 mg/l
L-Arginine	100 mg/l
Ascorbic acid	100 mg/l
Putrescine HCl	20 mg/l
Gibberelic acid	10 mg/l
Coconut water	10 ml/l
Sucrose	30 g/l
Agar	6 g/l
pH	5.7

* Basal salts of Murashige & Skoog (1962)

Supplier: Caisson

Preparation:

1. To prepare 1 litre of culture medium weigh 4.33 g of commercial MS salts and dissolve in 600 ml of demineralized-distill water. If no commercial salts disponibles, prepare them according to Annex 1.

2. Add 30 g of sucrose and dissolve by stirring.

3. Add 1 ml of the stock solutions of calcium pantothenate, calcium nitrate, L-Arginine and putrescine HCl. Add 0.5 ml of ascorbic acid stock solution (Annex 2). Stir constantly.

4. Add demineralized-distill water to a final volume of 985 ml.

5. Measure the pH and adjust to 5.7.

6. Add 6 g of agar into a heat resistant glass bottle. Pour the medium into the bottle.

7. Autoclave the medium for 20 minutes (at 121 °C, 15 pounds pressure).

8. Let the medium cool down to a temperature of 40-45°C (in the flow chamber). Add 10 mL of coconut water and 5 ml of gibberelic acid stock solution, both previously sterilized by vacuum filtration (in the flow chamber).

9. Dispense the medium into sterile test tubes. Cover test tubes with sterile caps (in the flow chamber).

10. Store medium under refrigeration at 4°C (up to 1 month).

3. Bacterial Screening Medium

Nutritive Broth (CN)

Composition:

Components	Concentration
Peptone	5.0 g
Yeast extract	2.0 g
Glucose	10.0 g
Sodium chloride	5.0 g
Meat extract	1.0 g
pH	7.0

Preparation:

1. Weigh 5.0 g of peptone, 2.0 g of yeast extract, 10.0 g of glucose, 5.0 g of Sodium chloride, 1.0 g of meat extract.
2. Dissolve compounds in 600 ml of demineralized-distill water. It is recommendable to dissolve the meat extract first in 1-2 ml of water before pouring it into the solution.
3. Add demineralized-distill water to a final volume of 1000 ml.
4. Measure the pH and adjust to 7.0.
5. Dispense the medium into test tubes. Cover test tubes with caps. Autoclave tubes for 20 minutes (at 121 °C, 15 pounds pressure).
6. Store medium under refrigeration at 4°C (up to 1 month).

Annex 2. Murashige & Skoog (MS) Salts formulation

Composition:

Components	Concentration (mg/l)
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
KNO ₃	1900
NH ₄ NO ₃	1650
KH ₂ PO ₄	170
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
MnSO ₄ .H ₂ O	16.9
H ₃ BO ₃	6.2
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
KI	0.83
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
EDTA-Na ₂	37.3
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8

Annex 3. Stock solutions

 MSA-BASE 1{+}

Composition:

Components	Concentration
Gibberelic acid	0.1 mg/l
Glycine-HCl	2 mg/l
Myo-inositol	100 mg/l
Nicotinic acid	0.5 mg/l
Pyridoxine-HCl	0.5 mg/l
Thiamine-HCl	0.1 mg/l

Preparation:

1. Weigh 0.5 g of Glycine HCl, 0.125 g of nicotinic acid, 0.125 g of pyridoxine-HCl, 0.025 g of thiamine-HCl.
2. Dissolve these compounds in 250 mL of demineralized-distill water. Stir.
3. Add slowly 25 g of Myo-Inositol. Stir.
4. Weigh 0.025 g of gibberelic acid and dissolve it in 2 mL of etanol. Add dissolved gibberelic acid to the myo-inositol solution. Stir until the reagents are completely dissolved.
5. Dispense 2 mL per plastic vessel.
6. Label vessels correctly (name of solution, solution concentration [mg/ml], preparation date).
7. Store solution in freezer at -20°C (up to 3 months).

MSA-BASE 2

Composition:

Components	Concentration
Glycine-HCl	2 mg/l
Myo-inositol	100 mg/l
Nicotinic acid	0.5 mg/l
Pyridoxine-HCl	0.5 mg/l
Thiamine-HCl	0.1 mg/l

Preparation:

1. Weigh 0.5 g of Glycine HCl, 0.125 g of nicotinic acid, 0.125 g of pyridoxine-HCl, 0.025 g of thiamine-HCl.
2. Dissolve these compounds in 250 mL of demineralized-distill water. Stir.
3. Add slowly 25 g of Myo-Inositol. Stir.
4. Dispense 2 mL per plastic vessel.
5. Label vessels correctly (name of solution, solution concentration [mg/ml], preparation date).
6. Store solution in freezer at -20°C (up to 3 months).

MPB-BASE

1. Prepare the following stock solutions for separate as further described: calcium pantothenate, calcium nitrate, L-Arginine, ascorbic acid, putrescine HCl.
2. Aggregate 4 ml of each stock solution into a 20 ml plastic vial.
3. Label vials correctly (name of solution, solution concentration [mg/ml], preparation date).
4. Store MPB-base solution in freezer at -20°C (up to 3 months).

Stock solution: Calcium pantothenate (2 mg/ml)

1. Weigh 0.2 g of calcium pantothenate.
2. Dissolve in 100 ml of demineralized-distill water.
3. Dispense into plastic vessels.
4. Label vessels correctly (name of solution, solution concentration [mg/ml], preparation date).
5. Store stock solution under refrigeration at 4°C (up to 1 month).

Stock solution: Calcium nitrate (100 mg/ml)

1. Weigh 10 g of calcium nitrate.
2. Dissolve in 100 ml of demineralized-distill water.

3. Dispense into plastic vessels.
4. Label vessels correctly (name of solution, solution concentration [mg/ml], preparation date).
5. Store stock solution under refrigeration at 4°C (up to 1 month).

Stock solution: L-Arginine (100 mg/ml)

1. Weigh 10 g of L-Arginine.
2. Dissolve in 100 ml of demineralized-distill water.
3. Dispense into plastic vessels.
4. Label vessels correctly (name of solution, solution concentration [mg/ml], preparation date).
5. Store stock solution under refrigeration at 4°C (up to 1 month).

Stock solution: Ascorbic Acid (200 mg/ml)

1. Weigh 20 g of ascorbic acid.
2. Dissolve in 100 ml of demineralized-distill water.
3. Dispense into plastic vessels.
4. Label vessels correctly (name of solution, solution concentration [mg/ml], preparation date).
5. Store stock solution under refrigeration at 4°C (up to 1 month).

Stock solution: Putrescine HCl (20 mg/ml)

1. Weigh 2 g of putrescine HCl.
2. Dissolve in 100 ml of demineralized-distill water.
3. Dispense into plastic vessels.
4. Label vessels correctly (name of solution, solution concentration [mg/ml], preparation date).
5. Store stock solution under refrigeration at 4°C (up to 1 month).

Stock solution: Gibberelic acid (2 mg/ml)

1. Weigh 0.2 g of gibberelic acid.
2. Dissolve in 5-10 ml of ethanol (96%). Add demineralized-distill water to a final volume of 100 ml.
3. Dispense into plastic vessels.
4. Label vessels correctly (name of solution, solution concentration [mg/ml], preparation date).
5. Store stock solution under refrigeration at 4°C (up to 1 month).

Annex 4. Preparation of solutions for pH adjustment

General Precautions: # Open the vessels carefully. If there is another cap internally, do not open with hands. Use gloves, scissors and a humid flannel. Be sure to close the chemical vessels correctly.

1. Ensure that the opening of the vessel caps show upwards.
2. Do not mix the caps and spatulas because the reagents could be contaminated.
3. Avoid to touch the reagents and the prepared solution.
4. Always have towel paper close to you while the solutions are prepared.

HCl 1N:

1. Fill 150 ml of destill water into a 250 ml glass beaker. Wear mask, glasses and gloves (to avoid the acid vapor).
2. Using a pipette pump, take 16,5 mL of chloride acid 12,1 N and pour it in the glass beaker with water. Do not pipette the acid with the mouth. Mix with a glass stirring stick
3. Pour the solution into a volumetric flask of 200 ml. Wash the glass beaker several times.
4. Add destill water to a final volume of 200 ml.
5. Pour the solution into a dark glass vessel and label correctly (name of solution, solution concentration [mg/ml], preparation date).
6. Store the solution to room temperature.

Calculation of normality (HCl):

$$V1 \times N1 = V2 \times N2$$

V1 = Volume of HCl concentrated (12.1N) = **searched volume**

$$N1 = 12.1N; V2 = 200 \text{ ml}; N2 = 1N$$

$$V1 = (200\text{ml} \times 1N)/12.1N = 16.53 \text{ ml}$$

--> To prepare 200 ml of HCl (1N) dilute 16.5 ml of concentrated HCl (12.1N)

NaOH 1N:

Sodium hydroxide is caustic, therefore it's necessary to use a spatula. Do not touch the reagent with the hands. After preparation wash your hands.

1. Fill 100 ml of destill water into a 250 ml glass beaker.
2. Weigh 8 g of sodium hydroxide (F.W. 40.00) into a plastic vessel.
3. Pour the sodium hydroxide into the water. Be carefully at the moment of aggregation (exothermic reaction that releases energy in form of heat). Mix with a glass stirring stick
4. Pour the solution into a volumetric flask of 200 ml. Wash the glass beaker several times.
5. Add destill water to a final volume of 200 ml.
6. Pour the solution into a dark glass vessel and label correctly (name of solution, solution concentration [mg/ml], preparation date).
7. Store the solution to room temperature.

Calculation of normality (NaOH):

The normality of a solution is the gram equivalent weight of a solute per liter of solution. A gram equivalent weight or equivalent is a measure of the reactive capacity of a given chemical species (ion, molecule, etc.). Normality is the only concentration unit that is reaction dependent.

Equivalent weight (EW) = Molecular weight (MW) / Valency. (Z)

Normality (N) = EW / 1000 ml of solution

Valency of NaOH = 1

EW = 40g/1 = 40g

1 N = 40g / 1000ml

--> To prepare 1000 ml of NaOH 1N dissolve 40g of sodium hydroxide.

--> To prepare 200 ml of NaOH 1N dissolve 8g of sodium hydroxide.

Annex 5. pH measurement using inoLab pH 720-pH meter

Always rinse the pH electrode with destill water and wipe it carefully with a tissue paper without touching the tip of the probe before immersing it in a new standard solution, sample, or its storage solution.

Instrument calibration procedure

1. Open the rubber plug that it is at the top of the electrode.
2. Press the "CAL" key several times till visualizing "AUTO CAL TEC" in the down left corner of the display.
3. Rinse the pH electrode with destill water and wipe it carefully with a tissue paper without touching the tip of the probe.
4. Carefully stir the pH electrode in the rinsing buffer of pH 7.
5. Press "RUN ENTER" key.
6. Wait till the "AR" letters stop flushing in the down right corner of the display. The "Ct 2" letters can be visualized.
7. Rinse the pH electrode with destill water and wipe it carefully with a tissue paper without touching the tip of the probe.
8. Carefully stir the pH electrode in the rinsing buffer of pH 4.
9. Press "RUN ENTER" key.
10. Wait till the "AR" letters stop flushing in the down right corner of the display. The mV/pH value should be visualized.
11. First press the "M" key then the "AR" key.
12. Rinse the pH electrode and wipe it with a tissue paper without touching the tip of the probe.
13. Colocate the pH electrode in its storage solution. Close the probe.

pH Measurement

1. Open the rubber plug that it is at the top of the electrode
2. In the down right corner of the display should appear the "AR" letters. If not, press the "AR" key.
3. The picture of pH electrode should appear completely painted, if not, begin the calibration procedure again.
4. Rinse the pH electrode with destill water and wipe it carefully without touching the tip of the probe.
5. Carefully stir the pH electrode in the medium.
6. Press the "RUN ENTER" key.
7. Wait till the "AR" letters stop flushing. Take out the probe from the medium and rinse with distill water.
8. Rinse the pH electrode with destill water and wipe it carefully with a tissue paper without touching the tip of the probe before immersing it in a new standard solution, sample, or its storage solution.
10. When finished, turn off the pH meter and put the electrode back in its storage solution. Ensure that the rubber plug is in the electrode-filling hole so that the electrode does not dry out. Close the probe.

INTRODUCCION

| La utilización de un medio de cultivo específico depende del objetivo de cultivo *in vitro*. Generalmente contienen los medios una fuente de carbono, nutrimentos minerales, vitaminas, agente gelificante (para el caso de medios semisólidos), sustancias reguladoras de crecimiento y otros compuestos como por ejemplo sustancias antioxidantes. La preparación de los medios de cultivo constituye un paso crítico para el éxito del cultivo *in vitro*. Es necesario utilizar reactivos de alto grado de pureza y agua bi-distilada o desmineralizada-distilada. El procedimiento para la preparación de los medios depende del tipo de medio (semisólido o líquido) y de la presencia de compuestos termolábiles. |

ALCANCE

| El presente protocolo describe la preparación de los medios de cultivo utilizados por IVU en sus *in vitro* actividades para la conservación y distribución de las germoplasmas de papa y camote. |

SEGURIDAD

| El personal operativo debe conocer los siguientes protocolos:

- Good practices during *in vitro* bank activities |

MATERIALES

| Equipos | |

Autoclave	Dispensador de medio
Potenciómetro	Balanza analítica
Cámara de flujo laminar	Agitador magnético
Refrigerador	Microondas
Destilador de agua	Bomba de vacío
Unidad de filtración (para filtración en vacío)	

Otros materiales	
Tubos de ensayo (13x100 mm, 16x125 mm, 18x150 mm, 25x150mm)	Bandejas para pesar
Tapas para tubos de ensayo	Gradillas
Espátulas	Magentas
Etiquetas	Vasos de precipitación de plástico (1, 2 y 4 litros)
Cinta indicadora de autoclave	Viales de plástico
Botellas de vidrio (1 litro)	Pipetas (1, 5 y 10 ml)
Compuestos químicos de acuerdo a la formulación del medio de cultivo (Anexo 1, 2 y 3)	Probetas (1 y 2 litros; 100 ml)
Filtro milipore (para filtración en vacío)	Prefiltros (para filtración en vacío)
Acido clorhídrico (12.1 N)	Hidróxido de sodio
Tijera	Guantes de plástico
Máscara	Lentes de seguridad
Bagueta de vidrio	Probeta aforada (200 ml)

2. PROCEDIMIENTO

| 2.1 Seleccionar los componentes químicos de acuerdo a la formulación del medio de cultivo a preparar. |

2.2 En un vaso de precipitación limpio y resistente al calor, colocar un magneto y agregar agua destilada hasta máximo 2/3 del volumen a preparar. Colocar el envase sobre un agitador magnético a una velocidad de 50 a 100 rpm.
2.3 Pesar cada uno de los componentes, verificando que la balanza indique un valor de cero antes de cada pesada. Tarar el peso del recipiente usado para la pesa.
2.4 Agregar los ingredientes no termolábiles al vaso de precipitación, excepto el agente gelificante. Mantener el agitador en funcionamiento hasta que todos los ingredientes se disolvieron.
2.5 Enrazar con agua hasta el volumen deseado (usando una probeta).
2.6 Verificar que el potenciómetro se encuentre calibrado adecuadamente (Anexo 5). Medir el pH y ajustar con soluciones de NaOH (1N) y/o HCl (1N) (Anexo 3) hasta alcanzar el valor establecido.
2.7 Para la preparación de medios semisólidos, agregar el agente gelificante y colocar el recipiente en el microondas a una potencia alta (10 minutos por litro de medio preparado, haciendo una pausa a los 7 minutos para agitar el medio). Si se autoclava el medio en botellas de vidrio (por agregar después sustancias termolábiles), no se requiere disolver el agente gelificante en el microondas.
2.8 Para los medios de cultivo que no contengan sustancias termolábiles, dispensar el medio en tubos de ensayo: 2-3 ml por tubo de 13x100 mm, 4-6 ml por tubo de 16x125 mm, 7-8 ml por tubo de 18x150 mm y 10-12 ml por tubo de 25x150 mm. Tapar los tubos y autoclavar por 20 minutos a 121°C y 15 libras de presión. Colocar cinta indicadora de autoclave (Sigmaware) encima de algunas tapas de tubo de ensayo para verificar el buen funcionamiento del equipo.

2.9 Para los medios de cultivo que contengan sustancias termolábiles, colocar el medio en botellas de vidrio resistentes al calor y autoclavar a 121°C por 20 minutos. Las botellas no deben estar cerradas por completo durante el proceso de esterilización. Se recomienda colocar una cinta indicadora de autoclave (Sigmaware) encima de las tapas de las botellas para verificar el buen funcionamiento del equipo. Llevar los frascos a una cámara de flujo estéril. Esperar que el medio llegue a una temperatura de 40-50°C. Agregar las sustancias termolábiles previamente esterilizadas por filtración. Agitar y dispensar en condiciones asépticas en recipientes de cultivo estériles: 25-30 ml por placa petri y 25- 35 ml por magenta.

2.10 Dejar reposar el medio hasta que llegue a la temperatura ambiental. Almacenar en refrigeración a 4°C por un máximo de 1 mes.

2.11 Etiquetar correctamente (tipo de medio, fecha de preparación).

2.12 Registrar los datos de la preparación del medio de cultivo en el formato correspondiente.

Anexo 1. Formulación de medios de cultivo

1. Medios de cultivo de papa

1.1 Medio de propagación (MSA)

Composición: | Compuesto | Concentración |

Sales MS* 4.33 g/l	
Ácido giberélico	0.1 mg/l
Glicina-HCl	2 mg/l
myo-Inositol	100 mg/l
Acido nicotínico	0.5 mg/l
Piridoxina-HCl	0.5 mg/l
Tiamina-HCl	0.1 mg/l
Sacarosa	25 g/l
Agar	6 g/l
pH	5.6

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

Preparación:

1. Para preparar 1 litro de medio disolver 4.33 g de sales MS comerciales en 600 ml de agua desmineralizada-destilada. En caso de no contar con las sales comerciales, preparar las sales MS de acuerdo al Anexo 1.
2. Agregar 25 g de sucrosa y agitar hasta disolver.
3. Agregar 1 ml de solución stock MSA-BASE 1 (Anexo 2) previamente descongelada. Agitar
4. Enraizar a un volumen de 1000 ml con agua desmineralizada-destilada.

5. Medir el pH y ajustarlo a 5.6.
6. Agregar 6 g de agar. Disolver el agar en caliente (horno microondas a 100% de intensidad por 10 minutos, haciendo una pausa a los 7 minutos para agitar el medio).
7. Dispensar el medio en tubos de ensayo. Tapar tubos de ensayo. Autoclavar los tubos por 20 minutos (a 121 °C, 15 libras de presión). Si se utiliza magentas o placas petri, se autoclava primero el medio para luego dispensarlo en recipientes estériles. Tapar los recipientes con tapas estériles (en la cámara de flujo laminar).
8. Conservar el medio bajo refrigeración a 4 °C (hasta 1 mes)

1.2 Medio para introducción in vitro (MSA-INT)

Composición: | Compuesto | Concentración |

Sales MS*	4.33 g/l
Ácido giberélico	0.1 mg/l
Glicina-HCl	2 mg/l
myo-Inositol	100 mg/l
Acido nicotínico	0.5 mg/l
Piridoxina-HCl	0.5 mg/l
Tiamina-HCl	0.1 mg/l
Sacarosa	25 g/l
Phytigel	3 g/l
PH	5.6

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

Preparación:

1. Para preparar 1 litro de medio disolver 4.33 g de sales MS comerciales en 600 ml de agua desmineralizada-destilada. En caso de no contar con las sales comerciales, preparar las sales MS de acuerdo al Anexo 1.
2. Agregar 25 g de sucrosa y agitar hasta disolver.
3. Agregar 1 ml de solución stock MSA-BASE 1 (Anexo 2) previamente descongelada. Agitar
4. Enrazar a un volumen de 1000 ml con agua desmineralizada-destilada.
5. Medir el pH y ajustarlo a 5.6.
6. Agregar 3 g de phytigel. Disolver el phytigel en caliente (horno microondas a 100% de intensidad por 10 minutos, haciendo una pausa a los 7 minutos para agitar el medio).
7. Dispensar el medio en tubos de ensayo. Tapar tubos de ensayo. Autoclavar los tubos por 20 minutos (a 121 °C, 15 libras de presión). Si se utiliza magentas o placas petri, se autoclava primero el medio para luego dispensarlo en recipientes estériles. Tapar los recipientes con tapas estériles (en la cámara de flujo laminar).
8. Conservar el medio bajo refrigeración a 4 °C (hasta 1 mes)

1.3 Medio de conservación I (S22)

Composición: | Compuesto | Concentración |

Sales MS*	4.33 g/l
Glicina-HCl	2 mg/l
myo-Inositol	100 mg/l
Acido nicotínico	0.5 mg/l
Piridoxina-HCl	0.5 mg/l
Tiamina-HCl	0.1 mg/l

Sacarosa	20 g/l
Sorbitol	20 g/l
Agar	6.5 g/l
pH	5.6

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

Preparación:

1. Para preparar 1 litro de medio disolver 4.33 g de sales MS comerciales en 600 ml de agua desmineralizada-destilada. En caso de no contar con las sales comerciales, preparar las sales MS de acuerdo al Anexo 1.
2. Agregar 20 g de sucrosa y 20 g de sorbitol. Agitar hasta disolver.
3. Agregar 1 ml de solución stock MSA-BASE 2 (Anexo 2) previamente descongelada. Agitar
4. Enrazar a un volumen de 1000 ml con agua desmineralizada-destilada.
5. Medir el pH y ajustarlo a 5.6.
6. Agregar 6.5 g de agar. Disolver el agar en caliente (horno microondas a 100% de intensidad por 10 minutos, haciendo una pausa a los 7 minutos para agitar el medio).
7. Dispensar el medio en tubos de ensayo. Tapar tubos de ensayo. Autoclavar los tubos por 20 minutos (a 121 °C, 15 libras de presión). Si se utiliza magentas o placas petri, se autoclava primero el medio para luego dispensarlo en recipientes estériles. Tapar los recipientes con tapas estériles (en la cámara de flujo laminar).
8. Conservar el medio bajo refrigeración a 4 °C (hasta 1 mes)

1.4 Medio de conservación II (S32)

Composición: | Compuesto | Concentración |

Sales MS*	4.33 g/l
Glicina-HCl	2 mg/l
myo-Inositol	100 mg/l
Acido nicotínico	0.5 mg/l
Piridoxina-HCl	0.5 mg/l
Tiamina-HCl	0.1 mg/l
Sacarosa	20 g/l
Sorbitol	30 g/l
Agar	6.5 g/l
pH	5.6

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

Preparación:

1. Para preparar 1 litro de medio disolver 4.33 g de sales MS comerciales en 600 ml de agua desmineralizada-destilada. En caso de no contar con las sales comerciales, preparar las sales MS de acuerdo al Anexo 1.
2. Agregar 20 g de sucrosa y 30 g de sorbitol. Agitar hasta disolver.
3. Agregar 1 ml de solución stock MSA-BASE 2 (Anexo 2) previamente descongelada. Agitar
4. Enrazar a un volumen de 1000 ml con agua desmineralizada-destilada.
5. Medir el pH y ajustarlo a 5.6.
6. Agregar 6.5 g de agar. Disolver el agar en caliente (horno microondas a 100% de intensidad por 10 minutos, haciendo una pausa a los 7 minutos para agitar el medio).
7. Dispensar el medio en tubos de ensayo. Tapar tubos de ensayo.
8. Autoclavar los tubos por 20 minutos (a 121 °C, 15 libras de presión).
9. Conservar el medio bajo refrigeración a 4 °C (hasta 1 mes)

1.5 Medio de conservación III (S42)

Composición: | Compuestos | Concentración |

Sales MS*	4.33 g/l
Glicina-HCl	2 mg/l
myo-Inositol	100 mg/l
Acido nicotínico	0.5 mg/l
Piridoxina-HCl	0.5 mg/l
Tiamina-HCl	0.1 mg/l
Sacarosa	20 g/l
Sorbitol	40 g/l
Agar	6.5 g/l
pH	5.6

* Basal Salts of Murashige & Skoog (1962)
Proveedor: CAISSON

Preparación:

1. Para preparar 1 litro de medio disolver 4.33 g de sales MS comerciales en 600 ml de agua desmineralizada-destilada. En caso de no contar con las sales comerciales, preparar las sales MS de acuerdo al Anexo 1.
2. Agregar 20 g de sucrosa y 40 g de sorbitol. Agitar hasta disolver.
3. Agregar 1 ml de solución stock MSA-BASE 2 (Anexo 2) previamente descongelada. Agitar
4. Enrazar a un volumen de 1000 ml con agua desmineralizada-destilada.
5. Medir el pH y ajustarlo a 5.6.
6. Agregar 6.5 g de agar. Disolver el agar en caliente (horno microondas a 100% de intensidad por 10 minutos, haciendo una pausa a los 7 minutos para agitar el medio).
7. Dispensar el medio en tubos de ensayo. Tapar tubos de ensayo.
8. Autoclavar los tubos por 20 minutos (a 121 °C, 15 libras de presión).
9. Conservar el medio bajo refrigeración a 4 °C (hasta 1 mes)

1.6 Medio para cultivo de meristemas (MMP)

Composición: | Compuestos | Concentración |

Sales MS*	4.33 g/l
Glicina-HCl	2 mg/l
myo-Inositol	100 mg/l
Acido nicotínico	0.5 mg/l
Piridoxina-HCl	0.5 mg/l
Tiamina-HCl	0.1 mg/l
Ácido giberélico	0.1 mg/l
Agua de coco	20 ml/l
Sacarosa	25 g/l
Phytigel	3 g/l
pH	5.6

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

Preparación:

1. Para preparar 1 litro de medio disolver 4.33 g de sales MS comerciales en 600 ml de agua desmineralizada-destilada. En caso de no contar con las sales comerciales, preparar las sales MS de acuerdo al Anexo 1.
2. Agregar 25 g de sucrosa. Agitar hasta disolver.
3. Agregar 1 ml de solución stock MSA-BASE 1 (Anexo 2) previamente descongelada. Agitar
4. Enrazar a un volumen de 980 ml con agua desmineralizada-destilada.
5. Medir el pH y ajustarlo a 5.6.
6. Agregar 3 g de phytigel en una botella de vidrio resistente al calor. Vaciar el medio a la botella.
7. Autoclavar el medio por 20 minutos (a 121 °C, 15 libras de presión).
8. Dejar enfriar el medio a una temperatura de 40-45 °C (en la cámara de flujo laminar). Agregar 20 ml de agua de coco previamente esterilizado vía filtración en vacío (en la cámara de flujo laminar).
9. Dispensar el medio en tubos de ensayo estériles. Tapar tubos de ensayo con tapas estériles (en la cámara de flujo laminar).
10. Conservar el medio bajo refrigeración a 4 °C (hasta 1 mes)

1.7 Medio de propagación rápida (MPR)

Composición: | Compuestos | Concentración |

Sales MS*	4.33 g/l
Ácido giberélico	0.1 mg/l
Glicina-HCl	2 mg/l
myo-Inositol	100 mg/l
Acido nicotínico	0.5 mg/l
Piridoxina-HCl	0.5 mg/l
Tiamina-HCl	0.1 mg/l
L-arginina	4 mg/l
Pantotenato de calcio	2 mg/l
Putrescina HCl	10 mg/l
Sacarosa	30 g/l
Agua de coco	10 ml/l
pH	5.6

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

Preparación:

1. Para preparar 1 litro de medio disolver 4.33 g de sales MS comerciales en 600 ml de agua desmineralizada-destilada. En caso de no contar con las sales comerciales, preparar las sales MS de acuerdo al Anexo 1.
2. Agregar 30 g de sucrosa. Agitar hasta disolver.
3. Agregar 1 ml de solución stock MSA-BASE 1 (Anexo 2) previamente descongelada, 4 mg de L-Arginina, 2 mg the pantotenato de calcio y 10 mg de putrescina-HCl. Agitar.
4. Enrazar a un volumen de 990 ml con agua desmineralizada-destilada.
5. Medir el pH y ajustarlo a 5.6.
6. Agregar 3 g de phytigel en una botella de vidrio resistente al calor. Vaciar el medio a la botella.
7. Autoclavar el medio por 20 minutos (a 121 °C, 15 libras de presión).
8. Dejar enfriar el medio a una temperatura de 40-45 °C (en la cámara de flujo laminar). Agregar 10 ml de agua de coco previamente esterilizado vía filtración en vacío (en la cámara de flujo laminar).
9. Dispensar el medio en tubos de ensayo estériles. Tapar tubos de ensayo con tapas estériles (en la cámara de flujo laminar).
10. Conservar el medio bajo refrigeración a 4 °C (hasta 1 mes)

1.8 Medio de inducción para microtuberización (PTM)

Composición: | Compuestos | Concentración |

Sales MS*	4.33 g/l
Benzilaminopurina (BAP)	5 mg/l
Cloruro de Clorocolina (CCC)	500 mg/l
Tiamina-HCl	0.4 mg/l
Sacarosa	80 g/l
pH	5.6

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

Preparación:

1. Para preparar 1 litro de medio disolver 4.33 g de sales MS comerciales en 600 ml de agua desmineralizada-destilada. En caso de no contar con las sales comerciales, preparar las sales MS de acuerdo al Anexo 1.
2. Agregar 80 g de sucrosa. Agitar hasta disolver.
3. Agregar 0.4 mg de tiamina-HCl, 5 mg de benzilaminopurina (BAP) y 500 mg de cloruro de clorocolina (CCC). Agitar hasta disolver.
4. Enrazar a un volumen de 1000 ml con agua desmineralizada-destilada.
5. Medir el pH y ajustarlo a 5.6.
6. Vaciar el medio en una botella de vidrio resistente al calor.
7. Autoclavar el medio por 20 minutos (a 121 °C, 15 libras de presión).
8. Dejar enfriar el medio a una temperatura de 40-45 °C (en la cámara de flujo laminar).
9. Dispensar 20 ml de medio por contenedor estéril.
10. Tapar los contenedores con sus tapas estériles (en la cámara de flujo laminar).
10. Conservar el medio bajo refrigeración a 4 °C (hasta 1 mes)

2. Medios de cultivo de camote

2.1 Medio para introducción *in vitro* y micropropagación (MPB)

Composición: | Compuestos | Concentración |

Sales MS*	4.33 g/l
Pantotenato de Calcio	2 mg/l
Nitrato de Calcio	100 mg/l
L-Arginina	100 mg/l
Acido ascórbico	200 mg/l
Putrescina HCl	20 mg/l
Acido Giberélico	10 mg/l
Sacarosa	30 g/l
Phytigel	3 g/l
pH	5.7

* Sales basales de Murashige y Skoog (1962)

Proveedor: CAISSON

Preparación:

1. Para preparar 1 litro de medio disolver 4.33 g de sales MS comerciales en 600 ml de agua desmineralizada-destilada. En caso de no contar con las sales comerciales, preparar las sales MS de acuerdo al Anexo 1.
2. Agregar 30 g de sucrosa. Agitar hasta disolver.
3. Agregar 4 ml de solución stock MPB-BASE (Anexo 2) previamente descongelada. Agitar.
4. Agregar 5 ml de solución stock de ácido giberélico (Anexo 2). Agitar.
5. Enrazar a un volumen de 1000 ml con agua desmineralizada-destilada.
6. Medir el pH y ajustarlo a 5.7.
7. Agregar 3 g de phytigel. Disolver el phytigel en caliente (horno microondas a 100% de intensidad por 10 minutos, haciendo una pausa a los 7 minutos para agitar el medio).
8. Dispensar el medio en tubos de ensayo. Tapar tubos de ensayo.
9. Autoclavar los tubos por 20 minutos (a 121 °C, 15 libras de presión).
10. Conservar el medio bajo refrigeración a 4 °C (hasta 1 mes)

2.2 Medio para recuperación de plántulas *in vitro* con baja viabilidad (MPB2)

Composición: | Compuesto | Concentración |

Sales MS*	
Pantotenato de Calcio	2 mg/l
Nitrato de Calcio	100 mg/l
L-Arginina	100 mg/l
Acido ascórbico	200 mg/l
Putrescina HCl	20 mg/l
Acido Giberélico	20 mg/l
Agua de coco	10 ml/l
Sacarosa	30 g/l
Phytigel	3 g/l
pH	5.7

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

Preparación:

1. Para preparar 1 litro de medio disolver 4.33 g de sales MS comerciales en 600 ml de agua desmineralizada-destilada. En caso de no contar con las sales comerciales, preparar las sales MS de acuerdo al Anexo 1.
2. Agregar 30 g de sucrosa. Agitar hasta disolver.
3. Agregar 4 ml de solución stock MPB-BASE (Anexo 2) previamente descongelada. Agitar.
4. Agregar 10 ml de la solución stock de ácido giberélico (Anexo 2). Agitar.
5. Enrazar a un volumen de 990 ml con agua desmineralizada-destilada.
6. Medir el pH y ajustarlo a 5.7.
7. Agregar 3 g de phytigel en una botella de vidrio resistente al calor. Vaciar el medio a la botella.
8. Autoclavar el medio por 20 minutos (a 121 °C, 15 libras de presión).
9. Dejar enfriar el medio a una temperatura de 40-45 °C (en la cámara de flujo laminar). Agregar 10 ml de agua de coco previamente esterilizado vía filtración en vacío (en la cámara de flujo laminar).
10. Dispensar el medio en tubos de ensayo o placas petri estériles. Tapar contenedores con tapas estériles (en la cámara de flujo laminar).
11. Conservar el medio bajo refrigeración a 4 °C (hasta 1 mes)

2.3 Medio para multiplicación (MPB) y conservación (MPB-cons) *in vitro*

Composición: | Compuesto | Concentración |

Sales MS*	4.33 g/l
Pantotenato de Calcio	2 mg/l
Nitrato de Calcio	100 mg/l
L-Arginina	100 mg/l
Acido ascórbico	200 mg/l
Putrescina HCl	20 mg/l
Sacarosa	30 g/l
Phytigel	2.8 g/l
pH	5.7

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

Preparación:

1. Para preparar 1 litro de medio disolver 4.33 g de sales MS comerciales en 600 ml de agua desmineralizada-destilada. En caso de no contar con las sales comerciales, preparar las sales MS de acuerdo al Anexo 1.
2. Agregar 30 g de sucrosa. Agitar hasta disolver.
3. Agregar 4 ml de solución stock MPB-BASE (Anexo 2) previamente descongelada. Agitar
4. Enrazar a un volumen de 1000 ml con agua desmineralizada-destilada.
5. Medir el pH y ajustarlo a 5.7.
6. Agregar 3 g de phytigel. Disolver el phytigel en caliente (horno microondas a 100% de intensidad por 10 minutos, haciendo una pausa a los 7 minutos para agitar el medio).
7. Dispensar el medio en tubos de ensayo. Tapar tubos de ensayo. Autoclavar los tubos por 20 minutos (a 121 °C, 15 libras de presión). Si se utiliza magentas o placas petri, se autoclava primero el medio para luego dispensarlo en recipientes estériles. Tapar los recipientes con tapas estériles (en la cámara de flujo laminar).
8. Conservar el medio bajo refrigeración a 4 °C (hasta 1 mes)

2.4 Medio para cultivo de meristemos I: fase inicial (MPM1)

Composición: | Compuesto | Concentración |

Sales MS*	4.33 g/l
Pantotenato de calcio	2 mg/l
Nitrato de calcio	100 mg/l
L-Arginina	100 mg/l
Acido ascórbico	100 mg/l
Putrescina HCl	20 mg/l
Acido giberélico	20 mg/l
Agua de coco	10 ml/l
Sacarosa	30 g/l
Agar	6 g/l
pH	5.7

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

Preparación:

1. Para preparar 1 litro de medio disolver 4.33 g de sales MS comerciales en 600 ml de agua desmineralizada-destilada. En caso de no contar con las sales comerciales, preparar las sales MS de acuerdo al Anexo 1.
2. Agregar 30 g de sucrosa. Agitar hasta disolver.

3. Agregar 1 ml de las soluciones stock de pantotenato de calcio, nitrato de calcio, putrescina HCl y L-Arginina. Agregar 0.5 ml de la solución stock de ácido ascórbico (Anexo 2). Agitar.
4. Enrazar a un volumen de 980 ml con agua desmineralizada-destilada.
5. Medir el pH y ajustarlo a 5.7.
6. Agregar 6 g de agar en una botella de vidrio resistente al calor. Vaciar el medio a la botella.
7. Autoclavar el medio por 20 minutos (a 121 °C, 15 libras de presión).
8. Dejar enfriar el medio a una temperatura de 40-45 °C (en la cámara de flujo laminar). Agregar 10 ml de agua de coco y 10 ml de ácido giberélico previamente esterilizados vía filtración en vacío (en la cámara de flujo laminar).
9. Dispensar el medio en tubos de ensayo o placas petri estériles. Tapar contenedores con tapas estériles (en la cámara de flujo laminar).
10. Conservar el medio bajo refrigeración a 4 °C (hasta 1 mes)

2.5 Medio para cultivo de meristemos II: Sub-cultivo (MPM2)

Composición: Componentes | Concentración |

Sales MS*	4.33 g/l
Pantotenato de calcio	2 mg/l
Nitrato de calcio	100 mg/l
L-Arginina	100 mg/l
Acido ascórbico	100 mg/l
Putrescina HCl	20 mg/l
Gibberelic acid	10 mg/l
Agua de coco	10 ml/l
Sacarosa	30 g/l
Agar	6 g/l
pH	5.7

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

Preparación:

1. Para preparar 1 litro de medio disolver 4.33 g de sales MS comerciales en 600 ml de agua desmineralizada-destilada. En caso de no contar con las sales comerciales, preparar las sales MS de acuerdo al Anexo 1.
2. Agregar 30 g de sucrosa. Agitar hasta disolver.
3. Agregar 1 ml de las soluciones stock de pantotenato de calcio, nitrato de calcio, putrescina HCl y L-Arginina. Agregar 0.5 ml de la solución stock de ácido ascórbico (Anexo 2). Agitar.
4. Enrazar a un volumen de 985 ml con agua desmineralizada-destilada.
5. Medir el pH y ajustarlo a 5.7.
6. Agregar 6 g de agar en una botella de vidrio resistente al calor. Vaciar el medio a la botella.
7. Autoclavar el medio por 20 minutos (a 121 °C, 15 libras de presión).
8. Dejar enfriar el medio a una temperatura de 40-45 °C (en la cámara de flujo laminar). Agregar 10 ml de agua de coco y 5 ml de ácido giberélico previamente esterilizados vía filtración en vacío (en la cámara de flujo laminar).
9. Dispensar el medio en tubos de ensayo o placas petri estériles. Tapar contenedores con tapas estériles (en la cámara de flujo laminar).
10. Conservar el medio bajo refrigeración a 4 °C (hasta 1 mes)

3. Medio para detección de bacterias

Caldo Nutritivo(CN)

Composición: Componentes | Concentración |

Peptona	5.0 g
Extracto de levadura	2.0 g
Glucosa	10.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Extracto de carne	1.0 g
pH	7.0

Preparación:

1. Pesar 5.0 g de peptona, 2.0 g de extracto de levadura, 10.0 g de glucosa, 5.0 g de cloruro de sodio, y 1.0 g de extracto de carne.
2. Disolver estos compuestos en 600 ml de agua desmineralizada-destilada. Se recomienda disolver el extracto de carne primero con 1-2 ml de agua (en el mismo recipiente en cual se pesó) para luego agregarlo a la solución.
3. Enrazar a un volumen de 1000 ml con agua desmineralizada-destilada.
4. Medir el pH y ajustarlo a 7.0.
5. Dispensar en tubos de ensayo. Tapar tubos. Autoclavar el caldo por 20 minutos (a 121 °C, 15 libras de presión).

Anexo 2: Preparación de sales de Murashige y Skoog (MS)

Composición: Componentes | Concentración (mg/l) |

CaCl ₂ .2H ₂ O	440
KNO ₃	1900
NH ₄ NO ₃	1650
KH ₂ PO ₄	170
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
MnSO ₄ .H ₂ O	16.9
H ₃ BO ₃	6.2
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
KI	0.83
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
EDTA-Na ₂	37.3
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8

Anexo 3. Soluciones Stock

MSA-BASE 1

Composición: | Componentes | Concentración |

Acido giberélico	0.1 mg/l
Glicina-HCl	2 mg/l
myo-Inositol	100 mg/l
Acido nicotínico	0.5 mg/l
Piridoxina-HCl	0.5 mg/l
Tiamina-HCl	0.1 mg/l

Preparación:

1. Pesar 0.5 g de glicina, 0.125 g de ácido nicotínico, 0.125 g de piridoxina HCl, y 0.025 g de tiamina.
2. Disolver en 250 ml de agua desmineralizada-destilada.
3. Agregar lentamente 25 g de myo-Inositol. Agitar.
4. Pesar 0.025 g de ácido giberélico y disolver en 2 ml de etanol. Agregar a la solución stock y agitar hasta que los reactivos estén totalmente disueltos.
5. Dispensar 2 ml en viales de plástico.
6. Etiquetar los viales correctamente (nombre de solución, concentración de solución [mg/ml], fecha de preparación)
7. Almacenar los viales en la congeladora (-20°C) por un tiempo máximo de 3 meses.

MSA-BASE 2

Composición: | Componentes | Concentración |

Glicina-HCl	2 mg/l
myo-inositol	100 mg/l
Acido nicotínico	0.5 mg/l
Piridoxina-HCl	0.5 mg/l
Tiamina-HCl	0.1 mg/l

Preparación:

1. Pesar 0.5 g de glicina, 0.125 g de ácido nicotínico, 0.125 g de piridoxina HCl, y 0.025 g de tiamina.
2. Disolver en 250 ml de agua desmineralizada-destilada.
3. Agregar lentamente 25 g de myo-Inositol. Agitar.
4. Dispensar 2 ml en viales de plástico.
5. Etiquetar los viales correctamente (nombre de solución, concentración de solución [mg/ml], fecha de preparación)
6. Almacenar los viales en la congeladora (-20°C) por un tiempo máximo de 3 meses.

MPB-BASE

1. Preparar los siguientes soluciones stock por separado (como descrito más adelante): pantotenato de calcio, nitrato de calcio, L-Arginina, ácido ascórbico, putrescina-HCl.
2. Agregar 4 ml de cada solución a viales de plástico de 20 ml.

3. Etiquetar correctamente (nombre de solución, concentración [mg/ml], fecha de preparación).
4. Almacenar los viales en la congeladora (-20°C) por un tiempo máximo de 3 meses.

Solución Stock: Pantotenato de calcio (2 mg/ml)

1. Pesar 0.2 g de pantotenato de calcio.
2. Disolver en 100 ml de agua desmineralizada-destilada.
3. Dispensar la solución en frascos de plástico.
4. Etiquetar correctamente (nombre de solución, concentración [mg/ml], fecha de preparación).
5. Conservar la solución bajo refrigeración a 4 °C (hasta 1 mes)

Solución stock: Nitrato de calcio (100 mg/ml)

1. Pesar 10 g de nitrato de calcio.
2. Disolver en 100 ml de agua desmineralizada-destilada.
3. Dispensar la solución en frascos de plástico.
4. Etiquetar correctamente (nombre de solución, concentración [mg/ml], fecha de preparación).
5. Conservar la solución bajo refrigeración a 4 °C (hasta 1 mes)

Solución Stock: L-Arginina (100 mg/ml)

1. Pesar 10 g de L-Arginina.
2. Disolver en 100 ml de agua desmineralizada-destilada.
3. Dispensar la solución en frascos de plástico.
4. Etiquetar correctamente (nombre de solución, concentración [mg/ml], fecha de preparación).
5. Conservar la solución bajo refrigeración a 4 °C (hasta 1 mes)

Solución Stock: Acido ascórbico (200 mg/ml)

1. Pesar 20 g de ácido ascórbico.
2. Disolver en 100 ml de agua desmineralizada-destilada.
3. Dispensar la solución en frascos de plástico.
4. Etiquetar correctamente (nombre de solución, concentración [mg/ml], fecha de preparación).
5. Conservar la solución bajo refrigeración a 4 °C (hasta 1 mes).

Solución Stock: Putrescina HCl (20 mg/ml)

1. Pesar 2 g de putrescina HCl.
2. Disolver en 100 ml de agua desmineralizada-destilada.
3. Dispensar la solución en frascos de plástico.
4. Etiquetar correctamente (nombre de solución, concentración [mg/ml], fecha de preparación).
5. Conservar la solución bajo refrigeración a 4 °C (hasta 1 mes).

Solución Stock: Acido giberélico (2 mg/ml)

1. Pesar 0.2 g de ácido giberélico.
2. Disolver en 5-10 ml de etanol (96%). Enrazar con agua desmineralizada-destilada hasta un volumen final de 100 ml.
3. Dispensar la solución en frascos de plástico.
4. Etiquetar correctamente (nombre de solución, concentración [mg/ml], fecha de preparación).
5. Conservar la solución bajo refrigeración a 4 °C (hasta 1 mes)

Anexo 4. Preparación de soluciones para el ajuste de pH

Precauciones generales:

- 1.) Utilizar guantes, máscara, y lentes de seguridad durante el manipuleo de las soluciones y reactivos.
- 2.) Abrir los frascos con cuidado. Si el frasco tiene otro tapón por dentro no sacarlo directamente, sino mediante unas tijeras y una franela húmeda.
- 3.) Siempre colocar las tapas de los frascos boca arriba.
- 4.) Al final de cada pesada, cerrar los frascos correctamente.
- 5.) No mezclar tapas ni espátulas durante el pesado.
- 6.) Evitar todo contacto directo con la sustancia a preparar.

HCl 1N:

Vaciar 150 ml de agua destilada en un vaso de precipitación de vidrio de 250 ml. Protegerse con máscara, lentes y guantes (para evitar los vapores tóxicos).

1. Con un pipetor verter cuidadosamente 16.5 ml de ácido clorhídrico concentrado (12.1 N) sobre el agua. No pipetear el ácido directamente con la boca.
2. Agitar con una bagueta de vidrio. Verter el contenido en una probeta aforada de 200 ml. Lavar el vaso de precipitación varias veces con agua.
3. Enrazar con agua destilada a un volumen de 200 ml.
4. Almacenar en frasco de vidrio de color oscuro correctamente etiquetado, indicando la concentración y la fecha de preparación de la solución.

Cálculo de normalidad (HCl):

$$V1 \times N1 = V2 \times N2$$

V1 = Volumen de HCl concentrado (12.1N) = volumen buscado

$$N1 = 12.1N; V2 = 200 \text{ ml}; N2 = 1N$$

$$V1 = (200\text{ml} \times 1N) / 12.1N = 16.53 \text{ ml}$$

--> Para preparar 200 ml de HCl (1N) disolver 16.5 ml de HCl concentrado (12.1N)

NaOH 1N:

El hidróxido de sodio es cáustico, usar espátula y no tocarlo con las manos al pesar. Lavarse las manos después de haber utilizado éste reactivo.

1. En un beaker de vidrio de 250 ml colocar 100 ml de agua destilada. 2. Pesar 8 g de hidróxido de sodio (F.W. 40.00) en un recipiente de plástico. 3. Verter el hidróxido de sodio en el agua. Agregar el hidróxido de sodio con cuidado ya se presenta una reacción exotérmica (genera calor).

4. Agitar con una bagueta de vidrio hasta disolviendo el hidróxido de sodio por completo. Vaciar la solución en una probeta o matraz aforado de 200 ml. Lavar el vaso de precipitación varias veces

5. Enrazar con agua destilada a un volumen de 200 ml.

6. Vaciar la solución en un frasco de vidrio de color oscuro. Etiquetar correctamente, indicando la concentración y la fecha de preparación de la solución.

7. Almacenar la solución a la temperatura ambiental.

Cálculo de normalidad (NaOH):

La normalidad de una solución puede definirse como el peso en gramos equivalentes de un soluto por litro de solución. El peso en gramos equivalentes (o peso equivalente o EW) es una medida para la capacidad de reacción de una determinada sustancia química. La normalidad es la única unidad de concentración que depende de la reacción química.

Peso equivalente (EW) = Peso molecular (MW) / Valencia (Z)

Normalidad (N) = EW / 1000 ml de solución

$$EW = 40\text{g} / 1 = 40 \text{ g}$$

$$1 \text{ N} = 40 \text{ g} / 1000 \text{ ml}$$

--> Para preparar 1000 ml de NaOH 1N disolver 40 g de hidróxido de sodio.

--> Para preparar 200 ml de NaOH 1N disolver 8 g de hidróxido de sodio.

Annex 5. pH measurement using inoLab pH 720-pH meter

Instrument calibration procedure

1. Open the rubber plug that it is at the top of the electrode.
2. Press "CAL" key several times until the meter displays "AUTOCAL TEC" in the down side left.
3. Always rinse the pH electrode with distilled water and wipe the sides carefully without touch the tip with a tissue paper before immersing it in a

standard solution.

4. Stir the pH electrode in the rinsing buffer of pH 7. Wipe with a tissue paper and then stir the pH electrode in a clean buffer of the same pH.
5. Press "RUN ENTER" key.
6. Wait until "AR" letters in the down side right of the screen stop flushing and appears "Ct 2".
7. Rinse the pH electrode with distilled water and wipe the sides carefully without touching the tip with a tissue paper before immersing it in a new standard solution.
8. Stir the pH electrode in the rinsing buffer of pH 4. Wipe with a tissue paper and then stir the pH electrode in a clean buffer of the same pH.
9. Press "RUN ENTER" key.
10. Wait until "AR" letters in the down side right of the screen stop flushing and appears a mV/pH value.
11. Press "M" key and the "AR" key.
12. Rinse the pH electrode; finally, wipe the sides with a tissue paper without touching the tip.
13. At the end, put the pH electrode back in its storage solution. Close the probe, too.
14. Throw out rinsing buffer of pH that was used.

pH Measurement

Before using the dimmer, it must be calibrated with the pH7 buffer solution.

1. Open the rubber plug that it is at the top of the electrode
2. Look down side right of the screen and the "AR" letters should appear. If not, press "AR" key.
3. The picture of pH electrode should appear completely painted, if not, begin the calibration procedure again.
4. Rinse the pH electrode with distilled water and wipe the sides carefully without touching the tip with a tissue paper before immersing it in the medium to measure.
5. Stir pH electrode into the medium.
6. Press "RUN ENTER" key.
7. Wait until the "AR" letters stop to flush, take away the sonda from the medium and rinse with distilled water.
8. Always rinse the electrode with distilled water and wipe the sides carefully without touching the tip with a tissue paper before immersing it in a new standard solution, sample, or its storage solution.
9. If it is necessary another measure, put the pH electrode into the medium and press "RUN ENTER" key.
10. When finished, remember to turn off the pH meter and put the electrode back in its storage solution. Be sure that the rubber plug is in the electrode-filling hole so that the electrode does not dry out. Don't forget close the probe.
11. Turn pH meter OFF and store electrode in pH 7 standard buffer.