

*Evaluación de las Metodologías de Crioconservación
en Una Accesión de Solanum Phureja*

*Alba Lucía Villa Triana
Alejandra María Sánchez Sánchez*

*Universidad del Tolima
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología
Ibagué
2003*

20553

BIBLIOTECA AGROPECUARIA
DE COLOMBIA

- 6 NOV. 2003

**EVALUACIÓN DE LAS METODOLOGÍAS DE CRIOCONSERVACION EN
UNA ACCESIÓN DE *Solanum phureja***

**ALBA LUCIA VILLA TRIANA
ALEJANDRA MARIA SÁNCHEZ SÁNCHEZ**

400263 - 50-30-IX

**UNIVERSIDAD DEL TOLIMA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
IBAGUE
2003**

**EVALUACIÓN DE LAS METODOLOGÍAS DE CRIOCONSERVACION EN
UNA ACCESIÓN DE *Solanum phureja***

**ALBA LUCIA VILLA TRIANA
ALEJANDRA MARIA SÁNCHEZ SÁNCHEZ**

**UNIVERSIDAD DEL TOLIMA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
IBAGUE
2003**

**EVALUACIÓN DE LAS METODOLOGÍAS DE CRIOCONSERVACION EN
UNA ACCESIÓN DE *Solanum phureja***

**ALBA LUCIA VILLA TRIANA
ALEJANDRA MARIA SÁNCHEZ SÁNCHEZ**

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar el título
de
BIÓLOGO**

**Director
RAUL IVAN VALBUENA Msc.
Codirector
NEFTALI MESA Msc.**

**UNIVERSIDAD DEL TOLIMA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
IBAGUE
2003**

La Universidad y los jurados del trabajo no son responsables de las ideas
emitidas por el autor del mismo.
Resolución 04 de 1974.

Nota de aceptación

Gloria Urueña Msc. Jurado

Roosevelt Escobar Msc. Jurado

Ibagué, 27 de Octubre de 2003

A mi familia por acompañarme y apoyarme, durante este proceso.
ALEJANDRA.

A Dios, a mi padre por su constante apoyo, confianza y por el amor que siempre me ha brindado. A mi madre que aunque no esté conmigo, le doy gracias por los principios que forjó en mí. A mi hermana Gloria, por su colaboración y comprensión, como también a Sebastián y a toda mi familia.
ALBA LUCIA.

AGRADECIMIENTOS

Las autoras expresan sus agradecimientos a:

La Universidad del Tolima, por la formación recibida. En especial a Gladis Reinoso, por el apoyo que siempre nos brindó y el gran aporte de sus conocimientos para nuestra formación.

Al profesor Neftalí Mesa, por su colaboración y disposición en la codirección de este trabajo.

Doctor Víctor Manuel Nuñez, Director del Programa Nacional de Recursos Genéticos y Biotecnología Vegetal de CORPOICA - TIBAITATA por el apoyo recibido durante esta etapa y por la oportunidad de seguir aprendiendo en nuestro proceso de formación.

Raúl Iván Valbuena, Director del trabajo, por su asesoría en el desarrollo del trabajo y colaboración en el análisis estadístico.

Doctor Joseph Thome director de la Unidad de Biotecnología del CIAT, por su colaboración y solidaridad para la culminación de este trabajo.

Roosevelt Escobar, Investigador de la Unidad de Biotecnología del CIAT, por el aporte de sus conocimientos, dedicación y consejos para el correcto desarrollo del trabajo.

Doctor Antonio María Caicedo, investigador de la Regional No 6 de CORPOICA, por su asesoría para la presentación del trabajo.

Y todo el personal del Programa Nacional de Recursos Genéticos y Biotecnología Vegetal de CORPOICA TIBAITATA y de la Unidad de Biotecnología del CIAT que de una u otra manera colaboraron en el desarrollo de este trabajo.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	2
1. OBJETIVOS	5
1.1 OBJETIVO GENERAL	5
1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	5
2. MARCO REFERENCIAL	6
2.1 ORIGEN Y DOMESTICACION DE LA PAPA <i>Solanum phureja</i>	6
2.2 ASPECTOS BOTÁNICOS	7
2.2.1 Clasificación Botánica	7
2.2.2 Papa Criolla (<i>Solanum phureja</i>)	7
2.3 IMPORTANCIA ECONOMICA	8
2.4 DIVERSIDAD GENETICA Y CONSERVACION	9
2.5 CRIOCONSERVACION	10
2.6 REPORTES DE INVESTIGACIONES REALIZADAS EN <i>Solanum</i>	13
3. METODOLOGÍA	17
3.1 LOCALIZACION	17
3.2 SELECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	17
3.3 PROPAGACIÓN DEL MATERIAL	17
3.4 EVALUACION DE PROTOLOCOS DE <i>Solanum</i>	18
3.5 AJUSTES EVALUADOS	18
3.5.1 Medios de propagación	20
3.5.2 Calidad del tejido	21
3.5.3 Encapsulación de los ápices	21
3.5.4 Concentración y tiempo de exposición a sacarosa	22
3.5.5 Deshidratación en sílica – gel	22
3.5.6 Efecto de la solución cargadora y soluciones PVS2 y PVS4	23
3.6 DISEÑO EXPERIMENTAL	24
4. RESULTADOS	25
4.1 PRIMERA FASE: CORPOICA	25
4.2 SEGUNDA FASE: CIAT	28
4.2.1 Medios de propagación	30
4.2.2 Calidad del tejido	32
4.2.3 Efecto de la concentración y tiempo de exposición a Sacarosa	35
4.2.4 Deshidratación en sílica – gel	37
4.2.5 Efecto de la solución cargadora y de las soluciones	

	PVS2 y PVS4.	39
5.	CONCLUSIONES	43
6.	RECOMENDACIONES	46
	BIBLIOGRAFÍA	47
	ANEXOS	51

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Protocolos de crioconservación para <i>Solanum</i> evaluados en la primera fase.	19
Tabla 2. Ajustes evaluados en los protocolos.	19
Tabla 3. Medios de propagación evaluados	20
Tabla 4. Medios de preacondicionamiento	21
Tabla 5. Resultados obtenidos en la primera fase para la evaluación de las metodologías.	27
Tabla 6. Efecto de los tiempos de secado en sílica gel y de los pretratamientos en sacarosa en la respuesta de ápices encapsulados sin congelar de <i>S.phureja</i> 100.	38
Tabla 7. Efecto del tiempo de secado en sílica gel sobre ápices no congelados de <i>S. phureja</i> 100 para la variable % de brotes.	38
Tabla 8. Efecto de la concentración del glicerol en la solución de cargado sobre ápices no congelados de <i>S. phureja</i> 100 para la variable número de Brotes.	40
Tabla 9. Efecto de la concentración del glicerol en la solución de cargado sobre ápices no congelados de <i>S. phureja</i> 100 para la variable número de callos.	40
Tabla 10. Efecto de las soluciones PVS2 y PVS4 sobre ápices no congelados de <i>S. phureja</i> 100 para la variable porcentaje de Brotes.	41
Tabla 11. Efecto de las soluciones PVS2 y PVS4 sobre ápices no congelados de <i>S. phureja</i> 100 para la variable porcentaje de callo.	42

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Recuperación de ápice congelado en la primera fase, mediante la técnica de Debabrata. (a) Fase inicial de desarrollo de callo. (b) Propagación de plántulas emergidas del callo inicial.	26
Figura 2. Recuperación de ápice congelado en la segunda fase (CIAT) <i>S. phureja</i> .	29
Figura 3. Efectos de las condiciones de propagación: a. Medio convencional (25 °C; 30 explantes por frasco) b. Medio ajustado (21 °C; 10 explantes por frasco).	31
Figura 4. Efecto del medio de preacondicionamiento sobre el crecimiento de los ápices a 21 días.	34
Figura 5. Comparación de las curvas de crecimiento de los ápices preacondicionados a 21 días.	35
Figura 6. Efecto de la concentración de sacarosa sobre el porcentaje de brotación de los ápices a diferentes tiempos de exposición.	36
Figura 7. Efecto de los tiempos de exposición al secado en sílica gel, sobre el porcentaje de brotación de los ápices.	37

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Medio de recultivo.	51
Anexo B. Soluciones de Encapsulación y vitrificación.	51
Anexo C. Promedios de las mediciones para las variables largo y ancho en los medios de preacondicionamiento.	52
Anexo D. Análisis de Varianza para la Deshidratación en sílica-gel.	52
Anexo E. Análisis de varianza para la soluciones de cargado.	54
Anexo F. Análisis de Varianza para las soluciones PVS.	55

ABREVIATURAS

AG ₃	: Ácido Giberélico - 3.
AIA	: Ácido Indol acético.
ANA	: Ácido Naftalen acético.
BAP	: Benzil amino purina.
BSA	: Albúmina de Suero Bovino.
CIAT	: Centro Internacional de Agricultura Tropical.
CIP	: Centro Internacional de la Papa.
CORPOICA	: Corporación Colombiana de Investigación Agrícola.
° C	: Grados Centígrados.
DMSO	: Dimetil Sulfoxido.
FAO	: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la alimentación.
g	: Gramos.
h	: Horas.
ha	: Hectáreas.
Kin	: Kinetina.
M & S	: Murashige & Skoog.
min	: Minutos.
mm	: Milímetros.
M	: Molar.
mM	: Milimolar.
uM	: Micromolar.
NL	: Nitrógeno líquido.
PVS2	: Solución de vitrificación 2.
PVS4	: Solución de vitrificación 4.
r.p.m	: Revoluciones por minuto.
R3	: Medio de cultivo para recuperación de ápices crioconservados.
TDZ	: Tiazurón
%	: Porcentaje.

GLOSARIO

ACCESIÓN: Designación oficial dada a la entrada de un material vegetal al banco de germoplasma.

CALLO: Conjunto de células desorganizadas originadas por el parénquima o por cualquier explante, por medio de división celular.

CÁPSULA: Gota de alginato polimerizado en la que se incluye un ápice.

CARBON ACTIVADO: Carbón vegetal empleado para la absorción de sustancias que pueden ser tóxicas como fenoles y polifenoles en los medios de cultivo.

CRIOPROTECTOR: Sustancia de carácter químico, cuya finalidad es proteger el tejido de la deshidratación excesiva e impedir la formación de hielo en el mismo.

ESTRÉS: Cambio de las condiciones óptimas para la vida que altera las respuestas locales o sistémicas del organismo.

EXPLANTE: Parte separada de un vegetal.

HIPERHIDRATACION: Conjunto de características físicas, que describen cambios en las hojas, tallo y raíces, que les dan una apariencia cristalina, acuosa, húmeda y translúcida. Estos desórdenes, especialmente manifiestos en las hojas, y afectan a dos de los procesos más importantes que realizan las hojas: la fotosíntesis y el intercambio gaseoso.

MERISTEMO: Grupo de células vegetales capaz de realizar divisiones en forma mas o menos continua.

OSMOTICO: Compuesto químico con propiedades que producen deshidratación celular.

PLASMOLISIS: Encogimiento del protoplasto debido a la pérdida de agua por ósmosis.

REGULADOR DE CRECIMIENTO: Sustancia sintetizada en una parte del organismo que se transporta hacia otra, con el objeto de ejercer control sobre alguna fase del proceso de crecimiento.

VACUOLA: Espacio o cavidad en el protoplasma que en su interior se aloja una solución acuosa, limitado por una membrana.

RESUMEN

Se evaluaron cuatro metodologías de crioconservación reportadas hasta la actualidad para papa en una accesión de *S. phureja*. Se propusieron algunos ajustes a las metodologías de Encapsulación – deshidratación y Encapsulación – vitrificación, dedicando especial atención a las etapas previas a la congelación, tales como: medios de propagación, calidad del tejido, encapsulación, pretratamiento en sacarosa, tiempos de secado en sílica gel y evaluación de soluciones cargadoras y de vitrificación PVS2 y PVS4, logrando establecer que son muchos los posibles factores que afectan el éxito de un proceso de crioconservación.

Se logró el establecimiento de un medio de preacondicionamiento M & S suplementado con BAP 0.18 uM y GA3 0.28 uM durante 5 días y la suplementación del alginato permitió una mejoría en cuanto a la respuesta de los ápices en las etapas previas al congelamiento.

INTRODUCCIÓN

La conservación de un recurso genético tiene como objeto mantener a disposición la variabilidad genética de especies de importancia socioeconómica actual y potencial, para su uso en programas de mejoramiento genético y procesos biotecnológicos. Se han planteado dos formas de conservación como son *in situ* y *ex situ*: (1) *in situ* que implica la conservación de las especies y su diversidad en su hábitat natural, permitiendo los procesos evolutivos; y (2) *ex situ*, donde se efectúa la conservación de algunos componentes de la diversidad biológica fuera de su hábitat natural y se mantienen en bancos de semillas, *in vitro* o campo; éstas deben ser complementarias en cuanto al manejo, empleo y distribución del germoplasma¹.

El cultivo *in vitro*, ofrece una estrategia para conservar la información genética de algunas especies que se propagan vegetativamente y para otras que poseen semillas recalcitrantes, donde el almacenamiento en forma de semillas no es posible, ya que éstas presentan esterilidad, limitada fertilidad ó son semillas altamente heterocigotas. Algunas de estas especies son de importancia agrícola y económica y en estos casos se prefiere la propagación clonal².

En el ámbito de la conservación, las especies que poseen semillas recalcitrantes también presentan las limitantes de perder rápidamente su viabilidad, ya que no toleran la desecación requerida para el almacenamiento de semillas a largo plazo y en algunos casos, presentan alta sensibilidad al frío y al secado. Así que convencionalmente, la conservación de éstas se realiza en campo donde no se puede garantizar la seguridad ante el riesgo de pérdida por ataque de plagas y patógenos o por desastres naturales; por tales motivos la conservación *in vitro* brinda mas seguridad³. Esta ofrece varias metodologías de almacenamiento de acuerdo a la duración del almacenamiento, dentro de los cuales se encuentran la conservación a corto, mediano y largo plazo. Las dos primeras pueden llevarse a cabo mediante

¹ HARDING, K. Approaches to asses the genetic stability of plant recovered from *in vitro* culture. En: *In vitro* conservation of plant genetic resources. University of Kebangsaan. Malasya. 1996. p. 135.

² ASHMORE, SARAH E. Status report on the development and application of *in vitro* techniques for the conservation and use of plant genetic resources. IPGRI. Roma, Italia. 1997. p. 4.

³ Ibid., p. 4.

métodos de lento crecimiento, a través del uso de modificaciones al medio de cultivo, por adición de inhibidores osmóticos, hormonales y por otros como el uso de retardantes de crecimiento, la reducción de la temperatura de almacenamiento, capas de aceite mineral y disminución de los niveles de oxígeno disponibles en los cultivos⁴. Cabe destacar que la conservación *In vitro* presenta ciertas desventajas como son: altos costos de mantenimiento, riesgo de variación somaclonal e inestabilidad genética. La conservación a largo plazo se refiere al almacenamiento a temperaturas ultra bajas, en las que el material vegetal se puede conservar sin alteraciones o modificaciones genéticas, al menos teóricamente, por un periodo de tiempo ilimitado y en un pequeño espacio⁵. Dentro de las estrategias de conservación a largo plazo, la crioconservación ofrece una alternativa viable y proporciona la posibilidad de mantener una copia de seguridad de las colecciones por tiempo indefinido bajo condiciones que garanticen mayor estabilidad genética de variedades ancestrales, silvestres, mejoradas y genotipos derivados de procesos biotecnológicos.

A *Solanum phureja* pertenecen las papas amarillas ó “criollas”, es una especie importante para el país, ya que ofrece una alternativa alimenticia de alto valor nutricional, como además presenta alta precocidad comparada con otras variedades. Desde el punto de vista económico, el cultivo de papa ocupa el tercer lugar en área sembrada y el primero en valor de la producción de 170.000 ha sembradas solo el 7 % corresponden a *S. phureja*⁶. Sin embargo en la actualidad se están llevando a cabo estudios para impulsar su procesamiento industrial enfocado a la exportación.

Desde el punto de vista de la conservación de recursos genéticos, *Solanum phureja* es un cultivar importante en fitomejoramiento, porque posee genes de resistencia a *Phytophthora infestans*; por lo cual es empleado en mejoramiento junto con especies silvestres para obtener variedades comerciales con un grado de resistencia al patógeno.

Debido a la importancia de este cultivar, Corpoica Tibaitatá, particularmente el programa nacional de recursos genéticos y biotecnología vegetal, tiene la responsabilidad de mantener y administrar la Colección Central Colombiana (C.C.C.) de Papa, que cuenta con 1098 accesiones de las subespecies *S. andigena*, *S. tuberosum*, y *S. phureja*; esta última comprende 113 accesiones conservadas bajo condiciones controladas de crecimiento mínimo *in vitro* y

⁴ RAMANATHA, V. The Use of Biotechnology for Conservation and Utilization of Plant Genetic Resources. En: Plant Genetic Resources Newsletter. 1994. No. 97. P. 8 - 9.

⁵ ENGELMAN, F. *In vitro* conservation of horticultural genetic resources review of the state of the art. IPGRI. Roma, Italia. 1998. <http://wchr.agrsci.unibo.it/wc2/engelmann.html>. p.1

⁶ <http://www.cipotato.org/wpa/samerica/Colombia.htm>. p. 33,36.

con un periodo de subcultivo que oscila entre 4 a 6 meses, dependiendo del genotipo; en campo se mantienen 53 accesiones con un periodo anual de subcultivo. Esta colección cuenta con tres sistemas de conservación: *in vitro*, en campo y en cava fría a 0 ° C⁷. Basada en su variabilidad genética la FAO consideró esta colección como la segunda más importante en el ámbito mundial en 1996⁸.

Dado que el presente estudio, es el primero que se lleva a cabo en Corpoica Tibaitatá a nivel exploratorio en el área de la crioconservación, éste tiene la finalidad de evaluar algunas metodologías establecidas para la especie papa tomando como modelo una accesión de *S. phureja* y proponer así ajustes en dichas metodologías.

En términos generales, este trabajo conduce a sugerir que se debe continuar la investigación en esta área pues aún quedan muchos aspectos por explorar.

⁷ FAJARDO, D. Sistemas Banco de Germoplasma Base. En: INFORME ANUAL. PROGRAMA NACIONAL DE RECURSOS GENÉTICOS Y BIOTECNOLOGÍA VEGETAL. 2001. Mosquera. Corpoica Tibaitatá.

⁸ FAO. Estado de la Diversidad. En: Informe Sobre el Estado de los Recursos fitogenéticos en el Mundo. FAO. Roma. 1996. p. 9.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar cuatro metodologías de crioconservación reportadas para papa.

1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

Seleccionar una accesión modelo a partir de la Colección Central Colombiana de Papa de la colección *in vitro Solanum phureja* que permita iniciar los estudios de crioconservación en esta especie.

Proponer algunos ajustes en las técnicas de crioconservación para *Solanum phureja*.

Estimar el efecto de las Citocininas y Giberelinas en los medios de propagación.

Evaluar la etapa posterior a la extracción de los ápices, a través de medios de preacondicionamiento.

2. MARCO REFERENCIAL

2.1 ORIGEN Y DOMESTICACION DE LA PAPA *Solanum phureja*

El origen de *Solanum phureja* es de carácter desconocido, al parecer el centro de origen de esta especie se encuentra en el altiplano entre Perú y Bolivia, alrededor del lago Titicaca, debido a que en esta zona se encuentra la mayor variabilidad genética de especies silvestres y variedades cultivadas de *Solanum sp*⁹. *Solanum phureja*, es una especie diploide ($2n = 24$), que se distribuye geográficamente desde el norte de Bolivia hasta el sur occidente venezolano con un centro de diversidad en el sur de Colombia, en el departamento de Nariño y el norte del Ecuador.

Estrada¹⁰, sostiene que ésta fue domesticada hace por lo menos 10.000 años en el altiplano, al suroeste del Perú y noroeste de Bolivia. No se conoce con exactitud el ancestro silvestre que originó las especies cultivadas diploides. Es posible que haya desaparecido al cruzarse con varias especies semi-cultivadas o silvestres. Entre las cuales se han citado *Solanum leptophyes*, *S. canasense*, *S. sparsipilum* (Hawkes, 1978b), *S. brevicaule* y *S. vernei* (Grun, 1990).

Con la domesticación, del cultivo de la papa y de otros tubérculos y raíces se originó la agricultura alto andina, cuyas principales especies fueron cultivadas a lo largo de toda la cordillera por la interconexión de los pueblos andinos y de acuerdo con las condiciones agroecológicas regionales. La papa criolla *Solanum phureja*, fue originalmente adaptada por sucesivas siembras realizadas por los indígenas de los Andes, donde otros cultivos no habían logrado ser adaptados¹¹.

⁹ ESTRADA, N. La biodiversidad en el mejoramiento genético de la papa. CID, Bolivia, 1996. p. 25.

¹⁰ Ibid., p. 25.

¹¹ LUJAN, C. L. Historia de la papa. En: Papa. Santafé de Bogotá. No. 16 (Dic. 1996). p. 4 - 27.

2.2 ASPECTOS BOTANICOS

2.2.1 Clasificación Botánica¹²

Nombre científico	: <i>Solanum phureja</i>
Nombre vulgar	: Papa criolla
Filum	: Angiosperma
Clase	: Dicotiledónea
Orden	: Tubifloras
Familia	: Solanaceae
Subfamilia	: Solanoideae
Tribu	: Solaneae
Género	: Solanum
Subgénero	: <i>Solanum</i>
Especie	: <i>phureja</i>

2.2.2 Papa Criolla (*Solanum phureja*)

Como lo expresa Lujan¹³, esta especie se caracteriza por su precocidad, los tubérculos son producidos en tres o cuatro meses bajo condiciones de días cortos. Poca pubescencia de la hoja y un tono amarillo verdoso, el follaje es recto y de unos 0.60 m. de alto. Poseen varios tallos con muchas ramas y numerosas hojas pequeñas a medianas. Las plantas comienzan a germinar alrededor de los veinte días. A los cuarenta comienza la floración, cuando tienen alrededor de 0.30 m de alto, manteniendo la floración hasta la cosecha.

Según Lora¹⁴, en general el cultivo requiere de clima suave y húmedo con ausencia de heladas durante el periodo vegetativo, agua bien distribuida para su mantenimiento, pisos térmicos entre los 1500-3000 m.s.n.m.

De acuerdo con Bolivar¹⁵, la planta se puede reproducir sexual y asexualmente. Con la reproducción sexual, los mejoradores incrementan la variabilidad genética para la formación de nuevos genotipos y se efectúa

¹² LOPEZ, L. E. Las papas silvestres de Colombia. En: Papa. Santafé de Bogotá: FEDEPAPA No. 7 (Abril 1993). p. 5.

¹³ LUJAN, C. L. Op. Cit. p. 4-27.

¹⁴ LORA, S.R. Fertilización de la papa en Colombia. En: Papa. Santafé de Bogotá. 1950. p. 26-36.

¹⁵ BOLIVAR, R., LOPEZ, G. Genética de la papa y su mejoramiento. En: Cuarto curso de actualización de conocimiento del cultivo de papa. Bogotá. 1985. p. 1-5.

mediante el empleo de semilla botánica; con la reproducción asexual se fijan los genes introducidos en el material genético mejorado. Este tipo de reproducción se realiza comercialmente por tubérculos - semilla; otras formas no comerciales son: esquejes y cultivo *in vitro* de tejidos.

Las especies de género *Solanum*, que tuberizan, han sido clasificadas dentro de una serie euploide que va desde el nivel diploide, hasta el nivel hexaploide, el mayor porcentaje corresponde a los diploides ($2n = 24$ cromosomas), por lo tanto en éste nivel se encuentra la fuente de germoplasma más importante para el mejoramiento, dentro de la cual se encuentra *Solanum phureja*.

2.3 IMPORTANCIA ECONOMICA

La papa es el cuarto cultivo alimenticio en orden de importancia en el mundo, después del trigo, el arroz y el maíz. La producción anual representa aproximadamente la mitad de la producción mundial de todas las raíces y tubérculos, llegando a más de 1000 millones de consumidores, de los cuales aproximadamente la mitad pertenecen a países en vías de desarrollo. En total se producen 247 millones de toneladas de tubérculos, siendo los principales productores Europa, Asia y Norteamérica. El mayor volumen de producción de papa en Suramérica lo tiene Colombia seguido de Brasil, Argentina y Perú. Particularmente en Colombia, la papa tiene gran importancia en los sistemas de producción de clima frío, ya que favorece la economía campesina, por la alta generación de empleos directos en el sector rural¹⁶.

En el ámbito alimenticio, la papa criolla aporta el doble de contenido de fibra, fósforo y mayor cantidad proteica comparada con otras variedades¹⁷; de igual modo, la coloración amarilla es una característica varietal que está altamente relacionada con el contenido de carotenos, precursores de la vitamina A.¹⁸

¹⁶ MORENO, José Dilmer. Problemática de la papa en Cundinamarca y Boyacá. Comunicaciones y Asociados. 2000. p. 93.

¹⁷ GOMEZ, M., REYES, P. Propagación y tuberización *in vitro* de tres variedades de papa criolla *Solanum phureja* de la Colección Central Colombiana de Papa. Santafé de Bogotá. 1998. p. 15. Trabajo de grado (Licenciado en Biología) Universidad Francisco José de Caldas. Facultad de Ciencias y Educación.

¹⁸ ROBLES, Hugo R., Delgado, C. Informe: Investigación y transferencia de tecnología sobre calidad de almidones, azúcares y valoración energética de materiales de papa. Programa Nacional de Maquinaria Agrícola y Postcosecha. Bogotá, Junio 30 DE 2002. p. 9.

2.4 DIVERSIDAD GENETICA Y CONSERVACION

Debido a que la papa es un producto de alto consumo en los países en vías de desarrollo, existe la necesidad de buscar alternativas de conservación de la diversidad genética de dicha especie que garanticen la seguridad del material vegetal ante el posible riesgo de pérdida de la información genética.

Estrada¹⁹, registra que los ancestros de la papa cultivada en la actualidad tienen un valor singular por dos razones principales:

1. Alta variabilidad genética. Las especies silvestres constituyen un reservorio de genes muy importante por sus características de resistencia a plagas y enfermedades, así como por su adaptación a factores abióticos y climáticos como heladas, sequía, granizo, suelos ácidos, etc. Se cuenta aproximadamente con 200 sp. de las cuales se llega a 2000 incluyendo sus variantes.
2. Debido a que no tienen diferencias básicas estructurales en sus cromosomas, porque los cambios en los cromosomas se realizaron por mutaciones simples. Esta característica es definitiva para obtener fertilidad y para facilitar la transferencia de genes de los híbridos a la generaciones siguientes.

En este momento, el Centro Internacional de la Papa (CIP) tiene centradas sus investigaciones en *S. phureja* con el objeto de encontrar los caracteres cuantitativos que contienen los genes de resistencia asociados a la enfermedad del tizón tardío (*Phytophthora infestans*), hecho en el que se fundamenta la importancia de la diversidad genética²⁰.

Otro aspecto que en la actualidad preocupa es la incidencia de la "erosión genética" (disminución de la variabilidad genética), ésta se ha venido presentando como consecuencia de la agricultura comercial moderna y con esto, la pérdida de variedades tradicionales de los agricultores con una diversidad elevada²¹.

2.5 CRIOCONSERVACION

La crioconservación está definida como la conservación a temperaturas ultrabajas, tal es el caso cuando se mantiene un material bajo condiciones de

¹⁹ ESTRADA, Op. cit. p. 25

²⁰ <http://www.cipotato.org/market/ARs/Ar2001e/10tapping.htm>. p. 4

²¹ FAO., Op., cit. p. 13.

nitrógeno líquido (-196 °C) o en su fase de vapor (-120 °C). Mediante este procedimiento, virtualmente se suspenden todos los procesos metabólicos en cualquier tejido vivo, semillas, suspensiones celulares, callos, tejidos cultivados, polen o ápices meristemáticos²².

La crioconservación abarca una serie de metodologías que se encuentran enmarcadas dentro de dos grupos de técnicas como son: clásicas y modernas. Las primeras se basan en la crioprotección química, donde la deshidratación de los tejidos es paralela a la congelación lenta. Las modernas, están basadas en el principio de vitrificación, el cual permite la transición de agua a una fase amorfa o vítrea, en la que se impide la formación de cristales de hielo, los cuales son perjudiciales para la integridad celular. La principal ventaja que tienen estas técnicas respecto a las clásicas, es su simplicidad, ya que éstas no requieren el uso de congeladores programables y su aplicabilidad está dirigida a un amplio rango de genotipos²³.

De acuerdo con Whitters²⁴ los pasos básicos que se llevan a cabo en una técnica de crioconservación son: pretratamiento, crioprotección, congelamiento, almacenaje, descongelación, pruebas de viabilidad y recuperación; los cuales se describen a continuación:

- **Pretratamiento**

La selección del material vegetal es determinante, ya que se deben preferiblemente explantes jóvenes provenientes de condiciones *in vitro* en lo posible. Además, éstos deben garantizar estabilidad genética y uniformidad de la progenie. Los meristemas apicales pueden garantizar un sistema de regeneración que se ajuste al modelo para la crioconservación, por su estructura, fisiología y tamaños pequeños.

El grado de tolerancia de las plantas a temperaturas ultra bajas depende de su genotipo, de las condiciones fisiológicas, y del ambiente en que crecen.

²² ENGELMAN, F. Op cit., p.1

²³ Ibid., p. 2.

²⁴ WHITERS. **Germplasm preservation through tissue culture: an overview.** Citado por MROGINSKI, L. A.; ROCA, W. M.; KARTHA, K. K. *Cryoconservación del germoplasma. Cultivo de tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones.* Cali. CIAT. 1991. p. 717.

La viabilidad del explante, puede aumentar si se somete a crioconservación en fases específicas de su crecimiento como: El estado globular en los embriones somáticos, la fase exponencial de las suspensiones celulares, y los meristemos luego de su extracción. El precultivo del material vegetal puede ser de gran ayuda para el proceso de crioconservación.

- **Crioprotección**

Permite proteger el material vegetal de los daños que pueden ocurrir en las etapas de congelamiento y descongelamiento; para esto se utilizan sustancias crioprotectoras, dentro de las cuales las más usadas son DMSO (5 % - 15 %) y glicerol (5 % - 20 %), también se emplean azúcares-alcoholes, aminoácidos y polímeros de alto peso molecular; de los cuales en muchos casos se utilizan mezclas. El tipo y la concentración de dichas sustancias crioprotectoras debe determinarse para cada especie; se debe tener en cuenta la citotoxicidad de la mayor parte de estas sustancias en concentraciones altas.

- **Congelación**

Existen tres procedimientos de congelación: rápida, lenta y escalonada. En la primera el material se coloca directamente en nitrógeno líquido. La velocidad de enfriamiento puede ser hasta de 1000 °C/min. Uno de los riesgos de este procedimiento es la formación de cristales intracelulares de hielo que pueden dañar el material vegetal. Este efecto se evita utilizando sustancias crioprotectoras adecuadas y procurando que la congelación se produzca tan rápido como sea posible. En el congelamiento lento el material se congela de modo gradual, disminuyendo la temperatura la cual puede oscilar entre 0.1 y 3 ° C/min. Y en el escalonado el material vegetal se somete sucesivamente a varias temperaturas por debajo de 0 ° C y se mantiene en cada una de ellas durante cierto tiempo; posteriormente, se sumerge en NL.

- **Almacenaje**

La forma más adecuada de almacenamiento es la que se realiza a temperaturas como las del NL (-196 ° C), lo que posibilita el cese de prácticamente toda actividad metabólica. El uso de congeladores que brinden temperaturas de almacenaje -70 y -100 ° C puede ser otra alternativa, pero no es recomendable para la conservación a largo plazo.

- **Descongelamiento**

Se lleva a cabo en forma rápida por medio del baño de maría de 1 - 3 minutos de duración en agua a 38 ° C (ó de acuerdo a lo establecido en cada metodología de trabajo); para el caso de material congelado con sustancias crioprotectoras, éstas deben ser removidas por medio de lavados con soluciones cuya concentración sea similar a las condiciones de deshidratación de donde viene el material, para evitar la desplasmólisis.

- **Pruebas de Viabilidad**

La estimación de la viabilidad puede hacerse de diferentes maneras: recultivando para determinar la capacidad de regenerar plantas o mediante técnicas colorimétricas que determinen indirectamente la actividad celular. Sin embargo esto no garantiza que el tejido crioconservado regenere plantas posteriormente.

- **Recuperación**

Una vez descongelado el material vegetal debe recultivarse utilizando, en general, los mismos medios y condiciones en que crecía antes de su congelamiento²⁵. Teniendo en cuenta que el material viene de una condición alta de estrés, se debe buscar una formulación adecuada de los medios para la recuperación de los explantes. Es importante tener en cuenta que estos deben colocarse en oscuridad o a baja intensidad lumínica por pocos días para evitar efectos dañinos por fotooxidación. El cultivo de explantes sobre un medio de cultivo modificado durante un corto periodo, se realiza en casos donde el crecimiento debe ser estimulado²⁶.

Existen siete procedimientos basados en vitrificación: encapsulación-deshidratación, vitrificación, encapsulación-vitrificación, desecación, precultivo, precultivo - desecación y gota congelada. Un aspecto común entre estos, es que el paso crítico para lograr la sobrevivencia son las fases previas al congelamiento y no el congelamiento en sí, tal como sucedía en las técnicas clásicas²⁷.

²⁵ MROGINSKI, L. A.; ROCA, W. M.; KARTHA, K. K. Cryoconservación del germoplasma. Cultivo de tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. Cali. CIAT. 1991. p. 725.

²⁶ ENGELMANN. Op., cit., p. 14

²⁷ ENGELMANN, F. Importance of desiccation for the Cryopreservation of recalcitrant seed and vegetatively propagated species. En: Plant Genetic Resources Newsletter. IPGRI. Roma. Italia. 1997. No 112. p 9.

Las investigaciones en papa, que han mostrado algunos resultados interesantes están basados en las metodologías que se enuncian a continuación:

Encapsulación-deshidratación: Esta técnica se basa en la tecnología desarrollada para la producción de semillas sintéticas, en la cual los explantes se encapsulan en gotas de gel hidrosoluble. Para la crioconservación, la encapsulación permite someter al explante a drásticos tratamientos, que podrían ser letales para explantes no encapsulados, pero estos son necesarios para la sobrevivencia del material después del congelamiento. La técnica de encapsulación-deshidratación fue implementada en proceso de crioconservación por Dereuddre empleando ápices de plantas *in vitro* de pera, papa y embriones somáticos de zanahoria, siendo aplicado actualmente a un gran número de especies²⁸.

Vitrificación: Este procedimiento implica el pretratamiento de las muestras con soluciones crioprotectantes de alta concentración para posteriormente sumergirlas en NL, a fin de lograr la vitrificación de los solutos internos. Las mezclas de soluciones crioprotectantes que requieren estos protocolos son tóxicas para las células y se debe tener cuidado con la temperatura, el tiempo de exposición a estas soluciones según el tamaño del explante y al momento de remover la solución en la etapa de descongelación.

Encapsulación-vitrificación: Es la combinación de los procedimientos anteriores, las muestras son encapsuladas en gotas de alginato y tratadas con soluciones vitrificantes antes del congelamiento. La cápsula reduce la toxicidad de la solución vitrificante y desde el punto de vista práctico se reduce el número de manipulaciones y la duración total del procedimiento.

2.6 REPORTES DE INVESTIGACIONES REALIZADAS EN *Solanum*

Los primeros trabajos en el área de la crioconservación en papa fueron realizados por Bajaj en 1977²⁹, quienes usaron una solución crioprotectora compuesta por DMSO, Glicerol y Sacarosa; en 1978 Grout y Henshaw³⁰,

²⁸ ENGELMANN, F. 2000. Conferencia Crioconservación principios y práctica. Memorias del curso Técnicas de Crioconservación para plantas tropicales: Nuevas opciones para la conservación del germoplasma vegetal. CATIE. Costa Rica. 2000. p. 1.

²⁹ BOUAHAL, S., DEREUDDRE, J. Cryopreservation of potato shoot tips by encapsulation – dehydration. Potato Research Vol. 39. París. 1996. p. 69.

³⁰ Ibid., p. 69

usaron solo DMSO como crioprotector y congelación ultra rápida, logrando bajas tasas de viabilidad (20- 26 %) con formación de callo.³¹

En 1981, en la Universidad de Wisconsin se adelantaron estudios con la especie *S. tuberosum*, usando ápices meristemáticos provenientes de plantas obtenidas a partir de tubérculos brotados en invernadero. Se empleó un congelamiento gradual y se evaluaron los siguientes parámetros: duración y concentración del pretratamiento en DMSO, efecto de la temperatura de congelamiento y de la tasa de descongelamiento, obteniéndose rangos de sobrevivencia del 45 % - 85 %³² en formación de brotes, debidos a que los procedimientos de congelamiento lento que se siguieron fueron apropiados.

Bajaj en 1985, evaluó la viabilidad de meristemas de *Solanum tuberosum* crioconservados por más de cuatro años, con el fin de demostrar que la duración de almacenamiento en nitrógeno líquido no afectaba la tasa de sobrevivencia³³.

En 1989, Harding y Benson³⁴, reportaron los efectos de los regímenes de luz sobre la recuperación de yemas apicales de dos variedades de *S. tuberosum*, crioconservadas. Estos autores usaron técnicas clásicas, DMSO al 10 % y lograron determinar que son muchos los factores en las etapas de pre y postcongelamiento que intervienen en la sobrevivencia del material, al igual que una respuesta varietal frente a la técnica y a las condiciones de luz antes y después del congelamiento que favorecer la recuperación del material crioconservado.

Fabre y Dereuddre en 1990³⁵, reportaron por primera vez la crioconservación en papa para la especie *S. phureja* a partir de meristemas apicales, adoptando la metodología de encapsulación-deshidratación. En esta

³¹ Ibid., p.70

³² TOWILL, L. E. *Solanum etuberosum*: A model for studying. The cryobiology of shoot-tips in the tuber-bearing *Solanum* species. Plant Science Letters, 20. 1981. University of Wisconsin, Madison, (USA). p. 315-324

³³ BOUAHAL, S. Op. Cit. p. 69-78.

³⁴ BENSON, E. Variation in recovery of cryopreserved of shoot tips of *S. tuberosum* exposed to different pre and post freeze light regimes. En: Cryo-Letters. Cambridge. 1989. Vol. 10. p. 323-344.

³⁵ FABRE, J., DEREUDDRE, J. Encapsulation-dehydration: A new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot tips. En: Cryo-Letters. Cambridge. 1990. Vol. 11. p. 413-426.

investigación, se reporta el congelamiento programado y rápido, empleando flujo de aire estéril para la deshidratación de las cápsulas. Mediante el uso de 0.5 y 0.75 M de sacarosa en el precultivo durante 24 h y la inmersión directa en NL, obtuvo una tasa de sobrevivencia del 7.8 y 19.6 % respectivamente, sin embargo no hubo desarrollo de los ápices a brotes. En congelamiento programado mejoró la sobrevivencia a 27.8% y 41.2% para 0.5 M y 0.75 M de sacarosa por 24 h. Aunque en 0.5 M de sacarosa algunos ápices se restablecieron directamente a brotes, el porcentaje de recuperación fue bajo (menor al 10%). Aumentando del tiempo de exposición a 72 h en el precultivo con 0.75 M de sacarosa, el desarrollo de brotes llegó a 26.5 %, en ápices congelados.

En 1991, Benson y Harding³⁶, estudiaron la recuperación de las yemas cultivadas *in vitro* y crioconservadas en dos variedades de *S. tuberosum*; al igual que en el anterior reporte, se realiza congelamiento programado y ultra rápido. La crioprotección se lleva a cabo con DMSO 10 % durante 1 hora; con lo cual establecieron que este método solo es viable para congelamiento ultra rápido y la respuesta en la recuperación de los brotes presenta diferencias significativas entre las dos variedades estudiadas.

En los últimos años, Schäfer y su grupo³⁷, se han dedicado a establecer el método de la micro gota, basado en el congelamiento ultra rápido, empleando yemas ápicales incubadas en DMSO y transferidas directamente a criotubos donde son rápidamente sumergidas en NL. En este estudio se emplearon 219 variedades, con porcentajes de sobrevivencia entre un 6 – 100 %, con un promedio del 40 % de regeneración a plantas.

La crioconservación de *Solanum* ha sido ampliamente desarrollada por el Centro Internacional de la Papa (CIP)³⁸, donde se evaluó en 1996, la metodología desarrollada por Steponkus³⁹. En esta los explantes se someten a una solución deshidratante y crioprotectora de BSA (50 : 15 : 6), durante 50 minutos a temperatura ambiente y empleando el congelamiento rápido. Se evaluaron 183 genotipos de *Solanum*, usando explantes axilares

³⁶ HARDING, K., BENSON, E. The effect of pre-freeze *in vitro* culture period on the recovery of cryopreserved shoot tips of *Solanum tuberosum*. *Cryo-Letters* Cambridge, U.K. 1991. Vol. 12. p.17-22.

³⁷ SHÄFER, A. Long term storage of old potato varieties by cryopreservation of shoot tips in liquid nitrogen. Alemania. En: <http://www.ipgri.cgiar.org>

³⁸ GOLMIRZAI, A. M. PANTA, A. Advances in potato cryopreservation by vitrification. En: <http://www.cipotato.org>. CIP. 1996. p. 1-7.

³⁹ STEPONKUS, P. Cryopreservation of plant tissues by vitrification. *Advances in low temperature biology*. 1992. Vol.1. p. 1-16.

se obtuvieron porcentajes de sobrevivencia entre el 0 – 80 % con un promedio del 33 % de formación de brotes entre especies y con ápices se obtuvo un rango de sobrevivencia entre el 45 - 90 % con un promedio del 67% en formación de brotes. Dentro de los genotipos evaluados, la especie *S. phureja* mostró las tasas de sobrevivencia más altas, con un promedio del 80 % de formación de brotes a partir de explantes apicales, pero esta respuesta disminuye si el explante es axilar, el cual da un promedio del 40 % de formación de brotes.

En 1996, Dereuddre y colaboradores⁴⁰, reportaron resultados satisfactorios para tres clones de *S. phureja* y dos de *S. tuberosum*, empleando la técnica de Encapsulación-deshidratación, realizando la deshidratación en sílica gel, las tasas de recuperación fueron del 58 – 77 % en formación de brotes.

Posteriormente, el Instituto Central de Investigaciones en papa de Pradesh (India)⁴¹ reporta una metodología empleando la técnica de vitrificación para cinco clones de la especie *S. tuberosum*, usando una solución vitrificante de PVS2 (Etilen glicol: Glicerol: DMSO) al 20 %, 60 % y 100 %, obteniendo un promedio de recuperación del 54 %. De los cuales sólo el 50% de los ápices vitrificados formó brotes directamente.

Teniendo en cuenta que las metodologías desarrolladas para crioconservación de papa no muestran resultados totalmente satisfactorios, Hirai & Sakai⁴² en el 2000 evaluaron la técnica de Encapsulación-vitrificación empleando el cultivar Danshakuimo. Los meristemos que se osmoprotegieron con una mezcla de 2 M de glicerol y 0.6 M de sacarosa por 90 min., antes de la deshidratación con PVS2 y sin congelación produjeron un 70 % de formación de brotes, mientras que cuando los meristemos se congelan el porcentaje de formación directa de brotes disminuye a 62.8 %.

⁴⁰ BOUHAL, H., op., cit. p. 69-78

⁴¹ DEBABRATA, S., PRAKASH, S. N. Vitrification: an efficient approach to cryopreservation of shoot tips for long term conservation of potato (*S. tuberosum*) germplasm. En: <http://130.75.194.9/seite10.htm>. India. 2000. p. 1 - 9.

⁴² HIRAI, D., SAKAI, A. Cryopreservation of *in vitro* grown meristems of potato (*S. tuberosum*) by encapsulation- vitrification. Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application. IPGRI. Roma. Italia. 2000. p. 205 - 211.

3. METODOLOGIA

3.1 LOCALIZACION

Dado que este es el primer estudio que se realiza en el Centro de Investigación de Corpoica Tibaitatá en el área de crioconservación, esta investigación preliminar se llevó a cabo en dos fases:

La primera se realizó en los laboratorios del Programa Nacional de Recursos Genéticos y Biotecnología Vegetal de Corpoica, ubicado en el municipio de Mosquera departamento de Cundinamarca (Colombia); en la cual se seleccionó el material vegetal *in vitro* para hacer un barrido de las metodologías existentes en *Solanum*.

La segunda se ejecutó en la Unidad de Biotecnología del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), situado en el municipio de Palmira departamento del Valle; allí se abordaron puntos claves de dos protocolos evaluados en la primera fase para ajustar las etapas previas a la crioconservación.

3.2 SELECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

El material vegetal se seleccionó a partir de la Colección *in vitro* del banco de germoplasma, el cual cuenta con 98 accesiones de *S. phureja*, a las que se les realizó cinco ciclos de propagación para seleccionar una accesión de acuerdo con el comportamiento *in vitro*, representado en el vigor de las plantas, rápido crecimiento y presencia de yemas apicales con óptimo estado fisiológico, las cuales se consideraron material base para las técnicas. Una vez seleccionada la accesión, se realizaron cinco ciclos de propagación cada 3 - 4 semanas, con el fin de disponer de una fuente de yemas apicales para la ejecución de cada una de las pruebas.

3.3 PROPAGACIÓN DEL MATERIAL

En la primera fase del estudio, el material fue propagado a partir de segmentos nodales, empleando un medio de cultivo M & S⁴³ suplementado con tiamina 1.18 uM, AG₃ 0.57 uM, sacarosa 0.08M, inositol 0.055 mM y

⁴³ MURASHIGE, T & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* Vol 15. P. 473-497. 1962.

phytagel 3 %⁴⁴ con pH 5.6 – 5.8 . El material se mantuvo por espacio de 3 - 4 semanas, a una temperatura de 18° C y un fotoperiodo de 16 horas⁴⁵.

3.4 EVALUACION DE PROTOCOLOS DE *Solanum*

En la primera fase se evaluaron los protocolos propuestos por Hirai & Sakai⁴⁶, Golmirzaie⁴⁷, Debabrata⁴⁸ y Bouahal⁴⁹ (Tabla 1); con diferentes accesiones de *S. phureja*.

Teniendo como referencia los resultados de estos protocolos, se continuó con la segunda fase del trabajo, correspondiente a dilucidar los puntos críticos para poder realizar los ajustes necesarios en las metodologías.

3.5 AJUSTES EVALUADOS

Dado que las metodologías evaluadas en la primera fase, no arrojaron resultados satisfactorios, el grupo de investigación en crioconservación, liderado por Roosevelt Escobar, perteneciente al proyecto SB – 2 de CIAT, plantearon algunos ajustes tomando como base la experiencia que tienen en el área sobre la especie yuca (*Manihot esculenta* Crants). Dentro de los ajustes se propuso: (Tabla 2)

⁴⁴ CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA. Producción de tubérculos - semillas de papa. Manual de capacitación. CIP. Lima Perú. 1997. Fascículo 4.1. p. 10.

⁴⁵ MEJIA, R. Cultivo in vitro de las plantas de papa. En: Manual de laboratorio. INIAA. Año 1. No. 1. Chile. 1988. p. 77

⁴⁶ HIRAI, D., SAKAI, A. . Cryopreservation of *in vitro* grown meristems of potato (*S. tuberosum*) by encapsulation- vitrification. Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application. IPGRI. Roma. Italia. 2000. p. 205 - 211.

⁴⁷ GOLMIRZAIE, A. M. PANTA, A. Advances in potato cryopreservation by vitrification. En: <http://www.cipotato.org>. CIP. 1996. p. 1 – 7.

⁴⁸ DEBABRATA, S., PRAKASH, S. N. Vitrification: an efficient approach to cryopreservation of shoot tips for long term conservation of potato (*S. tuberosum*) germplasm. En: <http://130.75.194.9/seite10.htm>. India. 2000. p. 1 - 9.

⁴⁹ BOUAHAL,. Op., cit., p. 70-71.

Tabla 1. Protocolos evaluados para crioconservación de *Solanum* evaluados en la primera fase.

Etapa	Bouahal	Debabrata	Golmirzaie	Hirai & Sakai
Metodología	Encaps-Desec	Vitrificación	Vitrificación	Encaps-Vitrific
Cultivo <i>in vitro</i>	M&S	M&S	M&S+ Vit	M&S+Casaminoacidos
Extracción de Apices	0.5 mm	0.5 – 0.7 mm	1.5 mm	1 mm
Encapsulación	Alginato 3%, CaCl ₂ 100mM	NO	NO	Alginato 3%, CaCl ₂ 100mM
Pretratamiento	Sacarosa 0.5-0.75M X24- 48 h	Sacarosa 0.3 – 0.5M Manitol 0.2M + 8.7 uMGA ₃ X48h	Sacarosa 0.6M X 5h	Sacarosa 0.3M X 16h
Secado	Silica gel 2 – 4.5 h	NO	NO	NO
Solución de Cargado	NO	NO	NO	Sacarosa 0.4–0.6M+ Glicerol 2M X 90 min
Vitrificación	NO	PVS ₂ 20% X30 min-60% X 15 min-100% X 5 min a 0°C	Etilenglicol: Sorbitol: BSA (50:15:6)	PVS ₂ 100% X 2 h 0°C
Congelación	Inmersión Directa en NL	Inmersión Directa en NL	Inmersión Directa en NL	Inmersión Directa en NL
Descongelación	38°C X3 min	38°C X3 min	38°C X3 min	38°C X3 min
Recuperación	M&S+BA+ANA+GA ₃	M&S + GA ₃	M&S+ KIN + GA ₃	* M&S+ BAP + ANA +GA ₃ x 24h * M&S+ GA ₃

Tabla 2. Ajustes evaluados en los protocolos.

Etapa	Encapsul- desecación	Encapsul - Vitrificación
Cultivo <i>in vitro</i>	M&S+GA ₃	M&S+GA ₃
Extracción de Apices	1 mm	1 mm
Preacondicionamiento	CIAT-CPRI- HS- CIP x 1 – 20 días	CIAT-CPRI- HS- CIP x 1 – 20 días
Encapsulación	Alginato 3% suplementado con BAP 0.18 uM y GA ₃ 0.28 uM, CaCl ₂ 100mM, 20min. de polimerización	Alginato 3% suplementado con BAP 0.18 uM y GA ₃ 0.28 uM, CaCl ₂ 100mM, 20min. de polimerización
Pretratamiento	Sacarosa 0.3-0.5-0.75-1M X 24-48-72 h	Sacarosa 0.3-0.5-0.75-1M X 24-48-72h
Secado	Silica gel 8 –12-16 h	NO
Solución de Cargado	NO	Sacarosa 0.4M+ Glicerol 0.5-1-1.5-2M X 90 min
Vitrificación	NO	PVS ₂ 20% X30 min-60% X 15 min-100% X 5 min 0°C PVS ₂ 100% X2 h 0°C PVS ₄ 20% X30 min-60% X 15 min-100% X 5 min 0°C PVS ₄ 100% X2 h 0°C
Congelación	Inmersión Directa en NL	Inmersión Directa en NL
Descongelación	37°C X 90 seg	37°C X90 seg
Recuperación	R3 x48 h oscuridad CIAT Luz tenue	R3 x48 h oscuridad CIAT Luz tenue

3.5.1 Medios de propagación

Para la segunda fase se modificaron las siguientes condiciones del medio convencional de propagación así; Tiamina 11.8 uM, Sacarosa 0.053 M, agar Duchefa 0.45 %, a una temperatura de 21 °C, debido a que el material presentó una clorosis acentuada e hiperhidratación. Además se evaluó la densidad de siembra determinado por el número de explantes por frasco: 10, 20, 30 y 40 para establecer si se presenta competencia, ya que ésta puede afectar las condiciones fisiológicas de las plantas.

Adicional a las modificaciones anteriores, se determinó evaluar 14 medios de propagación sugeridos por Roosevelt Escobar del CIAT, con los que se esperaba mejorar la calidad del material propagado, su formulación estuvo basada en la adición de Citocininas y Giberelinas. (Tabla 3). Adicionalmente se tomó como control el medio convencional mejorado denominado medio 15.

Tabla 3. Medios de propagación evaluados

Componente Tratamientos	BAP (uM)	KIN (uM)	TDZ (uM)	ANA (uM)	GA3 (uM)
1	0.18				0.14
2	0.18				0.28
3	0.18				1.4
4	0.18				2.8
5			0.11		0.14
6			0.11		0.28
7			0.11		1.4
8			0.11		2.8
9		2.3			0.14
10		2.3			0.28
11		2.3			1.4
12		2.3			2.8
13	2.2				1.4
14	0.18			0.11	0.14
15					0.28

* Para todos los tratamientos se usaron las mismas condiciones de:
Sales M&S, sacarosa 0.053 M, inositol 0.055 mM, vitaminas, agar Duchefa 0.45% y pH:5.7.

3.5.2 Calidad del tejido

Se extrajeron ápices de 1 mm a partir de plantas de 3 semanas de propagación, los cuales se sembraron en 4 medios de preacondicionamiento, denominados CIP, HS, CPRI y CIAT (Tabla 4) durante 20 días, en los cuales se realizaron mediciones al estereoscopio en los días 1°, 3°, 5°, 7°, 10°, 15° y 20°, para construir la curva de crecimiento y observar la recuperación de los ápices en la etapa posterior al corte. Se tomaron como variables cuantitativas las mediciones (ancho x largo) de cada uno de los ápices y como variable cualitativa la vigorización de los mismos. Los tratamientos establecidos se describen a continuación:

Tabla 4. Medios de preacondicionamiento

Tratamiento	1.HS*	2. CIP*	3.CPRI*	4.CIAT*
Componente				
BAP (uM)	0.045			0.18
KIN (uM)		0.18		
AIA (uM)		2.85		
ANA (uM)	0.005 5			
GA ₃ (uM)	2.8	0.56	8.7	0.28
Sacarosa(M)	0.08	0.08	0.08	0.053
pH	5.7	5.7	5.7	5.7
* Para todos medios se usaron las mismas condiciones de: Sales M&S, inositol 0.055 mM, tiamina 11.8uM, agar Duchefa 0.45 % y pH:5.7.				

3.5.3 Encapsulación de los ápices

Una vez cumplida la etapa de preacondicionamiento, los ápices se colocaron en alginato de sodio al 3% suplementado (Anexo B - 1) y resuspendidos gota a gota en una solución de cloruro de calcio 100 mM para su polimerización durante 20 minutos; posteriormente se realizan dos enjuagues con agua destilada estéril, cada uno de 10 minutos. Finalmente antes de pasar a la siguiente etapa se colocan sobre papel filtro.

3.5.4 Concentración y tiempo de exposición a sacarosa

Los ápices, previamente extraídos, preacondicionados y encapsulados, se sometieron a soluciones de sacarosa 0.3, 0.5, 0.75 y 1M, durante 24, 48 y 72 horas, a excepción de la concentración de 1M, que fue evaluada a 24 y 48 horas en agitación (80 r.p.m). Posterior a este proceso, las cápsulas se recultivaron en el medio CIP (medio de recuperación empleado hasta ese momento) y la evaluación se realizó 15 días después del recultivo. Las variables evaluadas fueron: formación de brotes, presencia de callo y muertos.

3.5.5 Deshidratación en sílica – gel

Una vez escogidas las concentraciones y los tiempos de exposición a la solución de sacarosa, se siguieron abordando los puntos claves de los protocolos. Para el ensayo de deshidratación se emplearon frascos de compota con 50g de sílica- gel, en los que se introdujeron 20 cápsulas. Los tiempos evaluados fueron 8, 12 y 16 horas. Una vez cumplidos los tiempos de exposición los ápices se recultivaron en medio R3 (Anexo A - 1) usado en el protocolo de crioconservación de yuca en CIAT⁵⁰ durante tres días y después en medio CIAT, bajo condiciones de oscuridad, durante las primeras dos semanas y después en penumbra progresiva durante 4 semanas. La evaluación se efectuó a las tres semanas. En este caso las variables evaluadas fueron: formación de brotes, callos y mortalidad.

Los tratamientos evaluados fueron:

No. De Tratamiento	Descripción de los tratamientos
T3	Sacarosa 0.3M x 48 h. Secado 8, 12 y 16 horas.
T4	Sacarosa 0.5M x 72 h. Secado 8, 12 y 16 horas.

⁵⁰ MANRIQUE, N. Respuesta varietal de 95 genotipos de la colección núcleo de yuca *Manihot esculenta* Crantz a la crioconservación usando la técnica de encapsulación - deshidratación. Palmira Valle. 2000. p. 23. Trabajo de grado (Ingeniero agrónomo) Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias.

3.5.6 Efecto de la solución cargadora y de las soluciones PVS2 y PVS4

Para continuar con el protocolo de Encapsulación – vitrificación⁵¹, se procedió a evaluar los efectos del glicerol en la solución cargadora, tomando cápsulas pretratadas en sacarosa, sometiéndolas a soluciones cargadoras, en las cuales se varió la concentración de glicerol de 0.5 M a 2 M. Se mantuvo constante la concentración de sacarosa y el tiempo propuesto en el protocolo original (Anexo B - 3). Las condiciones del recultivo y las variables evaluadas, fueron iguales a las descritas en el numeral anterior.

Los ápices se expusieron a la solución vitrificante PVS2⁵² (Anexo B - 2) propuesta en el protocolo, durante dos horas y como alternativa se realizó un montaje similar, empleando la solución vitrificante PVS4⁵³ (Anexo B - 2). Paralelo a esto, se evaluaron estas dos soluciones de forma diluida de acuerdo al protocolo propuesto por Debabrata⁵⁴.

Posterior a la exposición de los ápices a estas soluciones, éstos fueron lavados dos veces con solución de sacarosa 1.2 M (Anexo B - 3) durante 10 minutos y se emplearon de igual forma las condiciones de recultivo. La evaluación se realizó a las cuatro semanas. Evaluando las variables ya nombradas.

Los tratamientos evaluados para las soluciones de cargado y PVS son los siguientes:

Tratamientos	Descripción de los tratamientos
15	Control sacarosa 0.3Mx48h +2 M glicerol
16	Sacarosa 0.3 Mx48h + PVS2 diluida*
18	Sacarosa 0.3 Mx48h + PVS2 100%
20	Sacarosa 0.3 Mx48h + PVS4 diluida*
26	Sacarosa 0.5 Mx48h + PVS2 100%
28	Sacarosa 0.5 Mx48h + PVS4 100%
30	Sacarosa 0.5 Mx48h + PVS4 diluida*
32	Sacarosa 0.3Mx48h +0.5 M glicerol
33	Sacarosa 0.3Mx48h +1 M glicerol
34	Sacarosa 0.3Mx48h +1.5 M glicerol
35	sacarosa 0.3Mx48h +2 M glicerol

⁵¹ HIRAI, Op., cit. p. 205 - 211.

⁵² SAKAI, A. Development of cryopreservation techniques. En: cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research, progress and application. IPGRI. Roma. Italia. 2000. p.2.

⁵³ *Ibid.*, p. 2

⁵⁴ DEBABRATA, Op. cit., p. 1 - 9.

36	Sacarosa 0.5Mx72 h +0.5 M glicerol
37	Sacarosa 0.5Mx72 h +1 M glicerol
38	Sacarosa 0.5Mx72 h +1.5 M glicerol
39	Sacarosa 0.5Mx72 h +2 M glicerol

* Las soluciones diluidas PVS2 y PVS4 se usaron al 20 %, 60 % y 100 %.

3.6 DISEÑO EXPERIMENTAL

En los ensayos correspondientes a evaluar efectos secado en sílica gel, solución cargadora y soluciones PVS, se empleó un diseño experimental completamente al azar. Las variables evaluadas fueron sometidas al Análisis de varianza, en los experimentos que se encontraron diferencias significativas se les aplicó la prueba de separación de medias (Prueba de Rango Múltiple DUNCAN). En algunos casos para el análisis se transformó la variable: $\sqrt{x} + 0.5$. Los datos fueron analizados por medio del programa SAS versión 4.0.

Para la evaluación de la calidad del tejido se promediaron los datos, para encontrar la relación de crecimiento a través de los días determinado por el medio de cultivo empleado.

4. RESULTADOS

4.1 PRIMERA FASE: CORPOICA

De los 98 materiales de *S. phureja* evaluados en este trabajo, se encontró que el 92 % de éstos no reunían los parámetros de vigor necesarios, tales como: coloración verde, plantas normales (ausencia de callos e hiperhidratación), presencia de ápices grandes con dominancia apical y ausencia de raíces aéreas. La falta de calidad en la mayoría de los tejidos posiblemente se deba a que se requiere una nueva formulación en el medio de cultivo ó porque provienen de condiciones de conservación *in vitro* con retardantes de crecimiento, condición no apta para los tejidos a congelar. De acuerdo a lo reportado por Golmirzaie⁵⁵, es necesario realizar varios subcultivos para incrementar el vigor adecuado de las plantas.

De tal modo que después de 5 subcultivos, la accesión que mejor comportamiento mostró fue *S. phureja* 100; debido a que las plantas presentaban uniformidad en tamaño y vigor. Este material fue sometido a 5 ciclos de propagación mas para incrementar la cantidad de plántulas hasta lograr aproximadamente 500, para ser usadas como fuente de ápices meristemáticos durante el proceso de congelación.

Del material escogido para el ajuste del proceso, los datos de pasaporte son escasos, ya que solo se conoce que pertenece a la colección del CIP y dentro del banco de germoplasma en Corpoica correspondiente al número CIP703292.

Aunque *S. phureja* 100 presentaba las mejores condiciones de vigor frente a las demás accesiones, después de varios ciclos de propagación empleando un medio de cultivo usado como rutina en el mantenimiento de la Colección Central Colombiana (C.C.C) de papa, el cual se encuentra suplementado con tiamina 1.18 uM, AG₃ 0.57 uM, sacarosa 0.08M, inositol 0.055 mM y phytigel 3 %, se observaron síntomas de hiperhidratación, formación de callos en la base, alteraciones en su coloración y clorosis. Este problema fue superado con las modificaciones hechas al medio en el CIAT, basadas en una adición de tiamina 11.8 uM, Sacarosa 0.053 M, agar Duchefa 0.45 %.

En cuanto a las metodologías de crioconservación evaluadas en la primera fase (Tabla 1), se llevaron a cabo con 10 accesiones de la colección, porque en ese momento no se contaba con la cantidad suficiente y en buen estado

⁵⁵ GOLMIRZAIÉ., Op. cit., p. 1 - 7.

de *S. phureja* 100. En esta evaluación se obtuvieron resultados heterogéneos, debido a que no se podían definir parámetros claros, pues se observó mortalidad en los controles y sobrevivencia en la fase de congelación evidenciada en formación previa de callo en algunas metodologías.

En la metodología de Encapsulación – deshidratación, se evaluó la respuesta de los ápices en cada una de las etapas previas al congelamiento (Tabla 5). Para la encapsulación se probaron diferentes concentraciones de alginato, para la deshidratación en sacarosa se evaluaron diferentes concentraciones y tiempos de exposición y para la desecación en sílica gel los tiempos de exposición. Los controles mostraron alta mortalidad (70%) y baja diferenciación (10%); en la fase de congelamiento no hubo recuperación de brotes.

Las metodologías de Vitrificación propuestas por Golmirzaie⁵⁶ y Debabrata⁵⁷, se observó en los controles de los pasos previos al congelamiento, que la respuesta fue uniforme en comparación a la metodología anterior, aunque predominada la presencia de callos (Tabla 5); sin embargo, en la fase de congelamiento no hubo recuperación de brotes, en las dos metodologías. Utilizando el protocolo propuesto por Debabrata⁵⁸, se logró la recuperación de un ápice en la fase de congelamiento, que desarrolló callo y posteriormente formó planta (Figura 1).

Figura 1. Recuperación de ápice congelado en la primera fase, mediante la técnica de Debabrata. (a) Fase inicial de desarrollo de callo. (b) Propagación de plántulas emergidas del callo inicial.



⁵⁶ GOLMIRZAIÉ., Op., cit. p. 1 – 7.

⁵⁷ DEBABRATA., Op. cit., p. 1 - 9.

⁵⁸ Ibid., p. 1 - 9

En la evaluación de la metodología de Encapsulación – vitrificación, se encontró en cada una de las fases previas al congelamiento la presencia de brotes y callos en algunos casos (Tabla 5). Después del congelamiento hubo recuperación de los ápices a través de la formación de callo, estos se mantuvieron por un tiempo y finalmente murieron. A partir de estos resultados se comenzaron a realizar modificaciones en los tiempos de exposición a la solución PVS2 y a la proporción de DMSO en la misma. Dichas modificaciones resultaron ineficientes para aumentar el porcentaje de respuesta en la fase de congelación, como también para disminuir la tasa de formación de callo.

Las dificultades para el éxito en la validación de esta metodología fueron atribuibles a que el cuarto de crecimiento carecía de condiciones para estabilizar el fotoperiodo y la temperatura. Además, se planteó la posibilidad de realizar ajustes a los medios de cultivo.

Tabla 5. Resultados obtenidos en la primera fase para la evaluación de las metodologías.

Metodologías	PROTOCOLOS			
	Bouahal	Debabrata	Golmirzaie	Hirai & Sakai
	Encaps-Desec	Vitrificación	Vitrificación	Encaps-Vitrific
Encapsulación	70 % viables sin dif. 30 % Muertos	NO	NO	90 % Brotes 10 % Callos
Pretratamiento	30 % viables sin dif. 20 % Brotes 50 % Muertos	20 % Muertos 70 % Brotes 10 % Viables sin dif.	50% Callos 50% Muertos	30 % Brotes 50 % Callos 20 % Muertos
Secado	70 % Muertos 20 % viables sin dif. 10 % Brotes	NO	NO	NO
Solución de Cargado	NO	NO	NO	50 % Brotes 30 % Callo 20 % Muertos
Vitrificación	NO	60 % Callo-Brotes 40 % Muertos	20% Callos 30% Viables sin dif. 50% Muertos	60 % Muertos 30 % Viables sin diferenciar 10 % Brotes
Recuperación después de congelación	100 % Muertos	90 % Muerto 10 % Callo-Brotes	100% Muertos	15 % Callo-Muerto 85 % Muertos

Por las situaciones antes mencionadas, se optó por solicitar una asesoría al proyecto SB-2 "Acceso y uso de la Agrobiodiversidad a través de la Biotecnología" del CIAT, con el objeto de conocer la experiencia en yuca, y recibir aportes para solucionar las dificultades que se estaban presentando.

4.2 SEGUNDA FASE: CIAT

El Proyecto SB-2 "Acceso y Uso de la Agro-biodiversidad a través de la Biotecnología" del CIAT, tiene una trayectoria de investigación de aproximadamente 10 años en el área de crioconservación para la especie *Manihot esculenta* Crantz. En la primera parte de la capacitación se intercambiaron ideas sobre la problemática del trabajo práctico en papa.

Después de haber analizado la primera fase del trabajo, se propuso realizar un ensayo comparativo para la metodología Encapsulación – vitrificación como se venía realizando en la primera fase y una sugerida donde se tomaron en cuenta algunos aspectos claves para la crioconservación de yuca como son: fase de preacondicionamiento, suplementación del alginato, tiempo de polimerización, lavado de las cápsulas, además de evaluar la solución PVS4⁵⁹, medio de recuperación R3⁶⁰ y condiciones de recuperación oscuridad - luz difusa; aspectos que no fueron tenidos en cuenta en la primera fase.

Los resultados obtenidos en estas pruebas mostraron la posibilidad de encontrar soluciones evaluando nuevamente las metodologías de Encapsulación- deshidratación y Encapsulación- vitrificación teniendo en cuenta los aspectos que se describen a continuación:

En este primer ensayo se encontró un ápice que había sido tratado con el procedimiento sugerido, el cual sobrevivió al congelamiento mostrando regeneración de brote indicando que *S. phureja* 100 puede ser crioconservada con éxito (Figura 2). El tratamiento que permitió esta respuesta fue el caracterizado por cinco días de precrecimiento en el medio para propagación (HS), alginato suplementado de acuerdo a la formulación propuesta en el protocolo; polimerización de las cápsulas empleando cloruro de calcio 100 mM durante 20 min seguidos por 2 enjuagues con agua destilada estéril durante 10 min y utilizando PVS4 X 2 h como solución vitrificante.

⁵⁹ SAKAI, A., Op cit. p. 2.

⁶⁰ MANRIQUE, N., Op., cit.. p. 23.

Durante la recuperación del ápice congelado se estimó que las condiciones de los medios de recultivo no fueron los adecuados, porque la regeneración fue lenta considerando que, tres meses después de la congelación se expresó organogénesis directa (formación de planta sin mediar la formación de callo). La brotación se puede atribuir al recultivo hecho en el medio CIAT, y/o a la condición de estrés del tejido, indicios que permiten proponer que para la recuperación de ápices congelados se deben ajustar las condiciones de manejo para el recultivo.

Figura 2. Recuperación de ápice congelado en la segunda fase (CIAT) *S. phureja* 100.



Además, la suplementación de la cápsula y los enjuagues posteriores a la polimerización podrían haber favorecido el restablecimiento del tejido.

Algunos aspectos que se consideraron claves son los siguientes: La forma de extracción del ápice y la falta de uniformidad en el tamaño ocasionado por los instrumentos usados (agujas y bisturí). Se pudo observar que el tejido extraído con cuchilla No.11 mostró ser más uniforme y viable en las fases siguientes al precultivo. Al emplear agujas se evidenció mayor daño mecánico observado después quinto día del corte, aproximadamente el 50% del material había muerto, posiblemente debido al corte en bisel que da la aguja, haciendo que el explante presente mutilaciones y mayor desuniformidad. Con esto se pudo determinar que se presenta un efecto selectivo por el corte de acuerdo al implemento que se utilice y de la habilidad del operario. Las anteriores observaciones y los análisis condujeron a definir algunos ajustes metodológicos: se decidió realizar la extracción de los ápices con cuchilla de bisturí No. 11 y establecer la fase de preacondicionamiento con el fin de fortalecer el tejido, es decir que se recupere del estrés sufrido durante el corte y pueda seguir las etapas previas

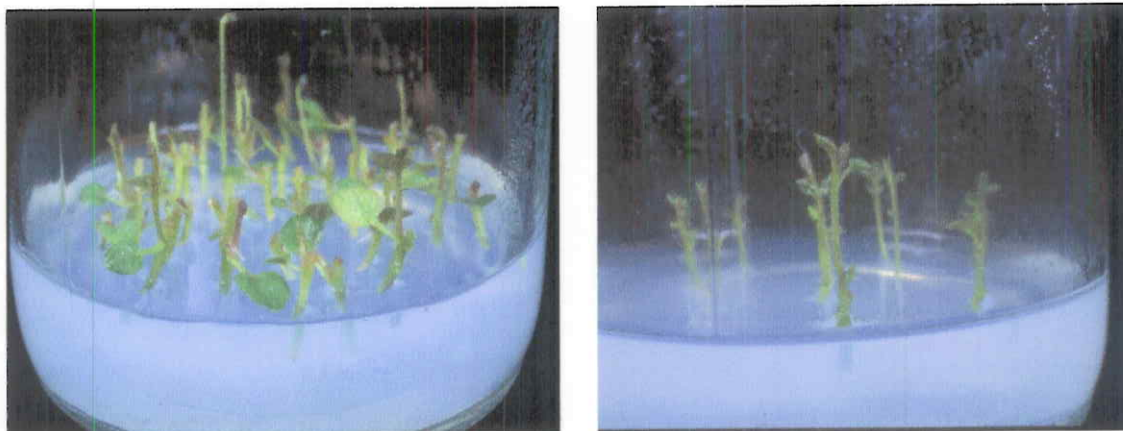
a la congelación teniendo mayor seguridad de que el material entre viable al proceso criogénico. Escobar⁶¹, registra para la especie yuca una la etapa de preacondicionamiento la cual se realiza después de la extracción y siembra de los ápices durante 3 días en un medio de propagación, con el fin de obtener un alto número de células con características meristemáticas, una reducción en el tamaño de las vacuolas y un incremento en la densidad del protoplasma del explante. Los parámetros que se tomaron en cuenta fueron las observaciones cualitativas y cuantitativas, las primeras expresan el vigor del ápice el cual debe tener un crecimiento normal y una coloración verde, las cuantitativas se registraron con la medición de los ápices durante el preacondicionamiento a través de los días empleando el estereoscopio.

4.2.1 Medios de propagación

En la primera fase, el material vegetal se propagó cada cuatro semanas en un medio convencional para papa, caracterizado por una proporción alta de azúcar y baja en tiamina. En este medio las plantas desarrollaron clorosis, hiperhidratación y formaron callo, por lo cual, en la segunda fase se propuso un ajuste al medio (Medio 15, Tabla 3), con el que se superaron los efectos negativos (Figura 3). A pesar de que con este medio las plantas mostraron elongación rápida aspecto que podría resultar desventajoso, no se manifestaron variaciones en el vigor como: aparición de raíces aéreas, proliferación de yemas axilares que afectan directamente la calidad del ápice. También con las nuevas condiciones, se determinó que *S. phureja* es susceptible a cambios medio ambientales tales como: aumento en la temperatura (mayores ó iguales a 25 °C) y reducción de la intensidad lumínica, que se expresan en coloraciones rojizas, quemazón en las yemas apicales precedido de muerte del tejido, las cuales son manifestaciones de estrés. Sí el proceso se detiene antes de estos puntos críticos, puede ser reversible al disminuirse la temperatura (18 – 21 °C) y manteniendo la intensidad lumínica. Otro aspecto que se tuvo en cuenta fue la evaluación de la densidad de siembra, para descartar el efecto de competencia. Se pudo establecer que 20 explantes por frasco, son la cantidad óptima en la que no se presenta competencia y las plantas se desarrollan normalmente. Densidades superiores a 25, disminuyen el vigor de las plantas propagadas.

⁶¹ ESCOBAR, R.; MAFLA G., and ROCA W. M. A methodology for recovering cassava plants from shoot tips maintained in liquid nitrogen. En: Plant Cell Reports. 1997. Vol. 16. p. 474-478.

Figura 3. Efectos de las condiciones de propagación: a. Medio convencional (25 °C; 30 explantes por frasco) b. Medio ajustado (21 °C; 10 explantes por frasco).



El haber definido las limitantes del medio de propagación permitió sugerir la evaluación de otros medios (Anexo A) que permitieran fortalecer el ápice y activar las yemas dormantes sin olvidar la importancia de una buena tasa de multiplicación. La formulación de estos medios se basó en el uso de diferentes concentraciones de citoquininas y de GA3.

Para los medios del 1 - 4, se observó que 0.18 uM BAP, proporciona un buen desarrollo de las plántulas, poca formación de callos, aunque el crecimiento es lento respecto al control (medio 15), se observó una buena coloración y expresión de vigor. A partir de estos resultados se propuso evaluar el medio 2 (denominado CIAT), en la fase de preacondicionamiento de ápices, ya que la concentración de los reguladores de crecimiento favorecieron poca elongación manteniendo al tejido en buenas condiciones fisiológicas.

En los medios del 5 al 8, la concentración 0.11 uM de TDZ induce la formación de callo y poco vigor en el tejido. Por lo cual el uso de TDZ aumenta la posibilidad de producir anomalías, debido a que es una citoquinina fuerte para papa, descartando la posibilidad del uso de ésta.

Los medios del 9 al 12, mostraron que 2.3 uM de kinetina incrementó la formación de callos. Además se observó un crecimiento heterogéneo, ápices débiles, poca presencia de raíces, tallos muy delgados y clorosis generalizada.

El medio No. 13 produjo características no deseadas en las plántulas tales como: deficiente crecimiento, poca formación de raíces, engrosamiento del

tallo y síntomas de hiperhidratación, posiblemente debido a que la concentración de BAP (2.2 uM) resulte perjudicial para el desarrollo de las plantas.

El medio 14 denominado 4E⁶², empleado exitosamente en la propagación de yuca, mostró un crecimiento acelerado favoreciendo la formación de brotes axilares, pero como desventaja los ápices se observaron muy débiles, esto puede ser debido a la combinación y concentración de citoquininas (BAP y ANA), las cuales pueden ser fuertes para *S. phureja*.

En general, se pudo determinar que el medio No. 2 mostró una buena proliferación de brotes; las plantas presentan buen vigor, sin anomalías. Por esta razón, se usó para las fases de propagación, preacondicionamiento, y recultivo. En la propagación se observó que el crecimiento es más lento, mostró efecto estimulante para brotes axilares, con disminución de la dominancia apical, condición que implica tamaños reducidos que limitan su extracción. En preacondicionamiento y recultivo se obtuvo buena respuesta favoreciendo el fortalecimiento del tejido.

4.2.2 Calidad del tejido

Resulta benéfico al proceso de congelación, tener un buen manejo sobre el tejido fuente. Tejidos estresados no responden en forma satisfactoria y podrían dar respuestas confusas. Así mismo es necesario establecer un medio de cultivo que favorezca la vigorización del material de partida y a su vez permita su rápida propagación. Posterior al corte de los ápices es necesario que estos pasen por un periodo corto de acondicionamiento con el fin de recuperar el ápice, del estrés ocasionado por el corte y estimular la activación y producción mitótica.

En esta etapa del proceso se determinó evaluar el efecto de los medios sobre la tasa de crecimiento de los ápices durante los primeros 21 días, tomando como variables cuantitativas el largo y ancho del ápice (Anexo C).

Los medios HS, CIP y CPRI, no favorecieron el buen desarrollo de los ápices, ya que se presentó clorosis generalizada y poco crecimiento. Con el transcurso de los días se observó que los ápices no presentaron brotación (Figura 4). A los 15 días, los ápices evaluados sobre los medios HS y CPRI, en su totalidad, presentaron coloraciones blanquecinas indicio de una clorosis muy generalizada, crecimiento anormal, asociado a estados de hiperhidratación, condiciones que inhibieron la diferenciación a plántula. En el medio CPRI, se presentó una marcada elongación con respecto a los otros

⁶² ROCA, W. Handbook of plant cell culture: crop species. New York: Mc Millam publishing Co, 1984. p. 269

medios, esto es debido probablemente a la alta concentración de GA₃. El medio CIP, tuvo una mejor respuesta en cuanto a coloración y crecimiento con respecto a CPRI y HS, pero decreció con el transcurso de los días. Por lo que se evaluó el medio CIAT y se encontró una buena respuesta. Los ápices mejoraron su calidad en cuanto color, vigor y diferenciación. Esto puede ser atribuido a la composición del medio. De tal forma que éste fortalece el tejido preparándolo para crioconservación.

La figura 5 registra el comportamiento de los ápices con respecto a su crecimiento sobre los medios evaluados, los medios HS, CIP y CPRI, favorecieron la elongación de los ápices, sin mostrar claramente estabilidad en el crecimiento. Por otra parte las características cualitativas (descritas para la figura 4) eliminaron la posibilidad de su selección como medios de preacondicionamiento. El medio CIAT estimuló un crecimiento moderado pero estable, esta última condición garantiza la obtención de ápices homogéneos. Además, las características morfológicas dejaban ver tejidos vigorosos y saludables, rasgos indispensables para llevar a cabo las metodologías.

Figura 4. Efecto del medio de precondicionamiento sobre el crecimiento de los ápices a los 21 días.

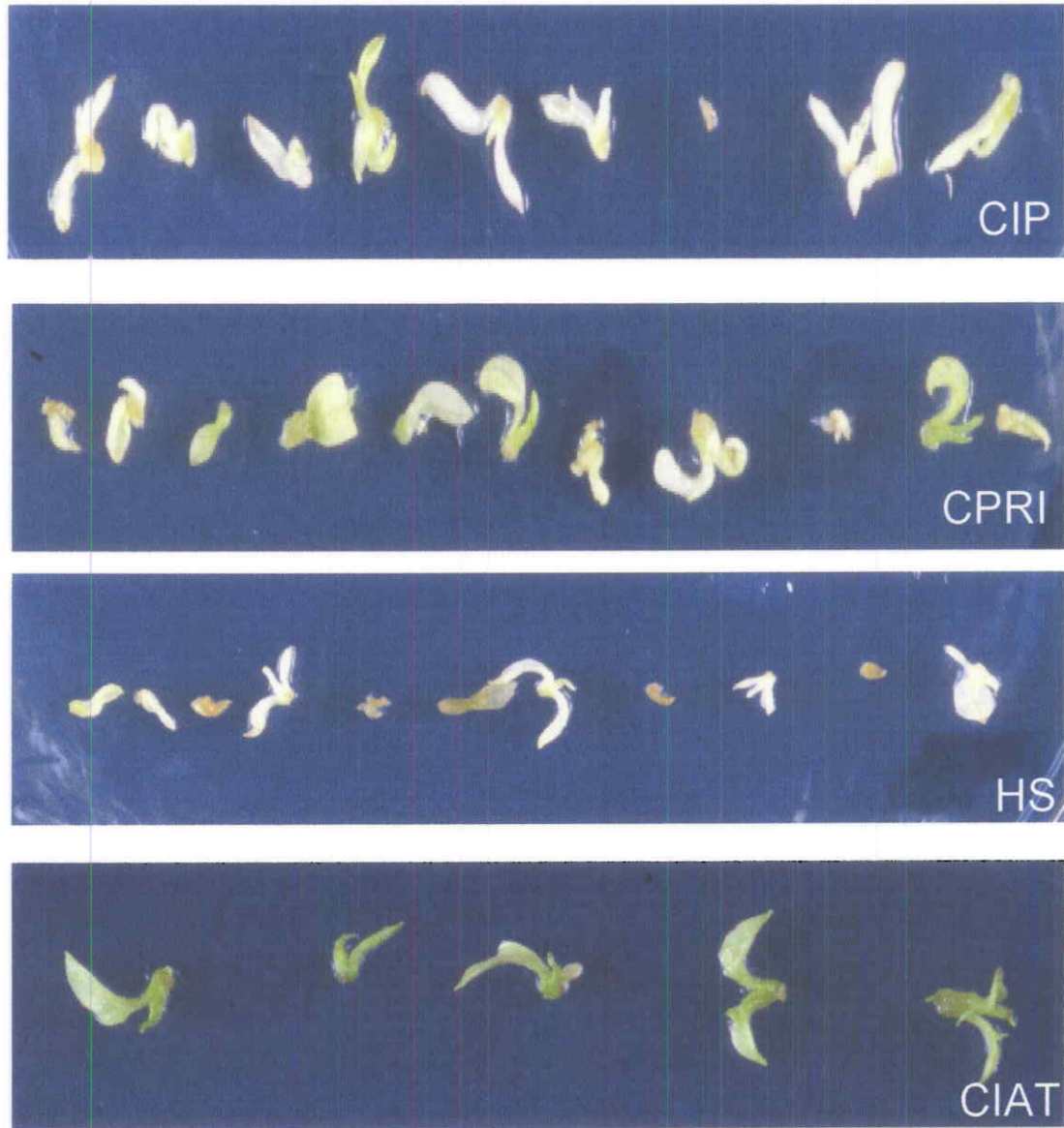
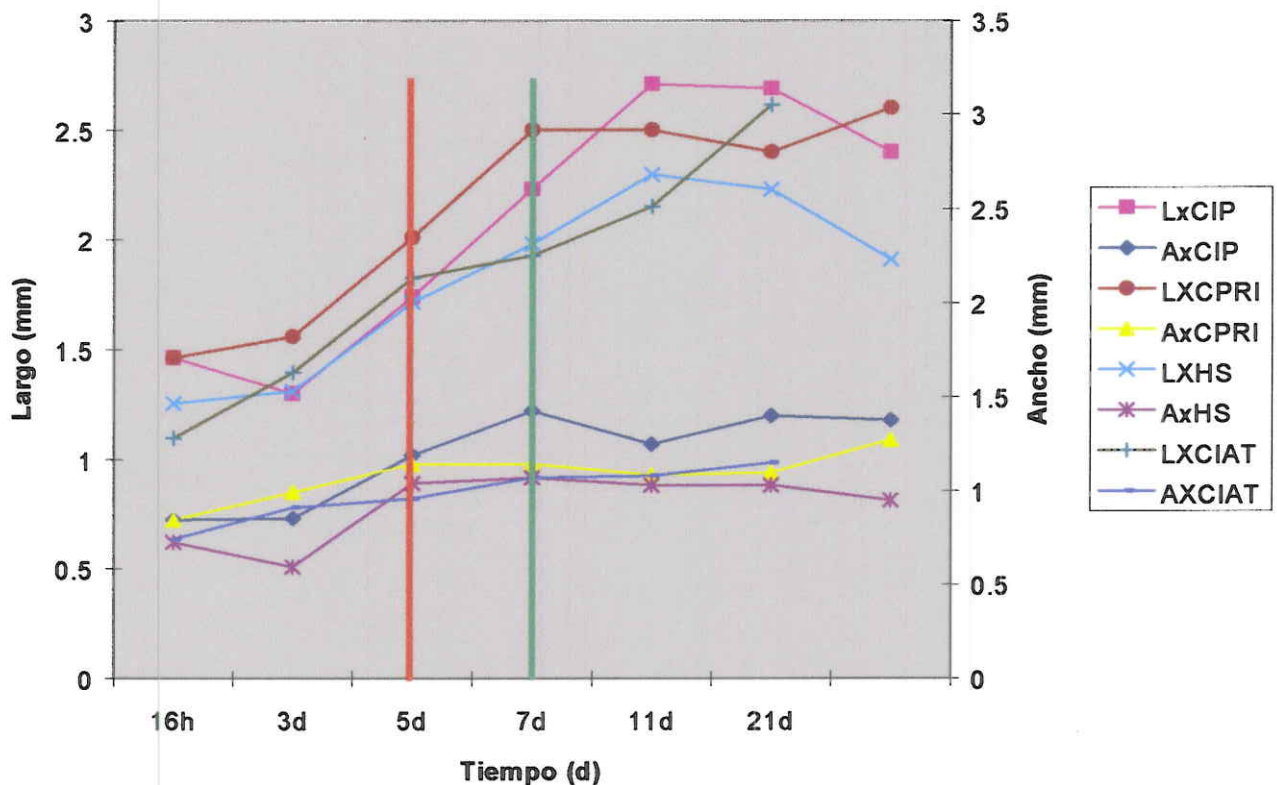


Figura 5. Comparación de las curvas de crecimiento de los ápices precondicionados a 21 días.



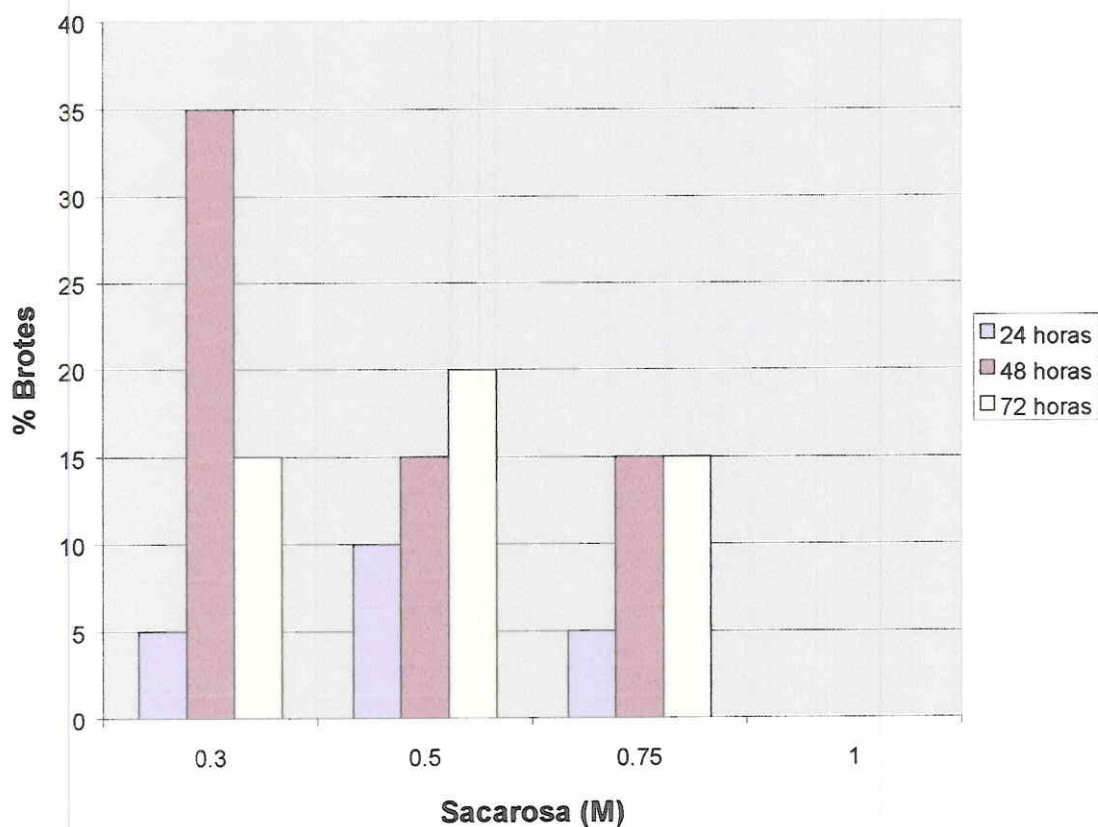
4.2.3 Efecto de la concentración y tiempo de exposición a sacarosa

Se pudo establecer que *S. phureja* no tolera concentraciones altas ni tiempos prolongados de exposición a sacarosa; criterio que deriva de las observaciones y resultados de los ensayos diseñados para tal fin. Los ápices mostraron un mejor desarrollo en los tratamientos de 0.3 M por 48 h y 0.5 M por 72 h, mostrando la mayor tasa de formación de brotes (Figura 6), como también uniformidad en el desarrollo y mejor calidad del tejido. En concentraciones superiores a 0.5 M se presentó una disminución en la sobrevivencia, crecimiento lento y proliferación de callos; hechos relacionados con el efecto osmótico de la sacarosa a nivel celular. En el tratamiento 1 M de sacarosa, los ápices presentaron coloraciones rojizas (dadas por condiciones estresantes, manifestándose por la producción de antocianinas⁶³) y/o cafés, hasta llegar a la muerte del tejido; no se presentó ningún tipo de crecimiento, aunque algunos permanecieron viables, por lo

⁶³ ESCOBAR, R. Comunicación personal. Abril 2003.

cual se podría decir que bajo esta condición evaluada hay una alta selección. Fabre⁶⁴, encontró en experimentos preliminares que concentraciones altas de sacarosa (superiores a 1 M) afectaban la sobrevivencia de los ápices y no permiten la sobrevivencia de éstos después de la congelación en NL. Sin embargo, Bouahal⁶⁵ halló que sacarosa 1 M por 48 h no afecta la sobrevivencia de los ápices. Esto sugere que en *S. phureja*, se presenta una respuesta varietal frente a los tratamientos aplicados.

Fig. 6 Efecto de la concentración de sacarosa sobre el porcentaje de brotación de los ápices a diferentes tiempos de exposición.



Al comparar los reportes sobre el efecto de la concentración de sacarosa en procesos de pretratamiento para crioconservación de tejidos y específicamente reportes relacionados con la especie, es posible atribuir que el comportamiento de *S. phureja* accesión 100, se deba a especificidades en respuesta de tipo varietal. Los parámetros de comparación con otros datos en *Solanum phureja* ó con la accesión 100

⁶⁴ FABRE, Op., cit., p. 419.

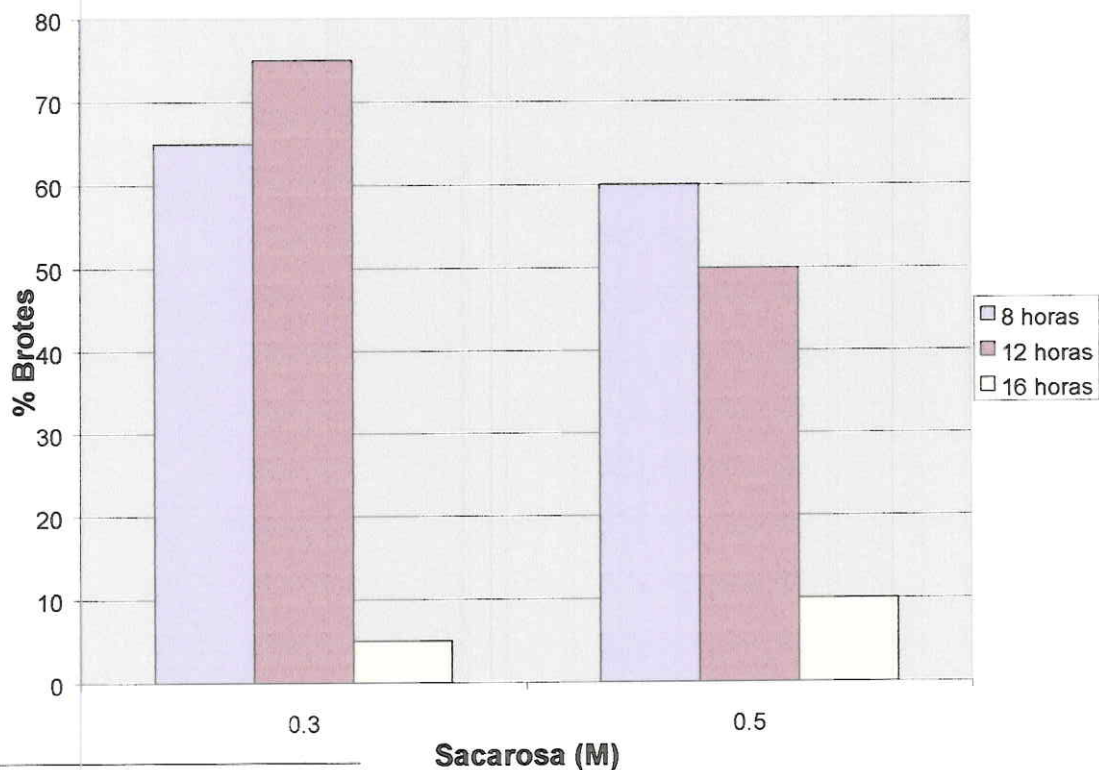
⁶⁵ BOUHAL, Op., cit., p. 72.

realizados en Colombia, no se pudieron establecer por carencia de publicaciones en el área.

4.2.4 Deshidratación en sílica – gel

Las cápsulas pretratadas en sacarosa (0.3 M X 48 h y 0.5 M X 72 h), mostraron formación de brotes en un 80 y 75 % respectivamente. El control de encapsulación mostró un 90% de formación de brotes (Tabla 6), lo que indica que el material se entra en buen estado a la etapa de secado (Figura 7). De acuerdo al Análisis de varianza se constató que la respuesta es proporcional al tiempo de secado (Anexo D). En el menor tiempo evaluado (8h), se halló una alta viabilidad reflejada en una alta formación de brotes, mientras que en el secado de 16 h, se encontró la respuesta más baja y por consiguiente la mortalidad más alta. Se hallaron diferencias significativas con respecto al tiempo (Tabla 7). El único reporte de esta metodología para la especie es el de Bouahal⁶⁶, en el que se encontraron tasas de sobrevivencia de un 60 % en un tiempo de secado de 4.5 h, teniendo en cuenta que en éste se usó una concentración de sacarosa 1 M x 48 h.

Figura 7. Efecto de los tiempos de exposición al secado en sílica gel sobre el porcentaje de brotación de los ápices.



⁶⁶ Ibid., p. 76.

Tabla 6. Efecto de los tiempos de secado en sílica gel y de los pretratamientos en sacarosa en la respuesta de ápices encapsulados sin congelar de *S.phureja* 100.

TRATAMIENTO	TIEMPO DE SECADO (h)	%BROTE	%BROTE/CALLO	%CALLO	% MUERTO
CONTROL (Encapsulación)		90	10	0	0
CONTROL (Sac. 0.3 M X 48 h)		80	15	0	5
CONTROL (Sac. 0.5 M X 72 h)		75	15	10	0
0.3 M X 48 h	8	65	15	10	10
	12	75	5	5	15
	16	5	0	0	95
0.5 M X 72 h	8	60	15	15	10
	12	50	15	5	30
	16	10	0	5	85

Tabla 7. Efecto del tiempo de secado en sílica gel sobre ápices no congelados de *S. phureja* 100 para la variable % de brotes.

Tiempos de Exposición (h)	Promedio	Duncan
8	62.500	A
12	62.500	a
16	7.500	b

Nivel de significancia 5%

Promedios con la misma letra no difieren significativamente.

El material de *S. phureja* se mostró muy sensible al secado. Lo cual se pudo notar durante los ensayos realizados para el análisis del tiempo de secado, donde se observaron zonas necrosadas en los ápices, sin embargo, algunos de ellos regeneraron brotes. Otros presentaron zonas blancas que progresaron hacia formación de callos. Estos resultados sugieren que *Solanum phureja* 100 presenta susceptibilidad al secado con tiempos de exposición superiores a 8 h; por debajo de este tiempo fue imposible recolectar información debido a que el diseño experimental no contempló este rango, por lo tanto tiempos inferiores a 8 h podrían incorporarse en nuevas experimentaciones.

A partir de estos resultados se corrió una pequeña prueba completa a congelación, en la que no se obtuvieron resultados satisfactorios, reflejados en la alta mortalidad e incidencia de contaminación, razón por la cual estos datos no se analizaron. Pero los resultados para la fase de secado sin

congelación fueron favorables; ya que a tiempos de exposición de 8 y 12 h, no presentaron diferencias significativas en cuanto a formación de brotes. En congelación no se observó una respuesta similar (no hubo sobrevivencia).

4.2.5 Efecto de la solución cargadora y de las soluciones PVS2 y PVS4

La evaluación del efecto del glicerol sobre los tejidos está basada en los resultados obtenidos en la metodología de Encapsulación-vitrificación de la primera fase; en ésta se evidenció la alta incidencia de formación de callo. De acuerdo al Análisis de varianza (Anexo E) no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, aunque la comparación de promedios para las variables brote y callo (Tabla 8 y 9), muestran diferencias significativas entre los dos límites de comparación; se aprecia que la respuesta de los tratamientos en cuanto a las variables evaluadas es inversa, porque a mayor brotación menor formación de callos y cuando existe mayor formación de callos la brotación es menor. Además, con el uso de una concentración menor de glicerol se presenta una mayor formación brotes que disminuyen con el aumento de ésta y favorece la formación de callo.

El uso de soluciones cargadoras ha sido implementado con éxito en la crioconservación de varias especies; Nishizawa⁶⁷, reporta el uso de una solución cargadora 2 M de glicerol más 0.4 M de sacarosa, la cual mejora la tasa de sobrevivencia en un 85.7 % en suspensiones celulares de *Asparagus officinalis*; Matsumoto⁶⁸, en su trabajo de vitrificación en Lirio reporta el efecto de la solución vitrificante 0.8 M sacarosa más 1 M de glicerol, con la cual se obtiene una alta tasa de sobrevivencia de 89.5 %.

⁶⁷ NISHIZAWA, Shuji. Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification. *Plant Science*. 1993. p. 67-73.

⁶⁸ MATSUMOTO, Toshikazu. An approach to enhance dehydration tolerance of alginate-coated meristems cooled to -196 °C. *Cryo-Letters*. 1995. Vol. 16. p. 299-306.

Tabla 8. Efecto de la concentración del glicerol en la solución de cargado para la variable número de Brotes.

Tratamiento	Promedio de Brotes(viables)	Duncan
32: S. 0.3 M x 48 h + 0.5 M glicerol.	10.000	a
36: S. 0.5 M x 72 h + 0.5 M glicerol.	9.000	ab
34: S. 0.3 M x 48 h + 1.5 M glicerol	8.500	ab
33: S. 0.3 M x 48 h + 1 M glicerol.	8.000	ab
37: S. 0.5 M x 72 h + 1 M glicerol.	8.000	ab
38: S. 0.5 M x 72 h + 1.5 M glicerol.	7.000	ab
35: S. 0.3 M x 48 h + 2 M glicerol.	5.500	ab
39: S. 0.5 M x 72 h + 2 M glicerol.	4.500	b

Nivel de significancia 5%

Promedios con la misma letra no difieren significativamente.

Tabla 9. Efecto de la concentración del glicerol en la solución de cargado para la variable número de callos.

Tratamiento	Promedio de Callos (viables)	Duncan
39: S. 0.5 M x 72 h + 2 M glicerol	2.345	a
35: S. 0.3 M x 48 h + 2 M glicerol	1.996	ab
38: S. 0.5 M x 72 h + 1.5 M glicerol	1.726	ab
37: S. 0.5 M x 72 h + 1 M glicerol	1.414	ab
34: S. 0.3 M x 48 h + 1.5 M glicerol	1.403	ab
36: S. 0.5 M x 72 h + 0.5 M glicerol	0.966	b
32: S. 0.3 M x 48 h + 0.5 M glicerol	0.707	b
33: S. 0.3 M x 48 h + 1 M glicerol	0.707	b

Nivel de significancia 5%

Promedios con la misma letra no difieren significativamente.

Datos transformados $\sqrt{x + 0.5}$

Las soluciones PVS2 y PVS4 mostraron diferencias altamente significativas entre tratamientos para las variables % brotes y % callos (Anexo F); de acuerdo a la prueba de comparación de promedios (Tabla 10), el mejor tratamiento para la variable % de brotes fue el 16 (Sacarosa 0.3 M X 48 h y PVS2 diluida) con un promedio de 45%, este resultado sugiere que el trabajo debe ser encaminado a continuar con la evaluación de soluciones diluidas, pues al parecer *S. phureja* 100 tiene poca tolerancia a soluciones que pueden resultar tóxicas al tejido. Este hecho se puede corroborar con lo obtenido en el tratamiento 18 (Sacarosa 0.3 M X 48h y PVS2 100%), frente a los demás tratamientos, con los que se encuentran diferencias significativas, debido a que predominó la formación de callos y no hubo respuesta para la variable % de brotes. Además, el tratamiento 16 respecto al control (Sacarosa 0.3 M X 48 h + 2 M de glicerol), no presenta diferencias significativas, lo que podría indicar que el tratamiento evaluado con PVS2

diluida resulta favorable al tejido en cuanto a la formación de brotes. El Instituto Central de Investigaciones en papa de Pradesh (India)⁶⁹, reporta la aplicación de la solución vitrificante PVS2 al 20 %, 60 % y 100 %, en cinco clones de la especie *S. tuberosum*, con la que obtuvieron un promedio de recuperación del 54%.

En los tratamientos 20,18,28 y 30 no se obtuvo respuesta para la variable % de brotes, debido a que en estos predomina la formación de callos. De acuerdo a la prueba de comparación de promedios para la variable % de callos (Tabla 11), se encontraron diferencias significativas entre cada uno de estos tratamientos. La evaluación de las soluciones PVS4 (tratamientos 28 y 30) presentan una alta incidencia de la formación de callo, por lo cual se podría pensar que el tiempo de exposición a estas soluciones ofreció una respuesta no deseable.

Tabla 10. Efecto de las soluciones PVS2 y PVS4 para la variable porcentaje de Brotes.

Tratamiento	Promedio	Duncan
15: Control S. 0.3 M x 48 h +2 M glicerol	55.000	a
16: Sac. 0.3 M x 48 h + PVS2 diluida	45.000	a
26: Sac. 0.5 M x 48 h + PVS2 100%	20.000	b
20: Sac. 0.3 M x 48 h + PVS4 diluida	0.000	b
18: Sac. 0.3 M x 48 h + PVS2 100%	0.000	b
28: Sac. 0.5 M x 48 h + PVS4 100%	0.000	b
30: Sac. 0.5 M x 48 h + PVS4 diluida	0.000	b

Nivel de significancia 5%

Promedios con la misma letra no difieren significativamente.

Sakai⁷⁰, en su trabajo de Vitrificación para *Citrus* demostró que, el uso de soluciones PVS2 a diferentes concentraciones mejora la tasa de sobrevivencia las cuales pueden llegar a estar en un rango del 65.4 - 83.5%. Hirai⁷¹, llevó a cabo la metodología de Encapsulación-vitrificación para *S. tuberosum* en la que empleó una solución de cargado que contiene 0.6 M de sacarosa más 2 M de glicerol y PSV2 al 100 % por 2 h, con la que obtuvo un porcentaje de brotes del 70 %.

Sakai⁷², propuso una nueva solución PVS4, en esta se aumentan las concentraciones de glicerol, etilen glicol y de sacarosa, suprimiendo el

⁶⁹ DEBABRATA, S. p. 1 - 9.

⁷⁰ SAKAI, A. Criopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. Var. *Brasiliensis* Tanaka) by vitrification. Plant cell Report. 1990. Vol. 9. p. 30 - 33.

⁷¹ HIRAI., Op. cit. p. 207.

⁷² SAKAI, A. Development of cryopreservation techniques. Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application. IPGRI. Roma. Italia. 2000. p. 2

DMSO; con la que se ha encontrado la misma respuesta de recuperación comparada con PVS2. De otro modo Takagi⁷³, evaluó en taro (*Colocasia esculenta*), diferentes tiempos de exposición a PVS2 y soluciones cargadoras con el fin de aumentar la tasa de sobrevivencia después del congelamiento. Ella logró establecer que la solución de cargado óptima compuesta de 2 M de glicerol más 0.4 M de sacarosa a 25 ° C durante 20 min., seguido por una deshidratación con la solución PVS2 por diez minutos a 25 °C, obteniendo tasas de sobrevivencia del 66 – 77 %, indicando baja toxicidad.

Tabla 11. Efecto de las soluciones PVS2 y PVS4 para la variable porcentaje de callo.

Tratamiento	Promedio	Duncan
28: Sac. 0.5 M x 48 h + PVS4 100%	100.000	a
30: Sac. 0.5 M x 48 h + PVS4 diluida	85.000	ab
20: Sac. 0.3 M x 48 h + PVS4 diluida	80.000	abc
26: Sac. 0.5 M x 48 h + PVS2 100%	70.000	bc
18: Sac. 0.3 M x 48 h + PVS2 100%	70.000	bc
16: Sac. 0.3 M x 48 h + PVS2 diluida	55.000	c
15: Control S. 0.3 M x 48 h +2 M glicerol	30.000	d

Nivel de significancia 5%

Promedios con la misma letra no difieren significativamente.

En las evaluaciones de secado, soluciones de cargado PVS2 y PVS4, cabe destacar la presencia de diferentes formaciones o tipos de respuesta del callo como son: callos verdes (crecen, sin inducción de brotes), callos marrones (crecen e inducen brotes y plantas) y callos negros (que permanecen en una fase latente).

⁷³ TAKAGI, H. Cryopreservation of in vitro- grow shoot tips of taro (*Colocasia esculenta* (L), Schoot) by vitrification. Plant cell report. Vol. 16. No. 9. 1997. p. 595 - 597.

CONCLUSIONES

PRIMERA FASE: CORPOICA

- Son muchos los factores que afectan el éxito de un proceso de crioconservación, por lo cual es necesario tener en cuenta todos los aspectos concernientes a la especie y a la metodología que se quiere aplicar.
- Al ser evaluadas las metodologías propuestas por Bouahal⁷⁴ y Golmirzaie⁷⁵, *S. phureja* 100 no arrojó resultados satisfactorios. Esto implica que la reproducibilidad de las mismas puede estar condicionada por la accesión evaluada.

SEGUNDA FASE: CIAT

Medios de propagación

- La propagación de *Solanum phureja*, para crioconservación requiere de un medio de cultivo que promueva la vigorización de las plantas antes que la elongación; con la evaluación de los 14 medios se evidencia que proporciones iguales o superiores de BAP 2.2 uM y GA3 1.4 uM, no son aptas.
- El medio de cultivo más apto para la propagación de *S. phureja*, fue el suplementado con GA3 0.28 uM, sacarosa 0.053 M, inositol 0.055 mM y tiamina 11.8 uM, correspondiente a la modificación realizada al medio convencional de propagación.

Calidad del tejido

- Con la fase de preacondicionamiento se disminuye el riesgo de incluir ápices que tengan daño mecánico causados durante el corte, antes de iniciar el proceso de crioconservación.

⁷⁴ BOUHAL, S. Op., cit. p. 69 - 78. 1996.

⁷⁵ GOLMIRZAIE, A. Op., cit. p. 1 - 7. 1996.

- El vigorizar el tejido durante 3 – 5 días antes de la etapa de congelación resulta crítico, para favorecer el restablecimiento post-congelación.
- Para garantizar la uniformidad y tamaño de los ápices se pudo establecer que es primordial el uso de bisturí en la fase extracción.
- La suplementación del alginato con BAP 0.18 uM y GA3 0.28 uM, permitió obtener una mejoría considerable en la respuesta de los ápices.

Efecto de la concentración y tiempo de exposición a sacarosa

- *Solanum phureja* mostró sensibilidad a altas concentraciones de sacarosa. Las concentraciones 0.3 y 0.5 M durante 48 y 72 h respectivamente mostraron los mejores resultados.

Deshidratación en sílica gel

- Probablemente la deshidratación en sílica gel induzca un estrés previo a la congelación que no favorece la formación de brotes post-congelación.

Efecto de la solución cargadora y de las soluciones PVS2 y PVS4

- A concentraciones altas de glicerol (2 M) en la solución cargadora, se induce la alta formación de callos, lo cual no favorece los procesos de recuperación post-congelación.
- Con respecto a la respuesta observada en la utilización de las soluciones PVS2 y PVS4, se pudo determinar que la excesiva manipulación durante el proceso causó contaminaciones sucesivas, lo cual no permitió tener conclusiones sobre el tema. Sin embargo se debe ajustar el proceso para evitar la contaminación.
- La formación de callo indica que las concentraciones y/o tiempos de exposición a las soluciones de cargado, PVS2 y PVS4, todavía alcanzan un grado de toxicidad que puede estar afectando la respuesta de los ápices.
- Todos los pasos previos a la congelación van disminuyendo la respuesta del tejido, pues se van acumulando los efectos. Por tanto se deben ajustar de tal manera que su efecto sea el menor posible, para llevar a

congelación un tejido en optimas condiciones que pueda recuperarse en alto porcentaje.

RECOMENDACIONES

Antes de comenzar un estudio en crioconservación se debe contar con material vegetal uniforme y tener establecidas condiciones seguras de propagación.

Se propone evaluar la metodología de Deseccación para crioconservación en la que se manejan secados rápidos para especies susceptibles, probando diferentes concentraciones de agar y/o sacarosa, para continuar con el ajuste de las condiciones previas al congelamiento.

Los medios 1, 3, 4E, 5, 6, 7 y 8 evaluados en propagación, pueden servir de base para iniciar evaluaciones en la fase de recultivo. Así mismo se sugiere la utilización de concentraciones inferiores a 0.18uM de BAP para la fase de propagación.

Se recomienda hacer evaluaciones con las soluciones PVS2 y PVS4 diluidas (20 %, 60% y 100%) y con diferentes tiempos de exposición.

Para confirmar el efecto y la concentración adecuada de glicerol en la solución cargadora, se hace necesario realizar una prueba con material suficiente que corroboren los resultados, esto implica el uso de mínimo 2 accesiones.

Se sugiere evaluar otros medios de recultivo, con el fin de obtener respuestas de los ápices post – congelación que favorezcan la formación directa a brotes, evitando el paso por callos.

BIBLIOGRAFIA

ASHMORE, SARAH E. Status report on the development and application of *in vitro* techniques for the conservation and use of plant genetic resources. IPGRI. Roma, Italia. 1997. p. 3-4, 13.

BENSON, E. Variation in recovery of cryopreserved of shoot tips of *S. tuberosum* exposed to different pre and post freeze light regimes. En: Cryo-Letters. Cambridge. 1989. Vol. 10. p. 323-344.

BENSON, E. Advances in Plant Cryopreservation Technology Current Application in Crop Plant Biotech. En: Agbiotech News and Information. 1998. p. 133.

BOLIVAR, R., LOPEZ, G. Genética de la papa y su mejoramiento. En: Cuarto curso de actualización de conocimiento del cultivo de papa. Bogotá. 1985. p. 1-5.

BOUAHAL, S. DEREUDDRE, J. Cryopreservation of potato shoot tips by encapsulation-dehydration. Potato Research. París. 1996. Vol. 39. p. 69-78.

CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA. Producción de tubérculos - semillas de papa. Manual de capacitación. CIP. Lima Perú. 1997. Fascículo 4.1. p. 10.

DEBABRATA, S., PRAKASH, S. N. Vitrification: an efficient approach to cryopreservation of shoot tips for long term conservation of potato (*S. tuberosum*) germplasm. En: <http://130.75.194.9/seite10.htm>. India. 2000. p. 1 - 9.

ENGELMANN, F. 2000. Conferencia Crioconservación principios y práctica. Memorias del curso Técnicas de Crioconservación para plantas tropicales: Nuevas opciones para la conservación del germoplasma vegetal. CATIE. Costa Rica. 2000. p. 1,14,18.

----- Importance of Desiccation for the Cryopreservation of Recalcitrant Seed and Vegetatively Propagated Species. En: Plant Genetic Resources Newsletter. IPGRI. Roma. Italia. 1997. No 112. p 9-10.

----- *In vitro* conservation of horticultural genetic resources review of the state of the art. IPGRI. En: <http://wchr.agrsci.unibo.it/wc2/engelmann.html>. Roma, Italia. 1998. p.1-2.

ESCOBAR, R.; MAFLA G., and ROCA W. M. A methodology for recovering cassava plants from shoot tips maintained in liquid nitrogen. En: Plant Cell Reports. 1997. Vol. 16. p. 474-478.

ESTRADA, N. La biodiversidad en el mejoramiento genético de la papa. CID, Bolivia, 1996. pg. 25.

FABRE, J., DEREUDDRE, J. Encapsulation-dehydration: A new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot tips. En: Cryo-Letters. Cambridge. 1990. Vol. 11. p. 413-426.

FAJARDO, D. Sistemas Banco de Germoplasma Base. En: INFORME ANUAL. PROGRAMA NACIONAL DE RECURSOS GENÉTICOS Y BIOTECNOLOGÍA VEGETAL. 2001. Mosquera. Corpoica Tibaitatá.

FAO. Estado de la Diversidad. En: Informe Sobre el Estado de los Recursos fitogenéticos en el Mundo. FAO. Roma. 1996. p. 9.

GEORGE, E. plant propagation by tissue culture. Part 1 "The Technology". 2nd Ed. 1993. p. 178

GOLMIRZAI, A. M. PANTA, A. Advances in potato cryopreservation by vitrification. En: <http://www.cipotato.org/market/PgmRprts/pr95-96/program2/prog22.htm>. CIP. 1996. p. 1-7.

GOMEZ, M., REYES, P. Propagación y tuberización *in vitro* de tres variedades de papa criolla *Solanum phureja* de la Colección Central Colombiana de Papa. Santafé de Bogotá. 1998. p. 15. Trabajo de grado (Licenciado en Biología) Universidad Francisco José de Caldas. Facultad de Ciencias y Educación.

HARDING, K. Approaches to assess the genetic stability of plant recovered from *in vitro* culture. En: *In vitro* conservation of plant genetic resources. University of Kebangsaan. Malaysia. 1996. p. 135.

HARDING, K., BENSON, E. The effect of pre-freeze *in vitro* culture period on the recovery of cryopreserved shoot tips of *Solanum tuberosum*. Cryo-Letters Cambridge, U.K. 1991. Vol. 12. p.17-22.

HIRAI, D., SAKAI, A. . Cryopreservation of *in vitro* grown meristems of potato (*S. tuberosum*) by encapsulation- vitrification. Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application. IPGRI. Roma. Italia. 2000. p. 205 - 211.

LIGARRETO, G. Caracterización Agroindustrial de la Colección Central Colombiana de Papa. En: MEMORIAS DEL CONGRESO DE PRODUCCIÓN DE CULTIVOS Y FITOMEJORAMIENTO. Ibagué. 2001. (Tolima). p. 5.

LOPEZ, L. E. Las papas silvestres de Colombia. En: Papa. Santafé de Bogotá: FEDEPAPA No. 7 (Abril 1993). p. 5.

LORA, S.R. Fertilización de la papa en Colombia. En: Papa. Santafé de Bogotá. 1950. p. 26-36.

LUJAN, C. L. Historia de la papa. En: Papa. Santafé de Bogotá. No. 16 (Dic. 1996). p. 4-27.

MANRIQUE, N. Respuesta varietal de 95 genotipos de la colección núcleo de yuca *Manihot esculenta Crantz* a la crioconservación usando la técnica de encapsulación - deshidratación. Palmira Valle. 2000. p. 23. Trabajo de grado (Ingeniero agrónomo) Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias.

MEJIA, R. Cultivo in vitro de las plantas de papa. En: Manual de laboratorio. INIAA. Chile. 1988. Año 1. No. 1. p. 77.

MURASHIGE, T & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. En: *Physiol. Plant.* 1962. Vol. 15. p. 473-497.

RAMANATHA, V. The Use of Biotechnology for Conservation and Utilization of Plant Genetic Resources. En: *Plant Genetic Resources Newsletter.* 1994. No. 97. p. 7-8.

ROCA, W. Handbook of plant cell culture: crop species. New York: Mc Milliam publishing Co, 1984. p. 269.

-----, Cultivo de tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. Cali. CIAT. 1991. p. 716-717,725.

SHÄFER, A. Long term storage of old potato varieties by cryopreservation of shoot tips in liquid nitrogen. Alemania. En: <http://www.ipgri.cgiar.org>

SAKAI, A. Cryopreservartion of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb var. *Brasilensis* Tanaka) by vitrification. En: *Plant Cell Reports.* 1990. No 9. P. 30-33.

SAKAI, A. Development of cryopreservation techniques. En: cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research, progress and application. IPGRI. Roma. Italia. 2000. p. 2

TAKAGI, H. Cryopreservation of in vitro- grow shoot tips of taro (*Colocasia esculenta* (L), Schoot) by vitrification. Plant cell report. 1997. Vol. 16. No. 9. p. 594-599.

TOWILL, L. E. *Solanum etuberosum*: A model for studying. The cryobiology of shoot-tips in the tuber-bearing *Solanum* species. Plant Science Letters. University of Wisconsin, Madison, (USA). 1981. 20. p. 315-324.

WHITERS. Germplasm preservation through tissue culture: an overview. Cultivos de tejidos en la Agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Cali. CIAT. 1991. pg 717.

Anexo A. Medio de recultivo

1. Medio de recuperación R3

Componentes	Cantidad
Sacarosa	0.3M
Carbón Activado	0.2%
Agar Duchefa	0.3%

Anexo B. Soluciones de Encapsulación y vitrificación

1. Soluciones de alginato de sodio y cloruro de calcio

COMPONENTES (100ml)	ALGINATO	CaCl ₂ – 100 mM
Sales Basales	M&S- sin Ca	0
Sacarosa (M)	0.058	0
Alginato de Sodio %	3	0
Myo-inositol (mM)	0.0055	0
Tiamina- HCl(uM)	44.38	0
BAP (uM)	0.01	0
GA ₃ (uM)	0.02	0
CaCl ₂ * 2H ₂ O	0	13.24
Ph	5.8	5.8

2. Soluciones PVS

COMPONENTE 100 ml	PVS2*	PVS2 20%	PVS2 60%	PVS 4*	PVS4 20%	PVS4 60%
Sales basales	M&S	M&S	M&S	M&S	M&S	M&S
Sacarosa (M)	0.4	0.4	0.4	0.6	0.6	0.6
Glicerol(%)	30	6	18	35	7	21
Etilen glicol (%)	15	3	9	20	4	12
DMSO(%)	15	3	9	0	0	0
pH	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8

*Soluciones PVS al 100%

3. Soluciones de cargado y enjuague

COMPONENTE	CARGADO	ENJUAGUE
Sacarosa	0.3	1.2
Glicerol(M)	0.5 – 2	0
PH	5.8	5.8

Anexo C. Promedios de las mediciones para las variables largo y ancho en los medios de preacondicionamiento.

TRAT	CIP		CPRI		HS		CIAT	
	ANCHO	LARGO	ANCHO	LARGO	ANCHO	LARGO	ANCHO	LARGO
Inicial	0.72333	1.46333	0.72333	1.46333	0.72333	1.46333	0.72333	1.46333
1	0.73	1.3	0.85	1.56	0.59	1.53	0.74	1.28
3	1.02	1.74	0.98	2.01	1.04	2	0.91	1.63
5	1.22	2.23	0.98	2.5	1.07	2.31	0.96	2.13
7	1.07	2.71	0.93	2.5	1.03	2.68	1.07	2.25
11	1.2	2.69	0.94	2.4	1.03	2.6	1.08	2.51
21	1.18	2.4	1.09	2.6	0.95	2.23	1.15	3.05

Anexo D. Análisis de Varianza para la Deshidratación en sílica-gel

Parámetro de evaluación: %Brotos

Fuente de variación	G.L.	S.C.	CM	Valor(F)	Significancia
Modelo	5	8741.66666	1748.33333	19.07	0.0013
Tratamiento	1	7	3	2.27	0.1824
Tiempo	2	208.333333	208.333333	44.00	0.0003
Trat *	2	8066.66666	4033.33333	2.55	0.1583
Tiempo	6	7	3		
Error	11	466.666667	233.333333		
Total corregido		550.000000	91.666667		
		9291.66666			
		7			
RMSE: 9.574271			CV: 21.67759		

** Diferencias altamente significativas (P≤0.01)

* Diferencias significativas (P ≤0.05)

Parámetro de evaluación: %Brote/callo

Fuente de variación	G.L.	S.C.	CM	Valor(F)	Significancia
Modelo	5	21.6529359	4.33058718	1.58	0.2955
Tratamiento	1	0	2.39311631	0.87	0.3864
Tiempo	2	2.39311631	8.70607199	3.17	0.1148
Trat *	2	17.4121439	0.92383781	0.34	0.7268
Tiempo	6	8	2.74346430		
Error	11	1.84767561			
Total		16.4607858			
corregido		1			
		38.1137217			
		1			
RMSE: 1.656341			CV: 69.63848		

** Diferencias altamente significativas ($P \leq 0.01$)

* Diferencias significativas ($P \leq 0.05$)

Datos transformados $\sqrt{x + 0.5}$

Parámetro de evaluación: %callo

Fuente de variación	G.L.	S.C.	CM	Valor(F)	Significancia
Modelo	5	12.4994558	12.4994558	1.43	0.3334
Tratamiento	1	7	7	0.70	0.4354
Tiempo	2	1.21640631	1.21640631	3.01	0.1245
Trat *	2	10.4808001	5.24040009	0.23	0.8011
Tiempo	6	7	0.40112469		
Error	11	0.80224939	1.74245595		
Total		10.4547357			
corregido		1			
		22.9541915			
		8			
RMSE: 1.320021			CV: 57.58951		

** Diferencias altamente significativas ($P \leq 0.01$)

* Diferencias significativas ($P \leq 0.05$)

Datos transformados $\sqrt{x + 0.5}$

Parámetro de evaluación: %muertos

Fuente de variación	G.L.	S.C.	CM	Valor(F)	Significancia
Modelo	5	15141.6666	3028.33333	51.91	0.0001
Tratamiento	1	7	8.33333	0.14	0.7185
Tiempo	2	8.33333	7408.33333	127.00	0.0001
Trat *	2	14816.6666	158.33333	2.71	0.1447
Tiempo	6	7	58.33333		
Error	11	316.66667			
Total		350.00000			
corregido		15491.6666			
		7			
RMSE: 7.637626			CV: 18.70439		

** Diferencias altamente significativas (P≤0.01)

* Diferencias significativas (P ≤0.05)

Anexo E. Análisis de varianza para las soluciones de cargado

Parámetro de evaluación: Brotes

Fuente de variación	G.L.	S.C.	CM	Valor(F)	Significancia
Tratamiento	7	39.7142857	5.67346939	2.20	0.1785
Error	6	1	2.58333333		
Total	13	15.5000000			
corregido		0			
		55.2142857			
		1			
RMSE: 1.607275			CV: 21.84646		

** Diferencias altamente significativas (P≤0.01)

* Diferencias significativas (P ≤0.05)

Parámetro de evaluación: callo

Fuente de variación	G.L.	S.C.	CM	Valor(F)	Significancia
Tratamiento	7	3.79330651	0.54190093	2.65	0.1282
Error	6	1.22885596	0.20480933		
Total	13	5.02216246			
corregido					
RMSE: 0.452559			CV:30.42379		

** Diferencias altamente significativas (P≤0.01)

* Diferencias significativas (P ≤0.05)

Datos transformados $\sqrt{x + 0.5}$

Parámetro de evaluación: Muertos

Fuente de variación	G.L.	S.C.	CM	Valor(F)	Significancia
Tratamiento	7	0.76950338	0.10992905	0.84	0.5928
Error	6	0.78388980	0.13064830		
Total corregido	13	1.55339318			
RMSE: 0.361453			CV:38.33455		

** Diferencias altamente significativas ($P \leq 0.01$)

* Diferencias significativas ($P \leq 0.05$)

Datos transformados $\sqrt{x} + 0.5$

Anexo F. Análisis de Varianza para las soluciones PVS.

Parámetro de evaluación: %Brotos

Fuente de variación	G.L.	S.C.	CM	Valor(F)	Significancia
Tratamiento	6	6469.23076	1078.20512	12.94	0.0033
Error	6	9	8		
Total corregido	12	500.000000 6969.23076 9	83.333333		
RMSE: 9.128709			CV: 49.44718		

** Diferencias altamente significativas ($P \leq 0.01$)

* Diferencias significativas ($P \leq 0.05$)

Parámetro de evaluación: %callo

Fuente de variación	G.L.	S.C.	C.M	Valor(F)	Significancia
Tratamiento	6	33.8396429	5.63994050	10.26	0.0061
Error	6	9	3.72106369		
Total corregido	12	22.3263821 2 56.1660251 1			
RMSE: 9.128709			CV: 13.48559		

** Diferencias altamente significativas ($P \leq 0.01$)

* Diferencias significativas ($P \leq 0.05$)