

CRIOPRESERVACIÓN DE YEMAS AXILARES DE PATATA (*Solanumtuberosum*L.) POR EL MÉTODO DE  
ENCAPSULACIÓN-DESHIDRATACIÓN.

## ÍNDICE

<b>1- RESUMEN</b> .....	Pág.5
<b>2- INTRODUCCIÓN</b> .....	Pág.6
2.1- Interés en la conservación de la Biodiversidad .....	Pág.6
2.2- Bancos de germoplasma.....	Pág.7
2.2.1-Conservación a medio plazo .....	Pág.7
2.2.1.1- Bancos de semillas .....	Pág.7
2.2.1.2- Cultivo <i>in vitro</i> de tejidos.....	Pág.8
2.2.2- Conservación a largo plazo: criopreservación .....	Pág.8
2.2.2.1- Historia de la criopreservación.....	Pág.10
2.2.2.2- Métodos de criopreservación .....	Pág.12
M.C.1- Desección .....	Pág.12
M.C.2- Precultivo .....	Pág.12
M.C.3- Desección- precultivo.....	Pág.12
M.C.4- Gota congelada.....	Pág.13
M.C.5- Vitrificación .....	Pág.13
M.C.6- Encapsulación-vitrificación .....	Pág.14
M.C.7- Encapsulación-deshidratación.....	Pág.14
2.2.2.3- Factores importantes a considerar .....	Pág.15
F.1- Nucleación .....	Pág.15

CRIOPRESERVACIÓN DE YEMAS AXILARES DE PATATA (*Solanumtuberosum*L.) POR EL MÉTODO DE  
ENCAPSULACIÓN-DESHIDRATACIÓN.

F.2- Vitrificación .....	Pág.16
F.3- Estrategia de deshidratación del material vegetal por vitrificación completa.....	Pág.17
F.4- Estrategia de deshidratación del material vegetal por congelación lenta: .....	Pág.18
F.5- Tratamientos crioprotectores: .....	Pág.18
F.6- Efecto del genotipo .....	Pág.19
2.2.2.4- Tratamientos de post-congelación.....	Pág.19
2.2.2.5- Estudios de criopreservación en patata ( <i>Solanum tuberosum</i> L.).....	Pág.20
<b>3- OBJETIVOS</b> .....	Pág.25
3.1- Objetivo General .....	Pág.25
3.2- Objetivo específico.....	Pág.25
<b>4- MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	Pág.26
4.1- Preparación de los Medios de Cultivo.....	Pág.26
4.2- Material vegetal.....	Pág.28
4.3- Aislamiento de yemas axilares .....	Pág.28
4.4- Encapsulación.....	Pág.29

CRIOPRESERVACIÓN DE YEMAS AXILARES DE PATATA (*Solanumtuberosum*L.) POR EL MÉTODO DE  
ENCAPSULACIÓN-DESHIDRATACIÓN.

**ÍNDICE**

4.5- Deshidratación.....	Pág.29
4.6- Congelación.....	Pág.30
4.7- Descongelación .....	Pág.30
4.8- Cultivo.....	Pág.31
4.9- Toma de datos .....	Pág.31
<b>5- RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>Pág.32</b>
<b>6- CONCLUSIONES .....</b>	<b>Pág.34</b>
<b>7- BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>Pág.35</b>

CRIOPRESERVACIÓN DE YEMAS AXILARES DE PATATA (*Solanumtuberosum*L.) POR EL MÉTODO DE  
ENCAPSULACIÓN-DESHIDRATACIÓN.

**ÍNDICE DE FIGURAS**

FIGURA 1: Material vegetal del que se extraen las yemas axilares .....	Pág.28
FIGURA 2: Lupa binocular y ápices seleccionados en medio <i>MALG</i> .....	Pág.28
FIGURA 3: Deshidratación de cápsulas tras encapsulación .....	Pág.29
FIGURA 4: Cápsulas en microtubos sumergidos en nitrógeno líquido .....	Pág.30
FIGURA 5: Descongelación de cápsulas .....	Pág.30
FIGURA 6: Placa preparada para el cultivo tras tratamiento .....	Pág.31
FIGURA 7: Detalle de brotación de las cápsulas Control.....	Pág.32

## CRIOPRESERVACIÓN DE YEMAS AXILARES DE PATATA (*Solanumtuberosum*L.) POR EL MÉTODO DE ENCAPSULACIÓN-DESHIDRATACIÓN.

### 1- RESUMEN

Para la realización de este Trabajo Fin de Carrera se utilizó la técnica de encapsulación-deshidratación para criopreservar yemas de patata (*Solanumtuberosum* L.) de la variedad Desirée.

Se aislaron meristemos axilares de vitroplantas de patata, con la ayuda de un estereoscopio y se cultivaron durante un día en un medio con alginato de sodio.

Posteriormente se precultivaron las cápsulas en un medio de cultivo con concentraciones crecientes de sacarosa (de 0,3 a 1,5M) por periodos de 24 horas en cada concentración.

Las cápsulas fueron deshidratadas durante 1 y 2 horas, según tratamiento, utilizando el flujo de aire estéril de la cabina de flujo laminar. A partir de este punto se separaron 10 cápsulas de cada tratamiento que sirvieron como Control, cultivándolas en un medio de cultivo estándar *P3 GA3*.

Con el resto de cápsulas se procedió a la congelación, iniciando un enfriamiento lento haciendo uso de un congelador tradicional, seguido inmediatamente por la congelación en Nitrógeno Líquido (NL).

Tras congelar las cápsulas se inició la descongelación de éstas, una vez más, aprovechando el aire estéril de la cabina de flujo laminar.

Cuando las cápsulas estuvieron de nuevo a temperatura ambiente, se colocaron en placas petri con medio de cultivo *P3*, enriquecido con giberelinas y se llevaron a la cámara de cultivo donde permanecieron, primero en oscuridad y luego con el fotoperiodo típico de estas cámaras, hasta el final de este estudio.

No se consiguió establecer un protocolo de criopreservación ya que únicamente brotaron las yemas procedentes de las placas Control, que no habían sido congeladas. Todo el material congelado no fue capaz de brotar tras la descongelación, en las condiciones ensayadas.

## 2- INTRODUCCIÓN

### 2.1- INTERÉS EN LA CONSERVACIÓN DE LA BIODIVERSIDAD

Los recursos fitogenéticos están siendo afectados por diferentes factores que han provocado su erosión genética, por lo cual han presentado una reducción continua en la variabilidad de los genes disponibles para su utilización en la mejora genética. Con el objeto de contribuir a reducir este proceso se han implementado estrategias de conservación de germoplasma *ex situ* que pretenden mantener y preservar la variabilidad original de las poblaciones con la menor pérdida de información genética posible (Rivera *et al.* 2008).

Así pues, la conservación de los recursos genéticos es un tema de enorme importancia en todos los foros de discusión ambiental del mundo (Takagi *et al.* 1997). La erosión genética en la mayoría de los cultivos importantes, se ha convertido en una preocupación tanto para los agricultores como para los investigadores de diferentes áreas y en diferentes regiones del planeta, siendo la recuperación del germoplasma lo primordial debido a su importancia en el mejoramiento de las especies económicamente utilizables para los pueblos (Lambardi *et al.* 2000). Debido a ésto, se ha visto un rápido incremento en el número de accesiones de germoplasma que se están conservando en los bancos de germoplasma nacionales e internacionales de cada región. El número sube cada vez más, y el principal reto entonces, es desarrollar los protocolos más eficientes posibles para la conservación a largo plazo (Englemann, 1997). Cabe recalcar que la conservación vegetal a largo plazo, no solo está siendo desarrollada en el ámbito agrícola, sino también en el médico. Por cientos de años los conocimientos científicos para la medicina, han tenido como base el conocimiento ancestral de la medicina natural. Las plantas, de las cuales se extraen los principios activos de algunos medicamentos, están siendo conservadas en bancos de genes, presentando los mismos problemas de conservación a largo plazo que en la rama agrícola (Dixit *et al.* 2004).

La conservación del medio ambiente es un tema de discusión que ha tomado fuerza en las últimas décadas, destacándose los esfuerzos en situaciones como el cuidado de bosques primarios de la Amazonía, de especies en peligro de extinción y de sistemas ecológicos. En el campo de la agricultura, los esfuerzos por conservar fueron escasos; más que nada porque los agricultores tradicionales o las grandes transnacionales, se han enfocado en el mejoramiento de las especies agrícolas ya explotadas, y han dejado de lado las variedades silvestres. Esto ha traído como resultado la erosión genética de una inmensa cantidad de especies vegetales que ahora se las explora para ser utilizadas en el mejoramiento genético. Los investigadores buscan y tratan de conseguir las variedades tradicionales que han existido por años de manera silvestre y que se han perdido por la poca importancia económica que se les ha dado. De hecho se estima que en la actualidad, alrededor de 100.000 especies vegetales están en peligro de extinción en su

## CRIOPRESERVACIÓN DE YEMAS AXILARES DE PATATA (*Solanumtuberosum*L.) POR EL MÉTODO DE ENCAPSULACIÓN-DESHIDRATACIÓN.

hábitat silvestre, lo cual representa casi un tercio de las especies de plantas a nivel mundial (Panis&Lambardi, 2005).

### 2.2- BANCOS DE GERMOPLASMA

La conservación de germoplasma comprende varias estrategias importantes en la toma de decisiones sobre los protocolos más adecuados a utilizarse, dependiendo tanto de la finalidad como de la experiencia que se tenga con la especie utilizada. Es decir, es muy diferente una conservación enfocada para un banco de germoplasma a una enfocada al mejoramiento de una variedad mediante el cruce con la especie que se preserva. Sea cual sea el proceso, es importante definir aspectos básicos de las plantas: como el ciclo de vida natural, tamaños de los individuos y modo de manejo del cultivo en un área de conservación (Scocchi& Rey, 2004). La conservación de las plantas en su lugar de origen o hábitat naturales, conocido como conservación *in situ*, requiere del manejo de parques naturales, grandes organizaciones y grandes sumas de dinero. Este tipo de conservación puede dar frutos en los casos de la conservación de ecosistemas enteros o de lugares que representan reservas de agrobiodiversidad para una región o un país; sin embargo, en el caso de la conservación centrada a una especie en sí, es mucho más complicado que se pueda mantener o rescatar esta especie en su lugar de origen. Debido a esto existen otros métodos de conservación conocidos como los métodos *ex situ*; y que representan una opción en el manejo controlado de una o muchas especies en lugares más pequeños y mejor optimizados, como son: bancos de semillas, bancos de cultivo *in vitro*, colecciones de jardines botánicos o viveros, entre los principales (Scocchi& Rey, 2004). Ya que la conservación *ex situ* necesita de tratamientos dirigidos a guardar el germoplasma, se lo relaciona también con conservación *in vitro*; la cual se basa en trabajos de laboratorio con sistemas controlados de asepsia.

#### 2.2.1-CONSERVACIÓN A MEDIO PLAZO:

##### 2.2.1.1- BANCOS DE SEMILLAS

El banco de semillas es uno de los métodos más utilizados y más sencillos para la conservación de germoplasma. Una de las principales ventajas es que permite almacenar grandes cantidades de material, de una manera económica, incrementando así la variabilidad genética guardada. El International PlantGeneticResourcesInstitute (IPGRI) recomienda la desecación de la semilla entre un 3-7% de humedad y su almacenamiento a temperaturas de -18°C. Algo que se debe tener en cuenta en este método, es que no todas las semillas se pueden almacenar, debido a la pérdida de viabilidad de algunas de ellas por desecación; estas semillas son conocidas como “recalcitrantes”. Las semillas de especies tropicales y subtropicales se encuentran mayormente en este grupo de semillas problemáticas: como muchos frutales, palmeras o el cacao (Scocchi& Rey 2004). Además existen especies como la caña de azúcar o

## CRIOPRESERVACIÓN DE YEMAS AXILARES DE PATATA (*Solanumtuberosum*L.) POR EL MÉTODO DE ENCAPSULACIÓN-DESHIDRATACIÓN.

la patata, las cuales no pueden ser conservadas por este método porque su propagación es vegetativa (Scocchi& Rey, 2004). La patata es uno de esos casos donde la conservación en forma de semilla verdadera es inviable debido a su alto grado de heterocigosis y a su baja fertilidad (Veramendi y Arregui 2001). Por último, las semillas que si resultan viables después de la desecación y se las puede almacenar por este método, son conocidas como “ortodoxas”; y entre ellas están el arroz, tomate y tabaco (Scocchi& Rey, 2004).

### 2.2.1.2- CULTIVO *in vitro* DE TEJIDOS

El cultivo *in vitro* de tejidos ha dado paso a un nuevo grupo de tecnologías para conservar plantas; esta técnica parte del principio de latotipotenciade las células de las plantas (Scocchi& Rey, 2004). Este método es el óptimo para la conservación de las plantas que tienen semillas recalcitrantes y por lo tanto deben ser propagadas vegetativamente. Las investigaciones de este tipo se realizan desde hace tres décadas en centros especializados como el Centro Internacional de la Papa (CIP)y el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) en Sudamérica; y básicamente, lo que se tiene ahora son genotipos conservados manteniendo plantas en cultivo *in vitro*.

Sin embargo, este método también tiene ciertos contratiempos, y uno de esos ellos es lo trabajoso que puede resultar mantener muchos individuos en permanentes sub-cultivos en los laboratorios. Es por esto que se trabaja con ciertos protocolos deretardamientodel crecimiento de las plantas en el cultivo *in vitro*; lo cual se basa en rebajar las condiciones óptimas del medio de cultivo, y las condiciones físicas a un nivel mínimo para el desarrollo lento, más controlado para las plantas (Scocchi& Rey 2004).

En general se requiere subcultivar el material a un medio de cultivo fresco cada 4-8 semanas. Cuando se quiere utilizar el cultivo *in vitro* como un sistema de conservación de germoplasma se puede actuar sobre dos factores; las condiciones ambientales de la cámara de cultivo y la composición del medio de cultivo. Los sistemas de conservación a medio plazo tienen en común el empleo de bajas temperaturas (6-15 °C) y baja irradiación (menor de 30-mol.m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>). Otras características comunes son el uso de retardadores de crecimiento como ácidoabscísico, manitol o ancymidol (Veramendiet.al. 1998: Doddset. al. 1991)

### **2.2.2- CONSERVACIÓN A LARGO PLAZAO: CRIOPRESERVACIÓN**

La criopreservación, es decir el almacenamiento del material biológico a temperatura ultra baja, generalmente la del nitrógeno líquido (-196 °C), es la única técnica actualmente disponible que asegura la conservación a largo plazo del germoplasmavegetal (Engelmann, 2004).A esta temperatura las divisiones celulares y los procesos metabólicos se encuentran detenidos, por lo que el material vegetal puede ser almacenado por un tiempo teóricamente ilimitado (Gonzalez-Arno&Engelmann, 2006). Más aún, el material criopreservado requiere



## CRIOPRESERVACIÓN DE YEMAS AXILARES DE PATATA (*Solanumtuberosum*L.) POR EL MÉTODO DE ENCAPSULACIÓN-DESHIDRATACIÓN.

un mínimo mantenimiento, un espacio reducido y no existen riesgos de inestabilidad genética (Sakai, 2000).

Es un método no dependiente de la electricidad, el costo del nitrógeno líquido es bajo y éste no es inflamable, además el material está protegido de la contaminación, ya que una vez almacenado no se manipula (Abdelnour, 2001)

La criopreservación de tejidos biológicos puede ser exitosa solo si se logra evadir la formación de cristales intracelulares en el proceso de congelación. Esta es la clave de toda técnica de congelación de células vegetales, debido a que los daños causados por estos cristales son irreversibles al afectar directamente a la permeabilidad de las membranas celulares (Panis&Lambardi, 2005).

En criopreservación se recomienda el almacenamiento de estructuras organizadas como meristemos, ápices, semillas, embriones cigóticos, polen y embriones somáticos para asegurar la estabilidad genética de los materiales, aunque también se han utilizado callos y suspensiones celulares. Este sistema de conservación permite almacenar desde células hasta órganos y tanto materiales generados en el laboratorio como los producidos por ingeniería genética. El factor decisivo en la selección del material a conservar es la disponibilidad de la técnica de cultivo *in vitro* para las especies de interés, con el fin de regenerar fácilmente plantas a partir del material almacenado. Por lo tanto para lograr el éxito en un programa de criopreservación es indispensable establecer a priori, un protocolo eficiente para la micropropagación de la especie de interés. (Ashmore 1997)

Para la mayoría de las especies vegetales, la criopreservación se encuentra en estado experimental, sin embargo se han logrado buenos avances en géneros como *Rubus*, *Pyrus*, *Solanum* y *ElaeisGuineensis*. (Abdenlur, 1999)

En criopreservación también es muy importante estimar la supervivencia de los tejidos criopreservados. Generalmente la supervivencia se determina por la recuperación de los tejidos empleando el cultivo de los mismos.

Adicionalmente, existen pruebas como la de diacetato de fluoresceína (fluoresceindiacetate - FDA) y tetrazolio por espectrofotometría que permiten determinar la supervivencia en menor tiempo. La prueba de FDA, es apta para cultivos de células viables no diferenciadas, las cuales poseen la esterasa activa. En esta prueba, las células vivas se observan de color amarillo verdoso bajo la luz ultravioleta del microscopio. Las células no viables no presentan fluorescencia. Esta prueba tiene como ventaja que puede efectuarse inmediatamente después de la descongelación, con el fin de determinar la habilidad de las células para sobrevivir a la criopreservación. Sin embargo se recomienda efectuar una segunda evaluación 24 horas después de la descongelación, con el fin de evitar falsos positivos (Widholme, 1972). La prueba de tetrazolio por espectrofotometría puede ser utilizada para diferentes tipos de tejidos. La

## CRIOPRESERVACIÓN DE YEMAS AXILARES DE PATATA (*Solanum tuberosum* L.) POR EL MÉTODO DE ENCAPSULACIÓN-DESHIDRATACIÓN.

principal ventaja de esta metodología es que permite cuantificarla viabilidad a través del espectrofotómetro (Steponkus y Lamphear, 1967). Las deshidrogenasas y el NADH (nicotinamida adenina dinucleótido) reducen el tetrazolio generando el formazán (color rojo), el cual puede ser detectado por el espectrofotómetro. La prueba puede interpretarse como la medida de la viabilidad y actividad respiratoria. Al igual que la prueba de FDA, también se pueden crear falsos positivos por lo cual es importante repetir la prueba 24 horas después de la descongelación (Steponkus y Lamphear, 1967).

En teoría, la criopreservación representa por ahora la única técnica realmente efectiva para la conservación de plantas a largo plazo; ya que según la literatura, esta técnica ofrece la posibilidad de mantener el material vegetal almacenado mucho tiempo sin correr riesgos de variación somaclonal ni cambios fisiológicos en las plantas (Hirai and Sakai, 1999; Sakai, 2000; Matsumoto *et. al.* 2001). Gracias a estas ventajas, no compartidas por otras técnicas, se han desarrollado métodos de criopreservación bastante efectivos y con un amplio espectro de aplicación. Estos métodos varían entre sí, debido a factores como: especie con las que se trabaja, disponibilidad de recursos, cantidad de individuos por evento y más que nada, por la tasa de eficiencia que arroja cada uno de estos diferentes métodos. (Matsumoto *et. al.* 1994; Takagiet. *al.* 1997; Charoensubet. *al.* 1999; Thinh *et. al.* 1999; Sakai 2000)

### 2.2.2.1. HISTORIA DE LA CRIOPRESERVACIÓN

La criopreservación de células, tejidos y órganos vegetales tiene sus raíces históricas en estudios realizados en la supervivencia de especies vegetales en condiciones de temperaturas bajo cero grados Celsius. A finales de los cincuenta, se propone por primera vez que algunos materiales pueden ser recuperados después de exponerlos a ultra bajas temperaturas. Sin embargo, no fue sino hasta 1973, después de numerosos experimentos, cuando se logró una verdadera criopreservación de células de zanahoria (*Daucus carota*) en nitrógeno líquido (Abdenour 2001, Cisne 1992).

Los primeros protocolos de criopreservación fueron desarrollados en los años 80 incluyendo pretratamientos con crioprotectores seguidos de congelación lenta. Estos protocolos basados en la congelación para provocar la deshidratación (Engelmann 1997) fueron aplicados a numerosas especies, especialmente de climas templados, sin embargo, había casos de plantas que no producían buenos resultados. Más investigaciones llevaron a nuevas conclusiones en los años 90 y se establecieron protocolos basados en la vitrificación (Engelmann, 2000).

De las plantas que se investigan actualmente, las que tal vez han dado más dificultad para la aclimatación a los procesos de criopreservación son las plantas tropicales y subtropicales (Wang *et. al.* 2005). Esto es muy lógico desde el punto de vista de la genética, ya que estas plantas son las que menos exposición al frío tienen en sus condiciones normales de

## CRIOPRESERVACIÓN DE YEMAS AXILARES DE PATATA (*Solanumtuberosum*L.) POR EL MÉTODO DE ENCAPSULACIÓN-DESHIDRATACIÓN.

reproducción; lo cual podría indicar que no disponen de los genes necesarios para adaptarse a bajas temperaturas. Por evolución, estas plantas pueden vivir en condiciones extremas de humedad, por ejemplo, más no necesariamente de frío; es por esto que los esfuerzos en la conservación de estas plantas está tomando importancia en varios centros de investigación (Panis&Lambardi 2005).

La criopreservación comprende diferentes metodologías que se encuentran enmarcadas en dos grandes grupos: clásicas y modernas. Las clásicas hacen referencia a la crioprotección química, en la que 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; técnica que supera a la química por su simplicidad ya que no requiere de congelación programada y es aplicable a un amplio rango de genotipos (Villa y Sánchez, 2003).

Las técnicas de criopreservación clásicas se desarrollaron en las décadas de 1970 y 1980; involucran un pretratamiento con un crioprotector que después es sometido a una congelación muy lenta empleando un aparato de enfriamiento programable. Las sustancias crioprotectoras más utilizadas son dimetilsulfóxido (DMSO), manitol, sorbitol, sacarosa y polietilenglicol (PEG). Los crioprotectores tienen acción osmótica, pero algunos de ellos (por ejemplo DMSO) pueden entrar en las células y proteger la integridad celular durante la congelación. Para la mayoría de los materiales, es conveniente hacer un enfriamiento lento (0,5 a 2°C/min) hasta alcanzar aproximadamente los -40°C, y posteriormente realizar la inmersión rápida de muestras en el nitrógeno líquido. Los procedimientos de criopreservación clásicos son principalmente usados para el enfriamiento de tejidos no diferenciados como las suspensiones celulares y callos (Engelmann, 2000).

Para la criopreservación de tejidos diferenciados como órganos, ápices, embriones cigóticos y somáticos, se han desarrollado nuevas técnicas durante los últimos años. Consisten en extraer la mayor parte del agua por deshidratación física u osmótica de los explantes seguida por una congelación muy rápida que produce vitrificación de los solutos contenidos dentro de las células, es decir, la formación de una estructura vítrea amorfa sin que se presente la formación de cristales de hielo que son perjudiciales para la estructura celular. Sus principales ventajas comparadas con los procedimientos clásicos son su simplicidad, no requiere de un congelador programable, y su aplicación a una gama amplia de genotipos. A estas técnicas pertenecen la encapsulación-deshidratación, encapsulación-vitrificación, la desecación, el presecamiento, el presecamiento-desecamiento y la gota congelada (Engelmann, 2000).

### **2.2.2.2. MÉTODOS DE CRIOPRESERVACIÓN**

#### **M.C.1: Desecación:**

La base para todo proceso de criopreservación, es que el tejido que se vaya a utilizar sea previamente deshidratado para que no se formen los cristales de hielo intracelulares que rompen las membranas y afectan a la integridad de las células (Wang *et. al.* 2005).

El proceso de desecación es un procedimiento simple que se puede realizar en cualquier cabina de flujo laminar. Está diseñado para emplearse en semillas, las cuales de por sí tienen una resistencia natural al flujo de aire por el ectodermo que presentan. El método en sí consta de someter a la semilla a una corriente de aire como en un flujo laminar o a una cámara hermética que contenga sílica gel. Una vez que las semillas alcancen los niveles óptimos de agua, alrededor de 3 a 7%, se las somete a la congelación con nitrógeno líquido (Scocchi& Rey, 2004)

#### **M.C.2: Precultivo:**

Esta técnica se caracteriza por el uso de sustancias conocidas como crioprotectores. Los ejemplos más utilizados son; la sacarosa para meristemasde *Musa spp.* por ejemplo, el PEG, DMSO y glicerol para embriones cigóticos, anteras, meristemas y semillas de algunas especies como *Orizaspp.* y algunas frutas tropicales (Scocchi& Rey, 2004; Engelmann, 1991). Es importante diferenciar entre dos tipos de crioprotectores: los penetrantes en la célula y los no penetrantes. El uso de cada uno de éstos depende estrictamente de la metodología de criopreservación y del material vegetal que se esté utilizando (Panis& Lombardi, 2005). Por ejemplo, el PEG constituye un criopreservante no penetrante por su alto peso molecular; mientras que el DMSO o el Glicerol son criopreservantes penetrantes, aunque también son tóxicos para la célula.

#### **M.C.3: Desecación-Precultivo:**

Esta metodología es la unión de las dos técnicas descritas anteriormente. Esta técnica se aplica principalmente en frutos tropicales de muy difícil propagación como el cocotero. Consiste en utilizar crioprotectores, como algunos azúcares, para un pre-tratamiento de las muestras; luego se las deseca a un porcentaje medio y se las somete a un enfriamiento rápido y directo en nitrógeno líquido. La clave de este proceso está en la duración del mismo. En algunos casos el proceso puede durar unas pocas horas; sin embargo, en el caso de la palmera de aceite, el proceso dura hasta 7 días (Panis&Lambardi, 2005; Scocchi& Rey, 2004)

#### **M.C.4:Gota congelada:**

El método de la gota congelada se ha ensayado en diferentes cultivos sin obtenerse resultados tan satisfactorios como se esperaba. Una de las pocas especies que ha tenido un verdadero éxito es la patata (*Solanumtuberosum* L.), con la cual se han estandarizado algunos protocolos (Schäfer-Menuhret.*al.*, 1996). La base del proceso está en un tratamiento de precultivo con DMSO de 2 a 3 horas en un medio líquido; luego se forma una gota que se suspende sobre el papel de aluminio, la cual por último se la sumerge en nitrógeno líquido (Schäfer-Menuhret.*al.* 1997).Hasta el momento se conoce que los resultados exitosos que se han obtenido son de un 50% de recuperación de los explantes. Según la literatura se han probado alrededor de 140 variedades de *Solanumtuberosum*, con las cuales se han obtenido tales porcentajes (Mix-Wagner *et. al.*, 2003).

#### **M.C.5:Vitrificación:**

Como ya se dijo, la vitrificación es un proceso que implica una mezcla de soluciones de criopreservación, de las cuales la mayoría penetran en la célula; sin embargo, siempre se tiene en el cóctel, soluciones que no penetren la célula. De manera general, estas mezclas de soluciones proporcionan a la célula una protección total, tanto dentro de ella como fuera (Panis&Lambardi, 2005).

La técnica en sí, se basa en una serie de pre-tratamientos a los cuales son sometidos los explantes que se quieren conservar. Existen diferentes soluciones de vitrificación, pero la PVS2 es la más utilizada nivel mundial; ésta contiene: 30% de Glicerol, 15% de etilenglicol, 15% DMSO y 0.4M de sacarosa (Sakai.*et.al.* 1990). Esta solución representa la base de la gran mayoría de experimentos de vitrificación, y a la cual se le hacen algunos cambios según las necesidades específicas de las variedades con las que se trabaje. Tras estos pre-tratamientos con soluciones vitrificantes, mantenidas generalmente a 0°C para evitar toxicidad, las muestras se sumergen directamente en nitrógeno líquido o a veces se puede realizar un descenso lento y controlado de la temperatura (Scocchi& Rey. 2004).

Hay aspectos importantes a tener en cuenta en este método, pero el más importante tal vez es que estas soluciones vitrificantes son tóxicas para las plantas y, debido a esto, el tiempo de exposición a ellas debe ser controlado dependiendo del tamaño y tipo de explante con el que se trabaje (Sakar&Naik, 1998).

### **M.C.6: Encapsulación-Vitrificación:**

Este representa tal vez el método más utilizado en la criopreservación tradicional. El desarrollo de esta técnica se originó de pruebas con especies subtropicales, las cuales no respondían bien ni a la vitrificación por si sola ni a la encapsulación-deshidratación. Los explantes son encapsulados en perlas de alginato de calcio y son sometidos a vitrificación, finalmente son sumergidos directamente en nitrógeno líquido. Las ventajas en este caso se presentan en un 30 % más de recuperación en comparación a la vitrificación o la encapsulación por si solas; básicamente, porque las cápsulas de alginato ayudan a que la toxicidad de las sustancias criopreservantes disminuya significativamente y, en su caso, estas sustancias incrementan ampliamente la protección de los explantes congelados (Socchi & Rey, 2004).

### **M.C.7: Encapsulación-Deshidratación:**

Este método se basa en la tecnología desarrollada para la producción de semillas sintéticas, es decir, la encapsulación de explantes en perlas de alginato de calcio. El encapsulado de los explantes permite hacerles pasar por un proceso drástico sin lo cual no podrían sobrevivir. Los explantes encapsulados son entonces precultivados en un medio líquido con una alta concentración de sacarosa y son parcialmente desecados antes de la refrigeración (Engelmann 2011)

Esta técnica es una de las de mayor aplicación para protocolos de criopreservación, básicamente por su facilidad y la seguridad de protección al explante; aunque para muchas especies no ha dado resultados (Panis & Lombardi, 2005).

La técnica se compone de dos pasos fundamentales; primero, el explante a ser tratado se coloca en una matriz base de alginato de sodio. Esta matriz es polimerizada con cloruro de calcio, formando así la cápsula de gel alrededor del explante y el crioprotector, generalmente sacarosa, utilizado en altas concentraciones (0,5 M a 1,5 M). Posteriormente, se somete al explante a una corriente de aire controlada en un flujo laminar o con la desecación en una caja hermética con sílica gel (Scocchi & Rey, 2004). Por último, se sumerge la cápsula en el nitrógeno líquido; en este caso puede ser un descenso lento de temperatura o una inmersión rápida como en las otras técnicas descritas (Hirai & Sakai, 1999)

En casos donde los explantes provienen de plantas adaptadas naturalmente al frío, se ha visto que una exposición a bajas temperaturas previa al tratamiento de criopreservación, ha incrementado los resultados de recuperación y supervivencia de los explantes encapsulados. Las investigaciones recomiendan que la exposición sea de varias semanas antes del inicio de la encapsulación (Scocchi & Rey, 2004).

El protocolo de encapsulación-deshidratación es más eficaz cuando se combina con un período de 1 a 4 semanas de aclimatación en frío y deshidratación de 19 a 23% de humedad antes de la exposición a nitrógeno líquido (Reed *et. al.* 2001).

## CRIOPRESERVACIÓN DE YEMAS AXILARES DE PATATA (*Solanumtuberosum*L.) POR EL MÉTODO DE ENCAPSULACIÓN-DESHIDRATACIÓN.

La técnica de encapsulación-deshidratación fue establecida en Francia por el equipo de trabajo de Jean Dereuddre. Este método está basado en la tecnología para producir semillas sintéticas y fue estudiado inicialmente en pera y patata(Dereuddreet.al. 1990; Fabre and Dereuddre,1990). Esta técnica fue aplicada a otras especies de climas moderados incluyendo eucaliptos, brotes de uva (Poissonnieret. al., 1991; Plessiset.al., 1991) y embriones somáticos de zanahoria. (Dereuddreet. al., 1991).

Hoy en día el método de encapsulación-deshidratación se ha experimentado en alrededor de 70 especies de plantas, usando diferentes tipos de explantes; suspensiones celulares, yemas axilares, semillas, óvulos, callos...etc.

Dicha técnica se muestra como una eficiente técnica de criopreservación. Una de sus ventajas desde el punto de vista práctico es la fácil manipulación de los explantes encapsulados. Un interesante desarrollo de la encapsulación-deshidratación es la encapsulación-vitrificación, el uso de soluciones de vitrificación directamente después de la encapsulación permite saltarse el tiempo de dos pasos; la deshidratación y la desecación en sílica gel.

Es una técnica más para poner en manos de las investigaciones o los conservadores de las colecciones, para facilitar la conservación de los recursos genéticos de especies vegetales para la criopreservación (Engelmann 2011).

### **2.2.2.3. FACTORES IMPORTANTES A CONSIDERAR**

Existen mecanismos que determinan cómo los sistemas biológicos responden ante la disminución de la temperatura y a la solidificación del agua líquida, por ello, es necesario conocer los aspectos básicos que tienen lugar durante la congelación del agua como evento decisivo para desarrollar una metodología de criopreservación. En este sentido, se destacan los siguientes procesos:

#### **F.1.Nucleación:**

Diferentes autores han realizado definiciones aclaratorias sobre los fenómenos que ocurren durante la formación de los cristales de hielo a bajas temperaturas. Por ejemplo, Zachariassen y Kristiansen (2000) explicaron que para ellos la definición de punto de congelación de una solución, es la temperatura donde el último y más pequeño cristal de hielo se derrite, cuando una solución congelada se calienta lentamente, a este momento también se le denomina temperatura de congelación en equilibrio o punto de fusión. Estos autores plantearon que el fenómeno por el cual las soluciones se encuentran en estado líquido, a la temperatura de congelación, se le conoce como subenfriamiento y dicha temperatura es denominada como punto de subenfriamiento de la solución. Además diferencian, que de manera no generalizada, pueden aparecer cristales de hielo a determinada temperatura sin afectar el punto de fusión de la



## CRIOPRESERVACIÓN DE YEMAS AXILARES DE PATATA (*Solanumtuberosum*L.) POR EL MÉTODO DE ENCAPSULACIÓN-DESHIDRATACIÓN.

solución y denominan a este fenómeno como histéresis térmica y la temperatura a la que ocurre, como punto de congelación de histéresis.

Otros autores como Belouset.al. (1998) plantearon que existen diferencias entre los procesos de nucleación homogénea (formación espontánea de núcleos de cristales de hielo) y heterogénea (adición de algún catalizador para inducirlos).

Zachariassen y Kristiansen (2000) apoyan estas diferencias y definen que la nucleación homogénea es causada por las propiedades de atracción electrostática entre las partes polares de las moléculas de agua, para formar agregados en forma de cristales de hielo, a medida que disminuye la temperatura. Y que la nucleación heterogénea es cuando la agregación de las moléculas de agua se cataliza por sustancias diferentes a estas moléculas. Posteriormente, Wilson et.al. (2003) se oponen a esta diferenciación y demostraron que la nucleación en las soluciones biológicas son todas heterogéneas y el término de nucleación homogénea debe ser evitado. Estos autores plantean que en la práctica la nucleación homogénea es poco probable de lograr en condiciones de laboratorio y solamente el término debe utilizarse en situaciones muy precisas como en el caso de pequeñas muestras de agua ultrapura emulsionadas en aceite que tiene una temperatura alrededor de los  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **F.2. Vitrificación:**

Cuando una solución está altamente concentrada y por ende viscosa, ésta no permitirá la iniciación de cristales de hielo ni su crecimiento. Si se disminuye rápidamente la temperatura a valores muy bajos, la solución puede llegar a convertirse en un sólido amorfo (vítreo) sin la formación de cristales de hielo (Franks, 2003). Este proceso se denomina vitrificación y tiene lugar a la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ). Para realizar la criopreservación mediante la vitrificación, Fahy et.al. en el año 2000, propusieron que se requiere de una congelación por debajo de la temperatura de transición vítrea de la mezcla crioprotectora y un recalentamiento sin la formación de hielo. Ellos plantean además, que el problema de la toxicidad del crioprotector se minimiza cuando se utiliza la menor concentración posible de la mezcla crioprotectora y que esta concentración mínima se determina por la concentración donde la temperatura de nucleación homogénea ( $T_h$ ) se intercepta con la temperatura de transición vítrea. A concentraciones más bajas, la muestra debe atravesar la zona entre  $T_h$  y  $T_g$  donde la nucleación homogénea del hielo es inevitable. A concentraciones altas, la vitrificación es teóricamente posible a cualquier velocidad de congelación o recalentamiento si la nucleación heterogénea no está presente.

Sin embargo, según Franks (2003), en la práctica la nucleación heterogénea siempre está presente como obstáculo a la vitrificación. Este autor explica, además, que después de la vitrificación se necesita una velocidad de calentamiento rápida para evitar el crecimiento de los



## CRIOPRESERVACIÓN DE YEMAS AXILARES DE PATATA (*Solanumtuberosum*L.) POR EL MÉTODO DE ENCAPSULACIÓN-DESHIDRATACIÓN.

crisales de hielo (desvitrificación) que comienza a temperaturas cercanas a la terminación de la congelación e inicio del recalentamiento.

El proceso de vitrificación es de gran importancia para la supervivencia de las células vegetales congeladas hasta  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ya que previene la formación intracelular de crisales de hielo. El sólido amorfo (vítreo) presenta una menor presión de vapor de agua que el correspondiente sólido cristalino, yno permite la sobre-deshidratación causada por la congelación extracelular. Como consecuencia, el sólido amorfo disminuye la contracción celular, el aumento de la concentración de solutos internos y las alteraciones en el pH de la célula. Además, como la formación vítrea es muy viscosa, ésta puede detener todas las reacciones químicas que requiere una difusión molecular, de esta forma, la vitrificación de las células vegetales garantiza ladormancia y estabilidad durante el tiempo de almacenamiento en nitrógeno líquido (Franks, 2003).

### **F.3. Estrategia de deshidratación del material vegetal por vitrificación completa:**

Se refiere a la formación tanto intracelular como extracelular de una estructura sólida amorfa estable (vítrea) cuando se someten las células a lateperatura del nitrógeno líquido (Sakai, 2000).

Ello se logra al deshidratar el material vegetal y, de forma rápida, por la acción de una solución vitrificadora altamente concentrada, la temperatura del mismo se hace variar de  $25\text{ a }0\text{ }^{\circ}\text{C}$ , antes de colocar las muestras directamente en nitrógeno líquido. Las soluciones vitrificadoras no sólo reducen el contenido de agua en la célula sino que también penetran en los espacios intersticiales y contribuyen a inhibir la formación de los crisales de hielo en el medio intra y extra-celular durante el enfriamiento rápido (Panis, 1995). Sin embargo, el problema fundamental de la vitrificación completa radica en la necesidad de controlar la duración del tiempo de exposición a las soluciones vitrificadoras ya que pueden causar daños por una deshidratación excesiva o por toxicidad debido a una alta concentración de la misma (Reed, 2001).

Los primeros estudios sobre la criopreservación de plantas basada en la vitrificación completa fueron realizados por Uragamiet.al. (1989) con embriones somáticos de *Asparagusoﬃcinalis* L. y Langiset.al. (1989) con suspensiones celulares de *Brassicacampestris*. Desde entonces, la aplicación de esta estrategia ha permitido que hayan sido almacenados un elevado número de materiales vegetales como células nucleares de *Citrus sinensis* (Sakaiet.al., 1990) y protoplastos de *Secalesereale* (Langis y Steponkus, 1991), ápices vegetativos de *Ananascomosus* (piña) (González et.al., 1998), yuca (Charoensubet. al., 1999), boniato (Pennycooke y Towill, 2000) y *Anigozanthoshumilis* (Turner et.al., 2001), entre otros.

#### **F.4. Estrategia de deshidratación del material vegetal por congelación lenta:**

Se basa en la disminución de la temperatura mediante un enfriamiento lento hasta una temperatura de pre congelación (-40 °C), seguido de la inmersión rápida de las muestras en nitrógeno líquido (Sakai, 2000). La reducción lenta de la temperatura durante el enfriamiento conduce a la deshidratación de las células por la aparición de cristales de hielo extracelulares, que causan la disminución del volumen celular isotónico y producen el incremento de la concentración de solutos. Generalmente una velocidad entre 0.5-2.0 °C.min<sup>-1</sup> se considera como lenta, aunque en ocasiones, también se aplican velocidades tan bajas como 0.1°C.min<sup>-1</sup> o tan rápidas como 10°C.min<sup>-1</sup> (Withers, 1980). Cuando se obtienen temperaturas entre -35 ó -40°C, el material vegetal se transfiere al nitrógeno líquido y se asume que en estas condiciones toda el agua congelable ha abandonado la célula y el medio intracelular está altamente concentrado (Sakai, 2000). La principal limitación para aplicar la estrategia de deshidratación por congelación lenta en un gran número de laboratorios, a nivel internacional, radica en que se necesita un equipamiento programable de la velocidad de enfriamiento con un alto coste, por lo que los centros de investigación y desarrollo con escasos recursos no pueden utilizar esta modalidad criogénica (Reed *et.al.*, 2001).

#### **F.5. Tratamientos crioprotectores:**

La mayoría de los tejidos vegetales hidratados necesitan una protección química especial durante el ciclo de congelación-descongelación, para ello se emplean tratamientos crioprotectores con sustancias de un grupo heterogéneo de compuestos que tienen gran afinidad por el agua y que a determinadas concentraciones no resultan tóxicos al sistema (Chen y Kartha, 1986). Estos tratamientos pueden aplicarse mediante pre-cultivos en base semisólida o líquida que sirven de medio de suspensión para las células y los tejidos durante la congelación. Han sido descritas dos categorías de sustancias crioprotectoras: penetrantes y no penetrantes (Panis, 1995). En el primer grupo se encuentran el dimetilsulfóxido (DMSO), metanol y el glicerol y en el segundo están presentes los azúcares, alcoholes azucarados y aditivos de alta masa molecular. La aplicación de los crioprotectores penetrantes incrementa el volumen de la solución intracelular, evitan una excesiva concentración de electrólitos tóxicos en la fase no congelable o aumentan la permeabilidad de la membrana citoplasmática, contribuyendo a la deshidratación. Adicionalmente, a los crioprotectores penetrantes se les atribuye la acción de disminuir el punto de fusión de la solución intracelular, factor decisivo para evitar la formación de cristales de hielo en el medio intracelular (Mazur, 1984).

Los compuestos no penetrantes actúan fundamentalmente como agentes osmóticos desde el medio externo y contribuyen a reducir la cantidad de agua intracelular que puede congelarse. Sin embargo, según Panis (1995), no existía una explicación convincente de cómo funcionaban las sustancias crioprotectoras o dónde se encontraban los sitios críticos de

## CRIOPRESERVACIÓN DE YEMAS AXILARES DE PATATA (*Solanumtuberosum*L.) POR EL MÉTODO DE ENCAPSULACIÓN-DESHIDRATACIÓN.

protección. Estas interrogantes aún no cuentan con respuestas comprobadas. Generalmente, se han empleado con buenos resultados las mezclas de sustancias crioprotectoras. Esto se debe a las ventajas que ofrece la combinación de las sustancias clasificadas como penetrantes y las no penetrantes, como por ejemplo, la mayor estabilidad física de las mezclas a las bajas temperaturas en relación con la de un componente simple y la acción protectora ante la toxicidad de unos compuestos con respecto a otros (Kartha *et.al.*, 1988). Sin embargo, según Reed *et.al.* (2001) hasta entonces, la selección del tipo y concentración de los agentes crioprotectores aún se realizaba de manera empírica en dependencia de la tolerancia de las células a criopreservar.

### **F.6. Efecto del genotipo:**

Autores como Reed *et.al.* (2001) plantearon que se necesita siempre tener en cuenta el factor genotipo para validar cualquier protocolo de criopreservación. Turner *et.al.* (2001) demostraron que resultó eficiente utilizar primero una especie indicadora (en su caso *Anigozanthosviridis* que tenía un alto coeficiente de multiplicación *in vitro*) para mejorar un protocolo de criopreservación y después aplicarlo a otras especies relacionadas, pero clasificadas como material vegetal de gran valor. Engelman (2000) explicó que en una metodología de criopreservación se debe tener en cuenta el genotipo y que existe un rango de temperatura en que la especie vegetal se puede conservar mejor y que sobre esa base podría ser conveniente mejorar la eficiencia del procedimiento para un genotipo de élite, lo cual justificaría la realización de ajustes al protocolo de criopreservación.

### **2.2.2.4. TRATAMIENTOS DE POST-DESCONGELACIÓN**

La descongelación es un proceso sencillo, pero está considerado como el paso más crítico durante la criopreservación. Mazur (1984) explicó que el objetivo fundamental es evitar la fusión de los microcristales de hielo formados durante la congelación, fenómeno conocido como re-cristalización. Si tal fusión llegara a ocurrir, entonces se podrían formar grandes cristales de hielo que dañarían la integridad celular.

Los tratamientos de descongelación se basan en cultivar el material vegetal descongelado en condiciones que permitan una correcta recuperación. En general, es importante tomar todas las medidas para recuperar la especie vegetal en cuestión en esta etapa del proceso, por ejemplo, incubar a niveles bajos de luz o, en algunos casos, en la completa oscuridad (Benson, 2000); atenuar el choque osmótico causado por una inmediata transferencia a un medio de cultivo con bajo potencial osmótico mediante la sucesiva transferencia a medios de cultivo con menos concentración de sacarosa (Schrijmakers y Van Iren, 1995); utilizar cambios de medio de cultivo semisólido a líquidos para mejorar el recrecimiento (Dussert *et.al.*, 1992) y eliminar progresivamente las sustancias crioprotectoras mediante lavados (Gnanapragasam y Vasil, 1992).

## CRIOPRESERVACIÓN DE YEMAS AXILARES DE PATATA (*Solanumtuberosum*L.) POR EL MÉTODO DE ENCAPSULACIÓN-DESHIDRATACIÓN.

Se recomienda que posterior a la descongelación los explantes se cultiven sobre papel de filtro colocado en un medio de cultivo semisólido. Esto posibilita la transferencia simple del material vegetal hacia un medio de cultivo fresco y la lenta difusión de los crioprotectores, lo cual es beneficioso para la recuperación celular ya que evita un estrés osmótico (Withers, 1987).

### **2.2.2.5. ESTUDIOS DE CRIOPRESERVACIÓN EN PATATA(*Solanumtuberosum*L.)**

Aunque el género *Solanum* es de los más grandes del reino vegetal y su distribución es mundial, su mayor diversidad se encuentra en el continente americano. La patata, perteneciente a este género, es una especie nativa de América, atribuyéndosele dos orígenes muy relacionados: un origen chileno y el otro andino (Perú, Bolivia y Ecuador) (Montano, 1984).

Es una planta suculenta, herbácea y anual por su parte aérea, y perenne por sus tubérculos que se desarrollan al final de los estolones que nacen del tallo principal. Posee un tallo principal y a veces varios tallos según el número de yemas que hayan brotado del tubérculo. En las axilas de las hojas con los tallos se forman ramificaciones secundarias (Guerrero, 1977).

La patata es uno de los alimentos más populares del mundo, junto con el arroz, el maíz y el trigo constituyen los alimentos más consumidos por el hombre. Este tubérculo posee diferentes biomoléculas como constituyentes. Entre los más importantes podemos citar: fibra, minerales, vitaminas, proteínas e indudablemente carbohidratos. Aproximadamente un 25% de su peso seco corresponde a estos últimos (Montano, A. 1984).

La patata ha recibido intensamente la influencia de los avances científicos y técnicos, y ha sido mejorada en aspectos como el rendimiento y la calidad, la mecanización del cultivo, la resistencia a enfermedades, la conservación y la industrialización. Es uno de los cultivos cuyo paquete tecnológico favorece mucho la producción de alimentos (Roca y Mroginski, 1991).

Después del éxito de Morel, alrededor del año 1965, en la multiplicación de orquídeas *in vitro*, se incrementó el interés por las técnicas de cultivo de tejidos como alternativas para la propagación asexual de plantas de importancia económica. Esta premisa hizo que la patata llegara a establecerse como una de las especies tradicionales de multiplicación por medio de estas técnicas. La obtención de plantas libres de virus y con una alta pureza varietal, que asegura a los productores un incremento en el rendimiento y una buena calidad del producto, fueron las razones más importantes para la implementación del cultivo *in vitro* en esta especie (Roca y Mroginski 1991; Flores *et. al.*, 2002).

Las mejoras genéticas, así como un incremento continuo en la producción, hacen necesaria la conservación del germoplasma de patata. Esta conservación garantiza el mantenimiento de su diversidad genética, con lo cual se preservan características que son fuente

## CRIOPRESERVACIÓN DE YEMAS AXILARES DE PATATA (*Solanumtuberosum*L.) POR EL MÉTODO DE ENCAPSULACIÓN-DESHIDRATACIÓN.

de resistencia, calidad nutritiva, adaptabilidad, así como genes desconocidos que pueden en un futuro ser considerados valiosos (Abdelnour, 1993; Cisne, 1992).

Bolívar y López (1985) reportan que la planta de patata criolla se puede reproducir sexual y asexualmente. Con la reproducción sexual, los mejoradores incrementan la variabilidad genética para la formación de nuevas variedades, lo cual se efectúa mediante el empleo de semilla botánica. Desde el punto de vista de la conservación, la semilla botánica o 'verdadera' se considera ortodoxa y se puede almacenar a bajas temperaturas (0–5°C y 20°C). Por su parte, mediante la reproducción asexual se fijan los genes introducidos en el material genético mejorado; ésta se realiza comercialmente a través de tubérculo-semilla, si bien se usan otras formas no convencionales como esquejes y cultivos *in vitro*. Desde la óptica de la conservación este tipo de material se considera recalcitrante y requiere de acciones de conservación en condiciones de campo e *in vitro*.

Bouahal y Dereuddre (1996) reportan que los primeros trabajos en criopreservación de la patata fueron realizados por Bajaj en 1977, utilizando una solución crioprotectora compuesta por DMSO, glicerol y sacarosa; en 1978, Grout y Henshaw usaron sólo DMSO como crioprotector y congelación ultra rápida, con lo que lograron bajas tasas de viabilidad (de 20 a 26%) y escasa formación de callos.

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 congelación gradual y se evaluaron los siguientes parámetros: duración y concentración del pretratamiento en DMSO, efecto de la temperatura de congelación y de la tasa de descongelación; con el ensayo se obtuvieron rangos de supervivencia entre 45% y 85% en la formación de brotes, lo cual se atribuye a que los procedimientos de congelación fueron apropiados (Towill, 1981).

Bajaj en 1985, evaluó la viabilidad de ápices de *Solanumtuberosum* criopreservados por más de cuatro años, con el fin de demostrar que la duración de almacenamiento en nitrógeno líquido no afectaba a la tasa de supervivencia (Bouahal y Dereuddre, 1996).

En 1989, Harding y Benson reportaron los efectos de diversos regímenes de luz sobre la recuperación de yemas apicales de dos variedades criopreservadas de *Solanumtuberosum*. Estos autores usaron técnicas clásicas (DMSO al 10%) y lograron determinar que son muchos los factores en las etapas de pre y post-congelación que intervienen en la supervivencia del material; así mismo, establecieron que existe una respuesta varietal relacionada con la técnica y las condiciones de luz antes y después de la congelación, que favorecen la recuperación del material criopreservado (Benson, 1989).

Fabre y Dereuddre (1990) reportaron por primera vez la criopreservación de patata de la especie *Solanumphureja* a partir de meristemos apicales y mediante una metodología de

## CRIOPRESERVACIÓN DE YEMAS AXILARES DE PATATA (*Solanumtuberosum*L.) POR EL MÉTODO DE ENCAPSULACIÓN-DESHIDRATACIÓN.

encapsulación-desección consistente en congelación programada y rápida, con flujo de aire estéril para la deshidratación de lascápsulas. Mediante el uso de 0,5 y 0,75 M de sacarosa en el precultivo durante 24 h y la inmersión directa en nitrógeno líquido, consiguieron tasas de supervivencia de 7,8 y 19,6%, respectivamente; sin embargo, los ápices no desarrollaron brotes. En congelación programada mejoró la supervivencia 27,8% y 41,2% para 0,5 y 0,75 M de sacarosa por 24 h. Aunque con 0,5 M de sacarosa algunos ápices desarrollaron brotes, el porcentaje de recuperación fue bajo (menor a 10%); aumentando el tiempo de exposición a 72 h en el precultivo y con 0,75 M de sacarosa, el desarrollo de brotes a partir de ápices congelados alcanzó el 26,5% de supervivencia.

En 1991, Harding y Benson estudiaron la recuperación de yemas en dos variedades de *Solanumtuberosum* cultivadas *in vitro* y criopreservadas; como en el anterior trabajo, realizaron congelación programada y ultra rápida. La crioprotección se llevó a cabo con DMSO al 10% durante 1 hora y se pudo establecer que este método sólo es viable para congelación ultra rápida, mientras la respuesta en la recuperación de los brotes presentó diferencias significativas entre las dos variedades en estudio.

En los últimos años, Shafer y su grupo (1996), se han dedicado a establecer el método de la micro-gota, basado en la congelación ultra rápida, empleando yemas apicales incubadas en DMSO y transferidas directamente a criotubos donde son rápidamente sumergidas en nitrógeno líquido. En este estudio se emplearon 219 variedades con porcentajes de supervivencia entre 6 y 100% y un promedio de regeneración de plantas del 40%.

Golmirzaie y Panta (1996) reportan que la criopreservación de patata ha sido ampliamente desarrollada por el CIP, adaptando una metodología desarrollada por Steponkus (1992): los explantes se sumergen en una solución deshidratante y crioprotectora de BSA (50:15:6) durante 50 minutos a temperatura ambiente y a continuación se someten a congelación rápida. Se evaluaron 183 genotipos de patata; cuando se usaron explantes axilares se obtuvieron porcentajes de supervivencia entre 0 y 80%, con un promedio del 33% en la formación de brotes entre especies; cuando se utilizaron ápices se logró un rango de supervivencia entre 45 y 90% con un promedio de 67% en la formación de brotes. Dentro de los genotipos evaluados, la especie *Solanumphureja* mostró las tasas de supervivencia más altas, con un promedio de 80% en la formación de brotes a partir de explantes apicales.

Por su parte, Bouahal y Dereuddre (1996) reportaron resultados satisfactorios con tres clones de *Solanumphureja* y dos de *Solanumtuberosum* mediante el uso de la técnica de encapsulación-desección, con deshidratación en sílica gel, con lo que se obtuvieron tasas de recuperación entre 58 y 77% en formación de brotes.

Posteriormente, el Instituto Central de Investigaciones en Patata de Pradesh (India) reportó el empleo de la técnica de vitrificación en cinco clones de la especie *Solanumtuberosum*, usando una solución vitrificante de PVS2 (etilen-glicol, glicerol y DMSO)



## CRIOPRESERVACIÓN DE YEMAS AXILARES DE PATATA (*Solanumtuberosum*L.) POR EL MÉTODO DE ENCAPSULACIÓN-DESHIDRATACIÓN.

al 20, 60 y 100%, con lo que consiguieron un promedio de recuperación del 54%, de los cuales sólo el 50% de los ápices vitrificados formó brotes directamente (Debabrata y Prakash, 2000).

Teniendo en cuenta que las metodologías desarrolladas para criopreservación de patata no muestran resultados totalmente satisfactorios, Hirai y Sakai (2000) evaluaron la técnica de encapsulación-vitrificación en la que los meristemas que se osmoprotegieron con una mezcla 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 meristemas se congelaron, el porcentaje de formación directa de brotes disminuyó a 62,8%.

Zhao *et.al.* (2005) realizaron modificaciones a la solución vitrificante PVS2 e incorporaron el osmoprotectante Supercool 100® en concentraciones de 0,1% y 1,0%, a las yemas deshidratadas con PVS2 y obtuvieron una supervivencia del 55% en la variedad de patata Superior y de 71,3% en la variedad Atlantic, respectivamente.

Mix-Wagner, Schumacher y Cross (2003) reportaron que después de siete años de almacenamiento de la colección de patata en nitrógeno líquido, tomaron una muestra de 51 variedades las cuales descongelaron y midieron la supervivencia de las mismas y el porcentaje de regeneración de brotes; al comparar los datos antes y después de la congelación encontraron que no se presentaron mayores cambios en cuanto a la supervivencia y congelación de los ápices.

Teniendo en cuenta los resultados de Villa y Sánchez (2003), el uso de yemas de microtubérculos puede ser una alternativa más útil que el uso de meristemas apicales para conservación del germoplasma de patata gracias a las siguientes ventajas; son fáciles de manipular, las yemas presentes en los microtubérculos también permiten obtener plántulas idénticas a la madre, son más vigorosa que los meristemas apicales, un brote en realidad cuenta con tres yemas viables, y además se encuentran libres de enfermedades (Rivera *et.al.* 2008)

Durante el período 2004-2006, con el objetivo de establecer un crio-banco para la conservación a largo plazo de las variedades locales de patata, se llevó a cabo una investigación para mejorar los procedimientos de congelación y como resultado se desarrolló el método de vitrificación PVS2.

En enero de 2008, los bancos de germoplasma del CIP (Centro Internacional de la Papa) en todo el mundo se convirtieron en los primeros en obtener la norma ISO 17025 para la conservación de germoplasma *in vitro* y los sistemas de distribución. El protocolo de vitrificación desarrollado por la Universidad de Cornell, se aplicó a 400 genotipos de patata, y 121 accesiones fueron criopreservadas con éxito.

En la actualidad, el método de vitrificación PVS2 de la gota es el procedimiento preferido a aplicar en las 4.607 accesiones de patatas cultivadas en el crio-banco. De 434 accesiones de

## CRIOPRESERVACIÓN DE YEMAS AXILARES DE PATATA (*Solanumtuberosum*L.) POR EL MÉTODO DE ENCAPSULACIÓN-DESHIDRATACIÓN.

patata usando tratamientos de pre-cultivo, de 6 y 22° C respectivamente, el 92% mostró frecuencia de recuperación de al menos 5%, el 67% de las investigaciones alcanzaron por lo menos el 20% de recuperación (Panisy Lynch, 2011). En el departamento de Producción y Protección Vegetal del Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario, NEIKER, se aplicó la criopreservación de cultivares de patata mediante el método de congelación ultrarápida a 10 cultivares mantenidos por micropropagación. Para ello se congelaron y conservaron en nitrógeno líquido meristemos apicales. La supervivencia tras la congelación, transcurrido un periodo de tres meses, fue superior al 50% en todos los casos, alcanzando en algún cultivar, como Fénix, hasta el 100% de los meristemos congelados. Las tasas de regeneración se situaron entre el 2,5 % y el 22,0%, dependiendo del cultivar empleado y el uso de fitohormonas en el medio MS sólido con agarosa. La estabilidad citogenética fue evaluada mediante citometría de flujo, no encontrando en ningún caso poliploides. Las plantas regeneradas mostraron un desarrollo vegetativo aparentemente idéntico a los cultivares originales (Barandalla *et. al.* 2003).



CRIOPRESERVACIÓN DE YEMAS AXILARES DE PATATA (*Solanumtuberosum*L.) POR EL MÉTODO DE ENCAPSULACIÓN-DESHIDRATACIÓN.

### **3- OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GENERAL**

Estandarizar un protocolo de criopreservación in vitro, de yemas axilares de patata, mediante encapsulación-deshidratación.

#### **3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO**

Definir el tiempo óptimo de deshidratación de las cápsulas.

Estudiar la influencia de las diferentes concentraciones de sacarosa, como crioprotector.

## 4- MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1-PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

En este trabajo son necesarios diferentes medios de cultivo que serán utilizados a lo largo del trabajo, por lo que será necesario disponer de cada uno de ellos en el momento adecuado. Las recetas que se han utilizado son las siguientes:

#### MP2: Medio P2 de Murashige y Skoog (M&S):

Sales minerales y vitaminas de M&S modificadas (1/10 de  $\text{NO}_3\text{NH}_4$  respecto a la formulación original).

Sacarosa, 20g/l

El pH del medio se ajusta a 5,7-5,8 antes de añadir 2g/l (p/v) de gelrite.

Se dispensa en cajas magenta y se autoclavan.

#### MP3: Medio de cultivo de patata estándar (P3 GA3):

Sales minerales y vitaminas de M&S modificadas (1/10 de  $\text{NO}_3\text{NH}_4$  respecto a la formulación original).

Pantotenato de calcio en proporción 2g/l

GA3 en proporción de 0,5mg/l

Sacarosa, 30g/l

Se ajusta el pH a 5,8

Gelrite al 0,2% (p/v)

Se autoclava

Cuando el medio está aproximadamente a 40 °C se añade 0,5 mg/l GA3 esterilizado por filtración

Se dispensa en placas petri.

CRIOPRESERVACIÓN DE YEMAS AXILARES DE PATATA (*Solanumtuberosum*L.) POR EL MÉTODO DE ENCAPSULACIÓN-DESHIDRATACIÓN.

MS: Medios de cultivo estándar líquidos:

Se preparan tres medios líquidos siguiendo el mismo proceso que para el medio estándar *MP3*, pero agregando a cada uno de ellos las siguientes concentraciones de sacarosa:

0,3M: *MS1*

0,5M: *MS2*

0,75M: *MS3*

Otra diferencia con respecto al medio estándar es que no se les añadirá gelificante de ningún tipo.

Se dispensan en frascos de cultivo y se autoclavan.

MCA: Medio de cultivo con 100mM de cloruro de calcio:

Preparar una solución nutritiva de macroelementos eliminando las fórmulas que contienen calcio y agregarla al resto del medio que se preparará igual que el estándar *MP3*, pero sin gelificante.

Agregar 100mM de cloruro de calcio.

Dispensar en frasco refractario y autoclavar.

MALG: Medio de cultivo con alginato de sodio al 3%:

Preparar una solución nutritiva de macroelementos eliminando las fórmulas que contienen calcio y agregarla al resto del medio que se preparará igual que el estándar *MP3*, pero sin gelificante.

Agregar alginato de sodio al 3%.

Dispensar en frasco refractario y autoclavar.

## CRIOPRESERVACIÓN DE YEMAS AXILARES DE PATATA (*Solanumtuberosum*L.) POR EL MÉTODO DE ENCAPSULACIÓN-DESHIDRATACIÓN.

### 4.2- MATERIAL VEGETAL

A partir de vitroplantas de patata *Solanumtuberosum* L. variedad Desirée, y dentro de la cabina de flujo laminar, se aíslan segmentos nodales y se cultivan en el medio basal *MP2*.

Al cabo de 40 días se desarrollan nuevos brotes (FIGURA 1). En las nuevas vitroplantas se observa la aparición de pequeñas yemas axilares que serán utilizadas como explante en este Trabajo Fin de Carrera.



FIGURA 1: Material inicial del que se extraen las yemas axilares.

### 4.3- AISLAMIENTO DE YEMAS AXILARES

Con la ayuda de una lupa binocular y dentro de la cabina de flujo laminar, se aíslan las yemas procedentes de las vitroplantas de patata, utilizando unas pinzas y la aguja de una jeringuilla como herramientas de trabajo. Se extraen yemas que van desde 0,5mm hasta 1,5mm de longitud. Estas yemas son directamente introducidas en el medio de cultivo *MALG*, donde permanecen 24 horas (FIGURA 2).

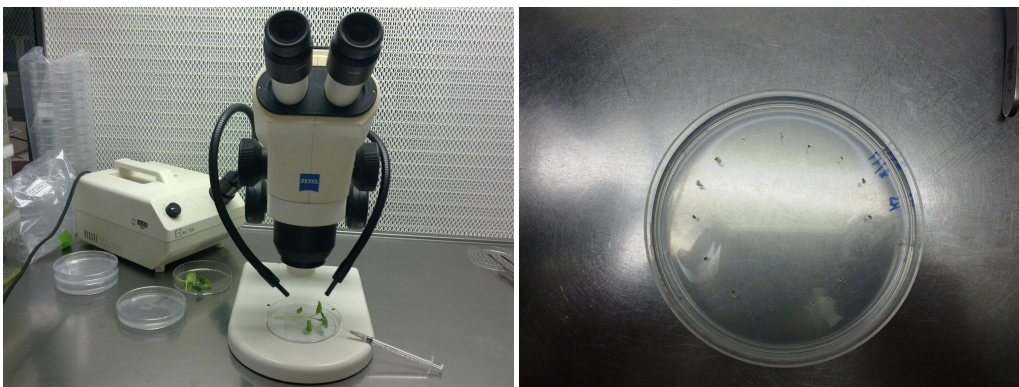


FIGURA 2: Lupa binocular en cabina de flujo laminar y ápices seleccionados, en medio *MALG*.

## CRIOPRESERVACIÓN DE YEMAS AXILARES DE PATATA (*Solanumtuberosum*L.) POR EL MÉTODO DE ENCAPSULACIÓN-DESHIDRATACIÓN.

### 4.4- ENCAPSULACIÓN

Con una pipeta cuentagotas estéril se van recogiendo las yemas y se dejan caer gota a gota en el medio líquido *MCA*, teniendo en cuenta que deberá caer una yema en cada gota. Las yemas previamente recubiertas por alginato de sodio, polimerizan en la solución de cloruro de calcio y en aproximadamente 10 minutos se forma un gel de alginato de calcio en forma de cápsula alrededor de la yema.

Una vez encapsuladas las yemas se extraen y son pretratadas con sacarosa, que actúa como crioprotector. Primeramente se introducirán en el medio *MS1*, y se mantienen en agitación permanente, con una velocidad de 65 r.p.m., y en oscuridad.

Tras 24 horas en agitación se cambiará el medio líquido y se pasarán al medio *MS2* y se sigue con el mismo protocolo de agitación y oscuridad.

Por último y tras 24 horas, se repite la operación utilizando el medio *MS3* en el que permanecerán otras 24 horas, también en oscuridad y agitación.

### 4.5- DESHIDRATACIÓN

Al cuarto día, desde el aislamiento, se procede a la deshidratación de las cápsulas. Para ello se colocan todas las cápsulas sobre una placa petri para facilitar su manipulación y se preparan otras dos placas con papel de filtro estéril, que se colocan en el fondo de la cabina de flujo laminar y así utilizar el flujo de aire estéril como método de deshidratación.

Una a una se van colocando las cápsulas sobre los papeles de filtro hasta tener las dos placas con el mismo número de cápsulas, 50 cada una.

Una de estas placas, será la correspondiente al Tratamiento 1 del estudio, se mantendrá en esa posición una hora para que las cápsulas se vayan deshidratando, y la otra, correspondiente al Tratamiento 2, se mantendrá durante dos horas en proceso de deshidratación (FIGURA 3).

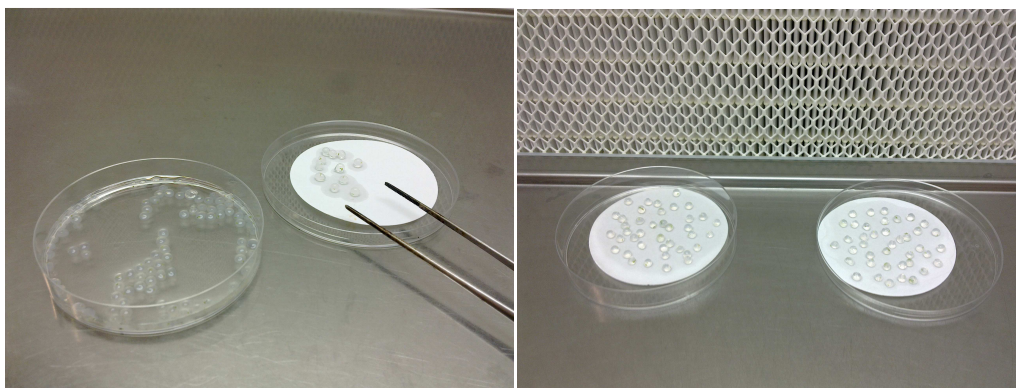


FIGURA 3: Deshidratación de cápsulas tras encapsulación

## CRIOPRESERVACIÓN DE YEMAS AXILARES DE PATATA (*Solanumtuberosum*L.) POR EL MÉTODO DE ENCAPSULACIÓN-DESHIDRATACIÓN.

Como Tratamiento Control se separan 10 cápsulas de cada Tratamiento y se cultivan en dos placas petri con medio sólido *MP3*. Se sellan las placas con parafilm y se rotulan.

### 4.6- CONGELACIÓN

Las yemas del Tratamiento 1 y del Tratamiento 2 se transfieren a microtubos estériles de 2mm de diámetro y se congelan durante 30 minutos en el congelador a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ , transcurrido este tiempo se congelan por inmersión en nitrógeno líquido durante 10 minutos (FIGURA 4).

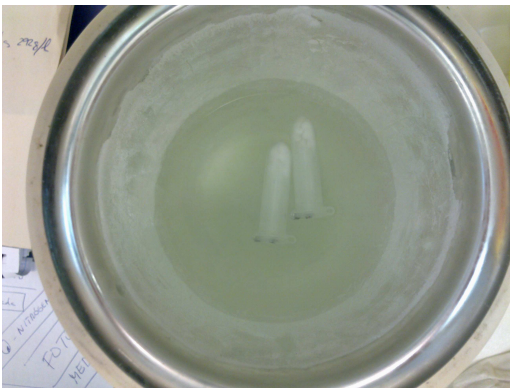


FIGURA 4: Cápsulas en microtubos sumergidos en nitrógeno líquido.

### 4.7- DESCONGELACIÓN

Una vez transcurrido el tiempo de congelación, se colocan los microtubos en una gradilla que se colocará en el fondo de la cabina de flujo laminar, lugar en el que comenzará la descongelación de las cápsulas, que dura aproximadamente 20 minutos (FIGURA 5).



FIGURA 5: Descongelación de cápsulas.



## CRIOPRESERVACIÓN DE YEMAS AXILARES DE PATATA (*Solanumtuberosum*L.) POR EL MÉTODO DE ENCAPSULACIÓN-DESHIDRATACIÓN.

### 4.8- CULTIVO

Cuando las cápsulas están descongeladas, se disponen en placas petri con medio sólido *MP3*, se sellan con parafilm y se rotula el tratamiento llevado (FIGURA 6).

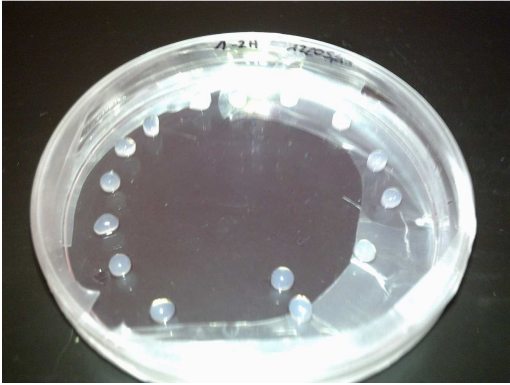


FIGURA 6: Placa preparada para el cultivo tras tratamiento

Todas la placas, incluidas las de Control, se mantendrán en oscuridad durante una semana, transcurrida la cual se dispondrán en la cámara de cultivo, con fotoperiodo de 16 horas y temperatura constante de 25 °C y bajo un papel de filtro que disminuya la radiación.

### 4.9- TOMA DE DATOS

Se tomarán datos semanales. Se datará la semana en la que la yema sobresalga de la cápsula, y la semana en la que aparezca la primera raíz. Además semanalmente se medirá la longitud de los brotes formados.

CRIOPRESERVACIÓN DE YEMAS AXILARES DE PATATA (*Solanumtuberosum*L.) POR EL MÉTODO DE ENCAPSULACIÓN-DESHIDRATACIÓN.

### 5- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados fueron negativos, únicamente brotaron las cápsulas que no fueron criogenizadas, las pertenecientes a los Tratamientos Control (FIGURA 7). En las cápsulas de los Tratamientos 1 y 2 no se observó ningún brote. Los resultados obtenidos se reflejan en la Tabla 1.

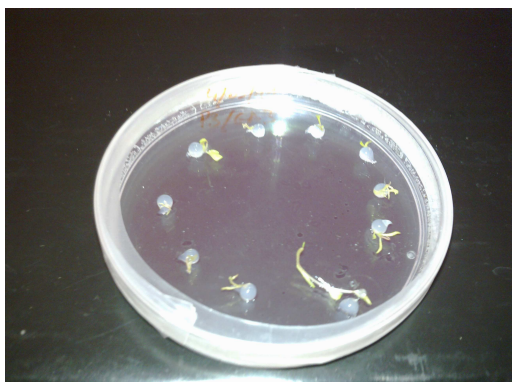


FIGURA 7: Detalle de brotación de las cápsulas Control

**Tabla 1:** Porcentaje de yemas brotadas en los distintos tratamientos tras la descongelación. Tratamientos 1 y 2 correspondientes a yemas deshidratadas durante 1 y 2 horas respectivamente y posteriormente congeladas. Tratamiento Control 1H, yemas deshidratadas durante 1 hora y sin congelar. Tratamiento Control 2H, yemas deshidratadas durante 2 horas y sin congelar.

TRATAMIENTOS	TIEMPO EN SEMANAS			
	1	2	3	4
1	0%	0%	0%	0%
2	0%	0%	0%	0%
Control 1H	60%	90%	100%	100%
Control 2H	40%	80%	100%	100%

A pesar de que el método de encapsulación-deshidratación ha sido satisfactorio en diferentes estudios realizados, en nuestro caso no ha dado resultados positivos, como muestra la tabla anterior.



## CRIOPRESERVACIÓN DE YEMAS AXILARES DE PATATA (*Solanumtuberosum*L.) POR EL MÉTODO DE ENCAPSULACIÓN-DESHIDRATACIÓN.

Sin embargo, un ejemplo del éxito obtenido con este método, es el estudio que se realizó con meristemas apicales de plantas *in vitro* de *Solanumphureja* por Fabre y Dereuddre en 1990. Mediante una metodología de encapsulación-deshidratación, consistente en congelación programada y rápida y con el flujo de aire estéril para la deshidratación de las cápsulas. Utilizaron 0,5 y 0,75M de concentración de sacarosa en el precultivo durante 24 h y realizaron inmersión directa en nitrógeno líquido, consiguiendo tasas de supervivencia de 7,8 y 19,6% respectivamente; sin embargo, los ápices no desarrollaron brotes. Con la congelación programada mejoró la supervivencia a 27,8% y 41,2% para 0,5 y 0,75 M de sacarosa durante 24 h. Aunque con 0,5 M de sacarosa algunos ápices desarrollaron brotes, el porcentaje de recuperación fue bajo (menor del 10%); aumentando el tiempo de exposición a 72 h en el precultivo y con 0,75 M de sacarosa, el desarrollo de brotes a partir de ápices congelados alcanzó el 26,5% de supervivencia.

Villaet *et al.* en 2007 realizaron con *Solanumphureja* un estudio en el que se extrajeron ápices de 1mm a partir de vitroplantas, los cuales se sembraron en distintos medios de preacondicionamiento, con el fin de fortalecer el tejido. Una vez cumplida la etapa de preacondicionamiento, los ápices se colocaron en alginato de sodio al 3 % y suspendidos gota a gota en una solución de cloruro de calcio para su polimerización; posteriormente se realizaron dos enjuagues con agua destilada estéril, cada uno de 10 minutos. Los ápices encapsulados se sometieron a soluciones de sacarosa 0,3, 0,5, 0,75 y 1M, durante 24, 48 y 72 horas. A continuación las cápsulas se cultivaron en un medio de recuperación. Para la posterior deshidratación se utilizaron frascos de vidrio con sílica gel. Los resultados obtenidos establecieron que las altas concentraciones de sacarosa y los tiempos prolongados de exposición a la misma, no son tolerados por la variedad y que el vigorizar el tejido durante 3 a 5 días antes de la etapa de congelación resultó favorable para el restablecimiento post-congelación.

González-Arnau *et al.* en 1993 reportaron que el aumento progresivo de la concentración de sacarosa, en este caso en criopreservación en caña de azúcar, tampoco incrementaba los resultados y por el contrario, repercutía en la caída drástica de la supervivencia aún en el rango de concentración más favorable.

Quizás, en este estudio, la concentración progresiva de sacarosa utilizada en las yemas encapsuladas haya sido la causante de la no supervivencia de los meristemas tras la congelación. Para posteriores trabajos se debería probar a utilizar diferentes concentraciones de sacarosa de manera independiente, no progresiva. Otra alternativa podría ser probar a cultivar en un medio de cultivo adecuado, las cápsulas deshidratadas, antes de la congelación de las mismas. Y para conseguir los mejores resultados, se podría realizar un cambio en la técnica de criopreservación, y ensayar la técnica de vitrificación, que es la que actualmente está ofreciendo mayores tasas de supervivencia, según Panis y Lynch en 2011.

## CRIOPRESERVACIÓN DE YEMAS AXILARES DE PATATA (*Solanumtuberosum*L.) POR EL MÉTODO DE ENCAPSULACIÓN-DESHIDRATACIÓN.

### 6- CONCLUSIONES

Tras ver los resultados negativos de este estudio, se pueden deducir las siguientes conclusiones:

El encapsulamiento de meristemas de patata en alginato de calcio no representa una barrera para la supervivencia y desarrollo de brotes.

El método de encapsulación-deshidratación empleado en este trabajo no ha sido válido para la variedad de patata Desirée.

## **7- BIBLIOGRAFIA**

Abdelnour A. (1999). Situación actual y perspectivas de las aplicaciones biotecnológicas en la conservación y uso de los recursos fitogenéticos. En: XI Congreso Nacional Agronómico. Centro de Investigación en Biotecnología. Instituto Tecnológico de Costa Rica, p.229-306.

Abdelnour, A. (1993). Criopreservación de especies vegetales tropicales: *Coffea*, *Musa* y *Theobroma*. Salazar, R. (ed.). Memorias. Turrialba, CR. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Pp: 81-84

Abdelnour, A. (2001). Conservación *in vitro* de los recursos fitogenéticos. Cartago. CR. Instituto Tecnológico de Costa Rica. 24 p.

Ashmore, S.E. (1997). Status report on the development and application of *in vitro* techniques for the conservation and use of plant genetic resources. Int. Plant Genetic Resour. Inst., Rome.

Barandalla, I.Sánchez, E. Ritter and J.I. Ruiz de Galarreta (2003) Conservation of potato (*Solanumtuberosum*L.) cultivars by cryopreservation. Spanish Journal of Agricultural Research 1 (4), 9-13. (NEIKER)

Barbara M. Reed, Laura Schumacher, Nan Wang, Jeff D´Achino and Reed E. Barker (2006).Cryopreservation of BermudagrassGermplasm by Encapsulation Dehydration. Crop Science Society of America 46: 6-11.

Belous, A.M., Gordienko E.A., Rozanov L.F. (1998).Congelación y crioprotección. Bioquímica de las membranas. Moscú, Editorial Escuela Superior, p.80.

Benson, E. (1989). Variation in recovery of cryopreserved of shoot tips of *Solanumtuberosum*exposed to different pre and post freeze light regimes. Cryo-Letters 10: 323-344.

Benson, E. (2000). Do free radicals have a role in plant tissue culture recalcitrance.In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 36: 136-170.

Bolivar, R. y g. López. (1985). Genética de la patata y su mejoramiento. En: Memorias Cuarto Curso de Actualización de Conocimiento del cultivo de patata. Bogotá.Pp 1-5.

Bouahal, S. y J. Dereuddre (1996). Cryopreservation of potato shoot tips by encapsulation-dehydration. Potato Res. 39:69-78.

Bouahal, S. y J. Dereuddre. (1996). Cryopreservation of potato shoot tips by encapsulation-dehydration.Potato Res. 39: 69-78.

CRIOPRESERVACIÓN DE YEMAS AXILARES DE PATATA (*Solanumtuberosum*L.) POR EL MÉTODO DE ENCAPSULACIÓN-DESHIDRATACIÓN.

Chang, Y., and B.M. Reed. (2000). Extended alternating-temperature cold acclimation and culture duration improve pear shoot cryopreservation. *Cryobiology* 40:311–322.

Charoensub, R., Phansiri S., Sakai A., Yongmenitchai W. (1999). Cryopreservation of cassava *in vitro* grown shoot tips cooled to -196 °C by vitrification. *Cryo-Letters* 20: 89-94.

Chen, T.H.H., Kartha K.K. (1986). Cryopreservation of plant cells and organs. En: F.A.Valentine (ed.). *Forest and Crop Biotechnology: Progress and prospects*, pp.217-240. Springer-velag, Heidelberg.

Chroensub, R.S. Phansiri, A. Sakai, and W. Yongmanitchai. “Cryopreservation of cassava *in vitro*-grown shoot tips cooled to -196 °C by vitrification”. *Cryo-Letters*. 20 (1999): 89-94.

Cisne, C.J. 1992. Criopreservación de embriones cigóticos y somáticos de cacao (*Theobroma cacao* L). Tesis de Mg. Sc. Turrialba, CR. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). 123 p.

Debabrata, S. y S.N. Prakash (1998).Cryopreservation of shoot tips of tetraploid potato (*Solanumtuberosum*L.) clones by vitrification. *Ann. Botany*. 82: 455-461.

Dereuddre, J., C. Scottez, Y. Arnaud, and M. Duron. (1990). Resistance of alginate-coated axillary shoot tips of pear tree (*Pyruscommunis* L. cv. Beurre Hardy) *in vitro* plantlets to dehydration and subsequent freezing in liquid nitrogen. *C. R. Acad. Sci. Paris* 310:317–323.

Dereuddre, J. Blandin, S. and Hassen, N. (1991). Resistance of alginate-coated somatic embryos of carrot (*Daucuscarota*L.) to desiccation and freezing in liquid nitrogen.Effects of preculture.*CryoLetters* 12: 125-134.

Dixit, S; Ahuja, S; Narula, A; Srivastava, PS. 2004. Cryopreservation: a potential tool for long-term conservation of medicinal plants. p. 278 - 288. In: Srivastava, PS; Narula, A; Srivastava, S. eds. *Plant biotechnology and molecular markers*.Kluwer Academic Publishers, Holanda - Anamaya Publishers, Nueva Delhi, India. 400 p.

Dodds. J.H., Huaman. Z., and Lizarraga, R., 1991. Potato germplasm conservation, In: J.H. Dodds ed., *In Vitro methods for conservation of plant Genetic Resources*. Chapman an Hall, London. 93-109.

Dussert, S., Mauro M.C., Engelmann F. (1992). Cryopreservation of grape embryogenic cell suspensión: Influence of post-thaw culture conditions and application to different strains. *Cryo-Letters* 13: 15-22.

Engelmann F. (2004) Plant cryopreservation: Progress and prospects. *In vitro Cell.& Dev. Biol.-Plant* 40: 427-433.

CRIOPRESERVACIÓN DE YEMAS AXILARES DE PATATA (*Solanum tuberosum* L.) POR EL MÉTODO DE ENCAPSULACIÓN-DESHIDRATACIÓN.

Engelmann F. (2011). "Encapsulation-dehydration for cryopreservation: past. Present and future" in Proceedings of the First International Symposium on cryopreservation in Horticultural Species. Ed: B Panis y P. Lynch. Acta Horticulturae Number 908, 165-171.

Engelmann F. "Importance of desiccation for the cryopreservation of recalcitrant seed and vegetatively propagated species". Plant Cell Resources Newsletter. 112 (1997): 9-18.

Engelmann F. 2000. Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources. En: Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application. Roma, IPGRI-JICARS, p 9-17.

Engelmann, F. "In vitro conservation of tropical plant germplasm-a review". Euphytica 57 (1991):227-243.

Engelmann, F., Takagi H. (2000). Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application. JIRCAS, Tsukuba, Japón / IPGRI, Roma.

Fabre, J. y J. Dereuddre. (1990). Encapsulation-dehydration: A new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot tips. Cryo-Letters 11: 413-426.

Fahy, G.M., McFarlane D.R., Agell C.A., Meryman H.T. (2000). Vitrification as an approach to cryopreservation. Cryobiology 21: 407-426.

Flores, D., Barboza, S., Orozco, R. 2002. Guía para la producción de semilla prebásica y básica de patata en Costa Rica. San José, CR. EUNED. 56 p.

Franks, F. (2003). Scientific and technological aspects of aqueous glasses. Biophysical Chemistry 105: 251-261.

García-Águila Leyanis, Manuel de Fera, Karen Acosta. Revista Biotecnología Vegetal vol. 7. No 2:67-79 abril-junio.2007.

Gnanapragasam, S., Vasil IK (1992) Cryopreservation of immature embryos, embryogenic callus and cell suspension cultures of gramineous species. Plant Science 83: 205-215.

Golmirzaie, A.M. y a. Panta.(1996). Advances in potato cryopreservation by vitrification. CIP, Lima. En: <http://www.cipotato.org/market/PgmRprts/pr95-96/program2/prog22.htm>. pp.1-7.

González, M.T., Ravelo M.M., Urra C., Martínez M.E., Engelmann F. (1998). Cryopreservation of pineapple (*Ananas comosus*) apexes. Cryo-Letters 19: 375-382.

González-Arno M.T., Engelmann F., Urra C. y Lynch P. (1993) Crioconservación de meristemos apicales de plantas *in vitro* de caña de azúcar mediante el método de encapsulación/deshidratación. Biotecnología aplicada, Revista de la

CRIOPRESERVACIÓN DE YEMAS AXILARES DE PATATA (*Solanumtuberosum*L.) POR EL MÉTODO DE ENCAPSULACIÓN-DESHIDRATACIÓN.

Sociedad Ibero-latinoamericana de Biotecnología Aplicada a la Salud. vol. 10, No. 3. 1993. Pag. 225-228.

González-Arno MT, Engelmann F (2006) Cryopreservation of plant germplasm using the encapsulation-dehydration technique: Review and case study on sugarcane. *Cryoletters* 27(3):155-168

Guerrero, A. 1977. Cultivos herbáceos extensivos. Madrid, ES. Ediciones Mundi-Prensa. 531 p.

Harding, K. y E. Benson.(1991). The effect of prefreeze *in vitro* culture period on the recovery of cryopreserved shoot tips of *Solanumtuberosum*. *Cryo-Letters* 12: 17-22.

Hirai, D. and A. Sakai. “Cryopreservation of *in vitro*-grown axillary shoot-tip meristems of mint ( *Menthaspicata*L.) by encapsulation vitrification”. *Plant Cell Reports* 19 (1999): 150-155.

Hirai, D. y A. Sakai. (2000). Cryopreservation of *in vitro* grown meristems of potato (*Solanumtuberosum*L.) by encapsulation-vitrification. En: Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application. IPGRI.Roma.Italia. Pp. 205-211.

Kartha, K.K., Fowke L.C., Leung N.L., Caswell K.L., Hakman I. (1988). Induction of embryos and plantlets from cryopreserved cell cultures of white spruce (*Piceaglauca*). *J Plant Physiol* 132: 529-539.

Lambardi, M.A., Fabbri, and A. Caccavale.“ Cryopreservation of white poplar (*Populus alba* L.) by vitrification of *in vitro*-grown shoot tips”. *Plant Cell Reports*. 19 (2000): 213-218.

Langis, R., Schnabel B., Earle E.D., Steponkus P.L. (1989). Cryopreservation of *Brassica campestris* L. cell suspension by vitrification. *Cryo-Letters* 10: 421-428.

Langis, R., Steponkus P.L. (1991) Vitrification of isolated rye protoplasts: Protection against dehydration injury by ethylene glycol. *Cryo-Letters* 12: 107-112.

Matsumoto, T., A. Sakai, and K. Yamada.“Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of wasabi (*Wasabi japonica*L.) by vitrification and subsequent high plant regeneration”. *Plant Cell Reports* 13. (1994): 442-446.

Matsumoto, T., K. Mochida, H. Itamura, and A. Sakai. “Cryopreservation of persimmon ( *Diospyros kaki* Thumb) by vitrification of dormant shoot tips”. *Plant Cell Reports* 20 (2001): 398-402.

Mazur, P. (1984). Freezing of living cells: Mechanisms and implications. *Am. J. Physiol.* 247: 125-142.

Mix-Wagner G, Schumacher HM, Cross RJ (2003) Recovery of potato apices after several years of storage in liquid nitrogen. *CryoLetters* 24:33–41

CRIOPRESERVACIÓN DE YEMAS AXILARES DE PATATA (*Solanumtuberosum*L.) POR EL MÉTODO DE ENCAPSULACIÓN-DESHIDRATACIÓN.

Mix-Wagner, G., H.M. Schumacher y R.J. Cross. (2003). Recovery of potato apices alter several years of storage in liquid nitrogen. *Cryo-Letter* 24(1): 33-41.

Montano, A. 1984. Cultivo y mejoramiento de la patata. San José, CR. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. 706 p.

Panis B. and P. Lynch (2011). "The effect of Pre-culture temperature treatment on the cryopreservation of Potato shoot-tips" in Proceeding of the First International Symposium on cryopreservation in Horticultural Species. *ActaHorticulturae*. 908, 509-512.

Panis, B. (1995) Cryopreservation of banana (*Musa spp*) germplasm. *Dissertationes de Agricultura* 272. Catholic University of Leuven, Bélgica.

Panis, B., M. Lambardi. "Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees)". *The Role of Biotechnology*. (2005)

Pennycooke, J.C., Towill L.E. (2000). Cryopreservation of shoot tips from *in vitro* plants of sweet potato by vitrification. *Plant Cell Report* 19: 733-737.

Plessis, P., Leddet, C. and Dereuddre, J. (1991). Resistance to dehydration and to freezing in liquid nitrogen of alginate coated shoot-tips of grape vine (*Vitisvinifera*L. cv. Chardonnay) *C.R. Acad. Sci. Paris* 313 Sér. III: 373-380.

Poissonnier, M. Monod, V. Páques, M. and Dereuddre, J. (1991). Cryopreservation in liquid nitrogen of *Eucalyptus gunnii* shoot tips grown *in vitro* following encapsulation and dehydration. *Ann. Rech. Sylv. AFOCEL* 1991-1992:5-23.

Reed, B.M. (2001) Implementing cryogenic storage of clonally propagated plants. *Cryo-Letters* 22: 97-104.

Reed, B.M., Dumet D., Denoma J.M., Benson E.E. (2001). Validation of cryopreservation protocols for plant germplasm conservation: a pilot study using *Ribes*L. *Biodiversity and conservation* 10: 939-949.

Rivera Calderón Angela Liliana, Raúl Iván Valbuena Benavides, Rigoberto Hidalgo Hidalgo, José Dilmer Moreno Mendoza. "Criopreservación de yemas de microtubérculos de patata *Solanumtuberosum*ssp. *Andígena* mediante desecado de tejidos". *Revista Corpoica. Ciencia y tecnología agropecuaria*. (2008) 9(2), 37-44

Roca, W; y Mroginski, L. (editores). Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Cali, CO. 970 p. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) 1991

Sakai, A. "Development of cryopreservation techniques". En F. Engelmann and H. Takagi (eds.) *Cryopreservation of tropical plant germplasm current research progress and application*. Japan International Research Centre for Agricultural Sciences, Tsukuba. International Plant Genetic Resources Institute Rome. (2000): 1-7.



CRIOPRESERVACIÓN DE YEMAS AXILARES DE PATATA (*Solanumtuberosum*L.) POR EL MÉTODO DE ENCAPSULACIÓN-DESHIDRATACIÓN.

Sakai, A., Kobayashi S., Oiyama I. Cryopreservation of nucellar cells of naval orange ( *Citrus sinensis*Osb. Var. Brasiliensis Tanaka) Byvitrification.Plant Cell Reports. 9. (1990): 30-35.

Sakai, A., Kobayashy S., Piyama I. (1990). Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis*osb.var. brasilliens Tanaka) by vitrification.Plant Cell Report 9: 30-33.

Sarkar D., P.S. Naik. Cryopreservation of Shoot Tips of Tetraploid Potato ( *Solanumtuberosum*L.) Clones by vitrification.Annals of Botany. 82 (1998): 455-461.

Schäger-Menuhr A., Muller E., Mix-Wagner G. “Cryopreservation: an alternative for the long term sotorage of old potato varieties”. Potato Research 39 (1996): 507-513.

Schäger-Menuhr A., Muller E., Mix-Wagner G. “Long-term storage of potato varieties by cryopreservation of shoot-tips in liquid nitrogen”.Plant Genetic Resources Newsletter. 111 (1997): 19-24.

Schrijmakers, E.W.M., Van Iren F.(1995). A two-step or equilibrium freezing procedure for the cryopreservation of plant cell suspensions. En: Day J.G., M.R. McLellan (eds.). Methods in Molecular Biology, vol.38: Cryopreservation and freezing drying protocols, pp. 103-111. Humana Press Inc.

Scocchi, A., H. Rey. “Conservación de Germoplasma *in nitro*. En V. Echenique, C. Rubinstein, L. Mroginski (eds.). Biotecnología y Mejoramiento vegetal. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Buenos Aires, Argentina. (2004): 179-185.

Shafer, A., E. Muller y G. Mix-Wagner. (1996). Cryoreservation: an alternative for the long-term storage of old potato varieties. Potato Res 39: 507-513.

SteponkusP.L.,Lamphear F.D. (1967). Refinement of the triphenyltetrazolium chloride method of determining cold injury. Plant Physiology 42: 1423-1426.

Steponkus, P.L., R. Langis y S. Fujikama. (1992). Cryopreservation of plant tisúes by vitrification p.1-61. En: P.L. Steponkus (ed.). Advances in low temperatura biology.Vol.1. JAI Press, London.

Takagi, H.N., Tien-Thinh, O.M. Islam, T. Sendoku, and A.Sakai. “Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of taro (*Colocasiaesculenta*(L.). Schott) by vitrificationprocedure”.Plant Cell Reports. 16 (1997): 594-599.

Thinh, N.T., H. Takagi, and Yashima. “Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of banana (*Musa spp.*) byvitrification method”. Cryo-Letters. 20 (1999): 163-174.

Towill, L.E. (1981) *Solanumtuberosum*: A model for studying. The cryobiology of shoot-tips in the tuber-bearing *Solanum* species. Plant Sci. Lett. 6: 315-324.



CRIOPRESERVACIÓN DE YEMAS AXILARES DE PATATA (*Solanumtuberosum*L.) POR EL MÉTODO DE ENCAPSULACIÓN-DESHIDRATACIÓN.

Turner, S.R., Senaratna T., Bunn E., Tan B., Dixon K.W., Touchell D.H. (2001). Cryopreservation of shoot tips from six endangered Australian species using a modified vitrification protocol. *Annal of Botany* 87: 371-378.

Uragami, A., Sakai A., Nagai M., Takahashi T. (1989). Survival of cultured cells and somatic embryos of *Asparagus officinalis*L. Cryopreserved by vitrification. *Plant Cell Report* 8: 418-421.

Veramendi J., L.M. Arregui and A.M. Mingo-Castel, 1998. A simple method for médium-term conservation of potato germplasm. *Plant Tissue Culture and Biotechnology* 4: 183-188.

Veramendi Jon y Arregui Luis M. “La conservación *in vitro* de los recursos fitogenéticos de patata (*Solanumtuberosum*)” *Revista VIDA RURAL* N° 139 del 15 de noviembre de 2001. Año VIII. Pag: 56-57.

Villa Alba Lucía, Sánchez A.M. 2003. Criopreservación de una accesión de *Solanumphureja*(Tesis de grado). Universidad del Tolima, Licenciatura en Biología, Ibagué, 55p.

Villa Alba Lucía, Alejandra Sánchez, Raúl Iván Valbuena y Roosevelt Escobar. 2007. “ Evaluación preliminar de técnicas de crioconservación en una accesión de *SolanumPhureja*” en *Corpoica,Ciencia y Tecnología Agropecuaria* (2007) 8(2), 50-59.

Wang, Y.L., M.J. Fan, S.I. Liaw. “Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of patataya (*Caricapatataya*L.) byvitrification”. *Botanical Bulleting of Academia Sinica*. 46 (2005): 29-34.

Widholme J.M. 1972. The use of fluorescein diacetate inn phenosafranine for detecting viability of culture plant cells. *Stain Technology* 47:189.

Wilson, P.W., Heneghan A.F., Haymet A.D.J. (2003). Ice nuclation in nature: supercoolingpoint (SCP) measurements and the role of heterogeneous nucleation. *Cryobiology* (46): 88-98.

Withers, L.A. (1980).Low temperature storage of plant tissue cultures. En: A Fiechter (ed.). *Advances in biochemical engineering, Plant Cell Cultures II*, vol. 18, pp.101-149.Springer-velarg, Basel.

Withers, L.A. (1987).The low temperature preservation of plant cell, tissue and organ cultures and seed for genetic conservation and improved agriculture practice. En: Grout B.W.W., Morris G.J. (eds.). *The effect of low temperature on biological systems*, pp. 389-409. Edward Arnold Ltd, London.

Zachariassen, K.E., Kristiansen E. (2000). Ice nucleation and antinucleation in nature. *Cryobiology* (41): 257-279.

Zhao, M.A., Y.Z. Xhu, S.P. Dhital, D.M. Khu y Y.S. Song. (2005). An efficient cryopreservation procedure for potato (*SolanumTuberosum*L.) utilizing the new ice blocking agent supercool X1000. *Plant Cell Rep* 27(6):477-481.

CRIOPRESERVACIÓN DE YEMAS AXILARES DE PATATA (*Solanumtuberosum*L.) POR EL MÉTODO DE  
ENCAPSULACIÓN-DESHIDRATACIÓN.