

ARTÍCULO CIENTÍFICO

Ángela Liliana Rivera Calderón¹, Raúl Iván Valbuena Benavides², Rigoberto Hidalgo Hidalgo³, José Dilmer Moreno Mendoza⁴

Cryoconservation of buds of potato's microtubers *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* by means of drying tissues

ABSTRACT

At the Corporación de Investigación Agropecuaria Corpoica, C.I. Tibaitatá, the cryoconservation of microtubers buds was evaluated in two potato accessions of *Solanum tuberosum* ssp. *andigena*, C.C.C. 4318 (carriza) and C.C.C. 4981 (guata negra), from the Colombian Central Collection by using the dried bud methodology. This methodology had two steps, the preliminary one or adjustment and the main one. In the main step, the tissue drying was made with sterile air flow for 30 minutes, cryoconservation in liquid nitrogen at -196°C during 1 day, water bath thawing at 37°C for 3 minutes and recuperation culture medium (100% MS + 8% sucrose + 2 g/L activated charcoal) during 7 days in dark, then the cultured medium was changed (100% MS + 0.04 mg/L kinetin + 0.1mg/L gibberellic acid). A completely randomized experimental design with 2 accessions, 4 treatments, 10 replications and 10 buds, was used. The survival was evaluated at 7, 14 and 30 days. At the same time, the tetrazolium test on seeds was adapted at 0.5% a 25°C for 24 hours, and evaluated after 14 and 30 days. In this bioassay, the survival evaluation of the buds was difficult possibly due to the effect of culture medium and environmental factors. The final result was loss of survival at 30 days, probably because the recovery conditions were not suitable.

Keywords: Cryopreservation, germplasm conservation, survival, tissue drying, liquid nitrogen.

Radicado: 4 de agosto de 2008
Aceptado: 9 de diciembre de 2008

¹ Ing. Agr., estudiante de Maestría en Ciencias con énfasis en Recursos Fitogenéticos Neotropicales. Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira. anlriverac@palmira.unal.edu.co

² Ing. Agr. M.Sc. Corpoica, Tibaitatá. i.valbuena@corpoica.org.co

³ Ing. Agr. M.Sc. Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira. rhidalgo@palmira.unal.edu.co

⁴ Ing. Agr. Ph.D. Corpoica, Tibaitatá. jdmoreno@corpoica.org.co

* Artículo derivado de la tesis de Maestría en Ciencias con énfasis en Recursos Fitogenéticos Neotropicales de la primera autora.

Crioconservación de yemas de microtubérculos de papa *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* mediante desecado de tejidos*

RESUMEN

En la Corporación de Investigación Agropecuaria Corpoica, C.I. Tibaitatá, se evaluó la crioconservación de yemas de microtubérculos en dos accesiones de papa *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* de la Colección Central Colombiana: C.C.C. 4318 (carriza) y C.C.C. 4981 (guata negra) mediante la metodología del desecado de yemas. Esta metodología tuvo dos etapas: la preliminar o de ajuste y la principal. En la principal, el secado se hizo con flujo de aire estéril durante 30 minutos, crioconservación en nitrógeno líquido a -196°C durante un día, descongelamiento en baño maría a 37°C durante 3 minutos y recuperación en medio de cultivo (100% MS + 8% sacarosa + 2 g/L carbón activado) durante siete días en oscuridad; luego, el medio de cultivo se cambió (100% MS + 0,04 mg/L kinetina + 0,1mg/L ácido giberélico). El diseño experimental fue al azar: dos accesiones, cuatro tratamientos, diez repeticiones y diez yemas. Se evaluó sobrevivencia a 7, 14 y 30 días. Paralelamente se adaptó la prueba de tetrazolio en semillas al 0,5% a 25°C durante 24 horas, y se evaluó a los 14 y 30 días; en esta prueba se dificultó la evaluación de la sobrevivencia de las yemas posiblemente por efecto del medio de cultivo y los factores ambientales; el resultado final fue pérdida de sobrevivencia a los 30 días, posiblemente porque las condiciones de recuperación no fueron aptas.

Palabras clave: criopreservación, conservación de germoplasma, sobrevivencia, secado de tejidos, nitrógeno líquido.

INTRODUCCIÓN

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 el mejoramiento genético. 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.

La papa es uno de los cultivos con mayor diversidad genética. Esta diversidad está concentrada en la zona Andina de América de Sur, y se encuentra ampliamente distribuida (Hijmans *et al.*, 2002 citados por Bonierbale *et al.*, 2004). La papa cultivada en la zona Andina pertenece a un conjunto de especies diploides (*S. ajanhuiri* Juz. *et* Buk., *S. phureja* Juz. *et* Buk., *S. stenotomum* Juz. *et* Buk), triploides (*S. chaucha* Juz. *et* Buk., *S. juzepzuckii* Buk.), tetraploides (*S. tuberosum* ssp. *andigena* Hawkes) y pentaploides (*S. curtilobum* Juz. *et* Buk.); por su parte, la papa cultivada en la región litoral del sur de Chile pertenece a la especie tetraploide *S. tuberosum* ssp. *tuberosum*. Estos grupos cultivados, sin embargo, no

son reconocidos por ciertos investigadores como ocho especies independientes, sino como unas pocas o una sola especie (Dodds, 1962; Huamán y Spooner, 2004 citados por Bonierbale *et al.*, 2004). *S. stenotomum* es probablemente el grupo más primitivo, mientras que *S. tuberosum* ssp. *andigena* predomina como la papa cultivada más importante en los Andes (Bonierbale *et al.*, 2004).

El Programa Nacional de Recursos Genéticos y Biotecnología Vegetal de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica, C.I. Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca), la cual es la segunda colección de este cultivo en cuanto a variabilidad genética (13%) después del Centro Internacional de la Papa (CIP) (20%) (FAO, 1996).

En la actualidad, la Colección Central Colombiana de papa (C.C.C.) posee 2985 accesiones de variedades cultivadas y silvestres de papa. Consta de 1607 accesiones conservadas en condiciones de campo, 2062 en cava fría (temperatura entre 0 y 5°C) y 818 en condiciones *in vitro* (algunas de las accesiones presentan duplicados en dos o tres sistemas) en el Centro de Investigación de Tibaitatá. Las anteriores se han clasificado de acuerdo

con el tipo de material (variedades de agricultor, introducciones, especies silvestres, variedades sustituidas, etc.). Dentro de estas colecciones se encuentran diferentes especies y/o subespecies como *Solanum tuberosum* subespecie *andigena*, *Solanum tuberosum* subespecie *tuberosum* (papa de año o guatas), *Solanum phureja* (papa criolla o chauchas), *Solanum chaucha* (papa amarilla) y especies silvestres (*Solanum colombianum*, *Solanum estradae*), entre otras (Cerón *et al.*, 2005).

El tipo de material conservado en los tres sistemas (campo, *in vitro* y cava fría) se refiere a material silvestre y cultivares del agricultor procedentes de diferentes partes del país, en especial de Nariño, Cauca, Boyacá, Cundinamarca, Santander, Norte de Santander, Caldas, Quindío y Magdalena e introducciones de Perú, Bolivia, Ecuador, México, Argentina, Inglaterra, Escocia, Alemania, Holanda y Bélgica; y variedades colombianas producto de procesos de mejoramiento genético del cruce de las subespecies *andigena* x *tuberosum* (Moreno y Valbuena, 2006).

La Colección Central Colombiana (C.C.C) de papa en el actual esquema de conservación podría estar en riesgo de pérdida de variabilidad genética debido a factores tan importantes como la gota *Phytophthora infestans*, los virus y el clima, entre otros. A esto se suma el hecho de que los costos de preservación son muy altos; en el 2005, la conservación *in vitro* fue de \$31.724.91 y en condiciones de campo fue \$53.869.967 (Cerón *et al.*, 2005); razones por las cuales se ha visto la necesidad de iniciar investigaciones en crioconservación. Se estima que los costos podrían reducirse hasta 20% para condiciones de conservación en campo.

La crioconservación se puede considerar un sistema no letal de almacenamiento de tejidos biológicos a temperaturas ultrabajas, pues permite detener su metabolismo celular (Kantha, 1985 citado por Escobar, 2005).

Este sistema es la única opción disponible para el almacenamiento a largo plazo del germoplasma de especies propagadas vegetativamente y especies con semillas intermedias o recalcitrantes. La utilización de nitrógeno líquido (-196°C) asegura las temperaturas ultrabajas y la indepen-

dencia de la electricidad. Tiene una gran ventaja y es que requiere de un espacio muy reducido, permite que el material esté protegido de la contaminación, ya que una vez almacenado no se manipula y el mantenimiento requerido por la colección es mínimo (Abdelnour, 1999).

En crioconservación 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. Este sistema de conservación permite almacenar desde células hasta órganos, y tanto materiales generados en el laboratorio como los producidos por ingeniería genética. Requisito indispensable antes de iniciar el programa de crioconservación de la especie de interés es contar con el protocolo de micropropagación, el cual debe estar bien evaluado y permitir altos porcentajes de regeneración de las plantas. Para la gran mayoría de las especies vegetales, la crioconservación se encuentra en estado experimental, sin embargo se han logrado buenos avances en géneros como *Rubus*, *Pyrus*, *Solanum* y *Elaeis guineensis* (Abdelnour, 1999).

La crioconservación 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 crioconservación 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 crioconservación clásicos son principalmente usados para el enfriamiento de tejidos no diferenciados como las suspensiones celulares y callos (Engelmann, 2000).

Para la crioconservación 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 algunas como la encapsulación-deshidratación, encapsulación-vitrificación, el desecamiento, el precrecimiento, el precrecimiento-desecamiento, la gota congelada (Engelmann, 2000).

En crioconservación también es muy importante estimar la sobrevivencia o viabilidad de los tejidos crioconservados. Generalmente la sobrevivencia se determina por la recuperación de los tejidos empleando el cultivo de tejidos. Adicionalmente, existen pruebas como la de diacetato de fluoresceína (fluorescein diacetate -FDA) y tetrazolio por espectrofotometría que permiten determinar la sobrevivencia 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 del descongelamiento con el fin de determinar la habilidad de las células para sobrevivir a la crioconservación. Sin embargo se recomienda efectuar una segunda evaluación 24 horas después del descongelamiento con el fin de evitar falsos positivos (Widholme, 1972).

La prueba de tetrazolio por espectrofotometría puede ser utilizada para diferentes tipos de tejidos. La principal ventaja de esta metodología es que permite determinar la cuantificación de la 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 del descongelamiento (Steponkus y Lamphear, 1967).

En Corpoica C.I. Tibaitatá en el 2003 se iniciaron evaluaciones de diferentes metodologías de crioconservación de una accesión de *Solanum phureja* utilizando meristemas apicales. Dicho estudio obtuvo como resultado que son muy importantes, entre otros, las etapas previas al congelamiento para que el explante sea vigoroso, y las condiciones del cuarto de crecimiento para obtener exitosamente la recuperación de plántulas después de la etapa de descongelamiento (Villa y Sánchez, 2003). De acuerdo con estos antecedentes, fue necesario continuar en este proceso, con nuevas investigaciones que permitieran establecer un protocolo de crioconservación apto, y facilitar el uso de esta herramienta como medio alternativo a los tres sistemas de conservación que se poseen hasta el momento en Corpoica.

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 papa gracias a las siguientes ventajas: más fáciles de manipular, las yemas pre-

sentes en los microtubérculos también permiten obtener plántulas idénticas a la madre, son más vigorosas que los meristemas apicales, un brote en realidad cuenta con tres yemas viables y además se encuentran libres de enfermedades.

La presente investigación se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos, del Programa de Recursos Genéticos y Mejoramiento Vegetal de Corpoica C.I. Tibaitatá, con el objetivo de evaluar el potencial de la crioconservación de yemas de microtubérculos de papa *Solanum tuberosum* ssp. *andigena*, mediante la metodología del secado de tejidos como parte de los proyectos de investigación para encontrar estrategias alternas en la conservación del germoplasma de papa.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se adelantó en la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria –Corpoica–, en el Centro de Investigación Tibaitatá, municipio de Mosquera, Cundinamarca (4°71'28,2" N, 74°18'30,5" W y altitud 2516 msnm), en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Programa Nacional de Recursos Genéticos y Mejoramiento Vegetal.

Material vegetal

Para el presente estudio se utilizaron microtubérculos de dos accesiones: C.C.C. 4318 (carriza) y C.C.C. 4981 (guata negra) utilizadas en los ensayos preliminares y cuyo registro de pasaporte se presenta en la tabla 1.

Propagación inicial de plántulas

Se realizó una multiplicación previa a partir de dos plántulas por cada accesión. Estas plántulas fueron obtenidas de la colección *in vitro* de papa, de Corpoica C.I. Tibaitatá. Se extrajeron tanto ápices como entrenudos para su propagación, los cuales se colocaron en frascos de

vidrio de 500 mL repartidos en grupos de diez explantes, para un total de cuarenta explantes por accesión, lo cual constituyó el material inicial para el presente estudio. Los explantes fueron sembrados en medio de propagación MS convencional para papa (Murashigue y Skoog, 1962) (CIP, 1997), (tabla 1). Posteriormente fueron colocados en un cuarto de crecimiento durante un mes, a temperatura de 18°C, humedad relativa de 60% y fotoperíodo de 16 horas-luz/día.

Producción de microtubérculos

Los microtubérculos empleados en esta investigación fueron producidos en condiciones *in vitro* de las dos accesiones mediante el protocolo sólido – líquido (Rivera, 2007).

Después de la multiplicación inicial se realizó una nueva propagación empleando ápices y entrenudos que corresponde a una etapa previa a la inducción de tuberización. En esta propagación se utilizó un medio de cultivo descrito por Gómez y Reyes (1998), que fue modificado con la adición de gelificante. Las condiciones de crecimiento fueron iguales a la propagación inicial durante un mes (tabla 2).

Para la inducción de tuberización, se adicionó el medio de cultivo descrito por Borda y colaboradores (2005, citados por Rivera 2007) a los contenedores donde se hallaban las plántulas (tabla 2). Las condiciones empleadas fueron total oscuridad, temperatura de 18°C y humedad relativa de 60%, durante un mes, periodo necesario para el desarrollo total de los microtubérculos (Rivera, 2007).

Etapla exploratoria

Se emplearon yemas de los microtubérculos de las dos accesiones exponiéndolas a diferentes tiempos de secado en el flujo de la cámara. El tiempo de exposición

Tabla 1. Datos de pasaporte de las accesiones seleccionadas para la producción de microtubérculos

Recolección No.	Especie/subespecie	Nombre vulgar	Municipio	Vereda	Altitud (msnm)
C.C.C. 4318	<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>andigena</i>	Carriza	Belén (Boyacá)	El Bosque	2900
C.C.C. 4981	<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>andigena</i>	Guata negra	Guachucal (Nariño)	Corregimiento Muellanuez	3140

Tabla 2. Composición de un litro de medio de cultivo para propagación de plántulas y producción de microtubérculos

Composición	Medio de propagación de papa	Medio de cultivo previo a tuberización*	Medio de cultivo para inducción de tuberización**
Solución macro (MS)	50 ml	40 ml	50 ml
Solución micro	1 ml	1 ml	1 ml
Solución de hierro	10 ml	10 ml	10 ml
Tiamina	1 ml	0,4 ml	1 ml
Myoioinositol	0,1 g	0,1 g	0,1 g
Azúcar	30 g	30 g	30 g
Ácido pantoténico	-	2 mg	-
Ácido giberélico	-	0,4 mg	-
6 benzil amino purina (BAP)	-	0,5 mg	5 mg
Cloruro de cloro colina	-	-	10 mg
Phytigel	3 g	3 g	-
pH	5,7	5,7	5,7

* Gómez y Reyes (1998) (modificado).

** Borda *et al.* (2005).

fue desde 15 minutos, aumentando cada 5 minutos hasta 1 hora. Posteriormente, parte de las yemas empleadas en este proceso fueron congeladas en nitrógeno líquido (-196°C) durante un día. El descongelamiento se efectuó en baño maría a 37°C durante 3 minutos. Para la recuperación se utilizó el medio de cultivo 1, durante los primeros 7 días después del descongelamiento en oscuridad y temperatura de 18°C. Posteriormente, se transfirieron las yemas al medio de cultivo 2, y se efectuó el acondicionamiento a la luminosidad gradualmente; la temperatura fue 18°C (tabla 3).

Estudio principal

Diseño experimental

El diseño utilizado fue completamente al azar, empleando las dos accesiones en cuatro tratamientos (tabla 4), por diez repeticiones y cada una de ellas con diez yemas. Para un total de 800 yemas.

Se evaluó la sobrevivencia en una escala de 0 y 1, donde 0 fue muerto y 1 fue vivo. Los resultados obtenidos se analizaron mediante el programa estadístico SAS Versión 9.01.

Secado

Las yemas en este proceso se secaron con flujo de aire estéril en la cámara de flujo laminar durante 30 minutos.

permanecer en éste, en baño María a una temperatura de 37°C durante 3 minutos.

Recuperación en medio de cultivo

Se realizó de igual forma que en la etapa exploratoria empleando los medios de cultivo mencionados en la tabla 2.

Prueba de viabilidad (trifenil tetrazolio cloruro)

Esta prueba se utilizó como metodología complementaria para evaluar la sobrevivencia o viabilidad de las yemas en cada uno de los tratamientos. Esta se efectuó a los 14 y 30 días después del descongelamiento.

Se adaptó la metodología de tetrazolio empleada para semillas de papa, ya que la metodología de Steponkus y Lanphear (1967) para material crioconservado, requiere 100 mg de material vegetal, cantidad que es difícil de obtener empleando este tipo de explantes porque son muy pequeños y de bajo peso.

Se tomaron submuestras al azar a los 14 y 30 días después del descongelamiento.

Descongelamiento

Los tratamientos que implicaron el congelamiento (-196°C) en nitrógeno líquido (3 y 4) se descongelaron después de un día de

Tabla 3. Composición de los medios de cultivo para recuperación de yemas crioconservadas para 1 litro de medio

	Medio de cultivo 1	Medio de cultivo 2*
Solución macro (MS)	50 ml	50 ml
Solución micro	1 ml	1 ml
Solución de hierro	10 ml	10 ml
Tiamina	1 ml	1 ml
Myoioinositol	0,1 g	0,1 g
Azúcar	80 g	25 g
Phytigel	2 g	2 g
Carbón activado	2 g	-
Kinetina	-	0,04 mg
Ácido giberélico	-	0,1 mg
pH	5,7	5,7

* Golmirzaie y Toledo (1996). Este medio de cultivo es empleado generalmente para recuperación de yemas apicales de papa crioconservadas.

Tabla 4. Tratamientos utilizados para la evaluación de crioconservación de yemas de microtubérculos

Tratamiento	Descripción
Testigo absoluto	Yemas sin secar (control absoluto)
Yemas secadas	Yemas secadas durante 30 minutos (etapa de secado)
Yemas secadas y congeladas	Yemas secadas durante 30 minutos y congeladas (crioconservadas)
Testigo negativo	Yemas sin secar y congeladas (control congelado)

miento. Se usaron tres repeticiones con diez yemas de cada uno de los cuatro tratamientos para las dos accesiones y se colocaron en una solución de trifenil tetrazolio cloruro (TTC) al 0,5%, durante 24 horas a 25°C en oscuridad; pasado este tiempo se realizó el enjuague de las yemas con agua desionizada y se efectuó la lectura a cada yema. Según la tinción de las yemas se asignó el valor 0 para ausencia de tinción o tejido muerto (color blanco) y 1, para buena tinción o sobrevivencia (color rojo intenso); las yemas con tinción muy deficiente (rosa muy pálido) se pueden considerar como un estado intermedio de pérdida de viabilidad.

La calificación para la tinción de yemas debió efectuarse según la intensidad del color, ya que no pudieron ser catalogadas de forma efectiva como se hace en semillas por la imposibilidad de realizar observaciones y cortes más detallados debido al tamaño de ellas.

Esta prueba no se realizó inmediatamente después del descongelamiento porque las yemas son muy sensibles a cambios abruptos y se encuentran muy deshidratadas, condiciones no aptas para hacer la prueba; por esta razón la primera lectura se efectuó 14 días después del descongelamiento.

RESULTADOS

Estudios preliminares

Los estudios preliminares mostraron que la sobrevivencia disminuyó al aumentar el tiempo de desecación. A los 15 minutos de secado la sobrevivencia fue de 70% a 80%, a los 30 minutos entre 50% y 60%, a los 45 minutos varió entre 20% y 30%, y al llegar a 60 minutos de secado no había sobrevivencia en el medio de recuperación 1.

En las yemas desecadas a 30 minutos y sometidas a un día de congelamiento, se observó la sobrevivencia y recuperación de una yema de la accesión C.C.C. 4318 - carriza, la cual presentó regeneración directa y un desarrollo similar a los testigos. Por lo anterior se implementó esta metodología para el desarrollo del presente estudio (figura 1).

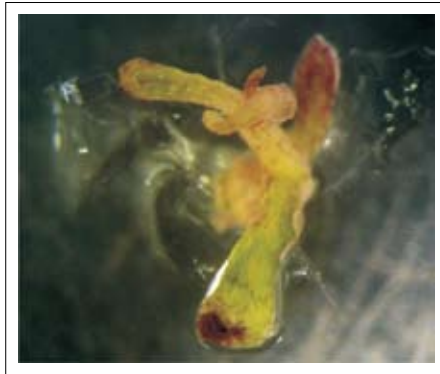


Figura 1. Plántula obtenida de yema crioconservada, accesión C.C.C. 4318

Estudio principal

Sobrevivencia de las yemas de microtubérculos por accesiones

Según el análisis de varianza y prueba de comparación de promedios de Duncan, para la variable sobrevivencia no se encontró diferencia significativa del 5% entre accesiones para las evaluaciones visual y de tetrazolio (tabla 5).

En las evaluaciones visuales, la accesión C.C.C. 4318 (carriza) presentó sobrevivencia promedio de 0,51 (51%), mientras que en la accesión C.C.C. 4981 (guata negra) fue de 0,52 (52%). Estos resultados son similares a los de la investigación de Schafer-Menuhr (1996, citada por Engelmann, 2000) que evaluó la crioconservación de yemas apicales de 219 accesiones de papa y obtuvo 40% de sobrevivencia. Golmirzaie y Panta (1996) encontraron que 69% de los genotipos que evaluaron presentaron diferentes niveles de sobrevivencia pero al parecer está relacionado con el genotipo y el vigor de la planta madre y han logrado incrementar la sobrevivencia hasta 75%.

En la prueba de tetrazolio, el análisis de varianza y la prueba de comparación de promedios de Duncan mostraron que las evaluaciones de sobrevivencia con tetrazolio en las accesiones no presentaron diferencias significativas entre éstas.

La evaluación visual de sobrevivencia o viabilidad de las yemas presentó promedios mayores que la prueba de tetrazolio. Para la accesión C.C.C. 4981 (guata negra) se obtuvo un promedio de 0,52 (52%) en forma visual, mientras que el tetrazolio fue 0,45 (45%); lo mismo sucede con la accesión C.C.C. 4318 (carriza), la cual en la parte visual obtuvo 0,51 (51%) y con el tetrazolio obtuvo 0,42 (42%) (tabla 5).

Estas diferencias, aunque no muy amplias, se pueden haber dado por subestimación o sobreestimación de lo observado. En las evaluaciones visuales se describe la coloración verde de la clorofila, lo cual puede sobreestimar los porcentajes de sobrevivencia. La evaluación con tetrazolio, aunque es mucho más exacta, produce tinción del tejido vivo, debido a que las deshidrogenasas y el NADH reducen la sal de tetrazolio y lo que genera el formazán que produce la característica del color rojo intenso. Es probable que se haya calificado como muertas yemas con pérdida avanzada de sobrevivencia o viabilidad debido a que hayan presentado tinción muy deficiente o no haya habido tinción, por lo cual pudo haberse dado una subestimación de lo observado.

Sobrevivencia de las yemas de microtubérculos por tratamientos

En la prueba visual la sobrevivencia presentó diferencias significativas del 5%. Se encontró que el testigo absoluto (yemas sin secar) obtuvo 0,99 de sobrevivencia (99%); para las yemas secadas fue 0,71 (71%); para las yemas secadas y congeladas fue 0,36 (36%) y para el testigo negativo (yemas sin secar y congeladas) fue 0,0 (0%), (tabla 6).

El análisis efectuado por tratamientos en relación con la prueba de tetrazolio mostró también diferencias significativas entre los cuatro tratamientos. El testigo absoluto (yemas sin secar) obtuvo la mayor sobrevivencia 1,0 (100%), yemas secadas 0,51 (51%), yemas secadas y congeladas 0,24 (24%) y yemas sin secar y congeladas 0,0 (0%), (tabla 6).

Tabla 5. Sobrevivencia promedio de las yemas de microtubérculos por accesiones

Accesión	Prueba visual	Prueba de tetrazolio
C.C.C. 4318 (carriza)	0,51 a	0,45 a
C.C.C. 4981 (guata negra)	0,52 a	0,42 a

Tabla 6. Sobrevivencia promedio de las yemas de microtubérculos por tratamientos

Tratamiento	Prueba visual	Prueba de tetrazolio
Testigo absoluto (yemas sin secar)	0,99 a	1,0 a
Yemas secadas	0,71 b	0,52 b
Yemas secadas y congeladas (crioconservadas)	0,36 c	0,24 c
Yemas secadas y congeladas	0,00 d	0,00 d

Entre ambas pruebas se observó que hay una tendencia similar de la respuesta de las yemas de microtubérculos a los tratamientos; aunque también se encontró que en la apreciación visual se obtuvieron mayores resultados de sobrevivencia que con la prueba de tetrazolio, es probable que se haya dado sobreestimación.

El testigo absoluto en ambas pruebas obtuvo el porcentaje más alto de sobrevivencia, puesto que no se sometió a ningún proceso que lo pudiera reducir. Las yemas secadas presentaron reducción de la sobrevivencia con respecto al testigo absoluto por efecto del proceso al cual fueron sometidas; las yemas de microtubérculos que fueron secadas y crioconservadas presentaron una reducción de la sobrevivencia mayor al tratamiento mencionado anteriormente, y en el caso del testigo negativo no hubo sobrevivencia de las yemas debido a los posibles daños que pudieron presentarse por el congelamiento del agua contenida en los tejidos.

Aunque la prueba de tetrazolio fue diseñada para semillas, y se adaptó como metodología alterna en esta investigación para la evaluación de la sobrevivencia o viabilidad de las yemas, no constituyó una prueba determinante para estimar dicha viabilidad. Para obtener un diagnóstico más acertado de la viabilidad de las yemas, sería necesario utilizar metodologías complementarias, como por ejemplo los cortes histológicos de las respectivas yemas.

Sobrevivencia de las yemas de microtubérculos por evaluaciones a través del tiempo

La sobrevivencia se evaluó a los 14 y 30 días después del descongelamiento y siembra de las yemas en el primer medio de recuperación (tabla 3). La primera lectura se efectuó a los 14 días puesto que a esta fecha las yemas de los microtubérculos hicieron la transición a la luminosidad, y es menos probable

obtener evaluaciones de sobrevivencia con falsos positivos como ocurre normalmente en los primeros días después del descongelamiento.

La sobrevivencia presentó diferencias significativas entre las lecturas efectuadas: a los 14 días fue 0,53 (53%) y a los 30 días fue 0,42 (42%). Probablemente la pérdida de sobrevivencia se presentó por las condiciones de recuperación empleadas en el presente estudio (tabla 7).

Tabla 7. Sobrevivencia promedio de las yemas de microtubérculos por evaluaciones a través del tiempo del estudio

Evaluación	Prueba visual	Prueba de tetrazolio
14 días	0,53 a	0,51 a
30 días	0,42 b	0,36 b

En la prueba de tetrazolio también se observaron diferencias significativas lo que corroboró que la sobrevivencia se redujo a través del tiempo; los 14 días después del descongelamiento fue 0,516 (51,6%), mientras que a los 30 días fue 0,366 (36,6%) (tabla 7).

Aproximación del uso de la prueba de tetrazolio en crioconservación de yemas de microtubérculos

A continuación se presentan algunas figuras con relación al comportamiento de las yemas en los diferentes tratamientos y la prueba de tetrazolio a los 14 días de encontrarse en los medios de cultivo para recuperación.

En la prueba de tetrazolio efectuada a los 30 días después de encontrarse las yemas en los medios de recuperación, se observó lo siguiente: tinciones similares en el testigo absoluto (yemas sin secar) y en las yemas que sufrieron procesos de secado; ausencia de tinción en el testigo negativo (yemas sin secar y congeladas) y en las yemas crioconservadas (secadas

y congeladas). Se deduce que a este tiempo se ha perdido la mayor parte de la viabilidad de las yemas crioconservadas debido, probablemente, a las condiciones y medios de cultivo empleados en este estudio, los cuales no fueron aptos para la recuperación y diferenciación de las yemas.

Testigo absoluto (yemas sin secar)

Las yemas sin secar presentaron una tinción muy marcada de color rojo fuerte, indicio de una buena actividad respiratoria (figura 2).

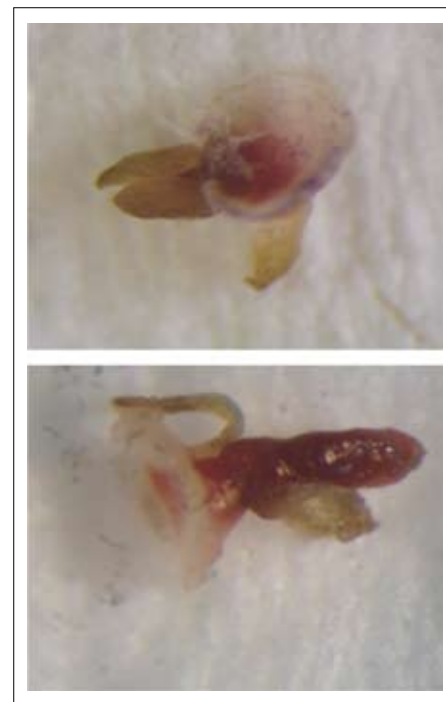


Figura 2. Yemas sin secar de papa *Solanum tuberosum* ssp. *andigena*, tratadas con tetrazolio. Vista superior e inferior de la yema

Yemas secadas

Las yemas secadas no presentaron tinción muy marcada, lo cual evidencia la reducción en la viabilidad de las yemas. La tonalidad rojo fuerte observada en el testigo absoluto no se percibió en éstas. La tinción se presentó en la base de la yema, sobre el epiderma del microtubérculo; en cuanto al segmento del microtubérculo se observó una delgada línea de tinción que demarca la posición de la yema (figura 3).

Yemas secadas y congeladas (crioconservadas)

En este tratamiento se observaron dos tipos de tinciones diferentes. La primera

corresponde a una tinción marcada, no igual al testigo absoluto, pero claramente visible; indicio de la viabilidad de las yemas (figura 4). En la segunda no se observa una clara tinción de la yema pero sí en el microtubérculo, sobre el corte realizado para su extracción, lo que demarca la zona de la base de la yema. Por lo anterior estas yemas se consideraron en proceso de pérdida de la viabilidad (figura 5).

Testigo negativo (yemas sin secar y congeladas)

En este tratamiento en el que las yemas se sometieron a la congelación rápida en nitrógeno líquido lo que ocasionó su muerte. Después de realizar la prueba de tetrazolio no se observó tinción de las mismas (muertas) (figura 6).

CONCLUSIONES

Las yemas de microtubérculos de las accesiones C.C.C. 4318 (carriza) y C.C.C. 4981 (guata negra) evaluadas en el proceso de desecación y crioconservación presentaron respuestas similares.

Después del proceso de descongelamiento, las yemas presentaron una coloración verde, por lo cual se pudo asumir que estaban vivas, lo cual fue corroborado con la prueba de tetrazolio, mucho más exacta, que produjo tinción de color rojo en el tejido vivo.

La pérdida de viabilidad o sobrevivencia de las yemas es bastante rápida. A pesar de que las yemas secadas y crioconservadas sobrevivieron al proceso de congelamiento en nitrógeno líquido, los medios y las condiciones ambientales de recuperación no fueron las adecuadas para facilitar el desarrollo de plántulas a partir de estas yemas. La apreciación visual y la prueba de tetrazolio pueden ser complementarias para la evaluación de sobrevivencia.

La sobrevivencia no pudo corroborarse a los 30 días por la pérdida de viabilidad de las yemas y la imposibilidad de realizar cortes histológicos de los tejidos internos de las yemas, con el fin de detectar algún daño en la membrana celular. Por consiguiente no se obtuvo regeneración de plántulas en los medios de cultivo.

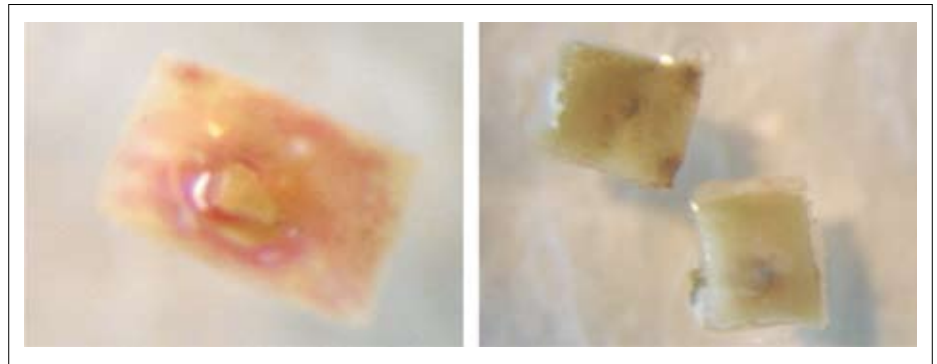


Figura 3. Yemas secadas de papa *Solanum tuberosum* ssp. *andigena*, tratadas con tetrazolio. Vista superior e inferior

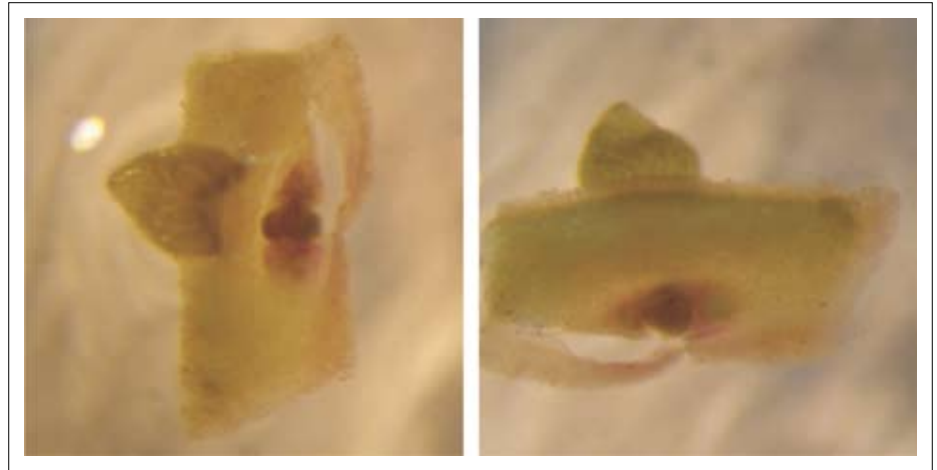


Figura 4. Yemas secadas y congeladas de papa *Solanum tuberosum* ssp. *andigena*. Tinción marcada de la yema. Vista superior e inferior

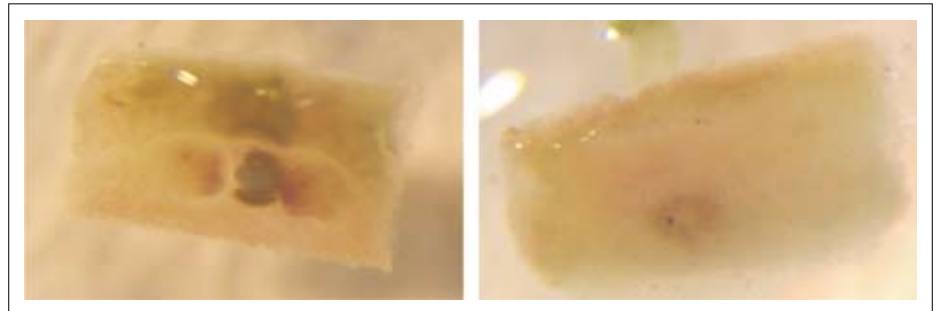


Figura 5. Yemas secadas y congeladas de papa *Solanum tuberosum* ssp. *andigena*. Tinción no muy marcada de la yema y tinción leve en el segmento del microtubérculo



Figura 6. Yemas sin secar y congeladas de papa *Solanum tuberosum* ssp. *andigena*. Vista superior e inferior

AGRADECIMIENTOS

Alba Lucía Villa, Ligia Suescún y Pablo Edgar Jiménez. Laboratorio de Cultivo de Tejidos. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria –Corpoica-C.I. Tibaitatá.

Edgar Iván Estrada, Mario García, Carlos Iván Cardozo y Manuel Sánchez. Profesores. Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Escuela de Posgrados

Juan Diego Palacio. Instituto Alexander von Humboldt – CIAT, Palmira.

REFERENCIAS

- 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. 299-306.
- Alonso J, Hijmans L, Robert. CIP. World Potato Atlas. Corpoica. Centro Internacional de la Papa. http://www.cipotato.org/wpa/samerica/colombia_c.htm
- Bonierbale M, Amoros W, Espinoza J, Mihovilovich E, Roca W, Gómez R. 2004. Recursos Genéticos de la papa: don del pasado, legado para el futuro. Suplemento de la Revista Latinoamericana de la Papa. Universidad Austral de Chile, p. 3-15.
- Borda CC, Toledo J, Golmirzaie A, Roca W. Efecto de inductores de tuberización y fotoperíodo sobre la microtuberización de *Solanum tuberosum* L. *in vitro*. En: Redbio/FAO Red de Cooperación Técnica en Biotecnología Agropecuaria para América Latina y el Caribe, http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc_2001/posters/01/posterpdf/01-100.pdf; consulta: 20 de noviembre de 2005.
- Centro Internacional de la Papa (CIP). Tissue Culture. CIP Training Manual. 1997.
- Cerón MS, Valbuena I, Moreno JD. 2005. Informe Técnico de Bancos, C. I. Tibaitatá, 22 p.
- 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.
- Escobar R. 2005. Aspectos logísticos de manejo y determinación de la estabilidad genética de materiales crioconservados de yuca *Manihot sculenta* Crantz. (Tesis de maestría) Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira, Maestría en Ciencias, Recursos Fitogenéticos Neotropicales, 100 p.
- Food and Agriculture Organization. 1996. Informe sobre el estado de los recursos fitogenéticos en el mundo, preparado para la Conferencia Técnica Internacional sobre los Recursos Fitogenéticos. FAO. Leipzig, 17-23 de junio.
- Golmirzaie A, Panta A. 1996. Advances in potato cryopreservation at CIP. Program 2. Germplasm Management and Enhancement. Program Report 95-96.
- Gómez MM, Reyes PL. Propagación y tuberización *in vitro* de tres variedades de papa criolla (*Solanum phureja*) de la Colección Central Colombiana (Tesis de grado). Universidad Distrital Francisco José de Caldas, Licenciatura en Biología. Bogotá, 71 p.
- Moreno JD, Valbuena RI. 2006. Colección Central Colombiana de Papa: riqueza genética para el mejoramiento del cultivo. Innovación y Cambio tecnológico 24(4): 16-24.
- Murashigue T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- Rivera AL, Valbuena RI, Hidalgo R, Moreno JD. 2008. Microtuberización *in vitro* de siete accesiones de papa de la colección central colombiana. *Acta Agronómica* 57(3): 175-180.
- Rivera AL. 2007. Evaluación de la crioconservación de yemas de microtubérculos como alternativa para la conservación a largo plazo de germoplasma de papa *Solanum tuberosum* ssp. *andigena*. (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Recursos Fitogenéticos Neotropicales, Palmira.
- Steponkus PL, Lamphear FD. 1967. Refinement of the triphenyl tetrazolium chloride method of determining cold injury. *Plant Physiology* 42:1423-1426.
- Villa AL, Sánchez AM. 2003. Crioconservación de una accesión de *Solanum phureja* (Tesis de grado). Universidad del Tolima, Licenciatura en Biología, Ibagué, 55 p.
- Widholme JM. 1972. The use of fluorescein diacetate in phenosafranin for detecting viability of cultured plant cells. *Stain Technology* 47: 189.