

ARTÍCULO CIENTÍFICO

Alba Lucía Villa¹, Alejandra María Sánchez²,
Raúl Iván Valbuena³ y Roosevelt Escobar⁴

ABSTRACT

Preliminary evaluation of cryoconservation techniques in an accession of *Solanum phureja*

The Tibaitatá Research Center of CORPOICA is the repository of the main Colombian potato germplasm collection with 1098 accessions, 151 belonging to *Solanum phureja* (98 preserved *in vitro* and 53 in the field), a key species because it possesses resistant genes against *Phytophthora infestans* and because it is an important food resource for the Colombian population. There cryoconservation methods are evaluated to determine the best conservation practices. For this purpose, encapsulation-dehydration and encapsulation-vitrification techniques were evaluated as reported for the *Solanum* species, adjusting methodologies and paying especial attention to tissue selection and quality, propagation media, apex encapsulation, concentration and time exposure to sucrose, dehydration in silica gel, and the effect of charger and PVS2 and PVS4 solutions, previous to freezing. Results indicated that explant quality and recuperation media determined the success in the cryoconservation process. A preconditioning M&S medium supplemented with 0.18 µM of BAP and 0.28 µM of GA₃ during 3 to 5 days allowed for tissue quality improvement after excision. Furthermore, alginate supplemented with 0.004 mg·L⁻¹ of BAP and 0.04 mg·L⁻¹ of GA₃ positively enhanced the response of shoot tips during steps previous to freezing. Of importance in this study, *Solanum phureja* is highly susceptible to physical and chemical stress, and the reason why after freezing the recovery rate was only 10%.

Key words: cryopreservation, *Solanum phureja*, encapsulation-dehydration, encapsulation-vitrification, growth regulators.

Recibido: noviembre 22 de 2007
Aceptado: diciembre 7 de 2007

1. Investigadora, Programa de Recursos Genéticos Vegetales, Banco de Germoplasma *in vitro*. C.I. Tibaitatá (Mosquera, Cundinamarca). CORPOICA. e-mail: avilla@corpoica.org.co
2. Tesista de biología, Banco de Germoplasma *in vitro*. C.I. Tibaitatá (Mosquera, Cundinamarca). CORPOICA.
3. Investigador master asociado, Programa de Recursos Genéticos Vegetales, Banco de Germoplasma. C.I. Tibaitatá (Mosquera, Cundinamarca). Corpoica. e-mail: ivalbuena@corpoica.org.co
4. Investigador, Unidad de biotecnología y biodiversidad, Centro Internacional de Agricultura Tropical –CIAT–, Palmira (Valle del Cauca). e-mail: r.escobar@cgiar.org

Evaluación preliminar de técnicas de crioconservación en una accesión de *Solanum phureja*

RESUMEN

En el Centro de Investigación Tibaitatá de CORPOICA se llevan a cabo ensayos para determinar los mejores métodos de crioconservación de los materiales que integran la Colección Central Colombiana de Papa; ésta se encuentra constituida por 1.098 accesiones de las cuales 151 corresponden a *Solanum phureja* (98 conservadas *in vitro* y 53 en campo), especie que se considera estratégica por poseer genes de resistencia a *Phytophthora infestans* y por ser un importante recurso alimenticio para la población colombiana. A tal fin se evaluaron las técnicas de encapsulación-deshidratación y encapsulación-vitrificación, reportadas en la actualidad para *Solanum* spp., implementando algunos ajustes y dedicando especial atención a las etapas previas a la congelación en cuanto la selección del material vegetal y los medios de propagación, la calidad del tejido, la encapsulación de los ápices, la concentración y el tiempo de exposición a sacarosa, la deshidratación en sílica gel y el efecto de la solución cargadora y de las soluciones PVS2 y PVS4. Fue posible establecer que la calidad de explante y el medio de recuperación determinaron el éxito del proceso de crioconservación. El medio de preconditionamiento MS, suplementado con 0,18 µM BAP y 0,28 µM durante 3 a 5 días, permitió mejorar la calidad del tejido después del corte. Además, la suplementación del alginato con 0,004 mg·L⁻¹ BAP y 0,04 mg·L⁻¹ AG3, incidió positivamente en la respuesta de los ápices en las etapas previas al congelamiento. Se destaca que *S. phureja* es muy susceptible a condiciones de estrés físico y químico, razón por la cual la tasa de recuperación después del congelamiento fue de 10%.

Palabras clave: crioconservación, *Solanum phureja*, encapsulación-deshidratación, encapsulación-vitrificación, reguladores de crecimiento.

INTRODUCCIÓN

EL ORIGEN DE *SOLANUM PHUREJA* no se conoce con precisión; al parecer, el centro de origen de esta especie se encuentra en el altiplano entre Perú y Bolivia, alrededor del lago Titicaca, debido a que en esta zona se encuentra la mayor variabilidad genética de especies silvestres y variedades cultivadas de papa. *Solanum phureja* es una especie diploide (2n= 24) que se distribuye geográficamente desde el norte de Bolivia hasta el suroccidente venezolano, con un centro de diversidad ubicado en el departamento de Nariño, al sur de Colombia, y en el norte de Ecuador (Estrada, 1996). Esta especie fue domesticada hace por lo menos 10.000 años en el altiplano localizado al suroeste del Perú y el noroeste de Bolivia. No se conoce con exactitud el ancestro silvestre que originó las especies cultivadas diploides. Es posible que haya desaparecido al cruzarse con varias especies semi-cultivadas o silvestres, entre las que se mencionan *Solanum leptophyes*, *S. canasense*, *S. sparsipilum* (Hawkes, 1978b), *S. brevicaulis* y *S. vernei* (Grun, 1990).

El Centro Internacional de la Papa (CIP, perteneciente al CGIAR con sede en Lima, Perú) enfoca sus investigaciones en *S. phureja* en la identificación de los caracteres cuantitativos que contienen los genes de resistencia asociados con la enfermedad del Tizón tardío o Gota (*Phytophthora infestans*), patología con impacto económico negativo de amplia ocurrencia en las zonas paperas andinas, por lo cual es importante conservar su diversidad genética (CIP, 2001).

Otro aspecto que en la actualidad pre-ocupa es la incidencia de la erosión genética (disminución de la variabilidad genética); ésta se ha venido presentando como consecuencia de la agricultura comercial moderna que genera la pérdida de variedades tradicionales de los agricultores que se sabe poseen una diversidad elevada (FAO, 1996).

Solanum phureja pertenece a la familia *Solanaceae*, serie tuberosa. Es una planta conformada por varios tallos herbáceos con muchas ramificaciones de donde brotan flores blancas o rojas que se conservan

hasta el final del ciclo y hojas compuestas de color amarillo verdoso. El sistema radicular está conformado por raíces con ramificaciones laterales y estolones a partir de los cuales se forman los tubérculos, que son órganos de reserva de la planta. El color de los tubérculos tiene distintos matices de amarillo y, en algunos casos, presenta tintes rojos; tiene forma redonda a ovoide y 'ojos' superficiales a intermedios distribuidos por toda la superficie (Luján, 1996).

Colombia no dispone de información precisa sobre área cultivada con papa criolla. FEDEFAPA reporta que el cultivo de *Solanum phureja* ocupa entre el 10% y el 16% del área sembrada en papa común o de año. Actualmente, la papa criolla o papa amarilla se cultiva en pequeñas áreas al margen del cultivo de papa común, en surcos dentro del mismo o en huertas familiares. Los principales departamentos productores en Colombia son Cundinamarca, Boyacá, Nariño, Antioquia, Cauca, Norte de Santander y Santander (Mosquera, 1992).

La papa criolla se cultiva entre los 1.800 y los 3.200 m.s.n.m., siendo óptimas para su cultivo las alturas comprendidas entre 2.300 y 2.800 m.s.n.m., lo que equivale a un rango de temperatura promedio de 10 a 20°C. Requiere, además, una precipitación promedio de 900 mm de lluvia al año; sin embargo, el cultivo se desarrolla bien con precipitaciones superiores (Mosquera, 1992).

Bolívar y López (1985) reportan que la planta de papa 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*.

En el ámbito alimenticio, la papa criolla aporta el doble del contenido de fibra y fósforo, así como mayor cantidad de proteínas, comparada con otras variedades; de igual modo, la coloración amarilla es una característica varietal que está altamente relacionada con el contenido de carotenos, precursores de la vitamina A (Robles y Delgado, 2002).

En la actualidad se desarrollan programas de investigación en poscosecha tendientes a desarrollar empaques adecuados para el producto en fresco. Así mismo, se están estudiando alternativas de transformación aprovechando su extraordinaria calidad culinaria, su alto valor alimenticio y la gran aceptación de la papa criolla por parte del consumidor interno. En las pruebas industriales se destacan los trabajos tendientes a obtener papa a la francesa, precocida, prefrita y congelada, papa entera precocida y congelada, papa en chips, preformados y puré de papa (Robles y Delgado, 2002).

Bouahal y Dereuddre (1996) reportan que los primeros trabajos en criopreservación de la papa 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 congelamiento gradual y se evaluaron los siguientes parámetros: duración y concentración del pretratamiento en DMSO, efecto de la temperatura de congelamiento y de la tasa de descongelamiento; con el ensayo se obtuvieron rangos de sobrevivencia entre 45% y 85% en la formación de brotes, lo cual se atribuye a que los procedimientos de congelamiento fueron apropiados. (Towill, 1981).

Bajaj en 1985, evaluó la viabilidad de meristemo de *Solanum tuberosum* criopreservados por más de cuatro años, con el fin de demostrar que la duración de almacenamiento en nitrógeno líquido no

afectaba la tasa de sobrevivencia (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 *S. tuberosum*. Estos autores usaron técnicas clásicas (DMSO al 10%) y lograron determinar que son muchos los factores en las etapas de pre y poscongelamiento que intervienen en la sobrevivencia del material; así mismo, establecieron que existe una respuesta varietal relacionada con la técnica y las condiciones de luminosidad, antes y después del congelamiento, que favorecen la recuperación del material criopreservado (Benson, 1989).

Fabre y Dereuddre (1990) reportaron por primera vez la criopreservación de papa de la especie *S. phureja* a partir de meristemos apicales y mediante una metodología de encapsulación-desecación consistente en congelamiento programado y rápido, con flujo de aire estéril para la deshidratación de las cápsulas. Mediante el uso de 0,5 y 0,75 M de sacarosa en el precultivo durante 24 h y la inmersión directa en nitrógeno líquido (NL), consiguieron tasas de sobrevivencia de 7,8 y 19,6%, respectivamente; sin embargo, los ápices no se desarrollaron a brotes. En congelamiento programado mejoró la sobrevivencia a 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 se restablecieron directamente a 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 sobrevivencia.

En 1991, Harding y Benson estudiaron la recuperación de yemas en dos variedades de *S. tuberosum* cultivadas *in vitro* y criopreservadas; como en el anterior reporte, realizaron congelamiento programado y ultra rápido. La crioprotección se llevó a cabo con DMSO al 10% durante 1 hora y se pudo establecer que este método sólo es viable para congelamiento ultra rápido, 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 el congelamiento ultra rápido, empleando yemas apicales incubadas en DMSO y transferidas directamente a criotubos donde son rápidamente sumergidas en NL. En este estudio se emplearon 219 variedades con porcentajes de sobrevivencia entre 6 y 100% y un promedio de regeneración de plantas del 40%.

Golmirzaie y Panta (1996) reportan que la criopreservación de papa 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 congelamiento rápido. Se evaluaron 183 genotipos de papa; cuando se usaron explantes axilares se obtuvieron porcentajes de sobrevivencia 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 sobrevivencia entre 45 y 90% con un promedio de 67% en la formación de brotes. Dentro de los genotipos evaluados, la especie *S. phureja* mostró las tasas de sobrevivencia 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 *S. phureja* y dos de *S. tuberosum* mediante el uso de la técnica de encapsulación-deseccación, 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 Papa de Pradesha (India) reportó el empleo de la técnica de vitrificación en cinco clones de la especie *S. tuberosum*, usando una solución vitrificante de PVS2 (etilen-glicol, glicerol y DMSO) 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 papa no muestran resultados totalmente

satisfactorios, Hirai y Sakai (2000) evaluaron la técnica de encapsulación-vitrificación en la que los meristemas que se osmoprotectaron 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 sobrevivencia del 55% en la variedad de papa 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 papa en NL, tomaron una muestra de 51 variedades las cuales descongelaron y midieron la sobrevivencia de las mismas y el porcentaje de regeneración de brotes; al comparar los datos antes y después del congelamiento encontraron que no se presentaron mayores cambios en cuanto a la sobrevivencia y congelamiento de los ápices.

Desde el punto de vista de la conservación de los recursos genéticos, *Solanum phureja* es un cultivar importante en fitomejoramiento porque, como se dijo antes, posee genes de resistencia a *Phytophthora infestans*, por lo que se emplea para mejoramiento junto con especies silvestres a fin de obtener variedades comerciales con tolerancia al patógeno (CIP, 2001).

El Programa Nacional de Recursos Genéticos y Mejoramiento Vegetal de CORPOICA tiene la responsabilidad de mantener y conservar la Colección Central Colombiana de Papa, la cual cuenta con 1.098 accesiones de las subespecies *andígena* y *tuberosum* y de las especies *chaucha* y *phureja*; esta última comprende 98 accesiones conservadas *in vitro* y 53 accesiones en condiciones de campo. La colección cuenta con tres sistemas de conservación: *in vitro*, en campo y en cava fría (0–5°C y –20°C). Basada en la variabilidad genética, a nivel internacional se considera esta colección como la tercera más importante en el ámbito mundial (Moreno *et al.*, 2005). Por esta razón es necesario buscar estrategias de conservación de las accesiones

de *S. phureja* a largo plazo mediante métodos como la criopreservación, que ofrece una alternativa viable y proporciona la posibilidad de mantener una copia de seguridad de las colecciones de campo e *in vitro* por tiempo indefinido bajo parámetros que garanticen la mayor estabilidad genética de variedades ancestrales, silvestres y mejoradas (Engelman, 2000).

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección del material vegetal

El material vegetal se seleccionó a partir de la colección *in vitro* del banco de germoplasma de papa, el cual cuenta con 98 accesiones de *S. phureja*, a las que se les realizaron cinco ciclos de propagación para seleccionar una accesión de acuerdo con su comportamiento *in vitro* representado por el vigor de las plantas, su rapidez de crecimiento y la presencia de yemas apicales con óptimo estado fisiológico.

Una vez seleccionada cada accesión se realizaron otros cinco ciclos de propagación a partir de segmentos nodales cada 3 ó 4 semanas, con el fin de disponer de una fuente de yemas apicales para la ejecución de cada una de las pruebas; para ello se empleó el medio de cultivo sólido MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 1,18 µM de tiamina, 0,57 µM de AG3, 0,08 µM de sacarosa, 0,055 µM de inositol y phytigel 3% (CIP, 1997). El material se mantuvo por espacio de 3 a 4 semanas a temperatura de 18°C y un fotoperíodo de 16 horas lux (Mejía, 1988).

Medios de propagación

Se modificaron las siguientes condiciones del medio convencional de propagación de papa empleado en CORPOICA: tiamina 11,8 µM, sacarosa 0,053 M, agar Duchefa 0,45%, temperatura de 21°C, debido a que el material presentó una clorosis acentuada e hiperhidratación. Además, se evaluó la densidad de siembra según el número de explantes por frasco: 10, 20, 30 y 40 para establecer si se presenta competencia, ya que ésta puede afectar las condiciones fisiológicas de las plantas.

Adicionalmente a las modificaciones anteriores, se evaluaron 14 medios de propagación basados en la adición de

citoquininas y giberelinas y un medio convencional ajustado denominado Medio 15, con los que se esperaba mejorar la calidad del material propagado y la cantidad de yemas para el proceso de criopreservación (Tabla 1).

Calidad del tejido

Se extrajeron ápices de 1 mm a partir de plantas de tres semanas de propagación, los cuales se sembraron en cuatro medios de precondicionamiento denominados HS, CIP, CPRI y CIAT (Tabla 2) durante 21 días; se realizaron mediciones con el estereoscopio en los días 1, 3, 5, 7, 10, 15 y 21, para evaluar el crecimiento y observar la recuperación de los ápices en la etapa posterior al corte. A tal fin se realizó la extracción de los ápices con cuchilla de bisturí No. 11 para disminuir el daño en el tejido y de esta forma establecer el medio adecuado para la fase de precondicionamiento con el fin de fortalecer el tejido, es decir que se recupere del estrés sufrido durante el corte y pueda continuar en las etapas previas a la congelación con la seguridad que el material presentará viabilidad para el proceso criogénico. Las variables evaluadas fueron cuantitativas (medición de largo y ancho del ápice) y cualitativas (el vigor de los ápices); a partir de estos resultados se determinó el medio y el tiempo de precondicionamiento de los ápices.

Encapsulación de los ápices

Una vez cumplida la etapa de precondicionamiento, los ápices se colocaron en alginato de sodio al 3% suplementado con las sales de MS (Murashige y Skoog, 1962), BAP 0,18 μM y GA3 0,28 μM y suspendidos gota a gota en una solución de cloruro de calcio 100 mM para su polimerización durante 20 minutos; posteriormente se realizaron dos enjuagues con agua destilada estéril, cada uno de 10 minutos.

Concentración y tiempo de exposición a la sacarosa

Los ápices previamente extraídos, precondicionados y encapsulados, se sometieron a soluciones de sacarosa 0,3, 0,5, 0,75 y 1M, durante 24, 48 y 72 horas, a excepción de la concentración 1M que fue evaluada a 24 y 48 horas en agitación (80 r.p.m). A continuación las cápsulas se cultivaron en medio CIP (1997) medio de recuperación

empleado hasta ese momento y la evaluación se realizó 15 días después del cultivo. Las variables evaluadas fueron: formación de brotes, presencia de callo y sobrevivencia o mortalidad de los explantes. A partir de estos resultados se seleccionaron las mejores concentraciones y tiempos de exposición a la sacarosa para seguir el procedimiento de deshidratación en sílica gel correspondiente a la metodología de encapsulación-deshidratación.

Deshidratación en sílica gel

Para el ensayo de deshidratación se emplearon frascos de vidrio con 50 g de sílica gel en los que se introdujeron 20 cápsulas. Los tratamientos evaluados fueron: sacarosa 0,3M y 0,5M, con 48 y 72 h de exposición y tiempos de secado en sílica gel de 8, 12 y 16 horas. Una vez cumplidos los tiempos de exposición, los ápices se cultivaron en

medio R3 usado en el protocolo de criopreservación de yuca del CIAT (Manrique, 2000) durante tres días y después se subcultivaron en medio No. 2 bajo condiciones de oscuridad durante las primeras dos semanas y después en penumbra progresiva durante cuatro semanas. La evaluación se efectuó después de tres semanas; en este caso las variables evaluadas fueron: formación de brotes, callos y mortalidad, para la metodología de encapsulación-deshidratación.

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

Según el protocolo de encapsulación-vitrificación (Hirai y Sakai, 2000), se procedió a evaluar los efectos del glicerol en la solución cargadora (compuesta por diferentes concentraciones de glicerol y sacarosa); ésta deshidrata el tejido per-

Tabla 1. Medios de cultivo probados para la propagación de material *in vitro* de *S. phureja*.

Componente Tratamientos*	BAP (μM)	KIN (μM)	TDZ (μM)	ANA (μM)	AG3 (μM)
1	0,18				0,14
2	0,18				0,28
3	0,18				1,4
4	0,18				2,8
5			0,11		0,14
6			0,11		0,28
7			0,11		1,4
8			0,11		2,8
9		2,3			0,14
10		2,3			0,28
11		2,3			1,4
12		2,3			2,8
13	2,2				1,4
14	0,18			0,11	0,14
15 (control)					0,28

* Para todos los tratamientos se usaron las mismas condiciones de: sales M&S, sacarosa 0,053 M, inositol 0,055 mM, tiamina 11,8 μM , agar Duchefa 0,45% y pH: 5,7. BAP: bencilaminopurina; KIN: Kinetina; TDZ: tidiazurón; ANA: ácido naftalenacético; AG3: ácido giberélico.

Tabla 2. Composición de los medios de precondicionamiento utilizados para los ápices de *S. phureja*.

Tratamiento Componente	HS*	CIP*	CPRI*	CIAT*
BAP (μM)	0,045			0,18
KIN (μM)		0,18		
AIA (μM)		2,85		
ANA (μM)	0,0055			
AG3 (μM)	2,8	0,56	8,7	0,28
Sacarosa(M)	0,08	0,08	0,08	0,053
pH	5,7	5,7	5,7	5,7

* Para todos medios se usaron las mismas condiciones de: sales M&S, inositol 0,055 mM, tiamina 11,8 μM , agar Duchefa 0,45 % y pH: 5,7.

mitiendo preparar los ápices para las etapas previas al congelamiento en nitrógeno líquido; el procedimiento se realiza tomando cápsulas pretratadas en sacarosa (0,3 – 1M), las cuales se someten a la solución cargadora con sacarosa de 0,3 – 0,5 M durante 48 y 72h, glicerol 0,5, 1,0, 1,5 y 2M. Las condiciones del subcultivo y las variables evaluadas fueron iguales a las descritas en el numeral anterior.

De acuerdo con el protocolo, una vez el material es sometido a la solución cargadora el siguiente paso es exponer a la solución vitrificante PVS2 durante dos horas; como alternativa se realizó un ensayo similar empleando la solución vitrificante PVS4 (Hirai y Sakai, 2000). Adicionalmente, se evaluaron estas dos soluciones de forma diluida al 20%, 60% y 100%, de acuerdo al protocolo propuesto por Debabrata y Prakash (1998).

Posteriormente a la exposición de los ápices en las soluciones, la mitad de éstos se lavaron dos veces con solución de sacarosa 1,2 M durante 10 minutos y se emplearon de igual forma las condiciones de subcultivo como control, mientras la otra mitad se llevó a inmersión directa en nitrógeno líquido. La evaluación se realizó a las cuatro semanas respecto de las variables ya mencionadas.

Diseño experimental

Se realizaron observaciones preliminares con relación al comportamiento del medio de propagación, la calidad de tejido y la encapsulación de los ápices; el objetivo de estas observaciones permitió tener un criterio de selección desde el punto de vista fisiológico y de calidad de la yema apical, antes de emplear las técnicas de pre-congelamiento. Para los ensayos de secado en sílica gel la solución cargadora y PVS se empleó un diseño experimental completamente al azar, con dos repeticiones por tratamiento, cada repetición estuvo conformada por cinco unidades experimentales y cada unidad experimental estaba representada por una yema apical. Las variables evaluadas fueron: porcentaje de brotación de los ápices y porcentaje de formación de callos; estas variables fueron sometidas al análisis de varianza y pruebas de separación de medias. Los datos fueron analizados por medio del programa SAS versión 4.0®.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Selección del material vegetal

Después de cinco subcultivos, la accesión que mejor comportamiento mostró fue *S. phureja* 100 debido a que las plántulas presentaron uniformidad en tamaño y vigor. Este material fue sometido a cinco ciclos de propagación más para incrementar la cantidad de plántulas hasta lograr aproximadamente 500 para ser usadas como fuente de ápices meristemáticos durante el proceso de congelación. Este resultado concuerda con el trabajo reportado por Golmirzaie y Panta, (1996), quienes recomiendan realizar varios subcultivos para incrementar el vigor de las plántulas antes del congelamiento.

Aunque *S. phureja* 100 presentó las mejores condiciones de vigor frente a las demás accesiones; después de varios ciclos de propagación se observaron síntomas de hiperhidratación, formación de callos en la base, alteraciones en su coloración y clorosis. Estos problemas fueron superados con las modificaciones hechas al medio de propagación basadas en una adición de 11,8 µM de tiamina, 0,053 M de sacarosa y agar Duchefa al 0,45 %.

Medios de propagación

Se determinó que el Medio No. 2, compuesto por 0,18 µM BAP y 0,28 µM AG3 (ver Tabla 1) mostró una buena proliferación de brotes axilares, con disminución de la dominancia apical y buen vigor de las plantas sin anomalías. Por esta razón, se empleó este medio para las fases de precondicionamiento de ápices y para el subcultivo. El objetivo de probar los 14 medios era buscar el medio más apropiado para mejorar la tasa de propagación, asegurar la calidad del tejido y determinar la respuesta con diferentes concentraciones de citoquininas y gibberelinas. En el proceso de propagación de *S. phureja* cuando los medios contienen BAP (en combinación con AG3 en concentraciones superiores a 0,28 µM), kinetina y TDZ (ver Tabla 1) inducen en los tallos y hojas formación de callo; así mismo, las yemas apicales y axilares presentaron un tamaño muy reducido y poca elongación de los tallos, determinando así que los medios con estas citoquininas no ofrecen una respuesta satisfactoria para la propa-

gación de papa, por lo cual en el proceso de propagación se siguió empleando el medio número 15 (control), suplementado con 0,28 µM de AG3 que se emplea rutinariamente en propagación de papa.

Calidad del tejido

Se determinó evaluar el efecto de los medios de precondicionamiento con el fin de recuperar el ápice del estrés ocasionado por el corte y estimular la actividad y producción mitótica sobre la tasa de crecimiento de los ápices en los primeros 20 días de cultivo.

En los medios CIP, CPRI y HS utilizados en las etapas previas al congelamiento en cada una de las metodologías de criopreservación reportadas para papa, se constató una respuesta indeseable en los ápices (clorosis, elongación excesiva de hojas y necrosis del tejido) (Figura 1); esto puede deberse a la concentración de AG3 empleada en cada uno de los medios (CIP: 0,56µM, CPRI: 8,7 µM, HS: 2,8 µM) con relación a la empleada en el Medio No. 2 (0,28 µM). Cuando se emplean cantidades elevadas de AG3 en algunas especies vegetales, el material suele presentar la respuesta mencionada; en el caso de la papa, concentraciones superiores a 0,28 µM de AG3 pueden afectar la condición fisiológica del tejido. Por esta razón se seleccionó el Medio No. 2 (CIAT) como medio de precondicionamiento porque hubo una buena respuesta: los ápices mejoraron su calidad en cuanto a su color, vigor y diferenciación. Esto puede atribuirse a la composición del medio (ver Tabla 2) en donde las dimensiones en promedio (largo y ancho) que alcanzaron los explantes a los 21 días de evaluación fueron las mayores: 1,15 y 3,05 mm (Figura 1), de tal forma que este medio de cultivo fortalece el tejido preparándolo para la criopreservación.

Además, se determinó que el tiempo ideal para el precondicionamiento de los ápices (tiempo en el cual el tejido se recupera después del corte) estuvo entre 3 y 5 días, tiempo en el que se logró un crecimiento moderado pero estable; esta última condición garantizó la obtención de ápices homogéneos, con características morfológicas favorables como tejidos vigorosos, que es un parámetro importante para emprender las técnicas de criopreservación (Figuras 1 y 2).

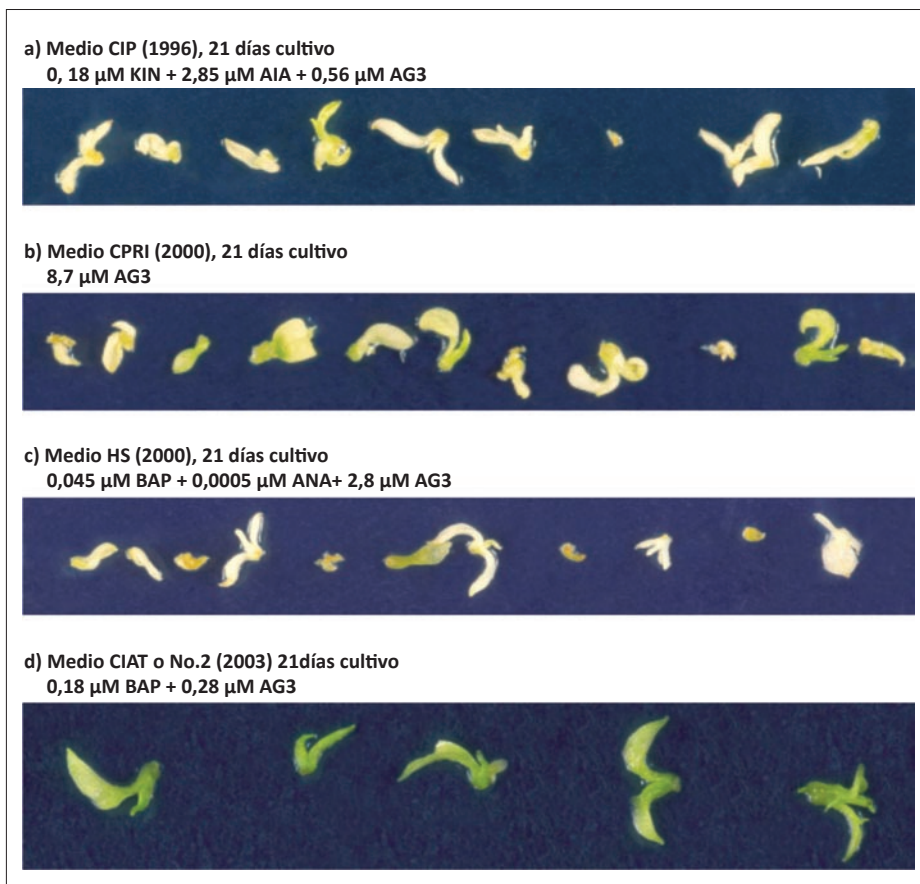


Figura 1. Calidad del tejido. Las figuras muestran la respuesta de las yemas apicales de *S. phureja* a cada uno de los medios de precondicionamiento probados: a) CIP: excesiva elongación de las hojas y clorosis; b) CPRI: respuesta similar al medio CIP; c) HS: presencia de clorosis y necrosis; d) No. 2 o CIAT: medio seleccionado para precondicionamiento y subcultivo.

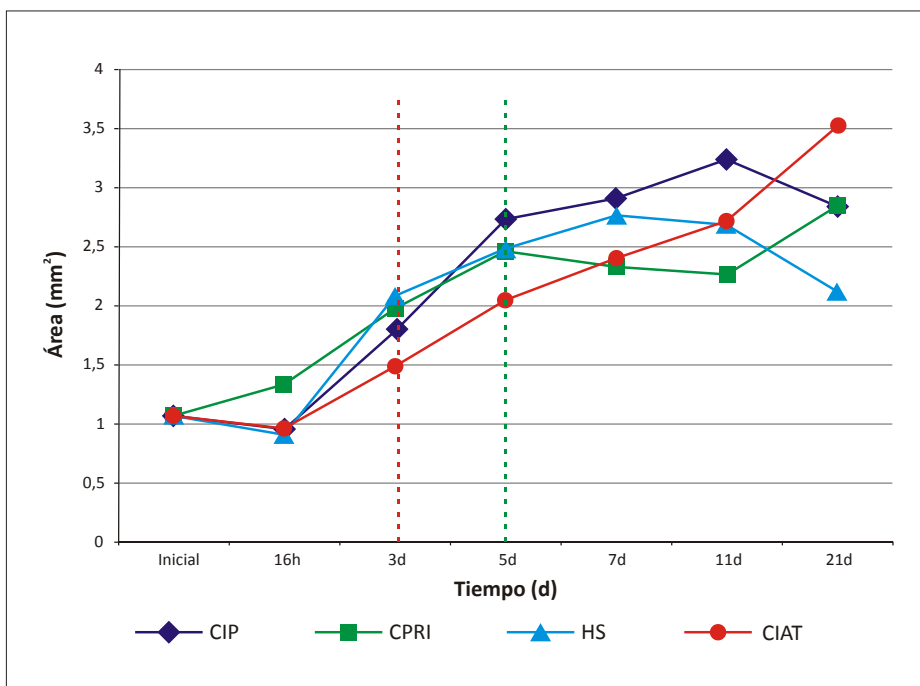


Figura 2. Efecto del medio de precondicionamiento sobre el crecimiento de los ápices.

Los resultados del medio de precondicionamiento para este caso coinciden con los reportados en yuca por Escobar *et al.*, (1997) quienes realizaron la etapa de precondicionamiento después de la extracción y siembra de los ápices durante tres días en un medio de propagación con el fin de obtener un alto número de células meristemáticas, reducción en el tamaño de las vacuolas e incremento en la densidad del protoplasma del explante. Los parámetros que se tomaron en cuenta fueron las observaciones cualitativas que expresan el vigor del ápice el cual debe tener un crecimiento normal y una coloración verde.

Efecto de la concentración y tiempo de exposición a la sacarosa

Se pudo establecer que *S. phureja* no tolera concentraciones altas ni tiempos prolongados de exposición a la sacarosa; en efecto, los ápices mostraron un mejor desarrollo en los tratamientos de 0,3 M por 48 h y 0,5 M por 72 h, dando como resultado una mayor tasa de formación de brotes (35% y 20% respectivamente) (Figura 3); así mismo, exhibieron mayor uniformidad en el desarrollo y mejor calidad del tejido. En concentraciones superiores a 0,5 M se presentó disminución del porcentaje de formación de brotes (solamente 15%) con un crecimiento lento y proliferación de callos (Figura 3), lo que posiblemente se relaciona con el efecto osmótico de la sacarosa a nivel celular. En el tratamiento 1 M de sacarosa, los ápices presentaron coloraciones rojizas y marrón debido a producción de antocianinas, y, finalmente, necrosis del tejido hasta llegar a su muerte; además, no se presentó ningún tipo de crecimiento, por lo cual se podría decir que bajo esta condición hay una alta selección. Fabre y Dereuddre (1990) encontraron en experimentos preliminares que concentraciones altas de sacarosa (superiores a 1 M) deshidratan los ápices afectando drásticamente su viabilidad y no permiten su sobrevivencia después de la congelación en NL. Sin embargo, Bouahal y Dereuddre (1996) encontraron que una concentración de sacarosa 1 M por 48 h no afecta la sobrevivencia de los ápices. Así, se sugiere que *S. phureja* puede presentar una respuesta varietal con los tratamientos aplicados, ya que esta accesión muestra un alto grado de selección cuando se aumenta la concentración de sacarosa (0,3 – 1 M).

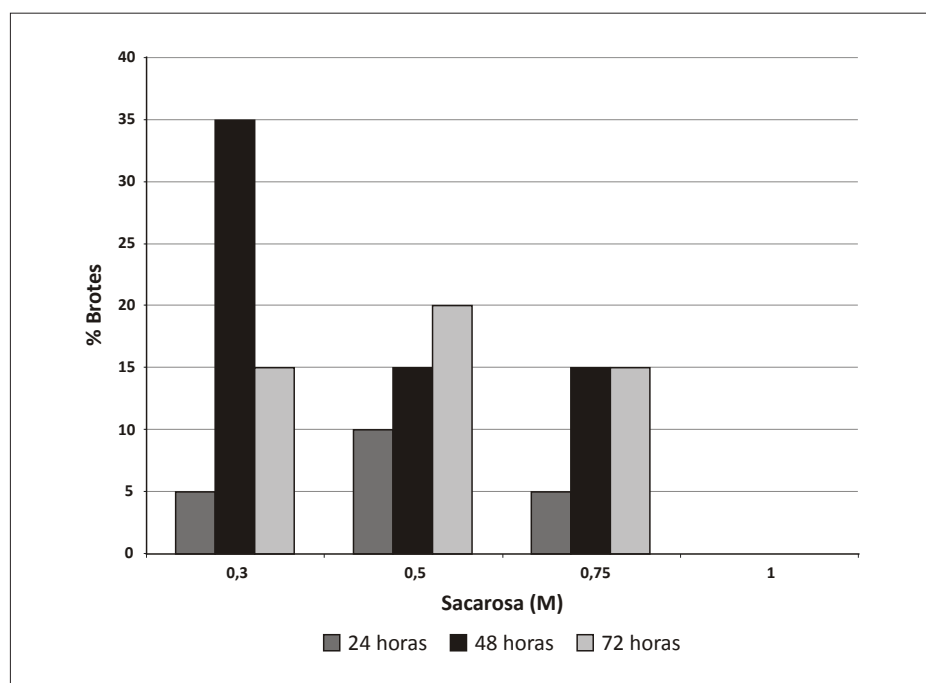


Figura 3. Efecto de la concentración y el tiempo de exposición a la sacarosa sobre el porcentaje de brotes obtenidos.

Tabla 3. Efecto de los tiempos de secado en sílica gel y de los pretratamientos con sacarosa en la respuesta de ápices encapsulados sin congelar de *S. phureja* 100.

Tratamiento	Tiempo de secado (H)	% Brote	% Brote/ Callo	% Callo	% Mortalidad
Control (encapsulación)		90	10	0	0
Control (Sacarosa 0,3 M por 48 h)		80	15	0	5
Control (Sacarosa 0,5 M por 72 h)		75	15	10	0
0,3 M por 48 h	8	65	15	10	10
	12	75	5	5	15
	16	5	0	0	95
0,5 M por 72 h	8	60	15	15	10
	12	50	15	5	30
	16	10	0	5	85

Tabla 4. Efecto del tiempo de secado en sílica gel sobre ápices no congelados de *Solanum phureja* 100 para la variable porcentaje de brotes.

Tiempos de exposición	Promedio brotes viables	Comparación de promedios (Duncan)
8	62.5	a
12	62.5	a
16	7.5	b

Nivel de significancia 5%; promedios con la misma letra no difieren significativamente.

Sakai y Hirai (2000) reportaron que meristemas de papa precultivados con solución de 0,3 M de sacarosa por 16 horas de exposición presentaron buena osmoprotección antes de someterlos a

las soluciones de glicerol y PVS2; esto se corrobora en esta investigación, pues de acuerdo con la Figura 1 el mayor porcentaje de brotes ocurrió a la concentración de 0,3 M de sacarosa.

Encapsulación-deshidratación en sílica gel

De acuerdo a los resultados anteriores, las yemas axilares encapsuladas en alginato de sodio suplementado con las sales MS + BAP 0,18 μ M + AG3 0,28 μ M permitió una mejor respuesta, ya que las cápsulas formadas contienen los nutrientes necesarios para que los yemas se recuperen después del estrés sufrido en las etapas pre y postcongelación. El material vegetal pretratado en las soluciones de sacarosa (0,3 M por 48 h y 0,5 M por 72 h) obtuvo un porcentaje de formación de brotes del 80% y 75% respectivamente, comparado con el control que llegó al 90%. El porcentaje de formación de callos fue inferior a 15% (Tabla 3). Lo anterior indica que el material se mantiene en buen estado en la etapa de secado.

Para las yemas encapsuladas que continuaron con la desecación en sílica gel, de acuerdo con la prueba de comparación de promedios (Duncan), los tiempos de desecación de 8 y 12 horas obtuvieron los promedios más altos de porcentaje de formación de brotes, ambos con 62,5% (Tabla 4), lo cual indica que la respuesta es proporcional al tiempo de secado. En el menor tiempo evaluado (8 h) se halló una alta viabilidad reflejada en una gran formación de brotes, mientras que en el secado por 16 h se encontró la respuesta más baja y, por consiguiente, la mayor mortalidad. El único reporte sobre esta metodología para la especie papa ha sido de Bouahal y Dereuddre (1996) en el que se encontraron tasas de sobrevivencia del 60 % en un tiempo de secado de 4,5 h y el uso de una concentración de sacarosa 1 M por 48 h, a diferencia de los resultados obtenidos en esta investigación en donde las concentraciones fueron muy bajas (0,3 y 0,5 M) con tiempos de exposición más prolongados (48 y 72 h) y con tiempos de secado en sílica gel de 8 y 12 horas; el porcentaje de formación de brotes que se obtuvieron concuerda con lo citado por estos autores.

La variedad *S. phureja* se mostró muy sensible a la desecación y ello fue evidente en los ensayos realizados durante el tiempo de secado, pues se desarrollaron zonas necróticas en los ápices, si bien algunos de ellos regeneraron brotes. Otros presentaron zonas blancas que progresaron hasta la formación de callos. Estos resultados

sugieren que *Solanum phureja* 100 presenta susceptibilidad al secado ante tiempos de exposición superiores a 8 h.

Los resultados para la fase de secado sin congelación fueron favorables, ya que en los tiempos de exposición de 8 y 12 h no se presentaron diferencias significativas en cuanto a la formación de brotes. Al congelar el material después del secado (8 a 16 h) no se presentó sobrevivencia (ni brotes, ni callos), lo cual se atribuye a que ocurre un proceso de selección inicial durante el secado. Podría pensarse que el proceso de secado fue excesivo o, por el contrario, insuficiente; en el último caso, el tejido presenta exceso de agua al congelar la cual forma cristales de hielo que rompen la membrana celular causando plasmólisis y ello ocasiona que no se presente el desarrollo de brotes. Así mismo, una exposición prolongada puede incrementar la desecación del tejido al punto de afectar su viabilidad.

Encapsulación-vitrificación

Efecto de la solución cargadora. En la técnica de encapsulamiento-vitrificación, el glicerol contenido en la solución cargadora tiene un efecto fundamental sobre los tejidos, ya que de este compuesto depende que el explante desarrolle una abundante formación de callos o diferenciación de brotes. Los resultados mostraron un comportamiento inversamente proporcional en cuanto al comportamiento de las variables 'número de brotes' y 'número de callos': a bajas concentraciones de glicerol (0,5 M) el promedio de número de brotes alcanzado fue de 10, comparado con la formación de callos que sólo presentó un número en promedio de 0,7 (Tabla 5), mientras a concentraciones altas de glicerol (2,0 M) el número de brotes formados fue solamente de 4,5, mientras el número de callos formados fue el más alto (2,34) (Tabla 5).

Nishizawa (1993) reportó el uso de una solución cargadora con 2,0 M de glicerol más 0,4 M de sacarosa, la cual mejoró la tasa de sobrevivencia en 87% en suspensiones celulares de *Asparagus officinalis*; Por su parte, Matsumoto (1995), en un trabajo de vitrificación en lirio, reportó el efecto de una solución vitrificante con 0,8 M sacarosa más 1,0 M de glicerol con la cual obtuvo una sobrevivencia de 89,5%. Estos resultados no concuerdan con los obteni-

Tabla 5. Efecto de la concentración de glicerol en la solución cargadora sobre ápices no congelados de *S. phureja* 100, para las variables 'número de brotes' y 'número de callos'.

Tratamiento	No. de brotes	No. de callos
S. 0,3 M x 48 h + 0,5 M glicerol	10 a	0,70 b
S. 0,5 M x 72 h + 0,5 M glicerol	9 ab	0,96 b
S. 0,3 M x 48 h + 1,5 M glicerol	8,5 ab	1,40 ab
S. 0,3 M x 48 h + 1,0 M glicerol	8,0 ab	0,70 b
S. 0,5 M x 72 h + 1,0 M glicerol	8,0 ab	1,41 ab
S. 0,5 M x 72 h + 1,5 M glicerol	7,0 ab	1,72 ab
S. 0,3 M x 48 h + 2,0 M glicerol	5,5 ab	1,99 ab
S. 0,5 M x 72 h + 2,0 M glycerol	4,5 b	2,34 a

Nivel de significancia 5%; promedios con la misma letra no difieren significativamente; datos transformados $\sqrt{x} + 0,5$

Tabla 6. Efecto de las soluciones PVS2 y PVS4 sobre ápices no congelados de *S. phureja* 100 sobre el porcentaje de brotes.

Tratamiento	% Brotes	% Callos
15: Sac. 0,3M x 48h + 2M glicerol (Control)	55% a	30% d
16: Sac. 0,3M x 48h + PVS2 diluída	45% a	55% c
26: Sac. 0,5M x 48h + PVS2 100%	20% b	70% bc
20: Sac. 0,3M x 48h + PVS4 diluída	0% b	80% abc
18: Sac. 0,3M x 48h + PVS2 100%	0% b	70% bc
28: Sac. 0,5M x 48h + PVS4 100%	0% b	100% a
30: Sac. 0,5M x 48h + PVS4 diluída	0% b	85% ab

Nivel de significancia 5%; promedios con la misma letra no difieren significativamente.

dos en esta investigación posiblemente porque estos reportes hacen referencia a especies diferentes, pues *S. phureja* parece ser susceptible a concentraciones altas de glicerol, lo que indica que la solución cargadora pudo tener un efecto tóxico para el tejido y generar efectos no deseables (formación de callo).

Sakai y Hirai (2000) evaluaron una técnica de encapsulación-vitrificación en papa, en la cual los meristemas se osmo-protegieron con una mezcla de 2 M de glicerol y 0,6 M de sacarosa por 90 min antes de la deshidratación con PVS2 y sin congelación; con dicho procedimiento 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%.

Efecto de las soluciones vitrificantes. Las soluciones PVS2 y PVS4 mostraron diferencias significativas entre tratamientos para las variables 'porcentaje de brotes' y 'porcentaje de callos'; de acuerdo con la prueba de comparación de promedios, el mejor porcentaje de brotes lo obtuvo el tratamiento 16 (sacarosa 0,3 M por 48 h y PVS2 diluída) con un promedio de 45%

(Tabla 6). Este resultado sugiere posteriores trabajos encaminados a continuar con la evaluación de soluciones diluídas, pues al parecer *S. phureja* 100 tiene poca tolerancia a soluciones concentradas, que pueden resultar tóxicas al tejido. Este hecho se puede corroborar con lo obtenido en el tratamiento 18 (Sacarosa 0,3 M X 48h y PVS2 100%), frente a los demás tratamientos con los que se encuentran diferencias significativas debido a que predominó la formación de callos y no hubo respuesta para la variable porcentaje de brotes (Tabla 6).

Además, el tratamiento 16 respecto al control (sacarosa 0,3 M por 48 h + 2 M de glicerol) no presentó diferencias significativas, lo que podría indicar que el tratamiento evaluado con PVS2 diluída resulta favorable para el tejido en cuanto a la formación de brotes. En el Instituto Central de Investigaciones en Papa de Pradesh India, los investigadores Debabrata y Prakash (1998) reportaron la aplicación de solución vitrificante PVS2 al 20, 60 y 100% en cinco clones de la especie *S. tuberosum*, con la que obtuvieron un promedio de recuperación del 54% en cuanto a brotes; este reporte concuerda con los resultados

de la presente investigación en la que el porcentaje de formación de brotes para la especie *S. phureja* fue del 45% antes del congelamiento. En este ensayo se encontró que los ápices que habían sido tratados con sacarosa 0,3 M por 48 h y PVS2 diluida (tratamiento 16) sobrevivieron al congelamiento en NL mostrando regeneración de brotes directa. Este resultado se puede atribuir a dos factores: 1) a la aplicación paulatina de la solución diluida PVS2 al material vegetal en las concentraciones de, primero, 20%, después al 60% y 100% respectivamente, lo que permite que la toxicidad de la solución vaya de menor a mayor y pueda el tejido adaptarse para lograr una deshidratación adecuada; 2) al subcultivo hecho al Medio No. 2 (CIAT) el cual favorece la recuperación del tejido después del proceso de estrés al que son sometidos los ápices; esto indica que *S. phureja* 100 puede ser criopreservada con éxito, pese a que la recuperación de las yemas después del congelamiento fue sólo del 10%.

Ariana *et al.* (2002), utilizando la técnica de vitrificación desarrollada por Steponkus (1992) y modificada por el CIP (1995), obtuvieron una sobrevivencia del 16,7% en dos variedades andinas de papa, resultados que concuerdan con el porcentaje de regeneración de brotes de 10% que se consiguió por la misma técnica. Aunque estos resultados son discretos, podría pensarse que las técnicas de vitrificación para la especie papa ofrecen la posibilidad de seguir investigando porque pueden representar una alternativa para conservar materiales de propagación vegetativa.

Sakai (1990), en un trabajo de vitrificación para *Citrus*, demostró que el uso de soluciones PVS2 a diferentes concentraciones mejora la tasa de sobrevivencia, la cual pueden llegar al rango de 65,4 a 83,5%. Hirai y Sakai (2000) implementaron la metodología de encapsulación-vitrificación para *S. tuberosum* empleando una solución de cargado que contiene 0,6 M de sacarosa más 2 M de glicerol y PVS2 al 100% por 2 h, con la que obtuvieron un porcentaje de brotes del 70%. Así mismo, Sakai (1990) propuso una nueva solución PVS4 en la que aumentan las concentraciones de glicerol, etilenglicol y sacarosa, suprimiendo el DMSO, con la que se ha encontrado la misma respuesta de recuperación comparada con PVS2. Al respecto, Takagi (1997) evaluó en taro (*Colocasia*

esculenta), diferentes tiempos de exposición a PVS2 y soluciones cargadoras con el fin de aumentar la tasa de sobrevivencia después del congelamiento. Se logró establecer que la solución de cargado óptima compuesta de 2 M de glicerol más 0,4 M de sacarosa a 25°C durante 20 min, seguida por una deshidratación con la solución PVS2 por diez minutos a 25°C, obtuvo tasas de sobrevivencia entre 66 y 77%, indicando baja toxicidad.

Zhao *et al.* (2005) expusieron yemas axilares de papa de las variedades Atlantic y Superior a una solución 2,0 M de glicerol con 0,6 M de sacarosa por un tiempo de exposición de 40 minutos, obteniendo una sobrevivencia del 51,5% (Atlantic) y 11,7% (Superior) lo que señala una posible diferencia varietal en la misma especie. Es probable que *S. phureja* 100 tenga una baja respuesta, pero dentro de la especie pueden existir accesiones que respondan mejor al proceso criogénico. Esto se puede demostrar con los trabajos de criopreservación que adelanta el CIAT en criopreservación de yuca, en donde han clasificado el material vegetal de acuerdo con la respuestas al procedimiento; esta clasificación es importante para poder realizar ajustes al protocolo para casos específicos, lo que les ha permitido lograr establecer la *core collection*.

Hirai y Sakai (2003) usando la técnica de encapsulamiento-vitrificación para yemas de batata observó un desarrollo normal de tallos y raíces en 21 días sin anomalía morfológica, con una sobrevivencia del 80%. Las yemas antes del congelamiento se sometieron a un pre-cultivo con 0,3 M de sacarosa por 16 horas, seguido con una solución mixta de 2,0 M de glicerol y 1,6 M de sacarosa por 3 horas y finalmente con una deshidratación con concentraciones altas de solución vitrificante PVS2 por una hora de exposición.

CONCLUSIONES

La propagación de *Solanum phureja* para criopreservación requiere de un medio de cultivo que promueva el vigor de las plantas antes que la elongación.

El medio de cultivo apto para la propagación de *S. phureja* fue el suplementado con AG3 0,28 µM, sacarosa 0,053 M, ino-

sitol 0,055 mM y tiamina 11,8 µM, correspondiente a la modificación realizada al medio convencional de propagación para papa (medio 15).

Implementando la fase de precondicionamiento disminuye el riesgo de incluir ápices que tengan daño mecánico causado durante el corte, antes de iniciar el proceso de criopreservación.

El vigorizar el tejido durante 3 a 5 días antes de la etapa de congelación resultó favorable para el restablecimiento post-congelación.

El alginato suplementado con BAP 0,18 µM y AG3 0,28 µM permitió obtener una mejor respuesta de los ápices.

Solanum phureja mostró sensibilidad a altas concentraciones de sacarosa, las concentraciones 0,3 y 0,5 M durante 48 y 72 h, respectivamente, mostraron los mejores resultados.

Probablemente la deshidratación en sílica gel induce estrés previamente a la congelación que no favorece la formación de brotes post-congelación.

La formación de callo indica que las concentraciones y tiempos de exposición a las soluciones de cargado, PVS2 y PVS4, todavía alcanzan un grado de toxicidad que puede estar afectando la respuesta de los ápices.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- Ariana, D., A.M. Clausen y S. Rigatto y G. Monterubbiansi. 2002. Criopreservación de variedades andinas de papa (*Solanum tuberosum* ssp. *andigena*). INTA. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. En: <http://www.inta.gov.ar/balcarce/info/documentos/posters/30/Clausen.htm>; consulta: julio 2007.
- Benson, E. 1989. Variation in recovery of cryopreserved of shoot tips of *S. tuberosum* exposed to different pre and post freeze light regimes. *CryoLetters* 10: 323-344.
- Bolívar, R. y G. López. 1985. Genética de la papa y su mejoramiento. En: *Memorias Cuarto Curso de Actualización de Conocimiento del Cultivo de Papa*. Bogotá. pp. 1-5.
- Bouahal, S. y J. Dereuddre. 1996. Cryopreservation of potato shoot tips by encapsulation-dehydration. *Potato Res.* 39: 69-78.

- CIP - Centro Internacional de la Papa. 1997. Producción de tubérculos - semillas de papa. Manual de capacitación. CIP. Lima Perú. Fascículo 4-1. 10 p.
- CIP - Centro Internacional de la Papa. 2001. Andean roots and tuber crops –ARTC–. Genetic resources conservation. En: <http://www.cipotato.org/artc/germplasm.asp>
- Debabrata, S. y S.N. Prakash. 1998. Cryopreservation of shoot tips of tetraploid potato (*Solanum tuberosum*L.) clones by vitrification. *Ann. Botany*. 82: 455-461.
- Engelman, F. 2000. Crioconservación: principios y práctica. Memorias del curso Técnicas de Crioconservación para Plantas Tropicales: Nuevas opciones para la conservación del germoplasma vegetal. CATIE. Costa Rica. Junio de 2000. pp. 1, 14, 18.
- Escobar, R., G. Maffla y W.M. Roca. 1997. A methodology for recovering cassava plants from shoot tips maintained in liquid nitrogen. *Plant Cell Rep* 16: 474-478.
- Estrada, N. 2000. La biodiversidad en el mejoramiento genético de la papa. Proinpa/CID/CIP, La Paz (Bolivia). 372 p.
- Estrada, N. 1996. Los recursos genéticos en el mejoramiento de la papa en los países andinos. En: Papas colombianas con el mejor entorno ambiental. Serie Agronomía 2010. Bogotá, Editorial Comunicaciones y Asociados Ltda. pp. 1-14.
- Fabre, J. y J. Dereuddre. 1990. Encapsulation-dehydration: A new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot tips. *CryoLetters* 11: 413-426.
- FAO. 1996. Estado de la diversidad. En: Informe sobre el estado de los recursos fitogenéticos en el mundo. FAO, Roma. En: <http://www.fao.org/FOCUS/S/96/06/more/report-s.htm>; consulta: enero 2007.
- 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.
- Grun, P. 1990. The evolution of cultivated potatoes. *Econ Bot* 44: 39-55.
- Harding, K. y E. Benson. 1991. The effect of pre-freeze *in vitro* culture period on the recovery of cryopreserved shoot tips of *Solanum tuberosum*. *CryoLetters* 12: 17-22.
- Hawkes, J.G. 1978. Byosystematics of the potato. En: Harris, P.M. (ed). The potato crop. London. pp. 15-69.
- Hirai, D. y A. Sakai. 2000. Cryopreservation of *in vitro* grown meristems of potato (*S. tuberosum*) by encapsulation- vitrification. En: Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application. IPGRI. Roma. Italia. pp. 205-211.
- Hirai, D. y A. Sakai. 2003. Simplified cyioconservation of sweet potato *Ipomea batatas* L.lam by optimizing conditions for osmoprotection. *Plant Cell Rep* 21(10): 961-966.
- Luján, C.L. 1996. Historia de la papa. Papa. Bogotá 16: 4-27.
- Manrique, N. 2000. Respuesta varietal de 95 genotipos de la colección núcleo de yuca *Manihot esculenta* Crantz a la crioconservación usando la técnica de encapsulación-deshidratación. Palmira (Valle del Cauca). Trabajo de grado (Agronomía), Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias. p. 23.
- Matsumoto, T. 1995. An approach to enhance dehydration tolerance of alginate-coatd meristems caged to -196°C . *CryoLetters* 16: 299-306.
- Mejía, R. 1988. Cultivo *in vitro* de las plantas de papa. En: Manual de laboratorio. INIAA. Chile. Año 1(1): 77.
- Mix-Wagner, G., H.M. Schumacher y R.J. Cross. 2003. Recovery of potato apices after several years of storage in liquid nitrogen. *CryoLetter* 24(1): 33-41.
- Moreno, J.D., M.S. Cerón e I. Valbuena. 2005. Informe Técnico Bancos de Germoplasma Vegetal: Colección Central Colombiana de Papa. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria -CORPOICA-, C.I. Tibaitatá. 14p.
- Mosquera, C.J. 1992. La modesta 'papa criolla'. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Bogotá. 40 p.
- Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Nishizawa, S., A. Sakai, Y. Amano y T. Matsuzawa. 1993. Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification. *Plant Science*. 91: 67-73.
- Shafer, A., E. Muller y G. Mix-Wagner. 1996. Cryopreservation: an alternative for the long-term storage of old potato varieties. *Potato Res* 39: 507-513.
- Sakai, A. 1990. Cryopreservartion of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb var. *Brasilensis* Tanaka) by vitrification. En: *Plant Cell Reports*. No 9. P. 30-33.
- Sakai, A y D. Hirai, 2000. Development of cryopreservation techniques. En: Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research, progress and application. IPGRI. Roma. Italia. pp.2.
- Steponkus, P.L., R. Langis y S. Fujikawa. 1992. Cryopreservation of plant tissues by vitrification. p. 1-61. En: P.L. Steponkus (ed.) *Advances in low-temperature biology*. Vol. 1. JAI Press, London.
- Robles, H. y C. Delgado. 2002. Informe: Investigación y transferencia de tecnología sobre calidad de almidones, azúcares y valoración energética de materiales de papa. Programa Nacional de Maquinaria Agrícola y Postcosecha. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria –CORPOICA-, Bogotá, pp. 9.
- Takagi, H. 1997. Cryopreservation of *in vitro* grow shoot tips of taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schoot) by vitrification. *Plant Cell Rep* 16(9): 594-599.
- Towill, L.E. 1981. *Solanum tuberosum*: A model for studying . The cryobiology of shoot-tips in the tuber-bearing *Solanum* species. *Plant Sci. Lett.* 6: 315-324.
- Zhao, M.A., Y.Z. Xhu, S.P. Dhital, D.M. Khu y Y.S. Song. 2005. An efficient cyiopreservation procedure for potato (*Solanum tuberosum* L) utilizing the new ice blocking agent supercool X1000. *Plant Cell Rep* 27(6): 477-481.