

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA  
ESCUELA DE BIOLOGÍA  
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

**ENCAPSULAMIENTO DE MERISTEMAS DE PAPA (*SOLANUM TUBEROSUM*) PARA  
LA CRIOCONSERVACIÓN Y LA PROPAGACIÓN EN INVERNADERO**

INFORME DE PRÁCTICA DE ESPECIALIDAD PARA OPTAR POR EL GRADO DE BACHILLER EN  
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

JOSE ALBERTO NAVARRO UREÑA

CARTAGO, 2002

La naturaleza está constituida de tal manera que es experimentalmente imposible determinar sus movimientos absolutos.

Albert Einstein

Para Jose Luis y Dicnora este trabajo, los amo mucho.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios en primer lugar.

A mi familia por la paciencia y el amor.

A la Doctora Ana Abdelnour Esquivel por la motivación, por las enseñanzas, el patrocinio y la tolerancia.

A la Ingeniera Montserrat Jarquín Cordero por la colaboración brindada en tantos aspectos de esta práctica.

Al Master Jhonny Peraza Moraga por la ayuda con el arte fotográfico de este informe.

**Encapsulamiento de meristemas de papa (*Solanum tuberosum*) para la  
crioconservación y la propagación en invernadero**

Informe final de práctica de especialidad presentado a la escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica por Jose Alberto Navarro Ureña como requisito parcial para optar por el título de bachillerato en Ingeniería en Biotecnología.

Dra. Ana María Abdelnour Esquivel  
Asesora

---

Lic. Jaime Brenes Madriz  
Lector

---

Ing. Montserrat Jarquín Cordero  
Lectora

---

Jose Alberto Navarro Ureña  
Candidato

---

## CONTENIDO

<b>1. Resumen</b> .....	<b>10</b>
<b>2. Abstract</b> .....	<b>11</b>
<b>3. Introducción</b> .....	<b>12</b>
<b>4. Objetivos</b> .....	<b>14</b>
<b>5. Revisión de literatura</b> .....	<b>15</b>
5.1. Semilla sintética.....	16
5.2. Propagación en invernadero de la semilla sintética.....	19
5.3. Crioconservación.....	21
5.4. Papa ( <i>Solanum tuberosum</i> ).....	25
<b>6. Metodología</b> .....	<b>27</b>
6.1. Cultivo <i>in vitro</i> de papa .....	27
6.2. Aislamiento y encapsulado de meristemas .....	27
6.3. Propagación en el invernadero de los meristemas encapsulados.....	28
6.4. Crioconservación de los meristemas encapsulados.....	29
<b>7. Resultados</b> .....	<b>32</b>
7.1. Propagación en invernadero .....	34
7.2. Crioconservación.....	36
<b>8. Discusión</b> .....	<b>39</b>
8.1. Propagación en invernadero .....	40
8.2. Crioconservación.....	41
<b>9. Conclusiones</b> .....	<b>44</b>
<b>10. Recomendaciones</b> .....	<b>45</b>
<b>11. Literatura consultada</b> .....	<b>46</b>
<b>12. Apéndices</b> .....	<b>52</b>

## TABLAS

Tabla 1. Efecto del aislamiento y encapsulado sobre la sobrevivencia de meristemas de papa cultivados en condiciones <i>in vitro</i> .....	32
Tabla 2. Efecto de algunos tratamientos sobre el porcentaje de sobrevivencia de las semillas sintéticas de papa ( <i>Solanum tuberosum</i> ) cultivadas en condiciones de invernadero. ....	34
Tabla 3. Efecto del tiempo de exposición a la solución vitrificadora PVS2 mod. sobre el porcentaje de sobrevivencia de meristemas encapsulados. ....	36
Tabla 4. Efecto del precultivo de los meristemas en medio semi-sólido enriquecido con 0.3 M sacarosa sobre la sobrevivencia al congelamiento en nitrógeno líquido. ....	37
Tabla 5. Efecto de la incubación en medio de carga sobre la sobrevivencia de los meristemas encapsulados al procedimiento de vitrificación-crioconservación. ....	38
Tabla 6. Efecto de la incubación en concentraciones crecientes en la solución vitrificadora PVS2 mod., sobre la sobrevivencia de los meristemas encapsulados crioconservados. ....	38
Tabla 7. Composición química del medio de cultivo básico Murashige y Skoog (1962). Base para la preparación de los medios utilizados en la práctica...	52
Tabla 8. Composición del medio de cultivo semi-sólido utilizado para multiplicación de papa. Medio utilizado en el Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) del Instituto Tecnológico de Costa Rica.....	53
Tabla 9. Medio de cultivo líquido adicionado con 3% de alginato de sodio. Utilizado para la preparación de las cápsulas.....	54
Tabla 10. Medio de cultivo líquido adicionado con 100 mM de cloruro de calcio. Utilizado para la preparación de las cápsulas.....	55

Tabla 11. Medio de cultivo líquido sin azúcar, utilizado para la fertilización de las pruebas en invernadero.....	56
Tabla 12. Medio de cultivo líquido adicionado con 0.4 M sacarosa y 2 M glicerina. Solución de carga (LSD), para las pruebas de crioconservación etapa general del protocolo.....	57
Tabla 13. Solución vitrificadora PVS2 mod. Constituida en base a medio de cultivo líquido 0.4 M sacarosa.....	58
Tabla 14. Medio de cultivo líquido adicionado con 1 M sacarosa, utilizado para el lavado de las cápsulas luego de la exposición a la solución vitrificadora. ..	59
Tabla 15. Medio de cultivo semisólido adicionado con 0.3 M sacarosa, utilizado en el aislamiento de meristemas (modificación a del protocolo general).....	60
Tabla 16. Medio de cultivo líquido adicionado con 0.3 M sacarosa y DMSO al 5% v/v. Solución de carga utilizado para las pruebas de crioconservación (modificación b).....	61

## FIGURAS

- Figura 1. Cultivo *in vitro* de los meristemas de papa (*Solanum tuberosum*). A. Cultivo de meristemas B. Vitroplanta obtenida a partir de cultivo *in vitro* de meristemas encapsulados C. Detalle del crecimiento de los meristemas encapsulados..... 33
- Figura 2. Efecto de algunos tratamientos sobre el porcentaje de sobrevivencia de las semillas sintéticas de papa (*Solanum tuberosum*) cultivados en condiciones de invernadero..... 35
- Figura 3. Plántula de papa (*Solanum tuberosum*) obtenida a partir del cultivo de las semillas sintéticas en invernadero..... 35
- Figura 4. Efecto del tiempo de exposición a PVS2 mod. sobre el porcentaje de sobrevivencia de meristemas encapsulados..... 37

## 1. RESUMEN

La tecnología de la semilla sintética consiste en el encapsulamiento de un explante meristemático para su cultivo *in vitro* o en condiciones directamente *in vivo*. Esta tecnología aumenta la protección del material vegetal y facilita su manipulación, por lo que es utilizada, adicionalmente, para la conservación de germoplasma a largo plazo o crioconservación. El objetivo de este proyecto fue la evaluación del encapsulado de meristemas en una especie de importancia económica como la papa (*Solanum tuberosum*).

En los ensayos de crioconservación se obtuvo la relación entre el tiempo de incubación en la solución vitrificadora PVS2 mod. y el porcentaje de sobrevivencia de los meristemas encapsulados. No obstante, será necesario realizar ensayos adicionales para optimizar el protocolo de crioconservación de los meristemas encapsulados de papa.

En las pruebas de propagación de las semillas sintéticas a condiciones de invernadero se determinó que las características propias del explante (tamaño y calidad) así como la humedad del sustrato fueron factores imprescindibles para una adecuada sobrevivencia y desarrollo de las plántulas. Se determinó que la esterilización del sustrato aumentó el porcentaje de sobrevivencia de los meristemas encapsulados y que la fertilización periódica acrecentó la vigorosidad de las plántulas.

**1.1. PALABRAS CLAVES:** Meristemas encapsulados, alginato de calcio, semilla sintética, Nitrógeno líquido, vitrificación, crioconservación.

## 2. ABSTRACT

The technology of the synthetic seed consists on encapsulating meristematic material for its culture under *in vitro* or *in vivo* conditions. This technology increases the protection of the plant material and facilitates its manipulation. It is additionally used for long-term storage of germplasm or cryopreservation. The objective of this project was to evaluate the technique of meristems encapsulation for propagation and conservation purposes in potato (*Solanum tuberosum*) an important economic specie.

In the cryopreservation tests, the existing relation between the time of incubation in the vitrification solution PVS2 mod. and the percentage of survival of meristems encapsulated was studied. However, it is necessary to make additional tests to optimize the protocol of cryopreservation for meristems encapsulated of potato.

In tests using synthetic seeds for propagation under greenhouse conditions, the characteristics of the meristems (size and quality) as well as the humidity of the substrate were essential factors for survival and development. We determined that sterilization of the substrate increased the percentage of encapsulated meristems survival and that periodic fertilization increased the vigor but not the percentage of survival.

**2.1. KEY WORDS:** Meristems encapsulated, Calcium alginate, Synthetic seed, Liquid Nitrogen , vitrification, cryopreservation.

### 3. INTRODUCCIÓN

El cultivo de tejidos vegetales es actualmente una de las ramas más desarrolladas de la biotecnología. Esta disciplina incluye un conjunto de técnicas de cultivo *in vitro*, donde se le proporciona a un explante (sección de hoja, raíz, brote, meristema u otras) las condiciones ideales, tanto nutricionales como físicas, para que alcance un desarrollo óptimo y se pueda establecer entonces, la multiplicación clonal. Se parte de la necesidad de introducción de materiales a condiciones asépticas, y luego de la multiplicación de este material dentro del laboratorio, se termina un ciclo, con la aclimatización a condiciones nuevamente *in vivo*.

Para garantizar la sobrevivencia del material proveniente de laboratorio, es necesario practicar ciertos cuidados en la etapa de acondicionamiento a condiciones de invernadero o *in vivo*, además, esta etapa del cultivo de tejidos requiere de un tiempo considerable.

La tecnología de la semilla sintética, la cual consiste básicamente en el encapsulado de un explante meristemático para su propagación, nace como respuesta a la urgencia de establecer métodos que reduzcan costos y tiempo en la etapa de aclimatización a condiciones *in vivo* de los materiales provenientes de laboratorio. La semilla sintética combina por un lado las ventajas de la reproducción asexual tales como: multiplicación de poblaciones idénticas y crecimiento acelerado, con las ventajas de la reproducción sexual o por semilla: fácil manipulación, capacidad de almacenaje, protección del explante, entre otras.

Por otra parte, la tecnología de las semillas sintéticas es utilizada también para la conservación a largo plazo o crioconservación, debido a que facilita la manipulación y aumenta la protección de los materiales. La crioconservación consiste en la preservación de cualquier material vivo a temperaturas ultrabajas, realizado en nitrógeno líquido (-196 °C). Esta es la única forma conocida de conservación a largo plazo y como procedimiento posee numerosas ventajas tales como: estabilidad genética del material, implementación en espacio reducido, bajos costos y poca peligrosidad.

Por las razones anteriormente citadas, este proyecto se encaminó hacia la evaluación del encapsulado de meristemas (tecnología de la semilla sintética), en una especie de importancia económica como la papa (*Solanum tuberosum*).

La papa es una de los 10 alimentos más consumidos a nivel mundial y por su importancia ha sido objeto de numerosos estudios y mejoramiento a todos niveles, desde la mecanización hasta mejoras genéticas. Esta especie constituye un modelo ideal para las pruebas de la tecnología de semilla sintética, debido a que es tradicionalmente cultivada en condiciones *in vitro*, y que la preservación de su germoplasma es de suma relevancia para salvaguardar características genéticas de importancia. Otros aspectos que hacen ideal a la papa como modelo de investigación son: sus requerimientos nutricionales básicos y su rápido crecimiento.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo general**

- ✓ Evaluar la técnica de encapsulamiento de meristemas de papa (*Solanum tuberosum*), para la crioconservación y la propagación en invernadero.

### **4.2. Objetivos específicos**

- ✓ Evaluar el tratamiento de vitrificación como protocolo de crioconservación de los meristemas encapsulados.
- ✓ Determinar el adecuado pretretratamiento de vitrificación, para alcanzar así el mayor porcentaje de sobrevivencia de los meristemas encapsulados.
- ✓ Determinar la relación entre el tiempo de incubación en la solución vitrificadora PVS2 mod. y la sobrevivencia de los meristemas encapsulados.
- ✓ Determinar los principales factores que influyen en la adecuada propagación de los meristemas encapsulados directamente a condiciones de invernadero.

## 5. REVISIÓN DE LITERATURA

Las plantas presentan dos sistemas de propagación: sexual y asexual. La reproducción sexual implica la unión o fusión de células sexuales masculinas y femeninas, denominadas conjuntamente gametos. Esta fusión lleva el desarrollo de un embrión y consecuentemente la formación de semillas, las cuales serán encargadas de provocar la germinación de una nueva planta. La reproducción sexual implica la creación de una población de plántulas con genotipos nuevos y diferentes, debido a los procesos genéticos presentados en la formación de los gametos (recombinación, mutación, y otros) (Artola, 2002; Flores-Vindas, 1999; Hartmann y Kester, 1987).

Por su parte, la reproducción asexual se da gracias a que cada célula contiene todos los genes necesarios para el crecimiento y desarrollo de una planta completa, por lo que cualquier conjunto de células, puede bajo condiciones específicas, provocar el desarrollo de un nuevo individuo. El fenómeno de reproducción asexual se presenta en forma natural por medio de órganos vegetativos especializados tales como: tubérculos, rizomas, estolones, bulbos, entre otros. Sin embargo, el hombre en su afán de aumentar el rendimiento de los cultivos, ha venido utilizando, desde hace varias décadas, formas artificiales de reproducción asexual como son: propagación por estacas, injertos y acodos.

En las últimas décadas, el cultivo de tejidos ha abierto toda una nueva gama de posibilidades de reproducción. Esta disciplina abarca una serie de técnicas de cultivo en condiciones asépticas, en donde se utilizan distintas partes de la planta (meristemas, trozos de hojas, raíces y células) a las que se les proporciona artificialmente las condiciones físicas y químicas con el fin de inducir un crecimiento óptimo. Cultivo de meristemas, embriogénesis somática, suspensiones celulares, cultivo de anteras, cultivo de microestacas, son varias de las metodologías ampliamente utilizadas en esta disciplina (Artola, 2002; CIAT, 1991; Dixon, 1991; George y Sherrington, 1984; Hartmann y Kester, 1987).

El éxito final de la propagación por medio de cultivo de tejidos, depende de la capacidad para manejar en el invernadero las plantas provenientes de laboratorio. Sin embargo, es evidente que existen diferencias entre el crecimiento de plantas en laboratorio y en invernadero. Para alcanzar el éxito, es necesario, un periodo de aclimatización a condiciones *in vivo* o donde se pueda alcanzar un alto grado de sobrevivencia, en un periodo de tiempo corto y con un costo reducido (Kity, S.F; Villalobos, 1987).

El empleo de la semilla sintética busca alcanzar estos objetivos y obtener así un logro importante en la aclimatización de materiales vegetales provenientes de cultivo de tejidos.

### **5.1. Semilla sintética**

Una semilla es definida como aquella unidad formada de un embrión cigótico y su provisión de alimento almacenado, rodeados por cubiertas protectoras. Las semillas naturales tienen, en su mayoría, un contenido de humedad bajo, un metabolismo a nivel reducido y no presentan actividad aparente de crecimiento sino hasta la germinación. La semilla sintética mantiene muchas de estas características, pero adquiere otras nuevas gracias a su naturaleza de propagación vegetativa (Hartmann y Kester, 1987; López, S.F).

Inicialmente los investigadores utilizaron el concepto de semilla sintética desde un punto de vista estricto, definiendo a esta aplicación, como la ingeniería de los embriones somáticos, donde es utilizado el encapsulamiento como forma de propagación. No obstante, en la actualidad esta definición ha sido revolucionada debido a la posibilidad del encapsulado de otros tejidos con capacidad meristemática (Artola, 2002; Muniswamy *et al*, 2000).

Se define entonces, tecnología de la semilla sintética (TSS) como el revestimiento de cualquier material vegetal meristemático tal como: embriones somáticos, meristemas, brotes o microestacas. El revestimiento debe constar de dos partes: una lámina externa la cual fortalece y protege la semilla y una solución interna con nutrientes requeridos por el explante para su desarrollo (endospermo artificial). Por lo general esta solución interna contiene reguladores del crecimiento, pero también pueden ser incorporados otros componentes como: funguicidas, antibióticos y microorganismos (Gray y Purohit, 1991; Redenbaugh, 1990; Rodríguez, 2000).

Las semillas sintéticas son propágulos clonales de fuente parental, que tienen la capacidad para germinar *in vitro* y luego ser transplantadas, pero que también pueden ser sembradas directamente en un sustrato *in vivo*. Aunque en la actualidad, la propagación vegetativa por este método es una práctica limitada a cultivos de alto valor comercial, podría llegar a difundirse ampliamente si se lograra bajar significativamente los costos de producción (Artola, 2002).

#### 5.1.1. Encapsulamiento

Los materiales usados para el encapsulamiento deben de cumplir con la función de protección física del material vegetal y además deben permitir la existencia de nutrientes, antibióticos, funguicidas y microorganismos. Redenbaugh y colaboradores a comienzos de los ochentas, y después de diversos estudios con compuestos prominentes, determinaron que los hidrogeles de alginato de calcio, llegaban a poseer las mejores características (Artola, 2002; Nieves, 2000; Rodríguez, 2000).

El encapsulamiento con base en este compuesto químico, suministra una protección adecuada para el tejido vegetal, gracias a que posee una dureza idónea. La información que estos estudios generaron sentó las bases para la búsqueda de nuevas alternativas que hacen el concepto de "semilla somática " cada vez más cercano (Artola, 2002).

Generalmente la técnica de formación de semillas sintéticas consiste en tomar una gota de la disolución alginato de sodio conteniendo el material vegetal a encapsular, y agregarla a una solución de sal de calcio. La incubación de las cápsulas de 20 a 30 minutos, en esta última solución, es necesaria para inducir así una constitución ideal (Muniswamy *et al*, 2000; Redenbaugh, 1990; Rodríguez, 2000).

#### *5.1.2. Usos de las semillas sintéticas*

La semilla sintética posee muchas aplicaciones al nivel de investigación, estudios sobre variación somaclonal, formación de la cubierta, y determinación del rol del endospermo, son algunas de estas (Rodríguez, 2000). Esta revisión, sin embargo, profundiza en dos aplicaciones importantes; por un lado se analiza la viabilidad de una propagación directamente a invernadero y por otro la utilización de esta tecnología en la crioconservación.

Muchas especies son estériles y otras por su uso comercial son de propagación principalmente vegetativa, la implementación de la tecnología de la semilla sintética podría constituir la manera idónea de propagación para éstas. Además, el uso de las semillas sintéticas permitiría acortar el tiempo que pasa el material vegetal en laboratorio, debido a que la etapa de desarrollo y producción de raíces se llevaría a cabo en condiciones de invernadero.

Características como: protección del material vegetal, bajo volumen y fácil manipulación, hace idónea a la semilla sintética para la conservación de germoplasma vegetal vía congelamiento en nitrógeno líquido o crioconservación (Abdelnour, 2002).

## **5.2. Propagación en invernadero de la semilla sintética**

La idea de la propagación de la semilla sintética en invernadero surge de la necesidad de acortar el tiempo que pasan los materiales vegetales en el laboratorio y durante el proceso de aclimatización. Esta reducción implica, además, la reducción de gastos efectuados para cada propágulo durante los periodos citados.

El periodo de aclimatización inicia propiamente en la etapa de trasplante, donde la planta es transferida del medio aséptico de cultivo *in vitro*, al ambiente de vida en invernadero y luego a su sitio final. Las plantas deben adquirir nuevamente su característica autótrofa, desarrollar raíces y brotes funcionales, aumentar su resistencia a la desecación y al ataque de organismos patógenos. Este periodo de aclimatización requiere de varias semanas y de condiciones ambientales esenciales, como por ejemplo, una elevada humedad relativa y la protección contra organismos nocivos y en ocasiones es necesario aplicar procedimientos particulares o especiales (Hartmann y Kester, 1987).

La propagación de materiales a invernadero por medio del uso de las semillas sintéticas reduce también, el periodo de tiempo que los materiales pasan en el laboratorio, debido a que se elimina la etapa de pretrasplante, es decir la etapa donde se favorece la iniciación de las raíces y el alargamiento del tallo (Hartmann y Kester, 1987).

### 5.2.1. Condiciones para la propagación

Durante el proceso de germinación, la semilla requiere de ciertas condiciones ambientales: disponibilidad de agua, temperaturas adecuadas, provisión de oxígeno y presencia o ausencia de luz, para garantizar un adecuado desarrollo de la plántula (Hartmann y Kester, 1987). Para alcanzar un alto grado de sobrevivencia y un adecuado crecimiento de los materiales encapsulados (semilla sintética) estas condiciones ambientales también deben ser proporcionadas adecuadamente en el invernadero.

Las condiciones internas de la semilla son variables que también influyen directamente en el desarrollo de las plántulas a la hora de la germinación.

En ensayos de germinación *in vivo* o en invernadero de las semillas sintéticas, se observó que el vigor de estas plántulas es inferior al vigor de las plántulas de semillas naturales. En un principio se pensó que los carbohidratos, presentes en el endospermo artificial, no estaban disponibles para la germinación. Sin embargo, se observó que las reservas de almidón y sacarosa eran rápidamente consumidas luego de la germinación, por lo que se descartó tal posibilidad. Posteriormente se determinó que un incremento en el nivel de proteínas de reserva provocaba un aumento en el vigor de las plántulas, dando luz así, a los factores que podrían mejorarse en la tecnología de la semilla sintética (Artola, 2002).

Finalmente, el tamaño y la calidad del explante, así como la capacidad para un desarrollo sincrónico, es decir, un desarrollo equivalente entre la raíz y la zona aérea, corresponden a factores propios del explante que son necesarios para obtener un alto porcentaje de sobrevivencia y un alto vigor en el crecimiento (CIAT, 1991; Rodríguez, 2000).

### 5.3. Crioconservación

La crioconservación consiste en el almacenamiento de materiales biológicos a temperaturas ultra bajas, donde los procesos metabólicos cesan y el material se encuentra en condiciones de suspensión animada. Es posible mantener este estado de suspensión por tiempo indefinido, sin que el material sufra alteraciones (Abdelnour, 2001).

La crioconservación de células, tejidos y órganos vegetales tiene sus raíces históricas en estudios realizadas en la sobrevivencia de especies vegetales en condiciones de temperaturas bajo cero grados Celsius. A finales de los cincuentas, se propone por primera vez que algunos materiales pueden ser recuperados después de exponerlos a ultra bajas temperaturas. Sin embargo, no fue sino hasta 1973, después de numerosos experimentos, cuando se logró una verdadera crioconservación de células de zanahoria (*Daucus carota*) en nitrógeno líquido (-196 °C) (Abdelnour, 2001; Cisne, 1992).

#### 5.3.1. Conservación de la biodiversidad

La biodiversidad se refiere a la variabilidad de organismos vivos de todos los orígenes comprendiendo los ecosistemas terrestres, marinos y acuáticos. La diversidad biológica implica la variabilidad de vida sobre la tierra, incluyendo la variabilidad genética dentro de las especies o abundancia relativa, como también el número de especies (riqueza) (Pulgnau, 1996).

La diversidad biológica es un recurso limitado y perecedero, que proporciona la materia prima o "genes" que dan o pueden dar origen a variedades mejoradas. El valor potencia de la diversidad genética radica fundamentalmente en los genes que contienen, los cuales son la fuente de resistencia, calidad nutritiva, adaptabilidad, así como genes desconocidos que pueden en un futuro ser considerados valiosos (Abdelnour, 1993; Cisne, 1992).

La evolución de las especies vegetales antes de la agricultura tenía solamente la selección natural, actuando sobre la variabilidad genética. Con el inicio de la domesticación de las especies de mayor interés para el hombre se presenta la selección artificial. Miles de años de selección artificial y natural ha producido variedades y/o genotipos adaptados a distintos lugares y prácticas culturales. Un incremento continuo en la producción y calidad del alimento hace necesario la conservación de los recursos fitogenéticos (Cisne, 1992; Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, 1979).

La importancia de la diversidad genética se fundamenta en la relación selección/variación. Cuanto mayor es el margen de acción reservado para la selección natural (evolución) y para la selección artificial (mejoramiento), hay mayor oportunidades para que se pueda encontrar características favorables. Es importante entonces, la disponibilidad de germoplasma para un uso posterior tanto en la agricultura y como en la industria (Cisne, 1992).

Para la conservación de germoplasma vegetal se dispone de varias formas o modalidades. Los bancos de semillas convencionales son adecuados para la preservación a largo plazo de especies con semillas ortodoxas (semillas que soportan deshidratación y almacenamiento a bajas temperaturas). Sin embargo para especies con semillas recalcitrantes (semillas que no soportan deshidratación) o especies con propagación vegetativa, se han implementado comúnmente colecciones de campo. No obstante, este sistema posee la desventaja de requerir grandes extensiones de tierra y gran consumo de mano de obra (Pulgnau, 1996).

La disponibilidad de las técnicas de cultivo de tejidos permitió el desarrollo de nuevas opciones para la conservación de germoplasma. La conservación a mediano plazo consiste en reducir la tasa de multiplicación *in vitro* del material vegetal por medio de la alteración en las condiciones físicas y químicas. Este procedimiento cuenta con la desventaja de poseer un alto grado de incertidumbre en cuanto a la asepsia y también se corre el riesgo de provocar inestabilidad genética en los materiales.

La criopreservación se reconoce como la única opción para el almacenamiento de materiales vegetales a largo plazo, sin que experimenten cambios genéticos, es un método no dependiente de la electricidad, el costo del nitrógeno líquido es bajo y este no es inflamable, además, el espacio para establecer una colección en el laboratorio es relativamente reducido (Abdelnour, 2001).

### 5.3.2. *El proceso de criopreservación*

El proceso general de criopreservación consiste en llevar el material biológico desde su temperatura fisiológica normal hasta ultra bajas temperaturas y de nuevo al punto inicial sin causarle daño. De acuerdo al tejido u órgano que se desee conservar así variará el procedimiento o conjunto de técnicas que se utilice (Abdelnour, 2001).

Con respecto de los pretratamientos utilizados para la criopreservación de materiales vegetales se pueden identificar dos grandes grupos: los métodos clásicos y los métodos nuevos. Ambos persiguen lograr una deshidratación de los materiales para evitar la formación de cristales intracelulares de agua, los cuales son destructivos para las células (Abdelnour, 2002).

Los métodos clásicos son aquellos en que los materiales desnudos son deshidratados. Por lo general, los procedimientos incluyen la incubación del material en soluciones crioprotectoras como sulfóxido de dimetilo, sacarosa, polietilenglicol, glicerol y/o combinados. Otro procedimiento clásico, utilizado con semillas y embriones, consiste en la deshidratación del material, colocando este en un flujo de aire estéril o utilizando envases con sílica gel herméticamente cerrados (Matsumoto *et al*, 1995; Sarkar y Naik, 1998; Towill y Jarret, 1992).

Los nuevos métodos comprenden procedimientos que utilizan la técnica de encapsulamiento en alginato de calcio. Por lo general, esta técnica es utilizada con materiales de tamaño mayor como embriones y meristemas. Existen dos procedimientos generales: el encapsulamiento-deshidratación que consiste en cultivar las cápsulas en soluciones crecientes de sacarosa para producir la deshidratación y el encapsulamiento-vitrificación que consiste en la incubación de las cápsulas en las sustancias crioprotectoras concentradas (Abdelnour, 2002; Suzuki *et al*, 1998; Wu, *et al* 1999).

Una vez efectuado el pretratamiento, la fase siguiente en el proceso general de crioconservación es el congelamiento. Existen dos procedimientos generales de congelamiento, el primero conocido como congelamiento rápido, es el método más simple y más utilizado actualmente, el cual consiste en sumergir el material a conservar directamente en nitrógeno líquido y el segundo método llamado congelamiento lento es el utilizado clásicamente, se utilizan congeladores programables de manera que la muestra se someta a una velocidad de enfriamiento constante y controlada. Una vez que la muestra alcanza una temperatura determinada (generalmente  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), se almacena en nitrógeno líquido (Abdelnour, 2001).

Para el descongelamiento, por lo general se realiza una inmersión de los criotubos que contienen las muestras en baños de agua a  $40^{\circ}\text{C}$  por 1 o 2 minutos, sin embargo se ha utilizado en algunos casos tiempos de descongelamiento mayores.

Cuando se han utilizado soluciones crioprotectoras durante el proceso, es necesario proceder a diluirlas o eliminarlas, antes de inducir el material a la recuperación, ya que estas pueden resultar tóxicos.

A partir de aquí se realiza la etapa de recuperación del material. Esta etapa consiste fundamentalmente en el cultivo del explante en condiciones especiales tales como: medios de cultivo modificados y variaciones en las condiciones físicas (cambios en la intensidad lumínica dadas al explante) (Abdelnour, 2001).

#### **5.4. Papa (*Solanum tuberosum*)**

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

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

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

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

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

Las mejoras genéticas, así como un incremento continuo en la producción, hace necesario la conservación del germoplasma de papa. Esta conservación garantiza el mantenimiento de su diversidad genética, con lo cual se preserva características que son fuente de resistencia, calidad nutritiva, adaptabilidad, así como genes desconocidos que pueden en un futuro ser considerados valiosos (Abdelnour, 1993; Cisne, 1992).

## **6. METODOLOGÍA**

Esta práctica se llevó a cabo en el Centro de Investigación en Biotecnología, en el Instituto Tecnológico de Costa Rica, entre los meses de julio a diciembre del 2002.

### **6.1. Cultivo *in vitro* de papa**

Para la realización de esta investigación, se utilizaron vitroplantas de papa donadas por el Centro de Investigación en Biotecnología (CIB). Se mantuvieron existencias del material durante el transcurso de la práctica. Las condiciones de crecimiento en el laboratorio fueron de  $20 \pm 2$  grados Celsius y un fotoperiodo de 16 horas luz, con una intensidad lumínica de 2000 lux. El medio de cultivo utilizado fue el descrito por Murashige y Skoog, (MS, 1962) (apéndice 1) complementado con  $0.5 \text{ mgL}^{-1}$  de  $\text{GA}_3$  y  $2 \text{ mgL}^{-1}$  de pantotenato de calcio, 3% de sacarosa, 0.2% de Phyta-Gel y con un pH de 5.8 (apéndice 2).

### **6.2. Aislamiento y encapsulado de meristemas**

Con la ayuda de un estereoscopio se aislaron meristemas axilares a partir de vitroplantas de aproximadamente 30 días. Estos fueron colocados en un medio de cultivo estándar semi-sólido, para promover su recuperación.

Una vez transcurrido un periodo de 24 horas desde el aislamiento, los meristemas fueron sumergidos en el medio de cultivo líquido con 3% de alginato de sodio (apéndice 3). Seguidamente con la ayuda de un gotero estéril se tomó una gota del medio anterior que contuviera un meristema y se agregó al medio de cultivo con 100 mM de cloruro de calcio (apéndice 4). Se incubaron las cápsulas por 20 minutos aproximadamente, para que tomaran la consistencia adecuada. Pasado este periodo, se eliminó todo el medio con cloruro de calcio y se secó el exceso de humedad de las cápsulas colocándolas en un plato Petri con papel filtro estéril.

Se realizaron controles de aislamiento y de encapsulado. Después de 30 días, se evaluó la recuperación y el crecimiento de los meristemas con base en la brotación.

### **6.3. Propagación en el invernadero de los meristemas encapsulados**

Se procedió a evaluar la sobrevivencia de los meristemas encapsulados en la propagación directamente a condiciones de invernadero o *in vivo*. Las semillas sintéticas (meristemas encapsulados), fueron colocadas en bandejas de plástico oscuro en camas de madera cubiertas con Sarán y plástico transparente. Un control periódico sobre la humedad del sustrato fue efectuado durante el tiempo de prueba.

Dos factores o variables fueron evaluados durante la propagación. El primer factor evaluado fue: la esterilización del sustrato mediante el autoclavado por presión de vapor (15 lb, 121,5 °C durante 20 minutos); un ensayo negativo (sustrato no autoclavado) fue establecido. Adicionalmente se efectuó un control negativo incubando las cápsulas durante 20 minutos en una solución de Afungil 50 WF. El crecimiento de los meristemas fue evaluado luego de 30 días luego de colocadas sobre el sustrato.

Un segundo factor evaluado en esta sección, fue la fertilización periódica del sustrato. Tal fertilización fue realizada con medio de cultivo líquido (apéndice 5) al 20% y con intervalos definidos de 3 días. Un Control negativo de la prueba fue evaluado. El crecimiento de los meristemas fue evaluado luego de 30 días de colocadas las semillas sintéticas.

#### **6.4. Crioconservación de los meristemas encapsulados**

##### *6.4.1. Protocolo general*

Los meristemas encapsulados fueron colocados en una solución de carga elaborada a partir de medio líquido M&S (1962) enriquecido con 0.4 M sacarosa y 2 M glicerina (apéndice 6), durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo, las cápsulas fueron incubadas en la solución vitrificadora PVS<sub>2</sub> mod. (30% v/v glicerol, 30% v/v polietilenglicol y 5% v/v DMSO) (apéndice 7), en un erlenmeyer de 100 ml en agitación (100 rpm, agitador orbital), estableciéndose siete tiempos de incubación: 5, 10, 15, 20, 30, 40 y 50 minutos.

Al finalizar cada periodo de vitrificación, parte de las cápsulas fueron lavadas con medio M&S (1962) enriquecido con 1 M sacarosa (apéndice 8) y se procedió con la etapa de recuperación (control de vitrificación).

Las restantes cápsulas, se introdujeron en criotubos y estos fueron colocados en nitrógeno líquido de forma directa. Después de permanecer 50 minutos en el nitrógeno líquido, los criotubos fueron descongelados en un baño de agua a 40° Celsius, durante 70 segundos. Una vez descongeladas las cápsulas, se procedió a diluir la solución vitrificadora con medio M&S (1962) enriquecido con 1 M sacarosa (apéndice 8). Seguidamente, se procedió con la etapa de recuperación.

#### *6.4.2. Etapa de recuperación*

Las cápsulas fueron colocadas en el medio de papa semi-sólido enriquecido con 0.7 M sacarosa, donde permanecieron durante 24 horas en condiciones de oscuridad. Pasado el periodo, las cápsulas fueron colocadas en un medio fresco con enriquecido 0.5 M sacarosa, y se mantuvieron igualmente durante 24 horas en la oscuridad. Un tercer paso, consistió en colocar las cápsulas en un medio enriquecido con 0.3 M sacarosa durante 24 horas en la oscuridad. Por último, las cápsulas fueron colocadas en un medio estándar (concentración normal de sacarosa; 0.1 M) y se expusieron a condiciones de luz difusa. Un día después se colocaban a condiciones normales de luminosidad.

#### *6.4.3. Modificación a*

Esta modificación consistió en el cultivo de los meristemas aislados, en medio de cultivo enriquecido con 0.3 M sacarosa (apéndice 9), durante 24 horas. Una vez encapsulados los meristemas, estos fueron colocados en solución de carga. Seguidamente las cápsulas fueron incubadas en la solución vitrificadora PVS2 mod. por dos periodos de tiempo: 30 y 40 minutos.

Luego de cada periodo de incubación, las cápsulas fueron introducidas en criotubos y estos colocados en nitrógeno líquido. Luego de aproximadamente 50 minutos de exposición al nitrógeno líquido, los criotubos fueron sacados y puestos en un baño María a 40 °C, durante 70 segundos. Seguidamente la solución vitrificadora fue diluida de las cápsulas utilizando medio líquido M&S (1962) adicionado con 1 M de sacarosa. Se estableció por último el procedimiento de recuperación (ver sección anterior)

#### 6.4.4. *Modificación b*

En esta oportunidad se realizó el aislamiento y encapsulado inmediatos (el mismo día). Una vez obtenidas las cápsulas, estas fueron incubadas en una solución de carga compuesta por: medio líquido de papa adicionado con 0.3 M de sacarosa y 5 % v/v de DMSO (apéndice 10). El erlenmeyer que contenía las cápsulas fue colocado en un agitador orbital a 100 rpm, durante 24 horas.

Se establecieron dos periodos de deshidratación en la solución vitrificadora PVS2 mod.: 30 y 40 minutos.

Luego de cada periodo de incubación, las cápsulas fueron introducidas en criotubos y estos colocados en nitrógeno líquido. Luego de aproximadamente 50 minutos de exposición al nitrógeno líquido, los criotubos fueron sacados y puestos en un baño María a 40 °C, durante 70 segundos. Una vez descongeladas las cápsulas, se retiró la solución vitrificadora lavando las cápsulas con el medio líquido MS enriquecido con 1 M de sacarosa. Se estableció seguidamente el procedimiento de recuperación.

#### 6.4.5. *Modificación c*

Esta modificación consistió en la incubación de las cápsulas en concentraciones crecientes de la solución vitrificadora. Concentraciones de 40%, 60%, 80% y 100% fueron establecidas. Las cápsulas fueron mantenidas en las tres primeras concentraciones durante 5 minutos, en la concentración de 100% las cápsulas fueron incubadas por 15 minutos.

Las cápsulas fueron introducidas en criotubos y congeladas directamente por inmersión en nitrógeno líquido. Luego de aproximadamente 50 minutos de exposición al nitrógeno líquido, los criotubos fueron sacados y puestos en un baño María a 40 °C, durante 70 segundos. Una vez descongeladas las cápsulas, se diluyó la solución vitrificadora lavando las cápsulas con el medio líquido MS adicionado con 1 M de sacarosa. Se estableció seguidamente el procedimiento de recuperación.

## 7. RESULTADOS

Al estudiarse el efecto del aislamiento y encapsulado de los meristemas de papa sobre su desarrollo bajo condiciones *in vitro* se encontró que el porcentaje de brotación fue del 100% tanto para los meristemas aislados como para los encapsulados (tabla 1).

Tabla 1. Efecto del aislamiento y encapsulado sobre la sobrevivencia de meristemas de papa cultivados en condiciones *in vitro*.

Tratamiento	Porcentaje de brotación
Aislamiento	100
Encapsulado	100

Fuente: Datos de laboratorio

Un desarrollo y crecimiento normal de los meristemas aislados y encapsulados se muestra en la figura siguiente, lo cual indica que estas técnicas no influyeron negativamente en la propagación *in vitro* de la papa.

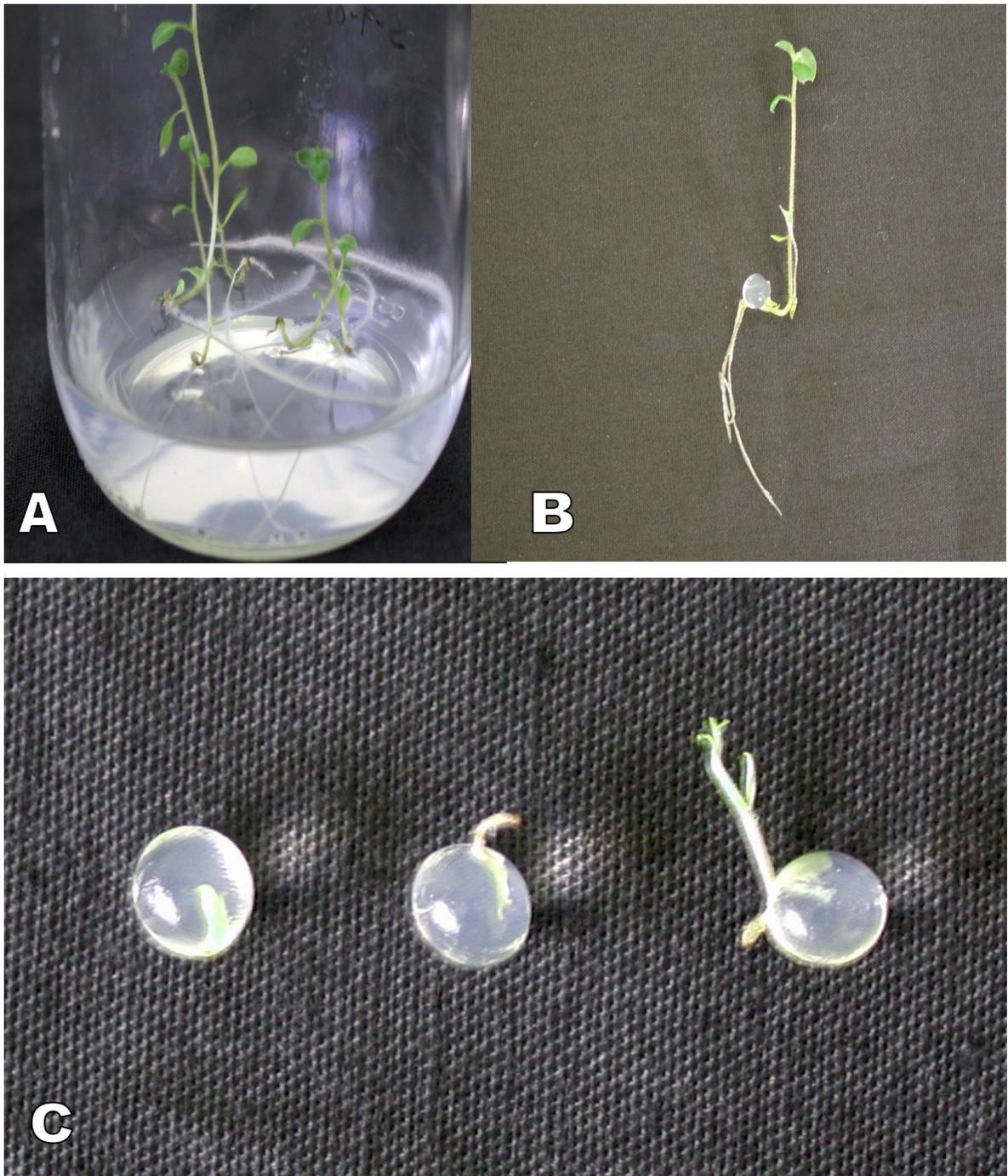


Figura 1. Cultivo *in vitro* de los meristemas de papa (*Solanum tuberosum*). A. Cultivo de meristemas B. Vitroplanta obtenida a partir de cultivo *in vitro* de meristemas encapsulados C. Detalle del crecimiento de los meristemas encapsulados.

## 7.1. Propagación en invernadero

Los resultados obtenidos en las pruebas de propagación de las semillas sintéticas cultivadas en condiciones de invernadero, se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 2. Efecto de algunos tratamientos sobre el porcentaje de sobrevivencia de las semillas sintéticas de papa (*Solanum tuberosum*) cultivadas en condiciones de invernadero.

Tratamiento			
Autoclavado del sustrato	Fertilización	Incubación en Afungil 50 WF	Porcentaje de sobrevivencia
+	+	-	26
+	-	-	30
-	+	-	2
-	+	+	10

Fuente: Datos de invernadero

La esterilización del sustrato mediante el autoclavado fue determinante para lograr los mayores porcentajes de sobrevivencia (26 y 30%), de las semillas sintéticas. Un 10% de sobrevivencia se obtuvo cuando los meristemas encapsulados fueron incubados en la solución de Afungil 50 WF, fertilizados y colocados en el sustrato sin esterilizar.

La siguiente figura muestra de forma gráfica los resultados obtenidos de las pruebas de crecimiento de las semillas sintéticas en invernadero.

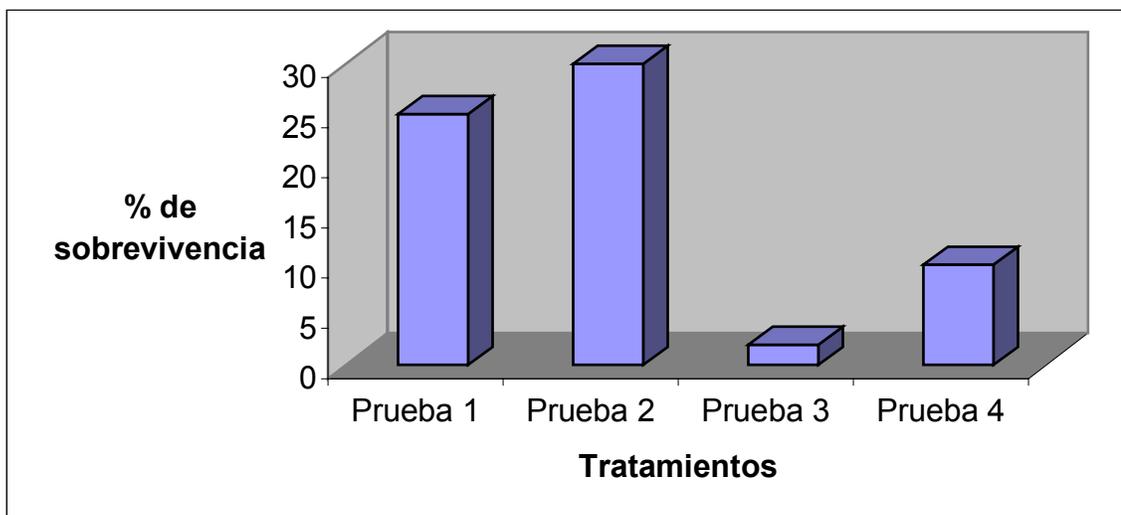


Figura 2. Efecto de algunos tratamientos sobre el porcentaje de sobrevivencia de las semillas sintéticas de papa (*Solanum tuberosum*) cultivados en condiciones de invernadero.



Figura 3. Plántula de papa (*Solanum tuberosum*) obtenida a partir del cultivo de las semillas sintéticas en invernadero.

## 7.2. Crioconservación

La tabla 3 es presentada a continuación, esta muestra los resultados obtenidos con relación a la sobrevivencia de los meristemas encapsulados expuestos a deshidratación, en la solución vitrificadora PVS2 mod. por varios periodos de tiempo.

Tabla 3. Efecto del tiempo de exposición en la solución vitrificadora PVS2 mod. sobre el porcentaje de sobrevivencia de meristemas encapsulados.

Tiempo de incubación en la solución vitrificadora PVS2 mod. (minutos)	Sobrevivencia (%)
5	93
10	83
15	80
20	80
30	75
40	65
50	30

Fuente: Datos de laboratorio

En la figura 4 se puede observar gráficamente la sobrevivencia presentada al incubar los meristemas encapsulados en PVS2 mod. durante siete lapsos distintos de tiempo.

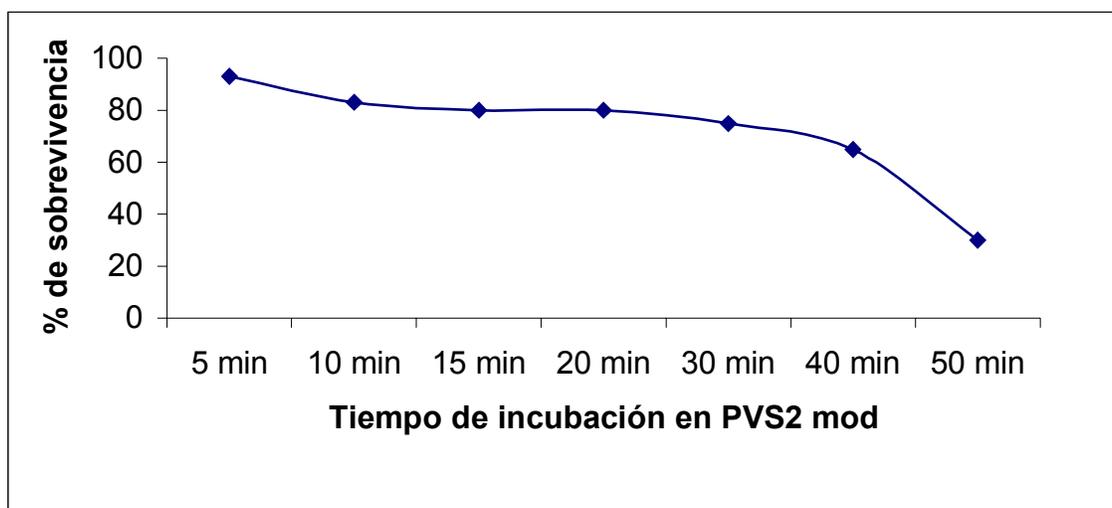


Figura 4. Efecto del tiempo de exposición a PVS2 mod. sobre el porcentaje de sobrevivencia de meristemas encapsulados.

#### *Modificación a*

A continuación se muestran los resultados obtenidos al precultivar los meristemas aislados en un medio de cultivo semi-sólido enriquecido con 0.3 M sacarosa, antes de su encapsulamiento.

Tabla 4. Efecto del precultivo de los meristemas en medio semi-sólido enriquecido con 0.3 M sacarosa sobre la sobrevivencia al congelamiento en nitrógeno líquido.

Tiempo de incubación en PVS2 mod. (minutos)	Sobrevivencia (%)	
	-NL	+NL
30	75	0
40	65	0

Fuente: Datos de laboratorio

### *Modificación b*

A continuación se muestran los resultados obtenidos de la modificación b, realizada al protocolo general. Tal modificación corresponde a la incubación de los meristemas encapsulados en un medio de cultivo líquido enriquecido con 0.3 M sacarosa y 5 % v/v DMSO, durante 24 horas.

Tabla 5. Efecto de la incubación en medio de carga sobre la sobrevivencia de los meristemas encapsulados al procedimiento de vitrificación-crioconservación.

Tiempo de incubación en PVS2 mod. (minutos)	Sobrevivencia (%)	
	-NL	+NL
30	75	0
40	65	0

Fuente: Datos de laboratorio

### *Modificación c*

A continuación se muestran los resultados obtenidos de la modificación c, realizada al protocolo general. Esta modificación consistió en la incubación de las cápsulas a concentraciones crecientes de la solución vitrificadora.

Tabla 6. Efecto de la incubación en concentraciones crecientes en la solución vitrificadora PVS mod., sobre la sobrevivencia de los meristemas encapsulados crioconservados.

Tiempo de incubación en PVS2 mod. (minutos)	Sobrevivencia (%)	
	-NL	+NL
40	65	0

Fuente: Datos de laboratorio

## 8. DISCUSIÓN

El cultivo de meristemas es una estrategia de propagación utilizada para la obtención, mantenimiento y multiplicación de materiales vegetales, además de ser útil para la erradicación de virus en plantas contaminadas. Los meristemas son las regiones de crecimiento de la planta tanto de forma primaria como secundaria. El presente proyecto se fundamentó en el uso de los meristemas axilares (región de crecimiento primario) de papa (*Solanum tuberosum*) para su utilización en la tecnología de las semillas sintéticas.

Se determinó un 100% de sobrevivencia y regeneración de vitroplantas a partir del aislamiento y cultivo *in vitro* de los meristemas de papa en medio estándar semisólido.

Aunque el aislamiento de los meristemas no presentó efectos adversos en la regeneración de vitroplantas, esta separación causa cierto estrés en los meristemas, lo que hace necesario cultivarlos en medio estándar semi-sólido durante 24 horas para inducir su recuperación antes de proceder con el encapsulamiento.

El encapsulamiento de materiales vegetales o formación de las semillas sintéticas es un procedimiento simple y que además requiere de poco tiempo para su obtención (ver metodología). En este procedimiento el punto más importante es el mantener las cápsulas una vez formadas, durante 20 o 30 minutos en incubación en la solución de calcio, para asegurar así el grado adecuado de aglutinación y dureza.

Se obtuvo un 100% de sobrevivencia cuando los meristemas fueron encapsulados y cultivados en medio semi-sólido en condiciones *in vitro*. Se podría aseverar entonces, que el encapsulado en alginato de calcio no presentó factores inhibidores sobre el crecimiento de los meristemas, ni representó una barrera para la elongación del brote.

### 8.1. Propagación en invernadero

Las pruebas de propagación en invernadero, señalaron algunos factores importantes de tomar en cuenta para obtener un adecuado desarrollo de las semillas sintéticas de papa.

En ensayos preliminares (datos no mostrados), se destacó la necesidad de un control estricto sobre el porcentaje de humedad en el sustrato utilizado para la brotación y desarrollo de las semillas sintéticas. Este control fue necesario debido a que la membrana de alginato de calcio presenta un alto grado de permeabilidad y un grosor relativamente bajo, lo que permite un movimiento de agua desde la cápsula hacia el sustrato, provocando así una deshidratación y la posible muerte del explante si el porcentaje de humedad alcanza valores muy bajos.

El tamaño apropiado del meristema fue otro aspecto importante a tomar en cuenta para obtener un alto porcentaje de sobrevivencia de las semillas sintéticas. La utilización de meristemas de un tamaño muy pequeño (menor a 2 mm) resultó en una pobre sobrevivencia de estas en las pruebas *in vivo* (datos no mostrados). Roca y Mroginski aseguran que cuanto menor sea el segmento utilizado mayor será la dificultad encontrada para fomentar la producción de brotes y raíces (CIAT, 1991). El uso de meristemas con un tamaño considerable (mayor a 4 mm) y aislados de vitroplantas de condición sana garantizó, en parte, una alta sobrevivencia.

De los tratamientos evaluados sobre germinación y sobrevivencia de las semillas sintéticas (tabla 2 y figura 3), se determinó la importancia de la esterilización del sustrato. Cuando las semillas fueron colocadas en el sustrato sin esterilizar el porcentaje de sobrevivencia alcanzó porcentajes bastantes bajos (2%). Por otra parte cuando no se esterilizó el sustrato, pero las cápsulas fueron incubadas en la solución funguicida, se alcanzó un 10% de sobrevivencia. Los mayores porcentajes de sobrevivencia (26 y 30%) se obtuvieron cuando el sustrato fue esterilizado mediante el autoclavado por presión de vapor de agua.

La necesidad de la esterilización del sustrato, se fundamenta en la presencia de azúcar en la solución interna de la cápsula (semilla sintética), lo que provoca la colonización por microorganismos. Aunque se ha pensado en la posibilidad de retirar el azúcar de la semilla sintética para evitar la contaminación, sin embargo, algunos estudios han determinado claramente que la presencia de carbohidratos es necesaria para el desarrollo del explante encapsulado al igual que sucede en las semillas naturales.

En cuanto a la fertilización utilizando medio de cultivo líquido sin azúcar (apéndice 5), se observó que su aplicación periódica aumenta la vigorosidad de las plántulas. Sin embargo, no se observó deferencia positiva entre el porcentaje de sobrevivencia de las unidades experimentales con y sin fertilización (26 y 30% respectivamente) (tabla 2 y figura 3). La presencia de suficientes nutrientes en el endospermo artificial de las semillas sintéticas, durante las primeras etapas de desarrollo del explante, puede explicar estos resultados.

En general, las pruebas de propagación a invernadero de las semillas sintéticas demostraron la clara posibilidad de utilizar esta tecnología para la propagación de materiales provenientes de laboratorio, como la papa, y reducir así el costo y tiempo de su aclimatización. Es necesario realizar mayores investigaciones para incrementar el porcentaje de sobrevivencia alcanzados en este proyecto.

## **8.2. Crioconservación**

La crioconservación ha demostrado a través de numerosas investigaciones ser un método viable para el almacenamiento de colecciones a corto y largo plazo. Para el almacenamiento de colecciones vivas muchos laboratorios en diferentes partes del mundo están utilizando este método (Abdelnour, 1996).

En esta sección del proyecto se determinó como primer punto, la relación existente entre el tiempo de incubación de los meristemas encapsulados y el porcentaje de sobrevivencia de los mismos (tabla 3 y figura 4). El análisis de estos datos, nos muestra que el porcentaje de sobrevivencia de los meristemas encapsulados se mantiene alto entre los 5 y los 30 minutos, y que desciende después de los 40 minutos de incubación en la solución vitrificadora. Estos resultados confirman los expuestos por Matsumoto y colaboradores (1998), los cuales determinaron que después de 40 minutos de incubación en la solución vitrificadora, hay un descenso significativo en la sobrevivencia de los meristemas encapsulados.

Aunque se comprobó que los componentes de las soluciones vitrificadoras poseen toxicidad para el material vegetal de la semilla sintética, se determinó que una exposición corta (menor a 30 minutos), tiene pocos efectos en la sobrevivencia.

Debido a que no se obtuvo sobrevivencia cuando el protocolo general fue evaluado (datos no mostrados), se dispuso como necesario, la evaluación de métodos de precultivo y de recuperación más eficientes para obtener datos positivos en esta sección del proyecto. Se realizaron tres modificaciones al protocolo general.

La primera modificación evaluada consistió en el cultivo de los meristemas aislados en un medio enriquecido con 0.3 M sacarosa por 24 horas, antes del encapsulado. La inducción de una deshidratación del meristema, antes de la incubación de las cápsulas en la solución vitrificadora y con esto una menor formación de cristales que rompen el material vegetal intracelular cuando se realiza la crioconservación, consistió la razón para efectuar este pretratamiento. Sin embargo, esta modificación no presentó sobrevivencia de los meristemas encapsulados luego de la crioconservación.

La incubación de los meristemas encapsulados durante 24 horas en una solución de carga, constituyó la segunda modificación. Esta incubación llevaba como objetivo una deshidratación progresiva de las cápsulas y su habituación a los crioprotectores. Esta segunda modificación del protocolo general, no presentó sobrevivencia de los meristemas encapsulados luego de la crioconservación.

La tercera modificación consistió en la incubación de las cápsulas a concentraciones crecientes de la solución vitrificadora. Esta modificación obedeció a la posibilidad de aumentar el porcentaje de sobrevivencia de los meristemas encapsulados, gracias a la habituación y deshidratación progresiva del material vegetal a la solución vitrificadora. No obstante, esta modificación tampoco presentó sobrevivencia de los meristemas encapsulados.

## 9. CONCLUSIONES

- ✓ El encapsulamiento de meristemas de papa en alginato de calcio no representó una barrera para la sobrevivencia y desarrollo de brotes.
- ✓ Fue posible la propagación de las semillas sintéticas (meristemas encapsulados) en condiciones de invernadero, lo que permite la utilización de esta tecnología para el desarrollo y aclimatización de materiales vegetales provenientes de laboratorio.
- ✓ La humedad presente en el sustrato, así como las características propias del explante (tamaño y calidad) son factores importantes para alcanzar un alto porcentaje de sobrevivencia de las semillas sintéticas propagadas en condiciones de invernadero.
- ✓ La esterilización del sustrato utilizado para la propagación en invernadero fue un factor determinante para la sobrevivencia de las semillas sintéticas.
- ✓ La fertilización periódica aumentó el vigor de las plántulas cultivadas en invernadero, pero no aumentó el porcentaje de sobrevivencia de las semillas sintéticas.
- ✓ La incubación de los meristemas encapsulados, en la solución vitrificadora PVS2 mod. durante un periodo menor a los 30 minutos presentó una poca reducción de la sobrevivencia, pero no permitió la regeneración después de la crioconservación.

## 10. RECOMENDACIONES

- ✓ Para aumentar el porcentaje de sobrevivencia de las semillas sintéticas (meristemas encapsulados) propagadas directamente en invernadero, se podría adicionar el medio de encapsulado con: proteínas de reserva, y/o reguladores de crecimiento.
- ✓ Evaluar adicionales ensayos de vitrificación para determinar el adecuado protocolo para la crioconservación de los meristemas encapsulados.
- ✓ Evaluar otras soluciones de vitrificación que se han descrito recientemente.
- ✓ Evaluar el protocolo de emcapsulamiento/deshidratación para la crioconservación de meristemas encapsulados de papa (*Solanum tuberosum*).

## 11. LITERATURA CONSULTADA

- Abdelnour, A. 1993. Crioconservación de especies vegetales tropicales: *Coffea*, *Musa* y *Theobroma*. Salazar, R. (ed.). Memorias. Turrialba, CR. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Pp: 81-84
- Abdelnour, A. 1996. Papel de la crioconservación en la fitoprotección. Bertsch, F.; Badilla, W. y García, J. (eds.). ¿Puede la agricultura sostenible ser competitiva? Memoria, V1: Agronomía y recursos naturales. San José, CR. EUNED/EUNA. Pp: 89-91
- Abdelnour, A. 2001. Conservación *in vitro* de los recursos fitogenéticos. Cartago. CR. Instituto Tecnológico de Costa Rica. 24 p.
- Abdelnour, A. 2002. Micropropagación, crioconservación y caracterización genética del chayote (*Sechium edule*). Tesis de Doctorado. San José, CR. 105 p.
- Aguilar, ME; Pérez, L; y Salazar, K. 1999. Crioconservación de ápices del vástago de caoba (*Swietenia macrophylla*) cultivados *in vitro* usando la técnica de encapsulación-deshidratación. Serie Técnica: Reuniones Técnicas. Turrialba, CR. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Pp: 60-63.
- Artola, A. La semilla artificial y su tecnología (en línea). Monografías.com. Consultado 5 ago 2002. Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos10/semar/semar.shtml>

- Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). 1979. Los recursos genéticos de las plantas cultivadas de América Central. Turrialba, CR. Pp:8-10.
- Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) 1991. Roca, W; y Mroginski, L. (editores). Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Cali, CO. 970 p.
- Cisne, CJ. 1992. Crioconservación de embriones cigóticos y somáticos de cacao (*Theobroma cacao* L). Tesis de Mg. Sc. Turrialba, CR. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). 123 p.
- Dixon, RA. 1991. Plant Cell Culture: a practical approach. Practical Approach Series. Washington DC, US. IRL Press. 236 p.
- Flores-Vindas, E. 1999. La planta: estructura y función. Cartago, CR. Libro Universitario Regional. 884 p.
- Flores, D; Barboza, S; Orozco, R. 2002. Guía para la producción de semilla prebásica y básica de papa en Costa Rica. San José, CR. EUNED. 56 p.
- George, EF y Sherrington, PD. 1984. Plant propagation by tissue culture. Handbook and directory of commercial laboratories. UK. Exegetics Limited. Pp: 370-375.
- Gray, DJ. y Purohit, A. 1991. Somatic embryogenesis and development of synthetic seed technology. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 10(1): 33-61.
- Gray, DJ. Synthetic seed for clonal production of crop plants. *Recent Advances in the development and germination of seeds*. New York, US. Plenum Press. 29-45.

- Guerrero, A. 1977. Cultivos herbáceos extensivos. Madrid, ES. Ediciones Mundi-Prensa. 531 p.
- Kyte, L. Plants from test tubes. An introduction to micropropagation. Portland, Oregon, US. Timber Press. Pp: 76-78.
- Hartmann, HT. y Kester, DE. 1987. Propagación de plantas: Principios y prácticas. Traducido por: Marino, A. México DF, MX. Compañía Editorial Continental. 760 p.
- López, C. Semillas artificiales (en línea). Estación Experimental La Mayora (CSIC). Consultado 26 ago 2002. disponible en: <http://www.ciencias.uma.es/publicaciones/encuentros/ENCUENTROS40/semillas.html>
- Matsumoto, T; Sakira, A; Yamada, K. 1995. Cryopreservation of in vitro-grown apical meristems of lily by vitrification. NL. Plant Cell. Tissue and Organ Culture. 41: 237-241.
- Matsumoto, T; Takahashi, A; Sakai, A; Nako, Y. 1998. Cryopreservation of in vitro-grown apical meristems of hybrid statice by three different procedures. JP. Scientia Horticulturae. 76: 105-114.
- Montano, A. 1984. Cultivo y mejoramiento de la papa. San José, CR. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. 706 p.

- Mujeeb-Kazi, A. y Sitch, LA. (editores). 1989. Review of advances in plant biotechnology, 1985-1988. 2nd International Symposium on genetic Manipulation in Crops. México DF, MX and Manila, PH. International Maize and Wheat Improvement Center and International Rice Research Institute. 328 p.
- Muniswamy, B; Krishna, G y Sreenath, HL. 2000. Encapsulation techniques for producing synthetic seeds in coffee. IN. Indian Coffee. 64(2): 3-5.
- Murashige, T y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues culture. *Physiol Plant*. 15: 473-497.
- Nieves, N; Blanco, M; González A y Tapia R. 2000. Composición de un endospermo artificial para embriones de mandarina 'Cleopatra' (*Citrus reshni* Hort ex Tan) (en línea). Consultado 26 ago 2002. Disponible en: [http://www.redpav-fpolar.info.ve/fagro/v27\\_1/v27m002.htm](http://www.redpav-fpolar.info.ve/fagro/v27_1/v27m002.htm)
- Nieves, N; Blanco, M; González A y Tapia R. 2000. Difusión del ácido giberélico a partir de la matriz de alginato de sodio. Efecto sobre la germinación de embriones somáticos de caña de azúcar (en línea). Instituto de Biotecnología de las Plantas. Consultado 26 ago 2002. Disponible en: <http://www.villaclara.civc.inf.cu/polo-cientifico/IBP/IBP/rnadina.html>
- Pulgnau, J. 1996. Conservación de germoplasma. Montevideo, UY. Programa Cooperativo para el Desarrollo Tecnológico Agropecuario del Cono Sur (IICA-PROCISUR). 166 p.
- Redenbaugh, K. 1990. Application of artificial seed to tropical crops. California, US. *HortScience*. 25 (3): 251-255.

- Rodriguez, I. 2000. Producción de semillas artificiales de microestacas de papa (*Solanum tuberosum*). Cartago, CR. ITCR. 35 p.
- Rosell, CH. (editor). 1990. Fundamentos teórico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales. Roma, IT. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Pp: 85-88
- Sarkar, D y Naik, P. 1998. Cryopreservation of shoot tips of tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L. ) clones by vitrificación. US. Annals of Botany. 82: 455-461.
- Senaratna, T; Mckersie, BD y Bowley, SR. 1990. Artificial seeds of alfalfa (*Medicago sativa* L) induction of desiccation tolerance in somatic embryos. In Vitro Cell Dev. Biol. 26: 85-90.
- Suzuki, M; Ishikawa, M; y Akihana, T. 1998. A novel preculture method for the induction of desiccation tolerance in gentian axillary buds for cryopreservation. Japan. Plant Science. 135: 69-76.
- Towill, L; y Jarret, R. 1992. Cryopreservation of sweet potato (*Ipomoea batatas* {L} Lam.) shoot tips by vitrificación. US. Plant Cell Reports. 11: 175-178.
- Villalobos, VM. 1987. Fundamentos teórico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales. Turrialba, CR. CATIE. Pp: 151-158.
- Wu, Y; Engelman, F; Zhao, Y; Zhou, M. y Chen, S. 1999. Cryopreservation of apple shoot tips: importance of cryopreservation technique and of conditioning of donor plants. UK. Cryo-letters. 20:121-130.

Zhao, Y ; Wu, Y; Engelman, F; Zhou, M. y Chen, S. 1999. Cryopreservation of apple *in vitro* shoot tips by the droplet freezing method. UK. Cryo-letters. 20:109-112.

## 12. APENDICES

### 12.1. Apéndice 1

Tabla 7. Composición química del medio de cultivo básico Murashige y Skoog (1962). Base para la preparación de los medios utilizados en la práctica.

<i>Componentes</i>	<i>Concentración (mg/l)</i>
<b>MACROELEMENTOS</b>	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650.00
KNO <sub>3</sub>	1900.00
CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	440.00
MgSO <sub>4</sub>	370.00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170.00
<b>MICROELEMENTOS</b>	
Fe-EDTA	43.00
FeSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	27.00
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.20
MnSO <sub>4</sub> * 4 H <sub>2</sub> O	22.30
ZnSO <sub>4</sub> * 4 H <sub>2</sub> O	8.60
KI	0.83
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	0.25
CuSO <sub>4</sub> * 5 H <sub>2</sub> O	0.025
CoCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	0.025
<b>COMPUESTOS ORGÁNICOS</b>	
Myo-inositol	100.00
Ácido nicotínico	0.50
Piridoxina	0.50
Tiamina	0.10
Glicina	2.00

Fuente: Murashige y Skoog, 1962.

## 12.2. Apéndice 2

Tabla 8. Composición del medio de cultivo semi-sólido utilizado para multiplicación de papa. Medio utilizado en el Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) del Instituto Tecnológico de Costa Rica.

Componente	Concentración
Macroelementos	M&S
Microelementos	M&S
Vitaminas e inositol	M&S
Fe EDTA	M&S
AG <sub>3</sub>	0.5 mg/l
Pantotenato de calcio	2 mg/l
Sacarosa	30 g/l
Gelificante	2.2 g/l

Fuente: Datos de laboratorio

### 12.3. Apéndice 3

Tabla 9. Medio de cultivo líquido adicionado con 3% de alginato de sodio. Utilizado para la preparación de las cápsulas.

Componente	Concentración
Macroelementos*	M&S
Microelementos	M&S
Vitaminas e inositol	M&S
Fe EDTA	M&S
AG <sub>3</sub>	0.5 mg/l
Pantotenato de calcio	2 mg/l
Sacarosa	30 g/l
Gelificante	----
Alginato de sodio	15 g/l

Fuente: Datos de laboratorio

\* Las fórmulas con calcio han sido retiradas.

#### 12.4. Apéndice 4

Tabla 10. Medio de cultivo líquido adicionado con 100 mM de cloruro de calcio.  
Utilizado para la preparación de las cápsulas.

Componente	Concentración
Macroelementos*	M&S
Microelementos	M&S
Vitaminas e inositol	M&S
Fe EDTA	M&S
AG <sub>3</sub>	0.5 mg/l
Pantotenato de calcio	2 mg/l
Sacarosa	30 g/l
Gelificante	----
Cloruro de calcio	100 mM

Fuente: Datos de laboratorio

\* Las fórmulas con calcio han sido retiradas.

## 12.5. Apéndice 5

Tabla 11. Medio de cultivo líquido sin azúcar, utilizado para la fertilización de las pruebas en invernadero.

Componente	Concentración
Macroelementos	M&S
Microelementos	M&S
Vitaminas e inositol	M&S
Fe EDTA	M&S
AG <sub>3</sub>	0.5 mg/l
Pantotenato de calcio	2 mg/l
Sacarosa	----
Gelificante	----

Fuente: Datos de laboratorio

## 12.6. Apéndice 6

Tabla 12. Medio de cultivo líquido adicionado con 0.4 M sacarosa y 2 M glicerina. Solución de carga (LSD), para las pruebas de crioconservación etapa general del protocolo.

Componente	Concentración
Macroelementos	M&S
Microelementos	M&S
Vitaminas e inositol	M&S
Fe EDTA	M&S
AG <sub>3</sub>	0.5 mg/l
Pantotenato de calcio	2 mg/l
Sacarosa	136.92 g/l
Gelificante	----
Glicerina	145.756 ml/l

Fuente: Datos de laboratorio

## 12.7. Apéndice 7

Tabla 13. Solución vitrificadora PVS2 mod. Constituida en base a medio de cultivo líquido 0.4 M sacarosa.

Componente	Concentración
Macroelementos	M&S
Microelementos	M&S
Vitaminas e inositol	M&S
Fe EDTA	M&S
AG <sub>3</sub>	0.5 mg/l
Pantotenato de calcio	2 mg/l
Sacarosa	136.92 g/l
Gelificante	----
Glicerol	30 ml/l
Polietilenglicol	30 ml/l
Dimetil Sulfoxido (DMSO)	5 ml/l

Fuente: Datos de laboratorio

## 12.8. Apéndice 8

Tabla 14. Medio de cultivo líquido adicionado con 1 M sacarosa, utilizado para el lavado de las cápsulas luego de la exposición a la solución vitrificadora.

Componente	Concentración
Macroelementos	M&S
Microelementos	M&S
Vitaminas e inositol	M&S
Fe EDTA	M&S
AG <sub>3</sub>	0.5 mg/l
Pantotenato de calcio	2 mg/l
Sacarosa	342.30 g/l
Gelificante	----

Fuente: Datos de laboratorio

## 12.9. Apéndice 9

Tabla 15. Medio de cultivo semisólido adicionado con 0.3 M sacarosa, utilizado en el aislamiento de meristemas (modificación a del protocolo general).

Componente	Concentración
Macroelementos	M&S
Microelementos	M&S
Vitaminas e inositol	M&S
Fe EDTA	M&S
AG <sub>3</sub>	0.5 mg/l
Pantotenato de calcio	2 mg/l
Sacarosa	102.69 g/l
Gelificante	2.2 g/l

Fuente: Datos de laboratorio

## 12.10. Apéndice 10

Tabla 16. Medio de cultivo líquido adicionado con 0.3 M sacarosa y DMSO al 5% v/v. Solución de carga utilizado para las pruebas de criopreservación (modificación b).

Componente	Concentración
Macroelementos	M&S
Microelementos	M&S
Vitaminas e inositol	M&S
Fe EDTA	M&S
AG <sub>3</sub>	0.5 mg/l
Pantotenato de calcio	2 mg/l
Sacarosa	102.69 g/l
Gelificante	----
Dimetil Sulfoxido (DMSO)	5 ml/l

Fuente: Datos de laboratorio