

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POST GRADO
MAESTRÍA EN MEJORAMIENTO GENÉTICO DE PLANTAS**



**“CRIOPRESERVACIÓN DE APICES CAULINARES DE CAMOTE
(*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) USANDO EL MÉTODO DE
VITRIFICACIÓN EN LA GOTA PEQUEÑA”**

Presentado por:

RAINER VOLLMER

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAGÍSTER SCIENTIAE EN MEJORAMIENTO GENÉTICO DE
PLANTAS**

Lima - Perú

2013

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POST GRADO
MAESTRÍA EN MEJORAMIENTO GENÉTICO DE PLANTAS**

**“CRIOPRESERVACIÓN DE ÁPICES CAULINARES DE CAMOTE
(*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) USANDO EL MÉTODO DE
VITRIFICACIÓN EN LA GOTA PEQUEÑA”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAGÍSTER SCIENTIAE**

Presentado por:

RAINER VOLLMER

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:


Dr. Jorge Jiménez Dávalos
PRÉSIDENTE


Dr. William Roca Pizzini
PATROCINADOR


M.Sc. Ricardo Sevilla Panizo
MIEMBRO


Dr. Raúl Blas Sevillano
MIEMBRO

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
Escuela de Post-Grado
Telf. 614-7800 Anexo 209 Telefax 614-7142
Apartado 12-056 La Molina
LIMA - PERU

ACTA DE SUSTENTACIÓN

Los Miembros del Jurado que suscriben, reunidos para evaluar la sustentación de tesis presentada por el alumno **RAINER VOLLMER**, denominada: "CRIOPRESERVACIÓN DE ÁPICES CAULINARES DE CAMOTE (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) USANDO EL MÉTODO DE VITRIFICACIÓN EN LA GOTA PEQUEÑA", para cumplir con uno de los requisitos para optar el grado académico de *Magister Scientiae* en la Especialidad de **MEJORAMIENTO GENÉTICO DE PLANTAS**.

Teniendo en consideración los méritos del referido trabajo así como los conocimientos demostrados por el sustentante, declaramos la tesis como:

APROBADA

con el calificativo (*) de

EXCELENTE



En consecuencia, queda en condición de ser considerado APTO por el Consejo Universitario y recibir el grado académico de *Magister Scientiae*, de conformidad con lo estipulado en el Artículo 41° del Reglamento de la Escuela de Post Grado.

La Molina, 25 de marzo del 2013


Dr. Jorge Jimenez Dávalos
PRESIDENTE


Dr. William Roca Pizzini
PATROCINADOR


M.Sc. Ricardo Sevilla Panizo
MIEMBRO


Dr. Raúl Blas Sevillano
MIEMBRO

(*) De acuerdo con el Artículo 17° del Reglamento de Tesis, éstas deberán ser calificadas con términos de: EXCELENTE, MUY BUENO, BUENO o REGULAR.

DEDICATORIA

A Dios, mi padre Roland, mi esposa Luisa y mis hijos Carsten y Letizia, por darme su apoyo y amor.

A la memoria de mi madre Maria y mi suegro Carlos por la inspiración de sus vidas.

AGRADECIMIENTO

Al Centro Internacional de la Papa (CIP) y el Global Crop Diversity Trust por permitir y financiar el presente trabajo de tesis.

Al Dr. WILLIAM ROCA PIZZINI, consultor externo del CIP y catedrático patrocinador de la presente tesis, por ser un gran Maestro, ejemplo en la investigación y un excelente ser humano.

Al Dr. DAVID ELLIS, actual jefe del banco de germoplasma del CIP, por confiar en mi trabajo y darme la oportunidad de acrecentar conocimientos y experiencia en el campo de la criopreservación, por su generosidad, apoyo y consejo en este camino científico que voy iniciando.

Al M.Sc. RICARDO SEVILLA PANIZO, Dr. RAÚL BLAS SEVILLANO y Dr. JORGE JIMENEZ, miembros del Jurado y destacados profesores en la Maestría de Mejoramiento Genético de Plantas, por sus muy valiosas enseñanzas, observaciones, consejos y confianza, que fueron aliento en la culminación de los estudios de Maestría y de la presente tesis.

A la Blga. ANA PANTA, actual responsable de la conservación *in vitro* del CIP, por brindarme en su momento, la oportunidad de desenvolverme en el área de criopreservación del CIP.

A la Sra. ROSALVA VILLAGARAY, actual técnica principal del área de criopreservación de papa en el CIP, por enseñarme la técnica de criopreservación y transmitirme su amplia experiencia práctica.

| INDICE GENERAL | | Página |
|-----------------------|---|--------|
| I. | INTRODUCCIÓN | 1 |
| II. | REVISION DE LITERATURA | 3 |
| 2.1 | EL CULTIVO DE CAMOTE | 3 |
| 2.1.1 | IMPORTANCIA ECONÓMICA Y NUTRITIVA | 3 |
| | a. Importancia económica | 3 |
| | b. Importancia nutritiva | 3 |
| 2.1.2 | TAXONOMÍA, ORIGEN, DISPERSIÓN Y GENÉTICA | 4 |
| | a. Taxonomía | 4 |
| | b. Origen | 5 |
| | c. Dispersión | 5 |
| | d. Genética | 6 |
| 2.2 | CONSERVACIÓN DE RECURSOS GENETICOS VEGETALES | 7 |
| 2.2.1 | ESTRATEGIAS DE CONSERVACIÓN | 7 |
| | a. Conservación <i>in situ</i> | 7 |
| | b. Conservación <i>ex situ</i> | 7 |
| | b1. Conservación <i>in vivo</i> en campo o invernadero | 8 |
| | b2. Conservación en forma de semilla botánica | 8 |
| | b3. Conservación vía polen | 8 |
| | b4. Conservación de ADN | 9 |
| | b5. Conservación <i>in vitro</i> | 9 |
| | b5.1 Conservación <i>in vitro</i> a corto y mediano plazo | 9 |
| | b5.2 Conservación <i>in vitro</i> a largo plazo: Criopreservación | 12 |
| 2.3 | FUNDAMENTOS TEÓRICOS DE LA CRIOPRESERVACIÓN | 14 |
| 2.3.1 | VITRIFICACIÓN | 14 |
| 2.3.2 | CRIOPROTECTORES | 15 |
| | a. Crioprotectores penetrantes | 15 |
| | b. Crioprotectantes no penetrantes | 17 |
| 2.4 | MÉTODOS DE CRIOPRESERVACIÓN | 18 |

| | Página | |
|-------|---|----|
| 2.4.1 | CRIOPRESERVACIÓN CLÁSICA VÍA CONGELAMIENTO PROGRAMADO (VITRIFICACIÓN PARCIAL) | 18 |
| 2.4.2 | MÉTODOS DE CRIOPRESERVACIÓN VÍA CONGELAMIENTO RÁPIDO (VITRIFICACIÓN COMPLETA) | 19 |
| | a. Método de pre-cultivo | 19 |
| | b. Método de desecación | 19 |
| | c. Método de pre-cultivo combinado con desecación | 19 |
| | d. Método de vitrificación | 19 |
| | e. Método de encapsulamiento-deshidratación | 20 |
| | f. Método de encapsulamiento-vitrificación | 20 |
| | g. Método de vitrificación en la gota pequeña de PVS2 o DMSO | 21 |
| 2.5 | CRIOPRESERVACIÓN DE CAMOTE | 22 |
| 2.5.1 | VITRIFICACIÓN EN LA SOLUCIÓN DE STEPONKUS | 22 |
| | a. Schnabel-Preikstas, Earle, Steponkus (1992) | 22 |
| | b. Plessis, Steponkus (1996) | 22 |
| | c. Golmirzaei, Panta, Diaz (2000) | 23 |
| 2.5.2 | VITRIFICACIÓN EN LA GOTA PEQUEÑA DE PVS2 | 23 |
| | a. Towill, Jarret (1992) | 23 |
| | b. Pennycooke, Towill (2000) | 24 |
| | c. Pennycooke, Towill (2001) | 25 |
| | d. Hardemann (2006) | 25 |
| | e. Verleije (2008) | 26 |
| 2.5.3 | ENCAPSULAMIENTO-DESHIDRATACIÓN | 27 |
| | a. Pennycooke, Towill (2001) | 27 |
| 2.5.4 | ENCAPSULAMIENTO-VITRIFICACION | 28 |
| | a. Hirai y Sakai (2003) | 28 |
| III. | MATERIALES Y MÉTODOS | 30 |
| 3.1. | MATERIAL VEGETAL | 30 |
| 3.2. | SUB-CULTIVO DE PLANTAS MADRE | 31 |

| | Página | |
|-------|---|----|
| 3.3. | ESCISIÓN DE YEMAS APICALES | 31 |
| 3.4. | PRE-CULTIVO | 31 |
| 3.5. | CRIOPROTECCIÓN | 32 |
| 3.6. | CONGELAMIENTO | 32 |
| 3.7. | DESCONGELAMIENTO | 32 |
| 3.8. | CULTIVO POST-DESCONGELAMIENTO | 33 |
| 3.9. | EVALUACIÓN DE SOBREVIVENCIA Y RE-BROTAMIENTO | 34 |
| 3.10. | DISEÑO Y EVALUACIÓN ESTADÍSTICA | 34 |
| IV. | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 37 |
| 4.1. | EFFECTO DE SACAROSA EN EL PRE-CULTIVO (ENSAYO 1) | 37 |
| 4.2. | EFFECTO DEL TIEMPO DE CRIOPROTECCIÓN CON PVS2 (ENSAYO 2) | 45 |
| 4.3. | COMPROBACIÓN DEL PROTOCOLO CON UN GRUPO DE 24 GENOTIPOS DE CAMOTE (ENSAYO 3) | 53 |
| V. | CONCLUSIONES | 56 |
| VI. | RECOMENDACIONES | 57 |
| VII. | REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 59 |
| VIII. | ANEXOS | 71 |

INDICE DE CUADROS

Página

Cuadro 1: Medias, error standard (SE) y comparación múltiple (Tukey, $\alpha=95\%$) de los efectos principales del porcentaje de sobrevivencia de ápices (*PSA*) y porcentaje de re-brotamiento de ápices (*PRA*) de seis genotipos de camote (CIP 442794, CIP 440669, CIP 420665, CIP 187019.1, CIP 420952, CIP 420964). Previa a la criopreservación vía el método de vitrificación en la gota pequeña de PVS2 (LS: 20 min, PVS2: 15 min, RS: 20 min), se pre-cultivaron las yemas apicales por 24 horas en medio de cultivo MS modificado, suplementado con diferentes concentraciones de sacarosa (0.00-0.60M).

40

Cuadro 2: Medias, error standard (SE) y comparación múltiple (Tukey, $\alpha=95\%$) de los efectos principales del porcentaje de sobrevivencia de ápices (*PSA*) y porcentaje de re-brotamiento de ápices (*PRA*) de seis genotipos de camote (CIP 442 794, CIP 440669, CIP 420665, CIP 187019.1, CIP 420952, CIP 420964) crioprottegidos por diferentes tiempos con PVS2 (15 min, 30 min, 45 min, 60 min) (LS: 20 min, RS: 20 min). Las yemas apicales se pre-cultivaron, previa a la crioprotección, por 24 horas sobre medio de cultivo (MPCC) suplementado con 0.35M de sacarosa.

48

INDICE DE FIGURAS

Página

- Figura 1:** Estructura molecular de los estados sólido, líquido y de vitrificación 14
- Figura 2:** Densidad vs. temperatura en el proceso de vitrificación 15
- Figura 3:** Estructura molecular de glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO) y etilenglicol (EG) 17
- Figura 4:** Etapas de criopreservación via el método de vitrificación en la gota pequeña de PVS2 36
- Figura 5:** Porcentajes generales de sobrevivencia (*PSA*) y re-brotamiento de ápices (*PRA*) de seis genotipos de camote (expresado como media de 12 concentraciones de sacarosa [0.0-0.6M]). 41
- Figura 6:** *PSA* y *PRA* general (promedio de seis genotipos) versus concentración de sacarosa (0.0-0.6M) en el medio de pre-cultivo. Los ápices han sido criopreservados vía el método de vitrificación en la gota pequeña de PVS2 (LS: 20 min, PVS2: 15 min, RS: 20 min). 41
- Figura 7:** Porcentaje de sobrevivencia (*PSA*) y re-brotamiento de ápices (*PRA*) de seis genotipos de camote (CIP 442794, CIP 440669, CIP 420665, CIP 420952, CIP 420694, CIP 187019.1) pre-cultivados por 24 horas con 12 concentraciones de sacarosa (0.0-0.6M). 42
- Figura 8:** Porcentajes generales de sobrevivencia (*PSA*) y re-brotamiento de ápices (*PRA*) de seis genotipos de camote, en promedio de 4 tiempos de crioprotección con PVS2 (15 min, 30 min, 45 min, 60 min). 49

- Figura 9:** *PSA* y *PRA* general (promedio de seis genotipos) versus tiempo de crioprotección con PVS2 (15 min, 30 min, 45 min, 60 min). Los ápices han sido criopreservados vía el método de vitrificación en la gota pequeña de PVS2 (LS: 20 min, PVS2: 15-60 min, RS: 20 min). 49
- Figura 10:** Porcentaje de sobrevivencia (*PSA*) y re-brotamiento de ápices (*PRA*) individuales de seis genotipos de camote (CIP 442794, CIP 440669, CIP 420665, CIP 420952, CIP 420694, CIP 187019.1), pre-cultivados por 24 horas en MPCC suplementado con 0.35M de sacarosa y crioprotegidos por tiempos diferentes con PVS2 (15 min, 30 min, 45 min, 60 min) aplicando el método de vitrificación en la gota pequeña de PVS2 (LS: 20 min, RS: 20 min). 50
- Figura 11:** Vista fotográfica de 3 genotipos de camote 28 días después del proceso de descongelamiento. 51
- Figura 12:** Porcentajes de sobrevivencia (*PSA*) y re-brotamiento de ápices (*PRA*) de 24 genotipos de camote, pre-cultivados por 24 horas en medio MPCC suplementado con 0.35M de sacarosa y posteriormente crioprotegidos por 30 minutos con PVS2 aplicando el método de la vitrificación en la gota pequeña de PVS2 (LS: 20 min, RS: 20 min). 54

INDICE DE ANEXOS

Página

- ANEXO 1:** ANOVA del porcentaje de sobrevivencia de ápices (*PSA*) de seis genotipos (GT) de camote (CIP 442794, CIP 440669, CIP 420665, CIP 420952, CIP 420964, CIP187019.1). Los ápices han sido pre-cultivados por 24 horas en medio MPCC (ver anexo 7.3) con 12 diferentes concentraciones de sacarosa (SAC) (0.00M-0.60M). 71
- ANEXO 2:** ANOVA del porcentaje de re-brotamiento de ápices (*PRA*) de seis genotipos (GT) de camote (CIP 442794, CIP 440669, CIP 420665, CIP 420952, CIP 420964, CIP187019.1). 71
- ANEXO 3:** Comparación de medias (Tukey, $\alpha=95\%$) del porcentaje de sobrevivencia de ápices (*PSA*) de seis genotipos de camote (CIP 442794, CIP 440669, CIP 420665, CIP 420952, CIP 420964, CIP187019.1), pre-cultivados por 24 horas con diferentes concentraciones de sacarosa (0.00M – 0.60M) previo a su criopreservación vía el método de vitrificación en la gota pequeña (LS: 20 min, PVS2: 15 min, RS: 20 min). 72
- ANEXO 4:** Comparación de medias (Tukey, $\alpha=95\%$) del porcentaje de re-brotamiento de ápices (*PRA*) de seis genotipos de camote (CIP 442794, CIP 440669, CIP 420665, CIP 420952, CIP 420964, CIP187019.1), pre-cultivados por 24 horas con diferentes concentraciones de sacarosa (0.00M – 0.60M) previo a su criopreservación vía el método de vitrificación en la gota pequeña (LS: 20 min, PVS2: 15 min, RS: 20 min). 73
- ANEXO 5:** ANOVA del porcentaje de sobrevivencia de ápices (*PSA*) de seis genotipos (GT) de camote (CIP 442794, CIP 420701, CIP 420665, CIP 420952, CIP 420964, CIP187019.1). 74

| | Página |
|---|--------|
| ANEXO 6: ANOVA del porcentaje de re-brotamiento de ápices (<i>PRA</i>) de seis genotipos (GT) de camote (CIP 442794, CIP 420701, CIP 420665, CIP 420952, CIP 420964, CIP187019.1). | 74 |
| ANEXO 7: Comparación de medias (Tukey, $\alpha=95\%$) del porcentaje de sobrevivencia (<i>PSA</i>) y re-brotamiento de ápices (<i>PRA</i>) de seis genotipos de camote (CIP 442794, CIP 420665, CIP 420952, CIP 420701, CIP 420964, CIP187019.1), pre-cultivados por 24 horas en medio MPCC suplementado con 0.35M de sacarosa y posteriormente crioprotegidos por diferentes tiempos con PVS2 (15min, 30 min, 45 min, 60 min) aplicando el método de la vitrificación en la gota pequeña de PVS2 (LS: 20 min, RS: 20 min). | 75 |
| ANEXO 8: ANOVA del porcentaje de sobrevivencia de ápices (<i>PSA</i>) de 24 genotipos (GT) de camote. Se pre-cultivaron los ápices por 24 horas en medio MPCC suplementado con 0.35M de sacarosa. | 76 |
| ANEXO 9: ANOVA del porcentaje de re-brotamiento de ápices (<i>PRA</i>) de 24 genotipos (GT) de camote. Se pre-cultivaron los ápices por 24 horas en medio MPCC suplementado con 0.35M de sacarosa. | 76 |
| ANEXO 10: Comparación de medias (Tukey, $\alpha=95\%$) del porcentaje de sobrevivencia (<i>PSA</i>) y re-brotamiento de ápices (<i>PRA</i>) de 24 genotipos de camote, pre-cultivados por 24 horas en medio MPCC suplementado con 0.35M de sacarosa y posteriormente crioprotegidos por 30 minutos con PVS2 aplicando el método de la vitrificación en la gota pequeña de PVS2 (LS: 20 min, RS: 20 min). | 77 |
| ANEXO 11: Medios de cultivo utilizados en la criopreservación de camote vía el método de vitrificación en la gota pequeña de PVS2 | 78 |

| | Página |
|---|--------|
| ANEXO 12: Medios de cultivo utilizados en la criopreservación de camote vía el método de vitrificación en la gota pequeña de PVS2 (continuación) | 79 |
| ANEXO 13: Medios de cultivo utilizados en la criopreservación de camote vía el método de vitrificación en la gota pequeña de PVS2 (continuación) | 80 |
| ANEXO 14: Características generales de los 31 genotipos criopreservados vía el método de vitrificación en la gota pequeña de PVS2 (ensayos 1, 2 y 3) | 81 |

Abreviaturas:

| | |
|-------|--|
| MS: | Medio Murashige & Skoog (1962) |
| EG: | Etilenglicol |
| DMSO: | Dimetilsulfoxido |
| PVS2: | Solución de vitrificación de plantas 2 |
| LS: | Solución de carga |
| RS: | Solución de recuperación (o de descongelamiento) |
| AIA: | Acido indolacético |
| PSA: | Porcentaje de sobrevivencia de ápices (%) |
| PRA: | Porcentaje de re-brotamiento de ápices (%) |
| ACP: | Agentes crioprotectores |
| AG3: | Ácido Giberélico |

RESUMEN

Se evaluó el efecto del pre-cultivo de yemas apicales de tallo con medio rico en sacarosa (0.0 – 0.6M) y el tiempo de crioprotección con solución de vitrificación de plantas 2 [PVS2] (15, 30, 45, 60 min) con un grupo de 6 entradas de camote (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.), aplicando el método de criopreservación de “Vitrificación en la gota pequeña de PVS2”. El pre-cultivo con sacarosa no reveló diferencias estadísticamente significativas del porcentaje de re-brotamiento de ápices (*PRA*) en un rango de 0.1 a 0.4M, con un valor máximo medio de *PRA* de 68.7% a una concentración de 0.35M de sacarosa. Tiempos medios de crioprotección con PVS2 de 30 y 45 minutos establecieron resultados significativamente mejores, con un *PRA* medio máximo de 68.5% con un tiempo de exposición de 30 minutos.

En un tamizado, con un grupo de 24 accesiones de camote se determinó *PRA*s de 1.7 a 66%, mostrando 21 de 24 accesiones un *PRA* mayor a 15%. Se observaron altos coeficientes de correlación ($r=0.95-0.99$) entre los porcentajes de sobrevivencia (*PSA*) y re-brotamiento (*PRA*) de ápices, derivando en la posibilidad de obviar la variable *PSA* en futuras investigaciones.

Palabras claves: Criopreservación, Camote, PVS2, Pre-cultivo, Sacarosa

ABSTRACT

The effect of shoot tip pre-culture on sucrose-rich media (0.0-0.6M) and treatment with Plant Vitriification Solution 2 [PVS2] (15, 30, 45, 60 min) was evaluated with 6 sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) accessions, using the “PVS2-droplet” cryopreservation method. No significant differences in the percent of shoot formation (*PSF*) were observed when shoot tips were pre-cultured on sucrose concentrations ranging from 0.1 to 0.4M, showing the highest mean *PSF* of 68.7 % with a sucrose concentration of 0.35M. Intermediate treatment times with PVS2 of 30 and 45 minutes showed significantly better results, with a maximum mean *PSF* of 68.5% at 30 minutes.

Screening a separate group of 24 sweetpotato accessions with the same treatments, *PSFs* from 1.7 to 66% were recorded, with 21 of 24 accesions having a *PSF* of 15% or higher. High correlation coefficients ($r=0.95-0.99$) between percent of shoot survival (*PSS*) and shoot formation (*PSF*) were observed; therefore recording *PSS* may not be necessary in future investigations.

Key words: Cryopreservation, Sweetpotato, PVS2, Pre-culture, Sacarose

I. INTRODUCCIÓN

Frente a las amenazas de calentamiento global, desertificación, erosión genética, contaminación ambiental y escasez hídrica se hace necesario la conservación segura y permanente de la diversidad genética de las especies de importancia alimenticia, medicinal, e industrial. El camote se ubica en posición 9 de los cultivos alimenticios de mayor producción al nivel mundial, con un volumen anual de 106.6×10^6 toneladas (FAO, 2010). Su origen tropical y su estructura citogenética (hexaploide y altamente heterocigótica) le dan al camote un alto potencial de adaptabilidad a futuras condiciones ambientales adversas. La protección segura y estable a largo plazo de su germoplasma es crucial para la sostenibilidad de futuras generaciones e investigaciones en el mejoramiento genético.

La conservación de germoplasma se realiza en el lugar de su procedencia (*in situ*) y/o fuera de éste (*ex situ*). La más importante estrategia actual de conservación *ex situ* del germoplasma de camote se realiza vía cultivo *in vitro*, independientemente del plazo de tiempo planeado como objetivo de la conservación (corto, mediano o largo plazo). Esta forma de conservación implica costos operativos altos en personal, equipos e infraestructura, y requiere una renovación (o sub-cultivo) frecuente de los clones. Los sub-cultivos sucesivos, bajo condiciones *in vitro*, implican el riesgo potencial de inducir hiper-hidratación (o vitrificación), variaciones somáticas y epigenéticas, mezcla de genotipos (por error humano) y contaminación (p.ej. bacterias endógenas en camote).

Ante esta situación, se considera el uso de la criopreservación como la mejor opción para la conservación a largo plazo de los Recursos Genéticos Vegetales de propagación vegetativa. La criopreservación permite el almacenamiento de material vegetal a temperaturas ultra bajas ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) y posibilita conservar los genotipos establemente en un espacio muy reducido por un tiempo ilimitado. Las muestras pueden ser descongeladas en cualquier momento para regenerar las plantas, fiel a su genotipo. El material criopreservado se mantiene protegido de contaminación con un costo bajo de mantenimiento (personal, insumos, equipos e infraestructura) de aprox 7 US\$/accesión por año (comunicación personal de Bart Panis y Joachim Keller, 2012).

Los métodos mayormente utilizados en la actualidad son (a) de encapsulamiento-vitrificación y (b) vitrificación en la “gota pequeña” de PVS2. Ambas técnicas han sido aplicadas exitosamente en diversas especies de zonas templadas y tropicales. No obstante, la técnica de congelamiento en la “gota pequeña” de PVS2 supera a la de encapsulamiento en cuestión de simplicidad, practicidad y ahorro de tiempo, lo que deviene en una ventaja para su aplicación a gran escala.

El método de vitrificación en la “gota pequeña” de PVS2 comprende las siguientes etapas: cultivo y pre-condicionamiento de las plantas madres, escisión de explantes (generalmente estructuras meristemáticas), pre-cultivo (opcional), tratamiento con crioprotectores (p.ej PVS2), congelamiento en nitrógeno líquido, descongelamiento y cultivo post-descongelamiento.

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo principal desarrollar un protocolo mejorado de criopreservación del germoplasma de camote. La investigación ha sido focalizada en las etapas de pre-cultivo y tratamiento con crioprotectores, evaluando: (a) el efecto de sacarosa como crioprotector de ápices meristemáticos caulinares de camote en la etapa de pre-cultivo, (b) el efecto de diferentes tiempos de exposición a PVS2, en combinación con una etapa de pre-cultivo.

Se realizó un tamizado final con un grupo de 24 accesiones de camote para verificar la aplicabilidad del protocolo a escala amplia.

La investigación tuvo lugar en el Centro Internacional de la Papa (CIP) donde se conserva bajo condiciones de *in vitro* una colección de 5759 entradas de camote.

II. REVISION DE LITERATURA

2.1. EL CULTIVO DE CAMOTE

2.1.1. IMPORTANCIA ECONÓMICA Y NUTRITIVA

a. Importancia económica

El camote (*Ipomoea batatas* L.) es el noveno cultivo alimenticio más importante a nivel mundial, después de maíz, arroz, trigo, papa, soya, yuca, tomate y cebada. En el año 2010 se estimó una producción mundial de 106,6 millones de toneladas, con China (76.2%), Uganda (2.7%), Nigeria (2.5%), Indonesia (1.9%), Tanzania (1.3%), Vietnam (1.2%), India (1.0%), Estados Unidos (1.0%) como los principales países productores. Según estadísticas de la FAO, en el año 2010 se sembró camote en 111 países, y se cosecharon 96% de la producción mundial en países en desarrollo. En términos de rendimiento promedio en el año 2010 sobresalieron los países de Senegal (33.3 t/ha.), Israel (30.9 t/ha.) y Egipto (30.6 t/ha.). El mayor productor mundial, China, se ubicó en novena posición (22.0 t/ha.). Los países americanos lograron los siguientes rendimientos promedios: Estados Unidos (22.4 t/ha.), México (18.8 t/ha.), Perú (16.8 t/ha.), Argentina (14.0 t/ha.), Brasil (11.2 t/ha.), Uruguay (10.9 t/ha.), Chile (10.3 t/ha.), Paraguay (8.7 t/ha.), Cuba (4.8 t/ha.), Bolivia (4.7 t/ha.), Ecuador (2.3 t/ha.) (FAOSTAT, 2011).

b. Importancia nutritiva

La raíz tuberosa del camote puede ser consumida hervida, frita, molida, o ya elaborada en mermeladas, hojaldres, helados, fideos y bebidas. Hojas y tallos son utilizados para la alimentación de ganado lechero y porcino. El camote es una materia prima industrial importante para la producción de almidón, azúcares y alcohol. Compañías como Toyota y Mitsui han comenzado a producir plásticos biodegradables, utilizando el camote como materia prima. (Shahidul, 2007). Aproximadamente 60 a 70% de la materia seca de la raíz comestible de camote está formado por almidón. Otros carbohidratos predominantes son azúcares, y en

menor cantidad pectinas, hemicelulosa y celulosa. Igualmente la materia seca de la raíz contiene: proteínas (0.46-2.93%), fibra (0.49-4.71%), lípidos (0.06-0.48%), ceniza (0.31-1.06%) y nutrientes minerales esenciales (Ca, P, Mg, Na, K, S, Fe, Cu, Zn, Mn, Al, B). El camote es una fuente excelente de beta-caroteno (provitamina A) y vitamina C, y en menor cantidad de vitamina B1 (tiamina), B2 (riboflavina), B3 (niacina) y B6 (piridoxina). El color anaranjado intenso de algunas variedades de camote es consecuencia de un contenido alto en beta-caroteno. Las hojas de la planta de camote contienen al menos 15 antocianinas y 6 compuestos polifenólicos, de tal manera que el contenido total de polifenoles de las hojas de camote es más alto que en todas las otras verduras comerciales (Shahidul, 2007).

2.1.2 TAXONOMÍA, ORIGEN, DISPERSIÓN Y GENÉTICA

a. Taxonomía

El camote (*Ipomoea batatas* L.) pertenece a la familia de las Convolvulaceae (familia de las enredaderas o “Gloria de la Mañana”). La familia de las Convolvuláceas forma parte del orden Solanales, y comprende un total de aprox. 55-60 géneros y 1600-1700 especies (Mabberley, 1987). Se estima que el género *Ipomoea* comprende un grupo de 600-700 especies, de las cuales 327 provienen de América (Austin y Huamán, 1996). El camote cultivado (*I. batatas* L.) y sus parientes silvestres más cercanos están ubicados en la sección *Eriospermum* Hallier f, serie Batatas (Choisy) DF Austin, la cual comprende la parte del camote cultivado (*I. batatas* L.), 10 especies silvestres y probablemente 3 híbridos naturales: *I. cordatotriloba* (= *I. trichocarpa*), *I. cynanchifolia*, *I. x grandifolia*, *I. lacunosa*, *I. x leucantha*, *I. littoralis*, *I. ramosissima*, *I. tabascanana*, *I. tenuissima*, *I. tiliacea*, *I. trifida*, *I. triloba* y *I. umbraticola*. (Austin, 1978, 1979; Austin y Huamán, 1996). *I. x leucantha* es considerado como un híbrido entre *I. cordatotriloba* x *I. lacunosa*; para *I. x grandifolia* existe la hipótesis que incluye derivatos de híbridos de *I. cordatotriloba* x *I. batatas* (Austin, 1978), y *I. tabascanana* podría ser un híbrido inter-específico entre *I. batatas* y *I. trifida*. (Srisuwan et al., 2006). Todas las especies silvestres de la serie Batatas se distribuyen en América, con excepción de *I. littoralis* que se encuentra en Australia y Asia (Huamán, 1999).

b. Origen

Basado en el análisis de caracteres morfológicos de camote y las especies silvestres de *Ipomoea* se pensó que el centro de origen de *I. batatas* se ubica entre la península de Yucatán (México) y la boca del río Orinoco (Venezuela) (Austin, 1977). Analizando un grupo de 69 variedades nativas y 11 líneas mejoradas de camote vía marcadores moleculares AFLP se llegó a la conclusión que el centro primario de diversidad de *I. batatas* se encuentra en Centro América (Zhang et al., 2000a). Se corroboró estos resultados en un estudio de 113 variedades nativas de camote con marcadores SSR (Zhang et al., 2000b) y vía análisis del ADN de cloroplastos de camote con marcadores ISSR (Huang y Sun, 2000). En estudios recientes se analizó, vía tecnología de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH), la distribución y organización del ADN ribosómico 5S y 18S en un grupo diverso de accesiones de camote y especies relacionadas. Se evaluaron 10 variedades hexaploides de *I. batatas*, 5 accesiones tetraploides de *I. trifida* y otras 6 especies relacionadas (diploides: *I. trifida*, *I. triloba*, *I. tiliacea*, *I. leucantha*, *I. setosa*; tetraploide: *I. tabascana*). Nuevamente se confirmó que *I. trifida* es la especie silvestre más cercanamente emparentada con *I. batatas* (camote) (Srisuwan et al., 2006). Perú y Ecuador están considerados como centros secundarios de la diversidad del camote (Zhang et al., 2000a, 2000b)

c. Dispersión

El camote se ha introducido hacia Europa occidental desde la India con el primer viaje de Colón en 1492. En el siglo dieciséis exploradores portugueses llevaron el camote hacia África, Brasil e India, mientras negociantes españoles transferían el camote directamente a las Filipinas. A China llegó el camote en el año 1594 y a Japón en 1674 (Zhang et al., 2000a). Se ha propuesto, en base al análisis con marcadores moleculares AFLP, que el camote ha sido introducido a Oceanía desde Mesoamérica vía dispersión natural (Rossel et al., 2000).

d. Genética

El camote cultivado (*I. batatas*) es una planta hexaploide ($2n=6x=90$) con un número cromosómico básico de $x=15$. Entre las especies silvestres de *I. tabascana* e *I. tiliaceae* se encuentran tetraploides ($2n=4x=60$), *I. cordatotriloba* ($2n=2x=30$ y $2n=4x=60$) y *I. trifida* ($2n=2x=30$, $2n=3x=45$, $2n=4x=60$ y $2n=6x=90$) han sido reportados con varios niveles de ploidía (Huamán y Zhang, 1997).

En la serie *Batatas* existen dos sub-grupos de genoma (A y B), y se distinguen en sus capacidades de autofertilización, cruzamiento interespecífico y características morfológicas y citogenéticas. Las especies del grupo A son autofértiles, mientras las del grupo B (que incluye el camote cultivado) son auto-incompatibles (Nishiyama y Sakamoto, 1975).

Aun no se ha establecido claramente si el origen del camote cultivado (*I. batatas* hexaploide) es auto- o alopolidiploide. Nishiyama, defensor del origen autopolidiploide, propone que *I. batatas* ($6x$) descendía de *I. trifida* y este último a su vez de *I. leucantha* ($2x$) e *I. littoralis* ($4x$) (Nishiyama y Sakamoto, 1975). Por otro lado, en base a estudios de homología cromosomal (en el estadio de paquiteno) el camote tendría un origen alopolidiploide (Magoon et al., 1970). Shiotani y Kawase propusieron que *I. batatas* ($6x$) sea de origen aloautoploide (tetradisómica), con dos genomas diferentes ($B_1B_1B_2B_2B_2B_2$) (Shiotani y Kawase, 1989). Austin ha postulado la hipótesis que las especies de *I. triloba* ($2n=2x=30$) e *I. trifida* ($2n=2x=30$) han contribuido al genoma de *I. batatas* (Austin, 1988).

2.2. CONSERVACIÓN DE RECURSOS GENETICOS VEGETALES

2.2.1 ESTRATEGIAS DE CONSERVACIÓN

a. Conservación *in situ*

De acuerdo al “Convenio sobre la Diversidad Biológica” (CBD) del 5 de Junio del 1992 se define la conservación *in situ* como: “*la conservación de los ecosistemas y los hábitats naturales y el mantenimiento y recuperación de poblaciones viables de especies en sus entornos naturales y, en el caso de las especies domesticadas y cultivadas, en los entornos en que hayan desarrollado sus propiedades específicas*” (CBD, 1992).

Enfocándose hacia la biodiversidad agrícola puede definirse la conservación *in situ* como el mantenimiento de la diversidad intra- e interpoblacional de especies, que se usan directamente en la agricultura o como fuentes de genes para los primeros, en hábitats donde aquella diversidad ha aparecido y sigue creciendo (Brown, 1999). La biodiversidad agrícola comprende variedades nativas de plantas (variedades autóctonas o tradicionales), parientes silvestres de las plantas cultivadas y variedades de ganado (Amend et al., 2008).

Existe la propuesta de reemplazar el término conservación *in situ* por lo de “conservación dinámica” (Bretting y Duvick, 1997)

b. Conservación *ex situ*

La CBD definió la conservación *ex situ* como: “*la conservación de componentes de la diversidad biológica fuera de sus hábitats naturales*” (CBD, 1992). Existe la propuesta de reemplazar el término conservación *ex situ* por el de “conservación estática” (Bretting y Duvick, 1997). En función de la especie y parte vegetal específica a conservar y el objetivo y duración de la conservación pueden distinguirse métodos diversos para la conservación *ex situ* de la agro-biodiversidad:

b1. Conservación *in vivo* en campo o invernaderos

La conservación en campo (bancos de genes en campo) o invernadero puede ser adecuada para cultivos de propagación clonar y aquellos que poseen semillas recalcitrantes (semillas que no son tolerantes al secado y la conservación a bajas temperaturas) o que raras veces producen semillas. La conservación en campo e invernadero encuentra aplicación en café, cacao, palma aceitera, plátano, olivo, coco, y la mayoría de las raíces y tubérculos (Engels y Visser, 2003).

b2. Conservación en forma de semilla botánica

La conservación de la agro-biodiversidad en forma de semilla botánica es el método más investigado y aplicado de la conservación *ex situ* y encuentra especialmente aplicación en especies que producen semillas ortodoxas (semillas tolerantes a la deshidratación y conservación a bajas temperaturas) (Engels y Visser, 2003). El proceso de deshidratación debe realizarse adecuadamente hasta alcanzar un contenido de humedad de aprox. 4-10%, dependiendo de la especie y variedad vegetal (Sevilla y Holle, 2004). Posterior a la deshidratación parcial se almacena la semilla botánica en recipientes especiales a temperatura baja (-18 °C) (Rao y Jackson, 1996). Este método se aplica por ejemplo en los cultivos de maíz, arroz, trigo, cebada, leguminosas, papa y tomate. Para monitorear la capacidad de germinación y viabilidad de las semillas conservadas se requiere realizar oportunamente las pruebas correspondientes. Si el porcentaje de germinación desciende bajo un valor mínimo pre-establecido se procede con el proceso de la regeneración de las semillas. La población de semillas regeneradas debe, en lo posible, tener la misma frecuencia génica (relación de alelos) que la poblacional original. La conservación en forma de semilla no es adecuada para cultivos con semillas recalcitrantes (Sevilla y Holle, 2004).

b3. Conservación vía polen

Una vez deshidratados los granos de polen a un contenido de humedad menor al 5% pueden conservarse, similarmente como las semillas botánicas, en recipientes especiales a

temperaturas bajo cero. La conservación en forma de polen involucra algunas desventajas: muchas especies producen solamente pequeñas cantidades de polen, los granos de polen tienen un ciclo de vida relativamente corto, el genoma de orgánulos (p.ej. cloroplastos) no puede transmitirse vía polen, la pérdida de genes relacionados al sexo, la verificación de viabilidad es costosa y difícil, la necesidad de contar con flores femeninas viables en el campo para su polinización con polen recuperado de conservación a largo plazo y por último, la falta de habilidad para regenerar el polen en plantas por sí solo (Hoekstra, 1995; Roca, com. personal, 2012). Hasta ahora puede aplicarse el cultivo de polen, seguido por la regeneración de plantas *in vitro*, solamente en pocas especies; para la mayoría de especies aún no se dispone de metodologías adecuadas (Roca, com. personal, 2012)

b4. Conservación de ADN

El ADN nuclear, mitocondrial y cloroplástico puede ser extraído, inmovilizado sobre láminas de nitrocelulosa, y luego ser conservado en congeladoras especiales a temperaturas bajas (-70 °C). La conservación en forma de ADN permite el almacenamiento de información genética en un espacio físico muy reducido, pero no posibilita la regeneración de organismos vivos (Maxted et al., 1997). Una alternativa para la conservación de ADN es la generación de plantas transgénicas, cis-génicas e intra-génicas (Roca, com. personal, 2012).

b5. Conservación *in vitro*

La conservación *in vitro* se define como el mantenimiento de explantes en un ambiente controlado, estéril y libre de patógenos (Engelmann, 1997). El objetivo de la conservación puede ser de corto, mediano o largo plazo, dependiendo del método o técnica aplicados (Shibli et al., 2006).

b5.1 Conservación *in vitro* a corto y mediano plazo

La conservación *in vitro* a corto y mediano plazo se realiza colocando explantes vegetales estériles bajo condiciones asépticas en un medio nutritivo (contenido en recipientes

de vidrio o plástico) para luego incubarlos en condiciones físicas adecuadas con el objetivo de estimular su crecimiento y desarrollo directo hasta obtener plantas normales (Roca y Mroginski, 1991).

Para fines de conservación *in vitro* se utiliza generalmente como explantes segmentos nodales o meristemas apicales y axilares. El uso de tejidos con meristemas pre-formados (ápices terminales y axilares del tallo) incrementa la probabilidad de mantener la fidelidad genética en la planta regenerada o sub-cultivada (Howell et al., 2003). Garantizar la estabilidad del genotipo en el tiempo (evitando mutaciones somaclonales) es de suma importancia en la conservación *in vitro* de cultivos de propagación clonar (p.ej. camote, papa, yuca, etc.).

El medio nutritivo proporciona a la planta todos los elementos esenciales requeridos para su crecimiento y desarrollo y puede contener, entre otros, los siguientes componentes: fuente de carbono (generalmente sacarosa o glucosa), iones minerales en forma de una mezcla compleja de sales (macro- y micronutrientes), vitaminas (B1, B2, B3, B5, B6, C), agente gelificante (para medios semisólidos, p.ej. agar o phytigel), reguladores de crecimiento (auxinas, citocininas, giberelinas) y otras sustancias orgánicas (agua de coco, aminoácidos, proteínas, ácidos orgánicos, antioxidantes, carbón activado, etc.) (Roca y Mroginski, 1991).

El establecimiento de condiciones físicas adecuadas de incubación es otro factor sustancial para la obtención de plántulas *in vitro* (Thorpe, 1994). El desarrollo y la diferenciación de plántulas *in vitro* es fuertemente influenciado por las condiciones de temperatura y luz (intensidad de iluminación, fotoperiodo, composición espectral) y varían en función de la especie (Hughes, 1981). Las temperaturas de incubación se establecen generalmente en un rango de 22 a 28 °C. La intensidad luminosa se expresa preferiblemente en unidades cuánticas, es decir en términos de densidad de flujo de fotones fotosintéticamente activos ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ o $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; [μE] = microeinstein). La mayoría de los cultivos requieren densidades de 50-200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Otras medidas alternativas de luz son la iluminancia e irradiancia. La iluminancia es definida como la densidad superficial de intensidad luminosa en una dirección dada y se expresa generalmente en lux (o lúmenes/m²). La irradiancia es definida como la energía radiante interceptada por unidad de tiempo y unidad de área, y se

expresa en $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$, $\text{J}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ o $\text{erg}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Reed et al., 2004). La energía de un microeinstein varía inversamente proporcional con la longitud de onda de la luz lo que impide una transformación exacta entre las unidades lux y $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ sin conocer el espectro exacto de la fuente de luz utilizado. Frecuentemente se utiliza como fuente de iluminación tubos fluorescentes de luz blanca y fría para cual se ha establecido la siguiente transformación aproximada: $1 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1} = 74 \text{ lux}$ (Apogee Instruments, 2012).

Los cultivos *in vitro* se incuban, generalmente, con fotoperiodos de 16h/12h o 12h/12h, donde el primer y segundo valor de cada relación corresponden a las horas de exposición a luz y oscuridad, respectivamente.

La conservación *in vitro* a mediano plazo (o de crecimiento mínimo) tiene como objetivo incrementar el periodo comprendido entre dos etapas sucesivas de sub-cultivo para maximizar el tiempo de permanencia de una planta viable en el mismo recipiente, sin tener que realizar su regeneración (o sub-cultivo). La reducción del crecimiento de la planta puede lograrse vía su exposición a condiciones físicas, químicas y nutricionales especiales, en función de la especie y su genotipo (Reed et al., 2004).

Las condiciones físicas de temperatura baja (especies de zonas templadas: $8 \text{ }^\circ\text{C}$ o menos, especies tropicales: $15\text{-}28 \text{ }^\circ\text{C}$), intensidad luminosa baja ($15\text{-}40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), fotoperiodo restringido, dimensiones mínimas de espacio para la planta (p.ej. tubos de ensayo angostos), disponibilidad mínima de oxígeno y exposición al estrés hídrico pueden reducir el crecimiento de la planta (Reed et al., 2004).

El crecimiento vegetal *in vitro* puede retardarse químicamente vía la agregación de osmoreguladores (p.ej. sorbitol, manitol, sacarosa, etc.) o reguladores de crecimiento (p.ej. ácido abscísico) al medio de cultivo. Similarmente puede lograrse un retardo del crecimiento vegetal *in vitro* si se reduce la cantidad de nutrientes en el medio de cultivo (macro- y micronutrientes) (Reed et al., 2004).

b5.2 Conservación *in vitro* a largo plazo: Criopreservación

La criopreservación se define como el almacenamiento de especímenes biológicos a temperaturas ultra bajas (-196°C), dentro de un medio criogénico (p.ej. nitrógeno líquido) de tal manera que se mantiene la viabilidad y capacidad de regeneración de la planta (Kaczmarczyk et al., 2011; Withers y Engelmann, 1997). Bajo estas condiciones extremas se detienen todos los procesos bioquímicos y físicos lo que permite la conservación de las muestras (explantes) por un periodo de tiempo teóricamente ilimitado. La criopreservación posibilita la conservación de germoplasma en un espacio muy reducido, protegido de contaminación, con un bajo costo de personal y material (Engelmann, 2004). Por ende la criopreservación representa, actualmente, la mejor opción para la conservación de germoplasma a largo plazo de especies con semillas no ortodoxas, de propagación vegetativa, y de productos biotecnológicos (Engelmann, 2004).

Diferentes tipos de explante, como ápices caulinares, meristemos, anteras, protoplastos, callos, y suspensiones celulares han sido criopreservados (Roca y Mroginski, 1991). En vegetales existen dos principales grupos de técnicas de criopreservación, las técnicas de vitrificación parcial (o técnicas clásicas de criopreservación) y las de vitrificación completa (o técnicas modernas) (Withers y Engelmann, 1997). Las técnicas de vitrificación parcial implican el enfriamiento lento hasta una temperatura determinada de pre-congelamiento (deshidratación vía congelamiento), seguido por la rápida inmersión de las muestras en nitrógeno líquido. En las técnicas modernas de criopreservación (vitrificación completa) se realiza la deshidratación antes del congelamiento, exponiendo las muestras a medios crioprotectores altamente concentrados y/o la desecación vía aire o silica gel, para luego sumergirlas rápidamente en nitrógeno líquido (Sakai et al., 1990). Las técnicas nuevas se distinguen de las clásicas por su practicidad que permite criopreservar órganos complejos (ápices meristemáticos caulinares, embriones). Los órganos complejos, como por ejemplo yemas caulinares apicales, están formados por diferentes tipos de células lo que dificulta la aplicación de la criopreservación clásica, por tener cada tipo de célula un comportamiento particular bajo las condiciones de deshidratación inducida por congelamiento. Los procesos críticos en las técnicas nuevas son la deshidratación en la etapa de pre-congelamiento, el tratamiento con crioprotectores, el

proceso de descongelamiento y el cultivo post-descongelamiento. La reducción del contenido intracelular de agua a niveles suficientemente bajos, varía en función de la técnica y el tipo y características del explante utilizado (Engelmann, 1997). Para toda criopreservación exitosa de tejidos biológicos, independientemente de la técnica aplicada, debe evitarse de cualquier manera, la formación intracelular de cristales de hielo (Panis y Lombardi, 2005).

2.3 FUNDAMENTOS TEÓRICOS DE LA CRIOPRESERVACIÓN

2.3.1 VITRIFICACIÓN

Vitrificación se define como la solidificación de un líquido sin cristalización. La mayoría de las sustancias sólidas posee una estructura cristalina con moléculas ordenadamente enlazadas entre sí (Figura 1a). Los líquidos, en cambio, son sustancias continuas y amorfas en las cuáles las moléculas están ubicadas en forma desordenada sin enlaces rígidos entre sí (Figura 1b). El estado de vitrificación (o de vidrio) se caracteriza por la falta de estructuras organizadas sin que se pierdan las propiedades mecánicas y físicas de un sólido (Figura 1c). (Gibbs, 1996)

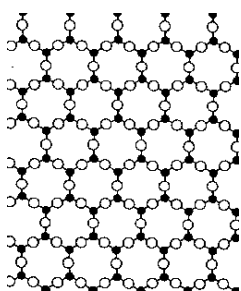


Figura 1a:
Estado Sólido

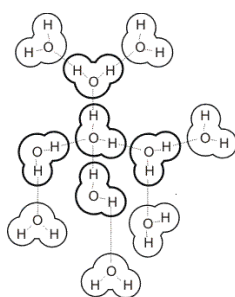


Figura 1b:
Estado Líquido

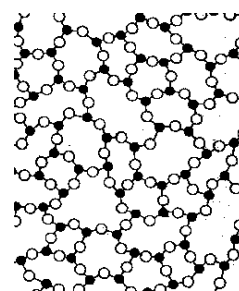


Figura 1c:
Estado de Vitrificación

Figura 1: Estructura molecular de los estados de sólido, líquido y de vitrificación

El estado de vitrificación puede establecerse vía enfriamiento super-rápido, el tratamiento con agentes crioprotectantes altamente concentrados, o la combinación de ambos. Volúmenes muy pequeños (1 nl) se enfrían en nitrógeno líquido muy rápidamente, con una tasa de aprox. 130000 °C/min. Los crioprotectantes altamente concentrados (hasta 50% en términos de masa) incrementan principalmente la viscosidad de la solución (Zhmakin, 2009). El incremento de viscosidad permite el super-enfriamiento de soluciones, manteniéndolas en estado líquido por debajo de su punto de fusión (no se encuentran lugares de nucleación para iniciar la cristalización). Si se incrementa la viscosidad suficientemente durante el proceso de

enfriamiento se puede formar un sólido amorfo (o estado de vidrio). Las moléculas del vidrio están en un arreglo desordenado, pero fijadas vía enlaces cohesivos (Figura 1c) (Gibbs, 1996).

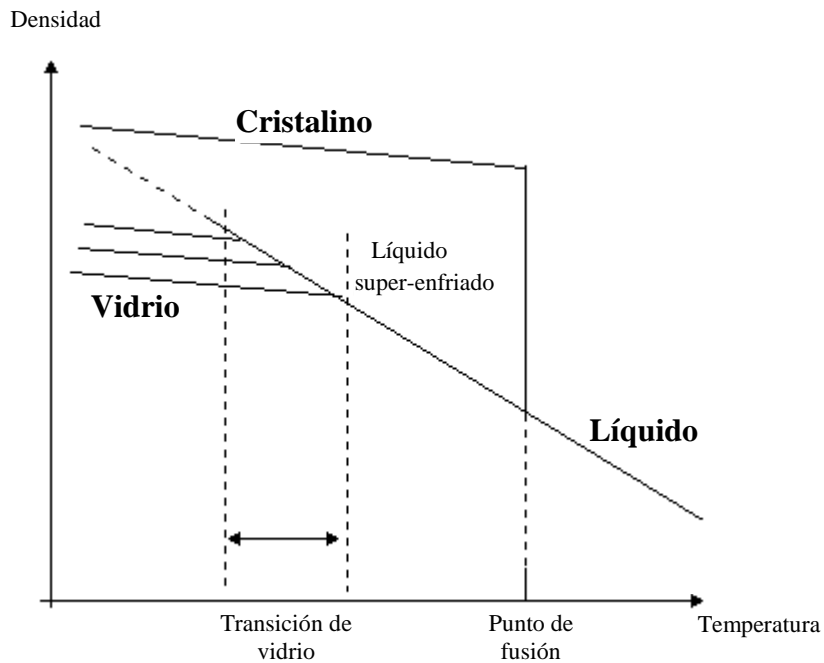


Figura 2: Densidad vs. temperatura en el proceso de vitrificación (adaptado de Gibbs, 1996)

2.3.2 CRIOPROTECTORES

Los agentes crioprotectores (ACP), criopreservantes o crioprotectores son sustancias hidrosolubles, no precipitantes, que disminuyen el punto de congelamiento del agua.

Los ACPs deben poseer toxicidad baja que permite su uso a altas concentraciones y pueden clasificarse en criopreservantes penetrantes y no-penetrantes (Pegg, 2007; Bacter et al., 2006).

a. Crioprotectores penetrantes

Los ACPs penetrantes son de bajo peso molecular y permeables a través de la membrana celular, como son por ejemplo glicerol, etilenglicol y dimetil sulfóxido (DMSO) (Bacter et al., 2006).

Glicerol (glicerina o 1,2,3-propanotriol), $C_3H_8O_3$ (Figura 3), es un alcohol con 3 grupos hidroxilos, es higroscópico, hidrosoluble, inodoro, de baja toxicidad y sabor dulce, con alto coeficiente de viscosidad. El glicerol es un cosmótropo no iónico que forma enlaces de puentes de hidrógeno fuertes con moléculas de agua compitiendo así con los enlaces de puentes de hidrógeno que se forman naturalmente entre las moléculas de agua. El glicerol contribuye al super-enfriamiento del agua, a una concentración de 60-70% de glicerol (disuelto en agua) se establece un punto de congelamiento de $-37.8\text{ }^{\circ}\text{C}$. Por su carácter cosmotrópico ayuda en interrumpir la formación de la estructura cristalina del hielo durante el proceso de congelamiento (SDA, 1990).

Dimetilsulfóxido (DMSO), CH_3SOCH_3 (Figura 3), es un solvente bipolar aprótico, hidrosoluble, que disuelve tanto compuestos polares como no polares (Roy, 2002). El DMSO previene la acumulación excesiva de electrolitos y otras sustancias durante el proceso de congelamiento, evita la formación de cristales de hielo, modula la estabilidad y fases de la bicapa de fosfolípidos de la membrana celular y afecta los procesos de solvatación de agua (Porcu, 2001; Garcia, 1984).

Etilenglicol (EG), $C_2H_6O_2$ (Figura 4) es un líquido incoloro, higroscópico, prácticamente sin olor, de baja volatilidad y viscosidad y es completamente miscible con agua y muchos otros líquidos orgánicos. Las características anti-congelantes del EG se basan en su capacidad de poder super-enfriar el agua. A una concentración de EG de 40% (v/v) se baja el punto de congelamiento del agua hacia aprox. $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$ (MEGlobal, 2009).


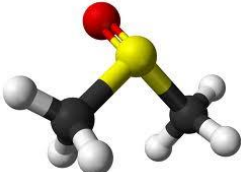

| | Glicerol | Dimetilsulfóxido (DMSO) | Etilenglicol (EG) |
|----------------------------------|--|--|--|
| Fórmula semi- desarrollada | $ \begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{OH} \\ \\ \text{CH} - \text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 - \text{OH} \end{array} $ | $ \begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{H}_3\text{C} - \text{S} - \text{CH}_3 \end{array} $ | $ \begin{array}{c} \text{H}_2 \\ \\ \text{HO} - \text{C} - \text{C} - \text{OH} \\ \\ \text{H}_2 \end{array} $ |
| Modelo de bolas |  |  |  |

Figura 3: Estructura molecular de glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO) y etilenglicol (EG)

b. Crioprotectantes no penetrantes

Los ACPs no-penetrantes son sustancias de alto peso molecular que no penetran a través de la membrana celular, como son por ejemplo sacarosa, glucosa, dextrosa y dextrano. Los crioprotectantes no-penetrantes ayudan a deshidratar la célula vía actividad osmótica, incrementan la tonicidad de soluciones de vitrificación (p.ej. PVS2) y mimetizan la actividad crioprotectora de proteínas extracelularmente (Bacter et al., 2006; Wowk, 2007)

2.4 MÉTODOS DE CRIOPRESERVACIÓN

Existen dos grupos de métodos de criopreservación: (a) criopreservación combinada con un congelamiento programado (criopreservación clásica con vitrificación parcial) y (b) criopreservación con congelamiento rápido (vitrificación completa). Dentro del segundo grupo se reconocen 7 métodos: pre-cultivo, desecación, pre-cultivo y desecación, vitrificación per-sé, encapsulamiento y deshidratación, encapsulamiento y vitrificación, y técnica de la vitrificación en la gota pequeña de PVS2 o DMSO (“Droplet-vitrification”) (Engelmann y Takagi, 2000).

2.4.1 CRIOPRESERVACIÓN CLÁSICA VÍA CONGELAMIENTO PROGRAMADO (VITRIFICACIÓN PARCIAL)

El control preciso del ritmo de enfriamiento, de la nucleación de hielo y la aplicación de crio-protectores coligativos son determinantes para impedir lesiones graves a causa de la formación intra- y extracelular de hielo y de las soluciones coligativas. Como principal crio-protector coligativo penetrante se utiliza al dimetilsulfóxido (DMSO), que se mezcla frecuentemente con aditivos osmo-activos no penetrantes (p.ej. azúcar, polietilenglicol). Al aplicar con el equipamiento programable (p.ej. “Mr Frosty”) un ritmo gradual y controlado de enfriamiento el hielo se forma primero extracelularmente, creándose una gradiente de potencial de agua a través de la membrana celular que hace mover el agua desde el interior hacia el exterior de la célula. Si el ritmo de enfriamiento es muy rápido puede formarse hielo intracelularmente (que es casi siempre letal) y si el ritmo es muy lento puede concentrarse el soluto celular excesivamente (lesiones por coligación excesiva). El ritmo de enfriamiento (“rampa”) es genotipo-dependiente, se encuentra generalmente en un rango de 0.1 a 5.0 °C/min, puede incluir la “siembra” de hielo extracelular, y procede hasta alcanzar la temperatura de transferencia terminal (T_t) de -35 a -40 °C (temperatura de nucleación homogénea). La sumersión de las muestras al nitrógeno líquido puede suceder una vez alcanzado T_t , o después de haber mantenido T_t por un tiempo de 35 a 40 minutos (Benson, 2004; Day y McClellan, 1995; Kartha, 1985; Sakai, 1966; Uemura y Sakai, 1980; Withers, 1975; Withers y King, 1980).

2.4.2 MÉTODOS DE CRIOPRESERVACIÓN VÍA CONGELAMIENTO RÁPIDO (VITRIFICACIÓN COMPLETA)

a. Método de pre-cultivo

El método de pre-cultivo consiste en el cultivo de explantes en medio nutritivo enriquecido con crioprotectores, seguido por un congelamiento rápido por inmersión directa en N₂ líquido (p.ej. meristemos de *Musa*) (Panis et al., 2002).

b. Método de desecación

El método de desecación radica en exponer los explantes a corrientes de aire (cámara de flujo laminar o aire estéril comprimido) o sílica gel, seguido por su inmersión directa en N₂ líquido. Generalmente, se observa mayor sobrevivencia deshidratando los explantes hasta un contenido de agua de 10 a 20% (a base de peso fresco) (Gonzalez-Arno et al., 2008).

c. Método de pre-cultivo combinado con desecación

El método de pre-cultivo y desecación consiste en una combinación de los dos anteriores, realizándose primero un pre-cultivo en presencia de crioprotectantes, seguido por la deshidratación (corriente de aire estéril, sílica gel), y la final sumersión directa de los explantes al N₂ líquido (p.ej. segmentos nodales de *Asparagus*, cultivos poliembrionarios de palmera aceitera, embriones cigóticos de coco) (Uragami et al., 1990; Assy-Bah y Engelmann, 1992; Dumet et al., 1993).

d. Método de vitrificación

El método de vitrificación, consiste en tratar los explantes con una solución de carga (solución LS) y de vitrificación altamente concentrada (generalmente PVS2 a 0 ó 25 °C), seguido por su inmersión en N₂ líquido (dentro de crioviales). El método de vitrificación incluye frecuentemente etapas de pre-cultivo y pre-tratamiento con el objetivo de inducir una

tolerancia a deshidratación y congelamiento en los explantes. El descongelamiento sucede en forma rápida sumergiendo los crioviales en baño maría de agua estéril (40 °C). El resto de solución de vitrificación se elimina lavando el explante en una solución de descarga (solución RS) (Withers y Engelmann, 1997).

e. Método de encapsulamiento-deshidratación

El método de encapsulamiento-deshidratación reside en un previo encapsulamiento del explante en una “perla” de alginato de calcio, seguido por su pre-cultivo en medio líquido con alta concentración de sacarosa, desecación, congelamiento rápido, y descongelamiento lento. El encapsulamiento del explante permite su deshidratación drástica, hasta un 25% de contenido de humedad (peso fresco) (Gonzalez-Arno y Engelmann, 2006). Se ha reportado éxitos de este método con embriones somáticos de zanahoria (Dereuddre et al., 1991), ápices de remolacha azucarera (Gonzales-Arno et al., 1993), semillas de orquídeas junto con su hongo simbiote (Wood et al., 2000), ápices caulinares de *Coffea* (Mari et al., 1995), *Vitis vinifera L.* (Plessis et al., 1991; Zhao et al., 2001), *Solanum tuberosum* (Grospietch et al., 1999), *Ipomoea batatas* (Pennycooke y Towill, 2001), *Pyrus communis* (Dereuddre et al. 1990; Scottez et al., 1992), etc.

f. Método de encapsulamiento-vitrificación

El método de encapsulamiento-vitrificación combina el encapsulamiento de los explantes en “perlas” de alginato con la técnica de vitrificación anteriormente descrita, derivando generalmente en un tratamiento de las “perlas” con soluciones LS y PVS2, y su descongelamiento en RS. Esta técnica se aplicó exitosamente a un gran número de especies, como: ñame (Hirai, 2001; Hirai y Sakai, 2001), piña (Gamez-Pastrana et al., 2004), camote (Hirai y Sakai, 2003), yuca (Hirai, 2001; Charoensub et al., 2004), etc.

g. Método de vitrificación en la gota pequeña de PVS2 o DMSO

El método de vitrificación en la gota pequeña (“droplet”) de PVS2 o DMSO consiste en tratar los explantes con solución LS y PVS2 o DMSO, para luego colocarlos junto con una gota de PVS2 o DMSO sobre una tira de papel platino, que se sumerge en N₂ líquido. El descongelamiento se logra sumergiendo las tiras directamente a solución RS (sin baño maría). A causa del mínimo volumen de PVS2 o DMSO en el cual se encuentran los explantes (gota o “droplet”) pueden lograrse altos ritmos de enfriamiento y recalentamiento (Sakai y Engelmann, 2007). Varias especies pudieron criopreservarse exitosamente con la técnica de droplet-vitrificación: *Ipomoea batatas* (Pennycooke y Towill, 2001), *Solanum tuberosum* (Keller y Dreiling, 2003; Criel et al., 2005; Kim et al., 2006), *Musa sp.* (Panis et al., 2005), etc.

2.5 CRIOPRESERVACIÓN DE CAMOTE

La criopreservación exitosa de ápices caulinares de camote se ha reportado con la aplicación de los siguientes métodos: vitrificación en solución de Steponkus, vitrificación en la gota pequeña de PVS2, encapsulamiento-deshidratación, encapsulamiento-vitrificación, En el año 1992 se reportaron las primeras criopreservaciones exitosas de camote vía los métodos de vitrificación en solución de Steponkus (Schnabel-Preikstas et al., 1992) y vitrificación en la gota pequeña de PVS2 (Towill y Jarret, 1992). Pennycooke y Towill han sido los primeros que aplicaron en camote el método de encapsulamiento-deshidratación (Pennycooke y Towill, 2000). Hirai y Sakai pueden considerarse como pioneros en la aplicación del método de criopreservación de encapsulamiento-vitrificación en camote (Hirai y Sakai, 2003).

2.5.1 VITRIFICACIÓN EN LA SOLUCIÓN DE STEPONKUS

a. Schnabel-Preikstas, Earle, Steponkus (1992)

Schnabel- Preikstas et al. pre-cultivaron yemas apicales de camote (cultivar ‘Georgia Red’ , de 1.0 mm de tamaño con 1-2 primordios foliares) sobre medio de cultivo rico en sacarosa (0.4 M) y trataron los ápices con la solución de vitrificación de Steponkus compuesta por medio MS (Murashige y Skoog, 1962), con 50% de [w/v] etilenglicol [EG], 15% [w/v] sorbitol y 6% [w/v] suero albumina de bovino [BSA]. Se sumergieron los ápices directamente en nitrógeno líquido; el descongelamiento se realizó en medio MS enriquecido con 1.5M de sorbitol. Se post-cultivaron los ápices descongelados en medio MS semi-sólido enriquecido con AIA y kinetina. Se observaron PSAs y PRAs de 71% y 23% respectivamente. La mayoría de los ápices sobrevivientes formaron callo (Schnabel-Preikstas et al., 1992).

b. Plessis, Steponkus (1996)

Plessis y Steponkus modificaron en el año 1996 el medio y proceso de recuperación de post-cultivo de las yemas apicales descongeladas, por 2 semanas, sobre medio MS

suplementado con kinetina y AG3, para luego transferirlas en un medio de cultivo libre de hormonas. Se observaron en el cultivar 'Georgia Red' PSAs y PRAs de 76% y 47% respectivamente (Plessis y Steponkus, 1996).

c. Golmirzaei, Panta, Diaz (2000)

Golmirzaei et al. aplicaron el método de Schnabel-Preikstas (1992) Plessis, pero utilizaron un medio de recuperación modificado (medio MS suplementado con 2 mg/l de pantotenato de calcio, 100 mg/l arginina, 200 mg/l de ácido ascórbico, 20 mg/l de putrescina, 20 mg/l de AG3, 5 ml/l de agua de coco y 0.09M de sacarosa). En los cultivares 'Jewel', 'Maria Angola', 'Jonathan', 'Morada Inta', 'Chugoku' y 'TIB 10' se reportaron PRAs de 0-26% (Golmirzaie et al., 2000).

2.5.2 VITRIFICACIÓN EN LA GOTA PEQUEÑA DE PVS2

a. Towill, Jarret (1992)

Towill y Jarret han sido los primeros que aplicaron el método de vitrificación en la gota pequeña de PVS2 en camote (Towill y Jarret, 1992). Su investigación estaba basada en publicaciones importantes de Kartha, Leung y Mroginski (desarrollaron el método de criopreservación en la gota pequeña para yuca) y Sakai, Kobayasi y Oiyama (desarrollaron la solución de vitrificación de plantas 2 [PVS2] para naranja Novel) (Kartha et al., 1982; Sakai et al., 1990). Towill y Jarret escindieron ápices caulinares axilares (cultivares PI 508515 y PI 290657, de 0.5-0.7 mm de longitud con 3-4 primordios foliares) de plantas madres de 8-12 semanas de edad. Los ápices se trataron gradualmente con diferentes concentraciones y tiempos de exposición de PVS2. Se utilizó como soporte de congelamiento para las yemas, pequeñas franjas estériles de papel (5x10 mm) que se doblaron antes de sumergirlas al nitrógeno líquido. Se reportaron PSAs de 64% y 26% para PI 508515 y PI 290657 respectivamente. En el cultivar PI 508515 se observó los mejores resultados si se crioprotejieron los ápices por 60, 10, 5 y 10 minutos a concentraciones de PVS2 de 20%, 40%,

60% y 80% respectivamente. En todos los experimentos se observó la formación de callo (Towill y Jarret, 1992).

b. Pennycooke, Towill (2000)

Basados en esta experiencia, Pennycooke y Towill evaluaron los efectos de pre-cultivo con sacarosa, tratamiento con solución de carga (LS), posición del ápice en la planta madre, exposición a la luz previa a la escisión y composición del medio de recuperación (Pennycooke y Towill, 2000). Se escindieron yemas apicales y axilares (cultivar PI 290657, longitud 0.5-1.0 mm, con 2-3 primordios foliares) de plantas madres de 4-8 semanas de edad que han sido sub-cultivadas en medio MS $\frac{1}{2}$ (mitad de concentración de NH_4NO_3 y KNO_3). Se pre-cultivaron las yemas por 24 horas en medio MS líquido (2% de sacarosa) seguido por 24 horas en medio MS líquido rico en sacarosa (0.3 M; 0.5M; 0.75M). Las condiciones de incubación se establecieron con un fotoperiodo de 16h/8h de luz y oscuridad con $60 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, a una temperatura de 25 °C. Las yemas fueron sido tratadas durante 20 ó 60 minutos con solución de carga (LS), antes de crioprotegerlas con PVS2 por tiempos de 10, 16 y 26 minutos. Como soporte de congelamiento se utilizó franjas delgadas de papel aluminio esterilizado (40 x 2 mm), sobre las cuales se colocaron las yemas junto con un pequeño volumen de PVS2 (10 μl). Las franjas se introdujeron directamente en nitrógeno líquido donde se mantenían por 1 hora antes de proceder con su descongelamiento en solución de recuperación (RS) por 20 minutos. Los ápices descongelados se post-cultivaron sobre medio MS semi-sólido, suplementado con 1 μM de ANA, 0.5 μM de BA y 0.1 μM de Kinetina. Se incubaron las yemas por 2 días en oscuridad, seguido por 3 días en luz difusa ($40 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). El pre-cultivo en medio MS con 0.3M de sacarosa mostró significativamente mejores resultados de sobrevivencia que con 0.5M o 0.75M. El mayor PRA ($66\pm 9\%$) se reportó crioprotegiendo los ápices por 60 y 16 minutos con LS y PVS2 respectivamente. Ápices terminales ($62\pm 13\%$) mostraron mejores resultados que los ápices ubicado en posición sub-apical ($45\pm 26\%$), central ($28\pm 16\%$) o basal (0%). Ápices que se escindieron directamente después del periodo de oscuridad (8 horas) mostraron PSAs más altos en comparación con ápices que se escindieron después de exponerlos a condiciones de luz (3 ó 10 horas) (Pennycooke y Towill, 2000).

c. Pennycooke, Towill (2001)

Pennycooke y Towill reportaron en el año 2001, que la eliminación del ion NH_4^+ del medio de post-descongelamiento mejora notoriamente la repuesta de recuperación de los ápices descongelados (Pennycooke y Towill, 2001). El protocolo aplicado se basó en los resultados de su publicación del año anterior, con tiempos de crioprotección de 60 y 20 minutos con LS y PVS2 respectivamente. Los ápices descongelados se cultivaron por 5 días encima de medio MS libre de NH_4^+ , suplementado con 1 μM de ANA, 0.5 μM de BA y 0.1 μM de Kinetina, para luego transferirlas en medio MS normal para su re-crecimiento. En los cultivares ‘PI 290657’, ‘PI 573324’, ‘PI 508515’ y ‘W-235’ se observaron PRAs de 62-92% (Pennycooke y Towill, 2001).

d. Hardemann (2006)

Hardemann estudio el efecto del tiempo de tratamiento con PVS2 en función del número de hojas primordiales presentes en el ápice caulinar axilar escindido. Plantas madres de camote (cultivares ‘Ibarreno’ y ‘TIS 87/0029’) se sub-cultivaron por 4-8 semanas en medio MS (2.5% de sacarosa) a 25 °C con un fotoperiodo de 16h/8h. Se escindieron ápices caulinares axilares de 1 mm³ de tamaño, con 2 o 4 hojas primordiales. Los ápices se colocaron por un tiempo de 1-5 horas encima de papeles filtro en medio MS (hasta haberse terminado el proceso de escisión). Se trataron los ápices por 20 minutos con LS (T° ambiental) y 15 minutos con PVS2 (0 °C), respectivamente, seguido por un enjuague en RS por 20 minutos (sin evento de congelamiento). El cultivo de recuperación se realizó por 9 días encima de medio MS en oscuridad, para luego exponer los ápices a condiciones normales de luz. En el cultivar ‘Ibarreno’ se observó los mayores porcentajes de sobrevivencia con tiempos de tratamiento de PVS2 de 30 y 40 minutos para ápices con 2 y 4 primordios foliares, respectivamente. El cultivar ‘TIS 87/0029’ mostró una mejor sobrevivencia cuando se trataron ápices de 2 primordios por 15 minutos con PVS2. Cuando se congelaron los ápices en nitrógeno líquido no pudo reportarse recuperación (PRA: 0%) en la etapa de post-descongelamiento (Hardemann, 2006).

e. Verleije (2008)

Basada en el experiencia de Hardemann, Verleije estudió el efecto de la posición de los ápices en la planta madre, el pre-cultivo con medios de cultivo rico en sacarosa y la composición del medio de cultivo de post-descongelamiento aplicando el método de vitrificación en la gota pequeña de PVS2 (Verleije, 2008). Se sub-cultivaron plantas madres de camote (cultivares 'Jewel', 'TIS 87/0029', 'Ibarreno', 'Tanzania') en medio MS (condiciones de incubación: 24 ± 1 °C, fotoperiodo de 16h/8h). Se escindieron ápices caulinares terminales y axilares (tamaño: aprox. 1.0 mm^3) de plantas madres, de 4-5 semanas de edad, que se pre-cultivaron por 1-3 días en medio MS con diferentes concentraciones de sacarosa (2.5%, 0.3M). Los ápices se crioprotegieron por 20 minutos (T° ambiental) con LS y 15 minutos con PVS2 (0 °C), se colocaron junto con una gota de PVS2 encima de una franja de papel aluminio esterilizado para luego sumergirlos rápidamente en nitrógeno líquido. Después de un tiempo mínimo de permanencia de 15 minutos en N_2 líquido, se descongelaron los ápices por 20 minutos en RS (T° ambiental). Posterior al descongelamiento se cultivaron los ápices en oscuridad por 2 días en medio MS con 0.3M de sacarosa, seguido por 7 días en medio MS normal (2.5% de sacarosa). Finalmente los ápices se sometieron a condiciones normales de luz (fotoperiodo de 12h/24h, temperatura de 25.9 °C). Los ápices ubicados en posición secundaria mostraron un *PRA* medio (14%) significativamente mejor que los ápices ubicados en posición terminal, tercera o cuarta. Los tratamientos de pre-cultivo por 1 día en medio MS normal (2.5% de sacarosa) y de 1 día en medio MS seguido por 1 día en medio MS rico en sacarosa (0.3M) mostraron *PRA*s medios significativamente mejores de, 50 y 54%, respectivamente. El pre-cultivo por 1 día en medio MS rico en sacarosa (0.3M) resultó en un *PRA* medio de 42%. Sin pre-cultivo (control) pudo observarse un *PRA* medio de 30%. Entre los 3 medios de recuperación evaluados (MS, $\frac{1}{2}$ MS, medio de Hirai), solamente pudo observarse diferencias significativas en uno de los cuatro cultivares ('Ibarreno'). En todos los ensayos se observó la formación de callo. (Verleije, 2008).

2.5.3 ENCAPSULAMIENTO-DESHIDRATACIÓN

a. Pennycooke, Towill (2001)

Se escindieron yemas apicales de tallo de 0.5-1.0 mm de tamaño (cultivar 'PI 290657', con 2-3 primordios foliares) de plantas madres de 4-8 semanas de edad. Se pre-cultivaron las yemas en medio MS (2% de sacarosa) por 24 horas y se suspendieron en un medio modificado de alginato de acuerdo a la técnica descrita por Dereuddre et al. (1990). El medio de alginato estaba suplementado con sales de MS modificado (sin calcio y nitrato de amonio), 3% (m/v) de solución de alginato de sodio y 0.3M de sacarosa. Dejando caer las yemas (contenidas en gotas de solución de encapsulamiento) en solución de 100 mM de cloruro de calcio se formaron perlas de 4-5 mm de diámetro (cada perla contiene una yema). Habiéndose tratado las perlas por 45 minutos en solución de CaCl_2 se pre-cultivaron las perlas a 22 °C, bajo rotación (85 rpm), en medio líquido cuya concentración de sacarosa se incrementó diariamente (1 día: 0.3M, 1 día: 0.5M, 1 día 0.75M). Las perlas se deshidrataron sobre papel filtro estéril bajo la cámara de flujo laminar por 0-7 horas para luego sumergirlas directamente en nitrógeno líquido donde se mantenían por 15-30 minutos a una temperatura de 196-209 °C bajo cero. Las yemas se descongelaron rápidamente en medio MS líquido (2% de sacarosa) a 30 °C por un tiempo de 5 segundos. Las perlas descongeladas se cultivaron por 2 días en oscuridad sobre medio MS (3% de sacarosa) libre de nitrato de amonio, enriquecido con 1 μM NAA, 0.5 μM BAP y 0.1 μM de kinetina. Al tercer día se liberaron las yemas de las perlas, y se siguieron cultivando por 3 días más encima del mismo medio con una intensidad de luz de 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Al quinto día posterior al descongelamiento se transfirieron las yemas a medio MS normal (con NH_4NO_3) suplementado con la misma composición hormonal inicial, bajo condiciones de luz normal (60 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). El PRA más alto (67%) se observó deshidratando las perlas por 4 horas. Bajo estas condiciones se pudo determinar que las perlas tenían un contenido de humedad de 18%.

2.5.4 ENCAPSULAMIENTO-VITRIFICACION

a. Hirai y Sakai (2003)

Se escindieron yemas apicales caulinares (con uno o dos nudos) de plantas madres *in vitro* (cultivares 'Beni-azuma' 'Chikou-1 gou', 'Kogane-sengan') y se cultivaron por 14 días en placas petri con medio MS [suplementado con 30 g/l de sacarosa, 1g/l de ácido casamino y 2 g/l de gelificante (goma Gellan), pH 5.7]. Las condiciones de incubación fueron de 25 °C de temperatura, 16h/8h de fotoperiodo y de 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de densidad de flujo de fotones. En la siguiente etapa de micropropagación se transferían segmentos nodales sin hojas (de aprox. 8 mm de longitud) hacia un medio basal suplementado con 0.5 mg/l 6-bencilaminopurina (BAP), bajo las mismas condiciones de incubación. Después de 10-14 días de incubación se escindieron yemas apicales con 3-4 primordios foliares (longitud: aprox. 1.0 mm), y se sumergieron en una solución de alginato [medio MS libre de Ca^{2+} suplementado con 2% (p/v) de Na-alginato y 30 g/l sacarosa]. Utilizando una pipeta se dispensaron gotas de solución de alginato (cada gota contenía una yema apical) en medio MS de encapsulamiento suplementado con 0.1M de CaCl_2 y 30 g/l de sacarosa. Las yemas se mantenían en solución de encapsulamiento (a 25 °C) por un tiempo de 30 minutos formándose perlas de aprox. 4 mm de diámetro. Las perlas se transferían, por grupos de 10-15, en frascos de Erlenmayer (100 ml) con 40 ml de medio de pre-incubación [medio MS líquido suplementado con 30 g/l sacarosa, 1 g/l ácido casamino] y se mantenían por 24 horas encima de un agitador rotatorio (90 rpm, 25 °C). Posteriormente se pre-cultivaron las yemas por 16 horas en medio MS líquido enriquecido con 0.3M de sacarosa. Se finalizó la osmo-protección incubando las perlas pre-cultivadas por 3 horas en medio MS líquido [suplementado con 1.6M de sacarosa y 2.0M glicerol] bajo rotación (60 rpm, 25 °C). Para el proceso de vitrificación se deshidrataron 10-15 yemas encapsuladas, previamente pre-incubadas, pre-cultivadas e incubadas, en frascos de Erlenmayer (50 ml) con PVS2 [30% (p/v) de glicerol, 15% (p/v) de etilenglicol, 15% (p/v) de DMSO, 0.4M de sacarosa, pH 5.8], bajo rotación (60 rpm, 25 °C). Posterior a la deshidratación se transfirieron las perlas en 0.5 ml de PVS2 contenido en crio-tubos de 2 ml. Los crio-tubos se sumergieron directamente en nitrógeno líquido (por al menos 1 hora), antes de descongelarlos rápidamente en baño maria (38 °C) por 2 minutos. Se retiró la PVS2

reemplazándola dos veces, en intervalos de 10 minutos, por 1 ml de solución azucarada (1.2M sacarosa). Para el proceso de re-crecimiento se colocaron las perlas descongeladas por 7 días en medio de recuperación 1 (medio MS suplementado con 0.5 mg/l bencilamina, 1 mg/l AG3) antes de transferirlas en medio de recuperación 2 (medio MS suplementado con 0.5 mg/l AG3). La evaluación de la formación de brotes se realizó 21 días después del descongelamiento. Se reportaron PRAs mayor a 80% para los 3 cultivares evaluados (Hirai y Sakai, 2003).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente trabajo de investigación se aplicó el método de criopreservación en la gota pequeña de PVS2. Se evaluaron el efecto de sacarosa en el medio de pre-cultivo (ensayo 1) y el efecto de PVS2 como crioprotector (ensayo 2). Se tamizó los resultados de mejor respuesta de los ensayos 1 y 2 con un grupo de 24 genotipos de camote (ensayo 3).

3.1 MATERIAL VEGETAL

Todo el material vegetal fue obtenido en la forma de plantas *in vitro* del banco de germoplasma del Centro Internacional de la Papa. En el ensayo 1 se utilizó como material vegetal los cultivares CIP 442794 ('TIS 2357'), CIP 440669 ('Cinitavo'), CIP 420665 ('Trujillano'), CIP 187019.1 ('Tacna'), CIP 420952 ('Chilpe Morado'), CIP 420964 ('Colorado'). En el ensayo 2 se utilizó el mismo grupo de cultivares, menos CIP 440669 ('Cinitavo') que fue reemplazado por CIP 420701 ('Pierna de Oso'), a causa de una contaminación del stock de plantas madre con bacterias endógenas. En ensayo 3 se evaluó un grupo de 24 accesiones de camote: CIP 420335 ('Bismambra'), CIP 420040 ('Negrito del Ihuanco'), 421132 ('Blanco de Chilca'), CIP 401205 (sin nombre), CIP 400048 ('Colorada'¹), CIP 400059 ('Blanca'), CIP 400060 ('Colorada'¹), CIP 400077 ('Colorada'¹), CIP 400103 ('Señorita'), CIP 420746 ('Quilikano'), CIP 420872 ('Amarillo'), CIP 420269 ('Napa'), CIP 441038 ('Kengi'), CIP 421061 ('Pampa Culebra NP-30'), CIP 421062 ('Boca de Chisco NP-31'), CIP 421070 ('Ramon Camacho UNPRG 49'), CIP 440449 ('American'), CIP 441103 (sin nombre), CIP 442056 ('9 Catty Variety'), CIP 422656 ('Huambachero'), CIP 400002 ('Morado'), CIP 420027 ('Zapallo'), CIP 420033 ('Zapallo o Costeño'), CIP 420051 ('Chinchano'). Nombre, número de accesión y datos de pasaporte importantes de todas las accesiones utilizadas están descritos en ANEXO 14.

¹ Las accesiones CIP 400048, CIP 400060 y CIP 400077 se conocen bajo el mismo nombre común de 'Colorada'.

3.2 SUB-CULTIVO DE PLANTAS MADRE

Las plantas madre *in vitro* se multiplicaron en tubos de ensayo de 25x150 con medio MPC (ANEXO 11), en periodos de 4-8 semanas (dependiente del cultivar). La composición y preparación de las soluciones stock de vitaminas, sales, hormonas y agua de coco están descritos en ANEXO 13. Como explante de propagación se utilizó segmentos caulinares binodales (colocando dos explantes por tubo de ensayo de 25x150 mm). Se establecieron las siguientes condiciones de incubación: temperatura de 24 ± 1 °C, fotoperiodo de 16h/8h (luz/oscuridad), densidad de flujo de fotones fotosintéticamente activos de $60-70 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Figura 4).

3.3 ESCISIÓN DE YEMAS APICALES

Utilizando pinzas largas (23 cm) de micropropagación *in vitro* y bisturí no. 11 se escindieron, bajo el estereoscopio (aumento x10), yemas apicales caulinares de plantas *in vitro* de camote de 28-35 días de edad. Las yemas tenían un tamaño de 1.0-1.2 mm, con 3-4 primordios foliares. En los ensayos 1, 2 y 3 se escindieron 27, 24 y 30 yemas por repetición respectivamente. Todos los ensayos se repitieron tres veces (ensayo 1: n=81, ensayo 2: n=72, ensayo 3: n= 90; n: número de ápices) (Figura 4).

3.4 PRE-CULTIVO

Para evaluar el efecto de la sacarosa en la etapa de pre-cultivo (ensayo 1) se cultivaron yemas apicales (en grupos de 8, 9 ó 10 dependiente del ensayo), por 24 horas en oscuridad, encima de papel filtro (aprox. 1.0 x 1.0 cm) contenido en placas Petri (Ø: 10 cm, altura: 1.5 cm) con medio de pre-cultivo (MPCC, ANEXO 11). Para el ensayo 1 se suplementó el MPCC con diferentes concentraciones de sacarosa (0.00M; 0.05M; 0.10M; 0.15M; 0.20M; 0.25M; 0.30M; 0.35M; 0.40M; 0.45M; 0.50M; 0.60M). En los ensayos 2 y 3 se pre-cultivaron los ápices en medio MPCC con 0.35M de sacarosa. En todos los ensayos se estableció una temperatura de incubación de 24 ± 1 °C (Figura 4).

3.5 CRIOPROTECCIÓN

Se introdujeron las yemas apicales pre-cultivadas (junto con el papel filtro de soporte) en pequeños tubos de ensayo estériles (15 ml, con tapa de rosca) con 2.0 ml de solución de carga (LS, ANEXO 11) previamente esterilizada vía filtración. Se trataron las yemas por un tiempo de 20 minutos con LS, a temperatura ambiental. Utilizando una pipeta Pasteur se retiró la solución LS del tubo para reemplazarla con solución de vitrificación 2 esterilizada (PVS2, ANEXO 11). Para evaluar el efecto de PVS2 (ensayo 2) se expusieron las yemas a PVS2 por diferentes tiempos (15, 30, 45 o 60 min con PVS2), a una temperatura de 0 °C. En el ensayo 1 se trató las yemas por 15 minutos con PVS2 y en el ensayo 3 por 30 minutos (Figura 4).

3.6 CONGELAMIENTO

Habiéndose terminado el tratamiento con PVS2, se absorbieron las yemas, junto con algo de PVS2, en una pipeta Pasteur. Se expulsó el PVS2 de la pipeta de tal forma que las yemas quedaran sumergidas en una cantidad muy pequeña de PVS2 en la punta de la pipeta. Se colocaron las yemas (8, 9 ó 10, ver punto 3.4) conjuntamente con una gota de PVS2 encima de una pequeña franja de papel aluminio esterilizado (5 x 20 mm, con doblez de aprox. 3 mm en un extremo), y esta última se sumergió, rápidamente, directamente en nitrógeno líquido. El nitrógeno líquido estaba contenido en un contenedor de tecnopor con revestimiento especial que soportaba crio-viales de 1.8 ml (con hilo interno y fondo redondo). Durante el proceso de congelamiento el nivel de nitrógeno se mantuvo al menos a 1 cm encima de las bocas de los crio-viales. Se transfirieron las franjas de papel aluminio (con las yemas apicales congeladas encima) en los crio-viales, teniendo especial atención a que la franja siempre se mantenga sumergida en nitrógeno líquido durante este proceso (Figura 4).

3.7 DESCONGELAMIENTO

Las yemas se mantuvieron por lo menos 1 hora sumergidas en nitrógeno líquido antes de proceder con el proceso de descongelamiento. Se introdujeron las franjas de papel aluminio rápidamente en 4.0 ml de solución de recuperación esterilizada (RS, ANEXO 12), contenida

en pequeños tubos de ensayo (15 ml, con tapa de rosca). Inmediatamente a la sumersión se sacudió el tubo por aprox. 2-5 segundos para permitir el descongelamiento rápido de todas las yemas. Se mantuvieron las yemas sumergidas por 20 minutos en RS (a temperatura ambiental) (Figura 4).

3.8 CULTIVO POST-DESCONGELAMIENTO

Usando una pipeta Pasteur se absorbieron las yemas contenidas en RS y se colocaron por aprox. 1 minuto encima de pequeños papeles filtros (aprox. 1.0 x 1.0 cm), soportados encima de más grandes (aprox. 3.0 x 3.0 cm), para facilitar el drenaje del RS sobrante. Se deslizaban los pequeños papeles filtros, con las yemas dirigidas hacia abajo, encima de papeles filtros más grandes (aprox. 3.0 x 3.0 cm) que se soportaron en placas Petri (\varnothing : 10 cm, altura: 1.5 cm) con medio de recuperación 1 (MRC-1, ANEXO 12). Utilizando pinzas y el papel filtro de transferencia pequeño se distribuyeron las yemas equidistantemente encima del papel filtro grande de MRC-1. Por placa Petri con MRC-1 se colocó, separadamente por ensayo y tratamiento, con un máximo de 3 papeles filtros por placa Petri (con 8-10 yemas por papel, ver 3.4 y 3.6). Habiéndose incubado las yemas por 3 días en oscuridad a 24 ± 1 °C, se trasladaron los papeles filtros (con las yemas encima) hacia el medio de recuperación 2 (MRC-2, ANEXO 12), siguiendo por 3 días más en oscuridad (a 24 ± 1 °C). Posteriormente se trasladaron los papeles filtros (con las yemas encima) a placa Petri con medio de recuperación 3 (MRC-3, ANEXO 12), incubándolas de nuevo por 3 días en oscuridad (a 24 ± 1 °C). Finalmente se transfirieron las yemas a un MRC-3 fresco, deslizando el papel filtro (con las yemas dirigidas hacia abajo) de tal forma que ahora las yemas se soportaron directamente encima del MRC-3. Por cada placa con MRC-3 solamente se deslizó un papel filtro, así que cada placa terminaba conteniendo 8-10 yemas. Se incubaron las yemas por 4 días en luz difusa, colocando un pliegue de papel aluminio encima de las placas (temperatura: 24 ± 1 °C, fotoperiodo: 16h/8h). A partir de entonces se exponen las yemas a condiciones normales de luz, retirando el pliegue de papel aluminio ($60-70 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) (Figura 4).

3.9 EVALUACIÓN DE SOBREVIVENCIA Y RE-BROTAMIENTO

28-32 días posteriores al evento de descongelamiento se evaluaron, bajo el estereoscopio (aumento: x10), la sobrevivencia y el re-brotamiento de las yemas. Se registraron en cada placa Petri, separadamente por tratamiento y ensayo, el número de yemas total, sobrevivientes y re-brotadas. Se consideró una yema como sobreviviente si pudo observarse nacimiento de tejido verde en la yema. Se consideró una yema como re-brotada si pudo observarse la formación de un brote completo (sin formación intermedio de callo) a partir de la zona domal. Como unidad experimental se consideró un conjunto de 3 placas Petri por tratamiento y repetición conteniendo un total de 24-30 yemas apicales de tallo (dependiente del ensayo). Considerando las 3 repeticiones de cada ensayo, se evaluaron 72-90 yemas apicales de tallo por tratamiento.

3.10 DISEÑO Y EVALUACIÓN ESTADÍSTICA

En los ensayos 1 y 2 se aplicó un diseño experimental completamente al azar (DCA) con arreglo factorial. En el ensayo 1 se evaluaron dos factores: el efecto de genotipo y concentración de sacarosa en el medio de pre-cultivo. El factor genotipo incluía 6 niveles (CIP 442794, CIP 440669, CIP 420665, CIP 187019.1, CIP 420952, CIP 420964), el factor concentración de sacarosa 12 niveles (0.00M; 0.05M; 0.10M; 0.15M; 0.20M; 0.25M; 0.30M; 0.35M; 0.40M; 0.45M; 0.50M; 0.60M), formándose un grupo de 72 tratamientos por repetición. La unidad experimental estaba formada por un conjunto de 3 placas, con 9 yemas apicales por placa (n=27).

El ensayo 2 evaluó los factores del efecto de genotipo y tiempo de crioprotección con PVS2. El factor genotipo incluía 6 niveles (CIP 442794, CIP 420701, CIP 420665, CIP 187019.1, CIP 420952, CIP 420964), el factor tiempo de crioprotección con PVS2, 4 niveles (15 min; 30 min; 45 min; 60 min), formándose un grupo de 24 tratamientos por repetición. La unidad experimental estaba formada por un conjunto de 3 placas, con 8 yemas apicales por placa (n=24).

En el ensayo 3 se aplicó un diseño experimental completamente al azar (DCA) para evaluar un grupo de 24 accesiones de camote (ver 3.1) con el mejor tratamiento resultante de los ensayos

1 y 2. La unidad experimental estaba formada por un conjunto de 3 placas, con 10 yemas apicales por placa ($n=30$). Todos los ensayos (ensayo1, ensayo2, ensayo 3) se repitieron 3 veces.

Los análisis estadísticos se realizaron bajo utilización del programa Minitab (V16). Las tasas de sobrevivencia y re-brotamiento de cada unidad experimental se expresaron dividiendo los números de yemas sobrevivientes y re-brotadas entre el número total de yemas congeladas (p.ej. ensayo 1: si sobrevivían 18 yemas de 27 congeladas, la tasa de sobrevivencia es de $18/27 = 0.67$). Valores de tasa de sobrevivencia y recuperación de 0 han sido reemplazados por $0 + [1/(4n)]$, valores de 1 han sido reemplazados por $1 - [1/(4n)]$, donde n es el número de individuos tratados independientemente por cada unidad (Gomez y Gomez, 1984) (p.ej. ensayo 1: si sobrevivían 0 yemas de 27 congeladas, la tasa de sobrevivencia es de $0/27 = 0$ y de acuerdo a Gomez y Gomez se obtiene: $0 + (1/4n) = 0 + [1/(4*27)] = 1/108 = 0.00926$). Para lograr una distribución normal de los datos se transformaron éstos vía $\arcsen[\sqrt{x}]$, donde x es el valor de tasa de sobrevivencia o recuperación (p.ej. ensayo 1: si re-brotaron 8 de 27 yemas, la tasa de re-brotamiento es $8/27 = 0.2963$; se transformó vía $\arcsen[\sqrt{x}] = \arcsen[\sqrt{0.2963}] = 0.5756$). Se comprobó la distribución normal (prueba de Ryan-Joiner) y homogeneidad de varianzas (prueba de Bartlett) de los datos transformados previa su análisis vía ANOVA. Se realizó la comparación de medias vía el método de Tukey ($\alpha=0.05$). Los datos se presentaron en las tablas y gráficos con sus valores originales.

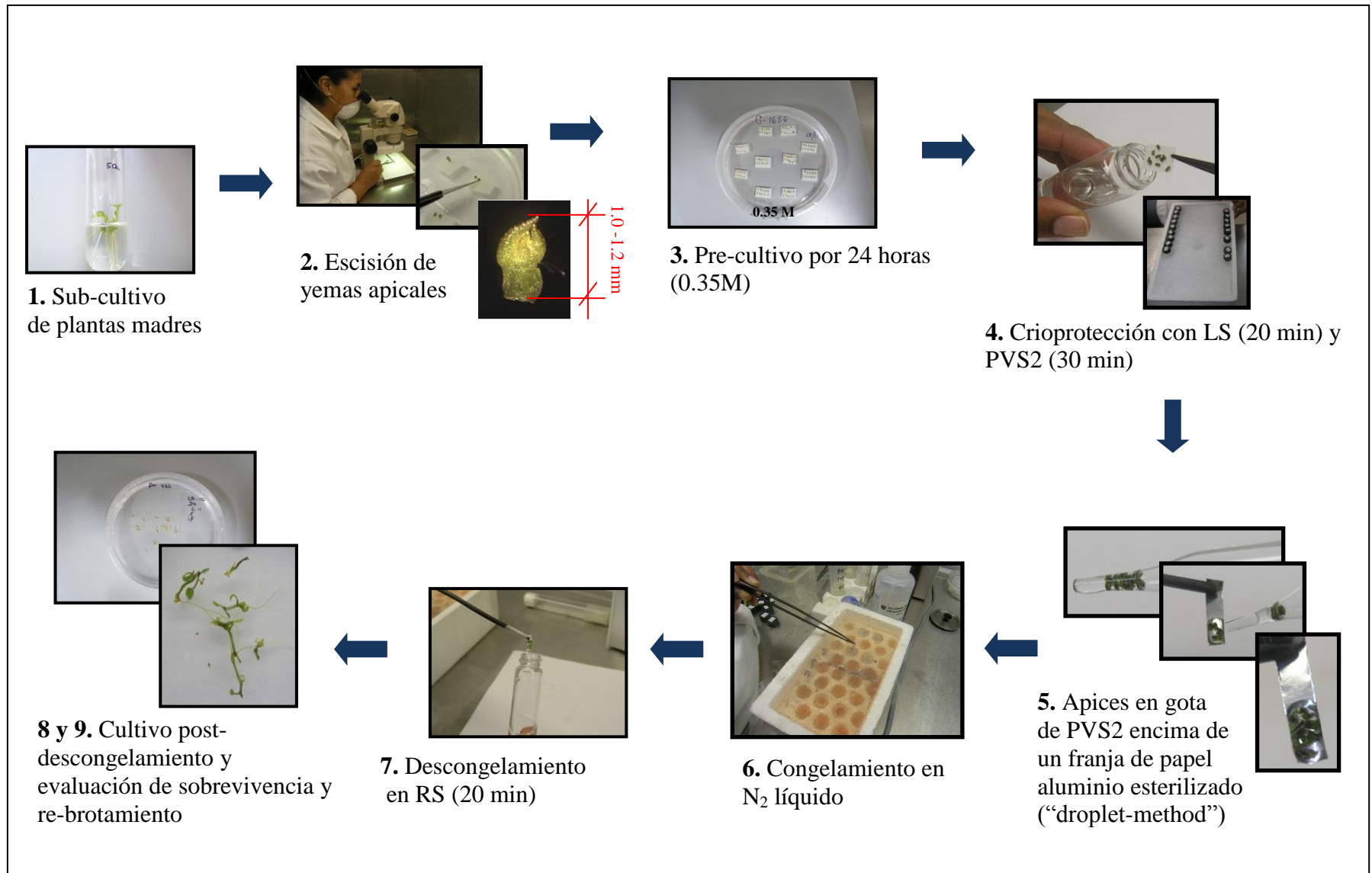


Figura 4: Etapas de la criopreservación de ápices caulinares de camote vía el método de vitrificación en la gota pequeña de PVS2

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. EFECTO DE SACAROSA EN EL PRE-CULTIVO (ENSAYO 1)

El análisis de varianza (ANOVA, $\alpha=0.05$) mostró, para el porcentaje de sobrevivencia de ápices (*PSA*), diferencias estadísticas altamente significativas entre genotipos ($p<0.001$) y concentraciones de sacarosa ($p<0.001$), así como diferencias estadísticas significativas en la interacción genotipo x concentración de sacarosa ($p=0.012$) (ANEXO 1).

De las seis accesiones evaluadas, CIP 442794 ('TIS 2357') mostró en el análisis de factores principales (Tukey, $p<0.05$) el *PSA* significativamente más alto de 83.6%. CIP 440669 ('Cinitavo') y CIP 420665 ('Trujillano') no mostraron diferencias estadísticas significativas entre sí, con 64.3% y 55.6%, respectivamente. Los genotipos CIP 187019.1 ('Tacna'), CIP 420952 ('Chilpe Morado') y CIP 420964 ('Colorado') mostraron *PSAs* más bajos de 39.4%, 37.9% y 30.3%, respectivamente, sin presentarse diferencias estadísticas significativas entre sí (Cuadro 1, Figura 5).

El efecto de genotipo mostró un coeficiente de correlación de Pearson [$r_{(PSA, PRA)}$] entre *PSA* y *PRA* de 0.983.

Con respecto a la concentración de sacarosa no pudo observarse diferencias significativas de *PSA* en un rango de 0.05-0.40M, observándose el *PSA* medio más alto de 68.7% con una concentración de sacarosa de 0.35M. La regresión poligonal (de 4to grado), con *PSA* como variable dependiente y concentración de sacarosa como independiente, mostró un valor de R^2 de 0.937 (Cuadro 1, Figura 6).

El efecto de concentración de sacarosa mostró un coeficiente de correlación de Pearson [$r_{(PSA, PRA)}$] entre *PSA* y *PRA* de 0.988.

Analizando los efectos simples (o de interacción) CIP 442974 (96.3%), CIP 420665 (85.1%) y CIP 420964 (53.1%) mostraron sus mejores *PSAs* a una concentración de 0.35M de sacarosa. CIP 440669 (87.2%) y CIP 187019.1 (65.5%) manifestaron sus *PSAs* más altos a

una concentración de 0.20M de sacarosa. CIP 420952 mostró su mejor respuesta de *PSA* (de 68.5%) a una concentración de 0.40M de sacarosa (ANEXO 3, Figura 7)

Analizando los seis genotipos por separado se observaron en la regresión poligonal (de 4to grado) valores de R^2 de 0.8522, 0.9133, 0.7912, 0.6870, 0.8694 y 0.8599 para los genotipos CIP 442794, CIP 440669, CIP 420665, CIP 420952, CIP 420964 y CIP 187019.1 respectivamente (Figura 7).

El ANOVA ($\alpha=0.05$) del porcentaje del re-brotamiento (*PRA*) manifestó diferencias altamente significativas entre genotipos ($p<0.001$) y concentraciones de sacarosa ($p<0.001$), pero no en su interacción ($p=0.309$) (ANEXO 2).

CIP 442794 mostró el *PRA* significativamente más alto de 67.2%, seguido por CIP 440669 y CIP 420665 (con 43.9% y 40.9% cada uno) que no evidenciaron diferencias estadísticas significativas entre si. Los genotipos de menor respuesta de *PRA*, CIP 420952, CIP 187019.1 y CIP 420964, no presentaron diferencias estadísticas significativas entre si con 30.8%, 27.4% y 21.1% respectivamente (Cuadro 1, Figura 5).

Con respecto al efecto de sacarosa no se observaron diferencias estadísticamente significativas de *PRA* en un rango de 0.1 a 0.4M, con un valor máximo de *PRA* de 68.7% a una concentración de 0.35M de sacarosa. Los *PRA*s con concentraciones de sacarosa de 0.45M y 0.50M no mostraron diferencias estadísticamente significativas con valores de 34.5 % y 24.8% respectivamente. La menor respuesta media de *PRA* de 11.3% y 10.5% se estableció con concentraciones de 0.00M y 0.60M respectivamente (Cuadro 1, Figura 6).

Aunque el ANOVA ($\alpha=0.05$) no reveló diferencias significativas de *PRA* en la interacción genotipo x concentración de sacarosa se realizó el análisis de factores simples para visualizar el comportamiento de cada genotipo individual. CIP 442794, CIP 420665 y CIP 420964 manifestaron a una concentración de sacarosa de 0.35M sus valores *PRA* más altos de 91.1%, 71.4% y 39.5% respectivamente. CIP 440669 y CIP 420952 establecieron sus mejores respuestas de *PRA* a una concentración de 0.30M con valores de *PRA* de 69.7% y 57.5% cada

uno. CIP 187019.1 mostró su mejor respuesta de *PRA* de 46.1% a una concentración de 0.20M (Figura 7, ANEXO 4).

El análisis de regresión (de 4to grado) de *PRA* versus la concentración de sacarosa indicó valores de R^2 de 0.8082, 0.8707, 0.7988, 0.730, 0.8682 y 0.8162 para los genotipos CIP 442794, CIP 440669, CIP 420665, CIP 420952, CIP 420964 y CIP 187019.1 respectivamente (Figura 7).

Cuadro 1: Medias, error standard (SE) y comparación múltiple (Tukey, $\alpha=95\%$) de los efectos principales del porcentaje de sobrevivencia de ápices (*PSA*) y porcentaje de re-brotamiento de ápices (*PRA*) de seis genotipos de camote (CIP 442794, CIP 440669, CIP 420665, CIP 187019.1, CIP 420952, CIP 420964). Previa a la criopreservación vía el método de vitrificación en la gota pequeña de PVS2 (LS: 20 min, PVS2: 15 min, RS: 20 min), se pre-cultivaron las yemas apicales por 24 horas en medio de cultivo MS modificado, suplementado con diferentes concentraciones de sacarosa (0.00-0.60M). La tabla muestra datos originales (sin transformación de datos vía $\arcsin[\sqrt{x}]$ y ajuste de valores para 0 y 100%)

Efecto de genotipo

| | <i>PSA (%)</i> ¹ | ± | SE | <i>PRA (%)</i> ¹ | ± | SE |
|------------------------------|-----------------------------|---|-----|-----------------------------|---|-----|
| CIP 442794 ('TIS2357') | 83.6 ^a | ± | 2.6 | 67.2 ^A | ± | 3.3 |
| CIP 440669 ('Cinitavo') | 64.3 ^b | ± | 3.7 | 43.9 ^B | ± | 3.7 |
| CIP 420665 ('Trujillano') | 55.6 ^b | ± | 4.3 | 40.9 ^B | ± | 4.4 |
| CIP 187019.1 ('Tacna') | 39.4 ^c | ± | 3.7 | 27.4 ^C | ± | 2.9 |
| CIP 420952 ('Chilpe Morado') | 37.9 ^c | ± | 4.3 | 30.8 ^C | ± | 3.7 |
| CIP 420964 ('Colorado') | 30.3 ^c | ± | 3.8 | 21.1 ^C | ± | 3.0 |

Efecto de sacarosa

| | <i>PSA (%)</i> ¹ | ± | SE | <i>PRA (%)</i> ¹ | ± | SE |
|--------|-----------------------------|---|-----|-----------------------------|---|-----|
| 0.00 M | 21.7 ^d | ± | 6.4 | 11.3 ^E | ± | 4.4 |
| 0.05 M | 54.4 ^{ab} | ± | 5.6 | 37.5 ^{BC} | ± | 5.2 |
| 0.10 M | 57.6 ^{ab} | ± | 6.2 | 43.3 ^{AB} | ± | 5.7 |
| 0.15 M | 63.0 ^{ab} | ± | 4.5 | 46.4 ^{AB} | ± | 4.5 |
| 0.20 M | 66.4 ^a | ± | 5.9 | 47.6 ^{AB} | ± | 5.3 |
| 0.25 M | 60.3 ^{ab} | ± | 5.8 | 47.5 ^{AB} | ± | 6.0 |
| 0.30 M | 61.6 ^{ab} | ± | 5.5 | 50.1 ^{AB} | ± | 5.4 |
| 0.35 M | 68.7 ^a | ± | 5.7 | 57.7 ^A | ± | 5.5 |
| 0.40 M | 63.2 ^{ab} | ± | 5.4 | 49.1 ^{AB} | ± | 4.6 |
| 0.45 M | 46.3 ^{bc} | ± | 7.1 | 34.5 ^{BC} | ± | 6.1 |
| 0.50 M | 38.0 ^c | ± | 6.1 | 24.8 ^{CD} | ± | 4.9 |
| 0.60 M | 19.5 ^d | ± | 4.5 | 10.5 ^{DE} | ± | 2.5 |

¹ Las medias de *PSA* y *PRA* se evaluaron vía la prueba de comparación múltiple de Tukey. Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas para $p \leq 0.05$ (n=81)

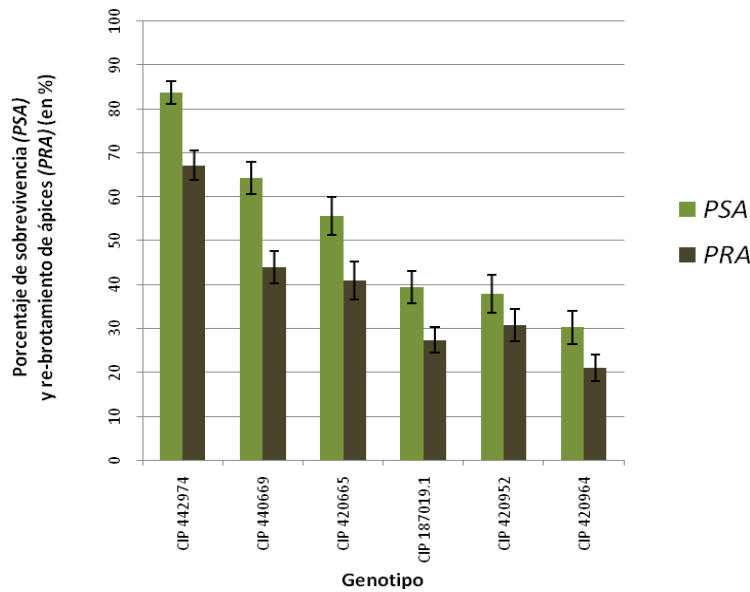


Figura 5: Porcentajes generales de sobrevivencia (*PSA*) y re-brotamiento de ápices (*PRA*) de seis genotipos de camote (expresado como media de 12 concentraciones de sacarosa [0.0-0.6M]). Los ápices han sido criopreservados vía el método de vitrificación en la gota pequeña de PVS2 (LS: 20 min, PVS2: 15 min, RS: 20 min). Los errores estándar de cada genotipo están indicados con barras (n=81, 3 repeticiones).

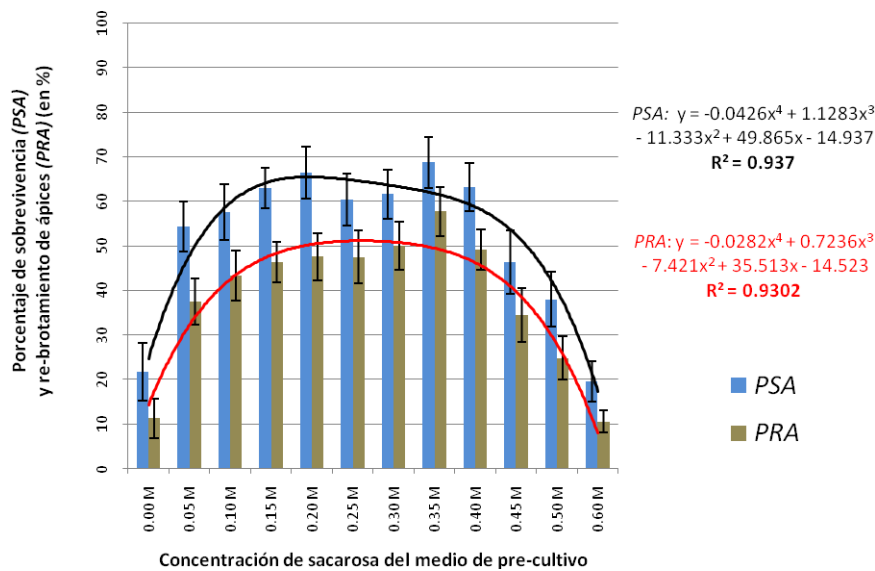
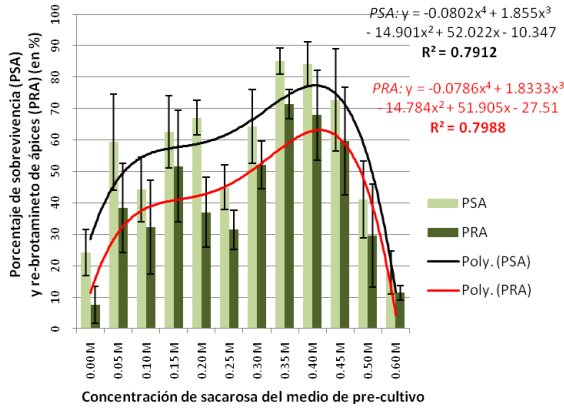
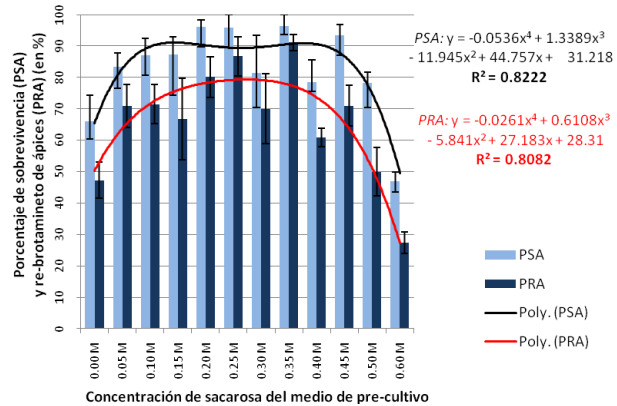


Figura 6: *PSA* y *PRA* general (promedio de seis genotipos) versus concentración de sacarosa (0.0-0.6M) en el medio de pre-cultivo. Los ápices han sido criopreservados vía el método de vitrificación en la gota pequeña de PVS2 (LS: 20 min, PVS2: 15 min, RS: 20 min). Los errores estándar de cada tratamiento están indicados con barras. Las líneas de regresión poligonal (4to grado) de *PSA* y *PRA* están dibujados en negro y rojo respectivamente (n=81, 3 repeticiones).

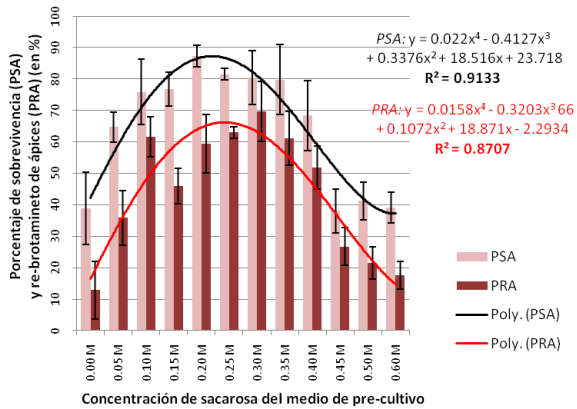
CIP 420665 ('Trujillano')



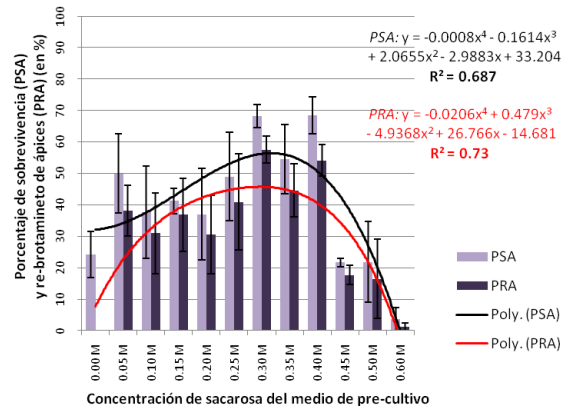
CIP 442794 ('TIS 2357')



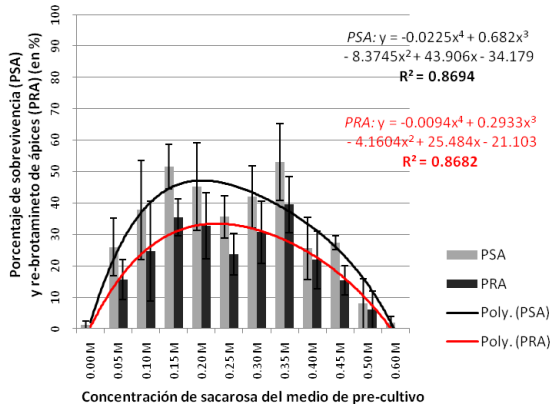
CIP 440669 ('Cinitavo')



CIP 420952 ('Chilpe Morado')



CIP 420964 ('Colorado')



CIP 187019.1 ('Tacna')

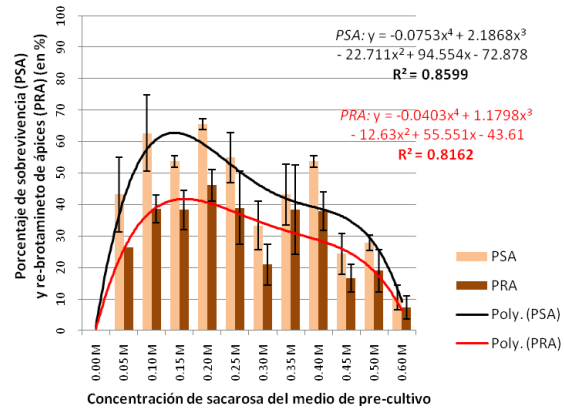


Figura 7: Porcentaje de sobrevivencia (*PSA*) y re-brotamiento de ápices (*PRA*) de seis genotipos de camote (CIP 442794, CIP 440669, CIP 420665, CIP 420952, CIP 420964, CIP 187019.1) pre-cultivados por 24 horas con 12 concentraciones de sacarosa (0.0-0.6M). Los errores estándar de cada tratamiento están indicados con barras. Las líneas de regresión poligonales (4to grado) de *PSA* y *PRA* se distinguen en negro y rojo respectivamente (n=81, 3 repeticiones).

Estos resultados confirman las tendencias reportadas por Pennycooke y Towill (2000), que mencionaron una respuesta máxima de *PRA* con 0.30M de sacarosa, y un descenso de *PRA* notable a partir de 0.5M. A diferencia del presente trabajo Pennycooke y Towill pre-cultivaron los ápices en medio de cultivo líquido en lugar de sólido.

Similarmente Verleije (2008) reportó el efecto positivo del pre-cultivo de ápices de camote en medio de cultivo rico en sacarosa, pero a diferencia del presente trabajo observó las mejores respuestas medias con pre-cultivos de 24 horas en MS normal (0.07M de sacarosa) y de 48 horas (24 horas en 0.07M, seguido por 24 horas en medio de cultivo con 0.3M de sacarosa). Considerando que en la investigación actual se trabajaron con genotipos diferentes de los usados por Verleije, y que no se observaron diferencias significativas de *PRA* en un rango de 0.1 a 0.4M, puede considerarse que el tratamiento mejor de Verleije (0.07M) está muy cerca del rango óptimo establecido en este trabajo. Sorprendentemente Verleije reportó resultados mejores pre-cultivando los ápices por 24 horas en medio con 0.07M de sacarosa que en lugar de 0.3M; este hecho no pudo confirmarse en la investigación presente, mostrándose más bien, dependiente del genotipo, las repuestas máximas de *PRA* con concentraciones de 0.35M, 0.30M y 0.20M.

Durante el tiempo de crioprotección con LS y PVS2 los ápices también estaban expuestos, por periodos cortos de 20 y 15 minutos respectivamente, a concentraciones altas de sacarosa de 0.4M. Concluyentemente podría establecerse las siguientes dos hipótesis: (a) El efecto de crioprotección de sacarosa es solamente al nivel osmótico y un tiempo corto de tratamiento con crioprotectores es suficiente para establecer el mismo equilibrio osmótico intracelular, independientemente si se pre-cultivaron los ápices con 0.1M o 0.40M de sacarosa. (b) El efecto crioprotector de sacarosa va más allá de su efecto osmótico.

Al sobrepasarse la concentración de sacarosa del pre-cultivo (0.45M) ligeramente encima de la concentración de sacarosa de los crioprotectores (0.40M) se notó un descenso notorio del *PRA*. Es posible que el pre-cultivo por 24 horas con 0.45M, o mayor concentración de sacarosa, derive en una deshidratación tan alta que la concentración de los solutos

intracelulares alcanzó un nivel tóxico dificultando una re-hidratación y recuperación adecuadas durante el tratamiento con los crioprotectores (LS y PVS2 con 0.4M de sacarosa). Pero asimismo, es posible que las moléculas de glicerol y agua estén utilizando los mismos canales de agua, lo que finalmente complicaría la entrada de los crioprotectores hacia el interior de la célula.

4.2. EFECTO DEL TIEMPO DE CRIOPROTECCIÓN CON PVS2 (ENSAYO 2)

Vía el análisis de varianza (ANOVA, $\alpha=0.05$) pudo determinarse diferencias altamente significativas del *PSA* para genotipos ($p<0.001$) y tiempos de crioprotección con PVS2 ($p=0.005$), pero no para la interacción genotipo x tiempo de crioprotección con PVS2 ($p=0.508$) (ANEXO 5).

El genotipo CIP 442794 mostró en el análisis de factores principales (Tukey, $p<0.05$) un *PSA* más alto de 82.4%. No se observaron diferencias estadísticas significativas entre los genotipos CIP 420665, CIP 420952 y CIP 420701 con 79.3%, 67.2% y 63.7% respectivamente. CIP 420964 y CIP 187019.1 se caracterizaron por *PSAs* más bajos de 48.6% y 46.1% respectivamente (Cuadro 2, Figura 8).

El efecto de genotipo mostró un coeficiente de correlación de Pearson [$r_{(PSA, PRA)}$] entre *PSA* y *PRA* de 0.956.

No se observaron diferencias significativas entre los tiempos de crioprotección de 30 y 45 minutos con *PSAs* de 75.2% y 67.9% respectivamente (Tukey, $p<0.05$). Los tiempos mínimos y máximos de 15 y 60 minutos de crioprotección con PVS2 no mostraron diferencias estadísticas significativas para el *PSA*, con valores de 56.0% y 58.6% respectivamente. La regresión poligonal (2do grado) indicó para tiempos de crioprotección con PVS2 versus *PSA* un valor de R^2 de 0.8719 (Cuadro 2, Figura 9).

El efecto de tiempos de crio-protección mostró un coeficiente de correlación de Pearson [$r_{(PSA, PRA)}$] entre *PSA* y *PRA* de 0.993.

Para evaluar el comportamiento individual de cada genotipo por separado se realizó el análisis de efectos simples (Tukey, $p<0.05$). Los genotipos CIP 420665, CIP 420952, CIP 420701 y CIP 420964 mostraron sus *PSAs* más altos de 96.3%, 80.3%, 75.1%, 63.0%, respectivamente, crioprotegiendo los ápices por 30 minutos con PVS2. CIP 442794 estableció su mejor

respuesta de *PSA* de 85.1% con un tiempo de PVS2 de 15 minutos, mientras CIP 187019.1 presentó su valor *PSA* más alto con 45 minutos de PVS2 (Figura 10, ANEXO 7).

El análisis de regresión (de 2^{do} grado) de *PRA* versus la concentración de sacarosa indicó valores de R^2 de 0.6613, 0.8358, 0.0829, 0.9092, 0.851 y 0.6055 para los genotipos CIP 442794, CIP 420665, CIP 420701, CIP 420964, CIP 187019.1 y CIP 420952 respectivamente (Figura 10).

Refiriéndose al diferencial entre valor máximo y mínimo de *PSA* en función del tiempo de tratamiento con PVS2 dentro de cada genotipo, sin considerar el error estándar, se establecieron los siguientes valores (en paréntesis se indicaron el genotipo y los tiempos de PVS2 de mayor y menor respuesta): 6.2% (CIP 442794, 15 min, 45 min), 19.1% (CIP 420701, 30 min, 45 min), 23.3% (CIP 420952, 30 min, 15 min), 30.0% (CIP 420964, 30 min, 15 min), 30.3% (CIP 420665, 30 min, 60 min), 39.0% (CIP 187019.1, 45 min, 60 min). Se pudo deducir que el *PSA* del genotipo CIP 442794 es poco afectado por el tiempo de tratamiento con PVS2 (en un rango de 15-60 minutos), mientras CIP 420701 y CIP 420952 estaban medianamente afectados. Los genotipos CIP 420964, CIP 420665 y CIP 187019.1 mostraron alta sensibilidad al tiempo de tratamiento con PVS2 (ANEXO 7).

El ANOVA del *PRA* ($\alpha=0.05$) evidenció diferencias altamente significativas entre genotipos ($p<0.001$) y tiempos de crioprotección con PVS2 ($p=0.001$), sin embargo no se observaron diferencias significativas en su interacción ($p=0.489$) (ANEXO 6).

El análisis del efecto principal mostró que no existen diferencias significativas (Tukey, $p<0.05$) de *PRA* entre CIP 420665, CIP 442794 y CIP 420701 con valores de *PRA* de 74.1%, 70.2% y 56.3% respectivamente. Los genotipos de menor respuesta fueron CIP 420952, CIP 187019.1 y CIP 420964 con *PRA*s de 49.7%, 38.8% y 34.9% cada uno, sin que se observaran diferencias estadísticas significativas entre ellos (Cuadro 2, Figura 8).

Con respecto al efecto principal de tiempo de crioprotección con PVS2 no se observaron diferencias estadísticas significativas (Tukey, $p<0.05$) entre los tratamientos de mayor

respuesta de 30 y 45 minutos con valores de *PRA* de 68.5% y 57.0% respectivamente. Crioprotegiendo los ápices por 15 o 60 minutos resultaron en *PRAs* menores de 42.5% y 47.8% correspondientemente, sin observarse diferencias estadísticas significativas entre sí. (Cuadro 2, Figura 9).

Analizando los *PRAs* de los genotipos separadamente pudo observarse que los genotipos CIP 442794, CIP 420665, CIP 420952, CIP 420701 y CIP 420964 mostraron su mejor respuesta de *PRA* de 74.3%, 92.5%, 72.5%, 71.3% y 56.8% tratándolos por 30 minutos con PVS2. El genotipo 187019.1 presentó su valor de *PRA* más alto de 62.4% con un tiempo de tratamiento de PVS2 de 45 minutos (Figuras 10 y 11, ANEXO 7).

Para el diferencial entre valor máximo y mínimo de *PRA* en función del tiempo de tratamiento con PVS2 dentro de cada genotipo, sin considerar el error estándar, se establecieron los siguientes valores (en paréntesis se indicaron el genotipo y los tiempos de PVS2 de mayor y menor respuesta): 8.0% (CIP 442794, 30 min, 15 min), 16.0% (CIP 420665, 30 min, 60 min), 25.4% (CIP 420701, 30 min, 15 min), 38.0% (CIP 187019.1, 45 min, 15 min), 39.1% (CIP 420952, 30 min, 15 min), 41.8% (CIP 420964, 30 min, 15 min). Se pudo deducir que el *PRA* del genotipo CIP 442794 es poco afectado por el tiempo de tratamiento con PVS2 (en un rango de 15-60 minutos), mientras CIP 420665 y CIP 420701 estaban medianamente afectados. Los genotipos CIP 420952, CIP 420964 y CIP 187019.1 mostraron alta sensibilidad al tiempo de tratamiento con PVS2 (ANEXO 7).

El análisis de regresión (de 2^{do} grado) de *PRA* versus la concentración de sacarosa estableció valores de R^2 de 0.6007, 0.9042, 0.3064, 0.8147, 0.8421 y 0.2571 para los genotipos CIP 442794, CIP 420665, CIP 420701, CIP 420964, CIP 187019.1 y CIP 420952 respectivamente (Figura 10).

Cuadro 2: Medias, error standard (SE) y comparación múltiple (Tukey, $\alpha=95\%$) de los efectos principales del porcentaje de sobrevivencia de ápices (*PSA*) y porcentaje de re-brotamiento de ápices (*PRA*) de seis genotipos de camote (CIP 442 794, CIP 440669, CIP 420665, CIP 187019.1, CIP 420952, CIP 420964) crioprottegidos por diferentes tiempos con PVS2 (15 min, 30 min, 45 min, 60 min) (LS: 20 min, RS: 20 min). Las yemas apicales se pre-cultivaron, previa a la crioprotección, por 24 horas sobre medio de cultivo (MPCC) suplementado con 0.35M de sacarosa. La tabla muestra datos originales (sin transformación de datos vía $\arcsen[\text{raíz}]$ y ajuste de valores para 0 y 100%)

| Efecto de genotipo | | | | | | |
|------------------------------|---------------------|---|-----|---------------------|---|-----|
| | <i>PSA</i> | ± | SE | <i>PRA</i> | ± | SE |
| CIP 442794 ('TIS 2357') | 82.4 ^a | ± | 3.1 | 70.2 ^{AB} | ± | 5.3 |
| CIP 420665 ('Trujillano') | 79.3 ^{ab} | ± | 4.9 | 74.1 ^A | ± | 5.8 |
| CIP 420952 ('Chilpe Morado') | 67.2 ^{abc} | ± | 5.1 | 49.7 ^{BC} | ± | 7.3 |
| CIP 420701 ('Pierna de Oso') | 63.7 ^{bcd} | ± | 3.5 | 56.3 ^{ABC} | ± | 4.2 |
| CIP 420964 ('Colorado') | 48.6 ^{cd} | ± | 7.0 | 34.9 ^C | ± | 6.4 |
| CIP 187019.1 ('Tacna') | 46.1 ^d | ± | 5.7 | 38.8 ^C | ± | 5.6 |

| Efecto del tiempo de crioprotección con PVS2 (PVS2) | | | | | | |
|--|--------------------|---|-----|--------------------|---|-----|
| | <i>PSA</i> | ± | SE | <i>PRA</i> | ± | SE |
| 15 minutos | 56.5 ^b | ± | 5.4 | 42.5 ^B | ± | 6.0 |
| 30 minutos | 75.2 ^a | ± | 4.0 | 68.5 ^A | ± | 4.5 |
| 45 minutos | 67.9 ^{ab} | ± | 3.5 | 57.0 ^{AB} | ± | 4.9 |
| 60 minutos | 58.6 ^b | ± | 6.4 | 47.8 ^B | ± | 6.0 |

¹ Las medias de *PSA* y *PRA* se evaluaron vía la prueba de comparación múltiple de Tukey. Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas para $p \leq 0.05$ (n=72)

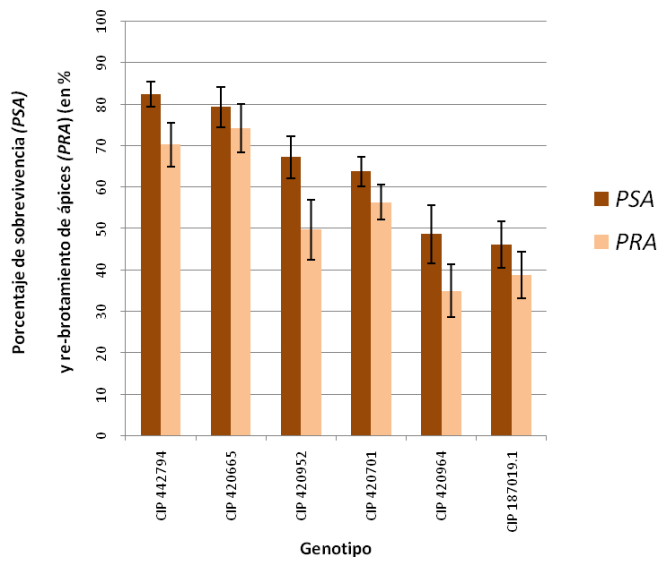


Figura 8: Porcentajes generales de sobrevivencia (*PSA*) y re-brotamiento de ápices (*PRA*) de seis genotipos de camote, en promedio de 4 tiempos de crioprotección con PVS2 (15 min, 30 min, 45 min, 60 min). Los ápices han sido criopreservados vía el método de vitrificación en la gota pequeña de PVS2 (LS: 20 min, PVS2: 15-60 min, RS: 20 min). Los errores estándar de cada genotipo están indicados con barras (n=72, 3 repeticiones).

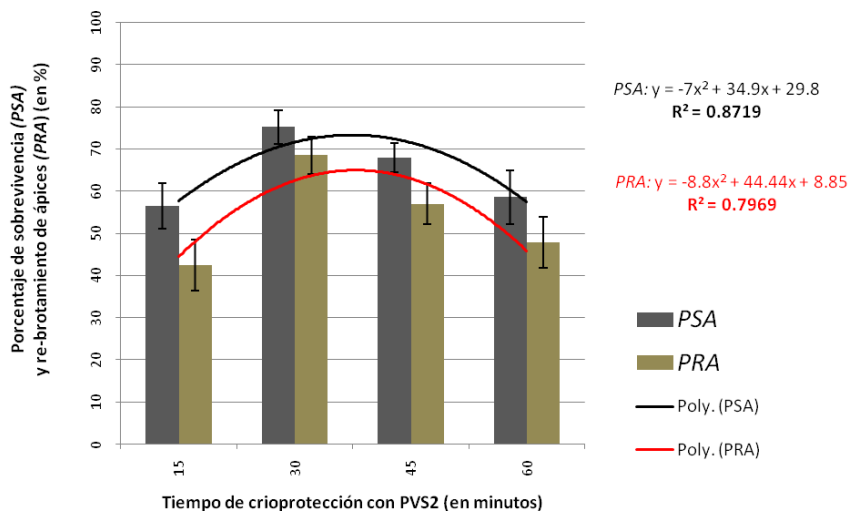


Figura 9: *PSA* y *PRA* general (promedio de seis genotipos) versus tiempo de crioprotección con PVS2 (15 min, 30 min, 45 min, 60 min). Los ápices han sido criopreservados vía el método de vitrificación en la gota pequeña de PVS2 (LS: 20 min, PVS2: 15-60 min, RS: 20 min). Los errores estándar de cada tratamiento están indicados con barras. Las líneas de regresión poligonal (2^{do} grado) de *PSA* y *PRA* están dibujados en negro y rojo respectivamente (n=72, 3 repeticiones).

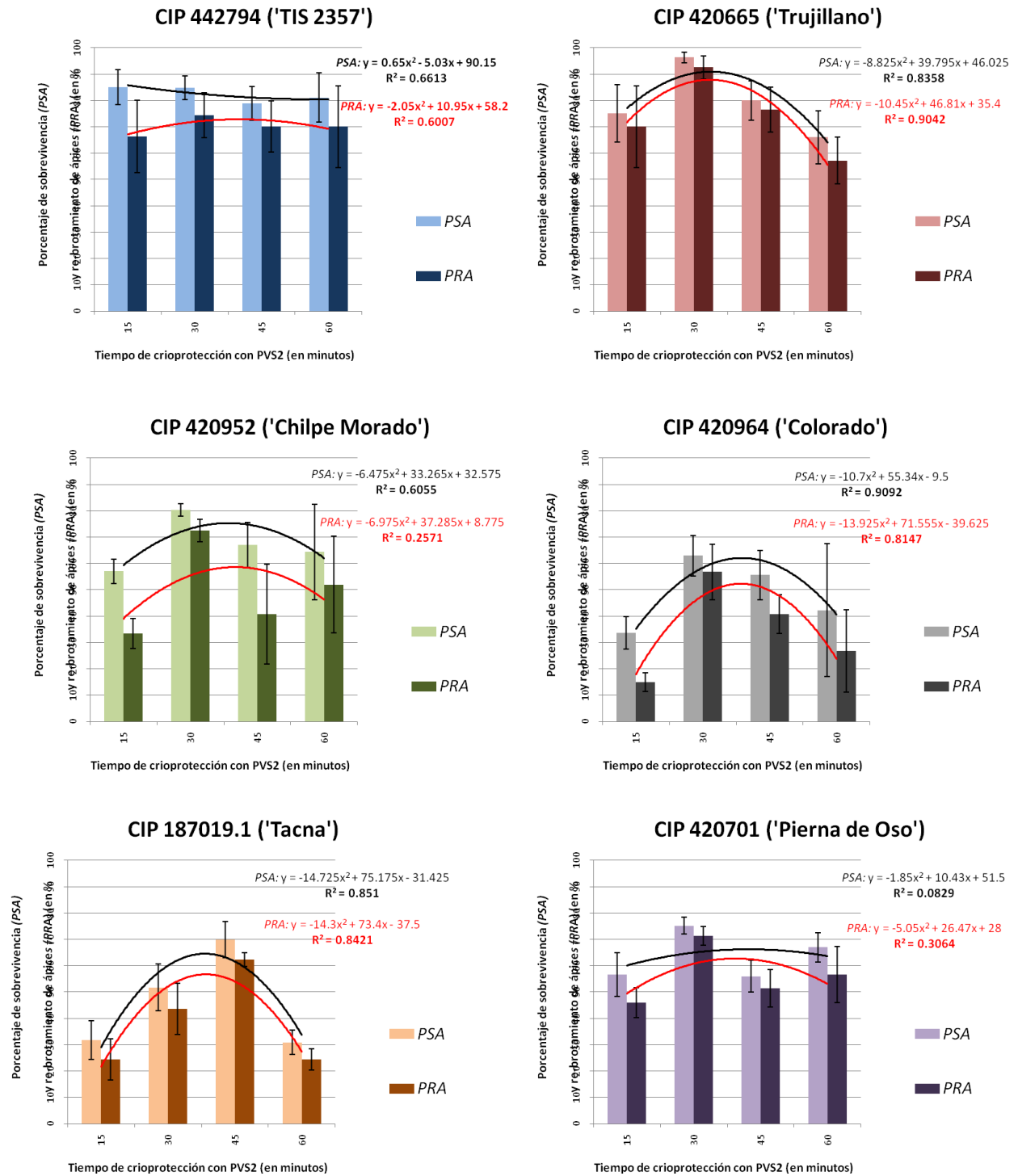


Figura 10: Porcentaje de sobrevivencia (*PSA*) y re-brotamiento de ápices (*PRA*) individuales de seis genotipos de camote (CIP 442794, CIP 440669, CIP 420665, CIP 420952, CIP 420694, CIP 187019.1), pre-cultivados por 24 horas en MPCC suplementado con 0.35M de sacarosa y crioprotegidos por tiempos diferentes con PVS2 (15 min, 30 min, 45 min, 60 min) aplicando el método de vitrificación en la gota pequeña de PVS2 (LS: 20 min, RS: 20 min). Los errores estándar de cada tratamiento están indicados con barras. Las líneas de regresión poligonales (2do grado) de *PSA* y *PRA* se distinguen en negro y rojo respectivamente (n=72, 3 repeticiones).













| | | Tiempo de crioprotección con PVS2 | | | |
|-----------|------------|---|---|--|---|
| | | 15 minutos | 30 minutos | 45 minutos | 60 minutos |
| GENOTIPOS | CIP 420701 |  |  |  |  |
| | CIP 420952 |  |  |  |  |
| | CIP 420665 |  |  |  |  |

Figura 11: Vista fotográfica de 3 genotipos de camote 28 días después del proceso de descongelamiento. Se crioprotegieron las yemas apicales por diferentes tiempos con PVS2 (15 min, 30 min, 45 min, 60 min) previa a su criopreservación vía el método de vitrificación en la gota pequeña de PVS2.

En el presente trabajo de investigación no pudo confirmarse los resultados reportados por Pennycooke y Towill en el año 2000. Pennycooke y Towill evaluaron tiempos de crioprotección de 0, 16 y 26 minutos de PVS2 combinado con tratamientos de LS de 20 y 60 minutos. Finalmente reportaron como mejor tratamiento una combinación de 16 minutos de PVS2 con 60 minutos de LS. Se debe considerar que el trabajo de Pennycooke y Towill se realizó con 1 solo genotipo y que su tratamiento con LS ha sido el triple del aplicado en la presente investigación. Verleije (2008) no evaluó el efecto de PVS2, basándose todos sus resultados en una combinación de 15 minutos de PVS2 con 20 minutos de LS. Consecuentemente puede considerarse el presente trabajo como pionero en el sentido que se evaluó el efecto de PVS2 por primera vez con un grupo mayor de genotipos.

4.3. COMPROBACIÓN DEL PROTOCOLO CON UN GRUPO DE 24 GENOTIPOS DE CAMOTE (ENSAYO 3)

Se observó que 21 de 24 accesiones mostraron un *PRA* mayor a 15%, lo que permite deducir que el protocolo tiene la potencialidad de poder ser aplicado exitosamente con un grupo amplio de genotipos. El análisis de varianza (ANOVA, $\alpha=0.05$) reveló diferencias altamente significativas de *PSA* y *PRA* para los 24 genotipos analizados ($p<0.001$) (ANEXOS 8 y 9).

El *PSA* varía de 2.5 a 73.0% dependiente del genotipo. Se clasificó la respuesta de *PSA* de los 24 genotipos en 5 categorías (Tukey, $\alpha=95\%$) de acuerdo a la combinación de diferencias estadísticas significativas entre sí (a, ab, abc, bc, c): muy buena (CIP 422656 y CIP 420051, con *PSAs* de 73.0 y 70.6% respectivamente); buena (CIP 421070, CIP 442056, CIP 420040 con *PSAs* de 61.8%, 59.5% y 58.8% cada uno); mediana (17 genotipos con *PSAs* de 19.4 a 53.3%); mala (CIP 421061 con un *PSA* de 11.4%); muy mala (CIP 400059, *PSA* de 2.5%) (Figura 12, ANEXO 10).

El *PRA* varía de 1.7 a 66.1% dependiente del genotipo. Igualmente se clasificó la respuesta de *PRA* de los 24 genotipos en 5 categorías (Tukey, $\alpha=95\%$) de acuerdo a la combinación de diferencias estadísticas significativas entre sí (A, AB, ABC, BC, C): muy buena (CIP 420051 con un *PRA* de 66.1%); buena (CIP 422656, CIP 421070, CIP 442056, CIP 420040 con *PRA*s de 59.1%, 54.9%, 58.4% y 54.1% cada uno); mediana (17 genotipos con *PRA*s de 16.0 a 48.9%); mala (CIP 421061 con un *PRA* de 9.2%); muy mala (CIP 400059, *PRA* de 1.7%) (Figura 12, ANEXO 10).

Para los 24 genotipos se estableció un coeficiente de correlación de Pearson [$r_{(PSA, PRA)}$] entre *PSA* y *PRA* de 0.981.

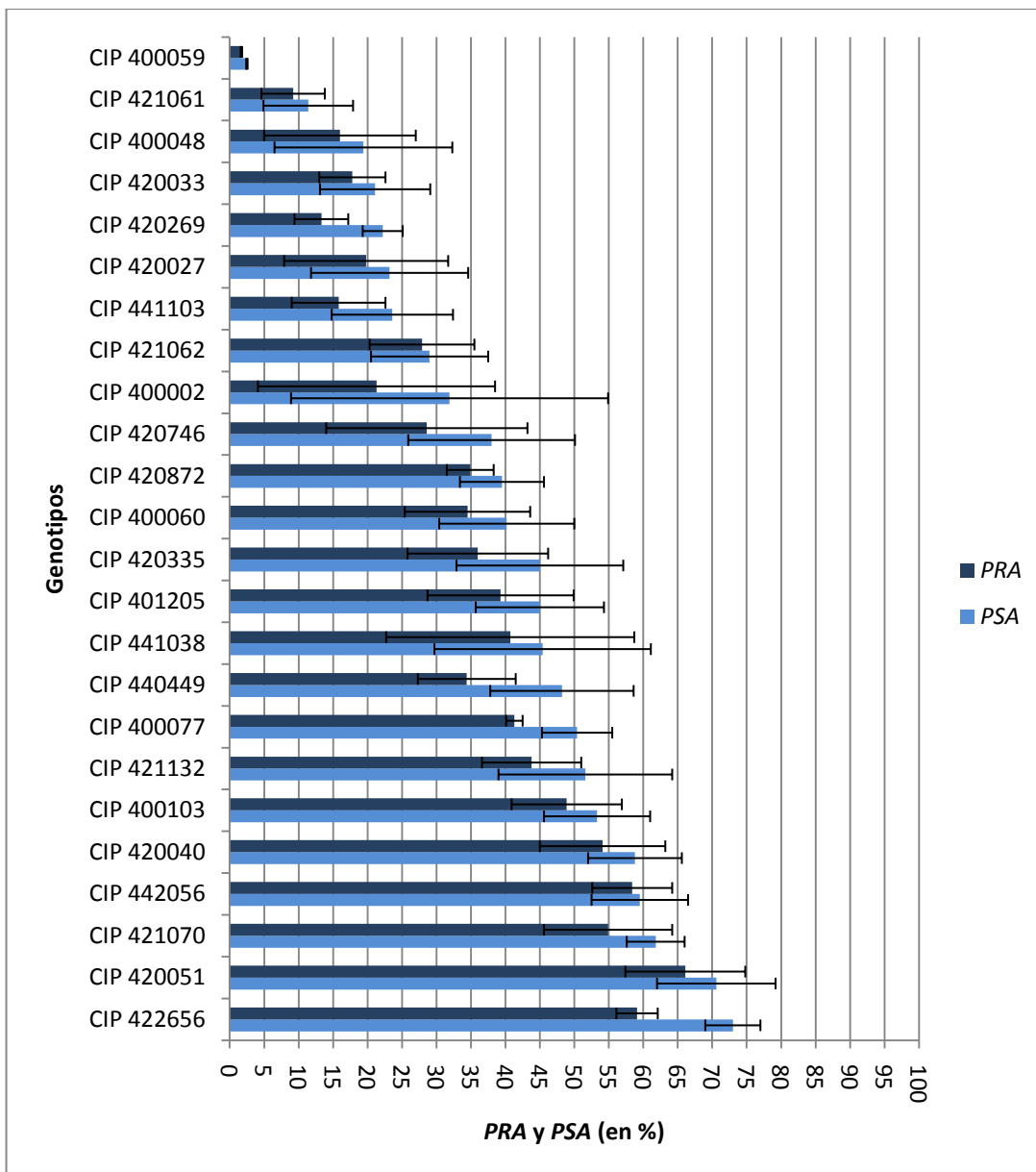


Figura 12: Porcentajes de sobrevivencia (*PSA*) y re-brotamiento de ápices (*PRA*) de 24 genotipos de camote, pre-cultivados por 24 horas en medio MPCC suplementado con 0.35M de sacarosa y posteriormente crioprotectados por 30 minutos con PVS2 aplicando el método de la vitrificación en la gota pequeña de PVS2 (LS: 20 min, RS: 20 min). Los errores estándar de cada genotipo están indicados con barras.

Vía la presente investigación se reporta por primera vez la comprobación de un protocolo de criopreservación de camote con un amplio rango de genotipos. 87.5% de los genotipos comprobados mostraron *PRA*s de 16 a 66%; todos los genotipos mostraron re-brotamiento (*PRA*>0%), con un *PSA* y *PRA* medio de $40.2\pm 8.9\%$ y $34.1\pm 8.1\%$ respectivamente (ANEXO 10). Incluyendo los genotipos de los ensayos 1 y 2, pudo mostrarse la aplicabilidad del protocolo con un grupo total de 31 genotipos. Por observar un error estándar alto en el tamizado, es recomendable realizar ensayos con plantas madres más jóvenes y/o estructuras vegetales más pequeñas (menos primordios foliares) e incrementar el número de muestras por tratamiento.

V. CONCLUSIONES

- El pre-cultivo de yemas apicales de camote por 24 horas, en medio de cultivo rico en sacarosa (0.1 a 0.4M), previa a la crioprotección y congelamiento vía el método de vitrificación en la gota pequeña de PVS2, mejora significativamente la respuesta de re-brotamiento de las yemas (*PRA*) en la etapa de post-descongelamiento, estableciéndose la mejor respuesta media con una concentración de 0.35M de sacarosa.
- El tiempo de crioprotección con PVS2 tiene un efecto significativo sobre el potencial de recuperación de los ápices posterior al descongelamiento. Tiempos medios de crioprotección con PVS2 de 30 y 45 minutos mostraron resultados significativamente mejores que una crioprotección corta de 15 minutos o prolongada de 60 minutos.
- La comprobación del método mejorado de crioprotección (pre-cultivo con 0.35M de sacarosa, crioprotección por 30 minutos con PVS2) con un grupo de 24 genotipos reveló que el método tiene el potencial para ser aplicado sobre un rango amplio de genotipos; todos los genotipos mostraron re-brotamiento y el 87.5% de ellos mostraron *PRA*s de 16 a 66%.
- Observándose en todos los ensayos coeficientes de correlación de Pearson altos entre *PSA* y *PRA* (de 0.95 a 0.99), y siendo el re-brotamiento de las yemas congeladas (*PRA*) la variable más importante, puede posiblemente obviarse la evaluación de sobrevivencia (*PSA*) en investigaciones futuras.

VI. RECOMENDACIONES

- Aunque pudo establecerse un rango aproximado de respuesta óptima de PVS2 (30 - 45 minutos) debería comprobarse el efecto de PVS2 en intervalos más cortos (p.ej. 5 minutos) con un mayor rango de genotipos (p.ej. mayor a 20).
- En algunos tratamientos se observaron errores estándar altos. Aunque se utilizaron yemas apicales de plantas de la misma edad y tamaño, debería realizarse ensayos con yemas apicales más pequeñas (menos primordios foliares) y de mayor número (p.ej. 200 yemas/entrada) con el fin de reducir el error estándar.
- Se recomienda comprobar el efecto de PVS2 y LS en conjunto, en combinación con una etapa de pre-cultivo en medio de cultivo rico en sacarosa (p.ej. 0.35M), utilizando en lo posible un grupo mediano de genotipos (p.ej. seis)
- Se utilizó como medio de post-descongelamiento el medio para el cultivo de meristemos de camote desarrollado en el Centro Internacional de la Papa (CIP). Es probable que las necesidades nutricionales y hormonales de ápices crioprotegidos, congelados (- 196 °C) y descongelados son distintos a meristemos comunes. Se recomienda evaluar el efecto de retiro de NH_4NO_3 del medio de post-descongelamiento en la primera etapa de recuperación (p.ej. 5 días).
- Sería interesante evaluar el efecto del tamaño de yemas (número de promordios foliares), la edad de la planta madre (plantas más jóvenes, p.ej. 2 semanas de edad), pre-condicionamiento de la planta madre (luz, temperatura), pre-cultivo alternativo (prolina, trehalosa, etc.), y tratamiento con antioxidantes en la etapa de post-descongelamiento.
- Se recomienda realizar un tamizado con un grupo más grande de genotipos (p.ej. colección núcleo de camote: ± 600 accesiones).
- Implementación de un protocolo de criopreservación rutinario para colecciones grandes de camote.

- La realización de estudios básicos al nivel celular (p.ej microscopía electrónica de ultra-estructuras, análisis diferencial de escaneo de calor [DSC], etc.) puede ayudar para acumular información valiosa para investigaciones futuras.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amend, T., J. Brown, A. Kothari, A. Phillips and S. Stolton (Eds). 2008. *Protected Landscapes and Agrobiodiversity Values*. Volume 1 in the series: “Values of Protected Landscapes and Seascapes”. Kasperek Verlag. Heidelberg. Germany

Apogee Instruments. 2012. Conversion Factors.

En: <http://www.apogeeinstruments.com/conversions/lux-ppf.html>

Ultima consulta: 10/Abril/2012

Assy-Bah, B., Engelmann, F. 1992. Cryopreservation of mature embryos of coconut (*Cococ nucifera* L.) and subsequent regeneration of plantlets. *CryoLettres* 13: 117-126.

Austin, D.F. 1977. Hybrid polyploids in *Ipomoea* section batatas. *The journal of Heredity* 68: 259-260.

Austin, D.F. 1978. The *Ipomoea batatas* complex. I. Taxonomy. *Bull. Torrey Bot. club* 105:114-129

Austin, D.F. 1979. An infrageneric classification for *Ipomoea* (Convolvulaceae). *Taxon* 28(4): 359-361

Austin, D.F. 1988. The taxonomy, evolution and genetic diversity of sweet potatoes and related wild species. In: *Exploration, maintenance and utilization of sweetpotato genetic resources*. Report of the First Sweet Potato Planning Conference 1987. International Potato Center, Lima, Peru. p. 27-59.

Austin, D.F., Huamán, Z. 1996. A synopsis of *Ipomoea* (Convolvulaceae) in the Americas. *Taxon* 45: 3-38

Bacter, L.M., Madero, J.I., Bacter, C.L., Bacter M.F.L., Bacter L.A., Gómez, M.D., Delgado, L.G., Gómez, C., Lozano, J.M.L., Reguero, M.T. 2006. Fundamentos de Criopreservación. Revista Colombiana de Obstetricia Ginecología Vol.57 No.4

Benson, E. E. Cryo-conserving algal and plant diversity: historical perspectives and future challenges. 2004. In: Fuller, B.; Lane, N.; Benson, E. E., eds. Life in the frozen state. London: CRC Press: 299–328

Bretting, P.K., Duvick, D.N. 1997. Dynamic conservation of plant genetic resources. Advances in Agronomy 61:1-51.

Brown, A.H.D. 1999. The genetic structure of crop landraces and the challenge to conserve them *in situ* on farms. In: Brush, S.B. (ed.), Genes in the Field: Conserving plant diversity on farms. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA. pp. 29–48.

Charoensub, R., Hirai, D., Sakai, A. 2004. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of cassava by encapsulation-vitrification method. CryoLetters 25: 51-58

Convention on Biological Diversity (CBD). 1992. United Nations. En: <http://www.cbd.int/doc/legal/cbd-en.pdf>. Ultima consulta: 15/Abril/2012

Criel, B., Panta, A., Carpentier, S., Renaut, J., Swennen, R., Panis B., Hausman J.F. 2005. Commun Agricult Appl Biol Sci 70, 83-86.

Day J.G., McClellan M.R. 1995. Cryopreservation and freeze-drying protocols. Methods in Molecular Biology Volume 38. Humana Press. Totowa. New Jersey.

Dereuddre J, Scottez C, Arnaud Y, Duron M. 1990. Résistance d'apex caulinaires de vitroplants de poirier (*Pyrus communis* L. cv. Beurré Hardy), enrobés dans l'alginate, à une déshydratation puis à une congélation dans l'azote liquide : effet d'un endurcissement préalable au froid. C R Acad Sci Paris Sér III ; 310 : 317-23.

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

Dumet, D., Engelmann, F., Chabrilange, N., Duval, Y. 1993. Cryopreservation of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) somatic embryos involving a desiccation step. *Plant Cell Report* 12: 352-355.

Engelmann, F. 2004. Plant Cryopreservation: Progress and Prospects. *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 40: 427-433.

Engelmann, F., Takagi, H. Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm. Current research progress and application. 2000. Engelmann, F. y Takagi, H. (eds). pp 8-20.

Engelmann, F. 1997. *In vitro* conservation methods. Ford-Lloyd, B.V., Newbury, J.H., Callow, J.A. eds. *Biotechnology and plant genetic resources : conservation and use*. Wallingford. CABI, pp 119-162.

Engels, J.M.M., Visser, L. (ed.). 2003. A guide to effective management of germplasm collections. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI). Rome. Italy.

En: <http://www.sgrp.cgiar.org/sites/default/files/Engels-Visser-EffectiveMgtGermplasm.pdf>

Ultima consulta: 17/Abril/2012

FAOSTAT Statistical Division of the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2011. Top Production 2010.

En: <http://faostat.fao.org/>

Ultima consulta: 12/Noviembre//2012

Gamez-Pastrana, R., Martinez-Ocampo, Y., Beristain, C.I., Gonzalez-Arno, M.T. 2004. An improved cryopreservation protocol for pineapple apices using encapsulation-vitrification. *CryoLetters* 25(6): 405-414.

García, J.V. 1984. Criopreservadores concepto y manejo. *Biol Clin Hematol* Vol. 6 (219).

Gibbs, P. 1996. Is glass liquid or solid? Department of Mathematics. University of California.

En: <http://math.ucr.edu/home/baez/physics/General/Glass/glass.html>

Ultima consulta: 02/Mayo/2012

Golmirzaie, A.M., Panta, A., Diaz, S. 2000. Systematic determination of an adequate method for large-scale sweetpotato cryopreservation at CIP. *JIRCAS Int. Agric. Ser.* 2000: Vol 8: 460-462

Gomez, K.A., Gomez A.A. 1984. *Statistical procedures for agricultural research*. EEUU, New York Wiley Editors. 680 p.

Gonzales-Arno M. T., Panta A., Roca W.M., Escobar R. H., Engelmann F. 2008. Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and embryo culture of tropical crops. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 92:1-13.

Gonzalez-Arno, M.T., Engelmann, F. 2006. Cryopreservation of plant germplasm using the encapsulation-dehydration technique: review and case study on sugarcane. *Cryo-Letres* 27(3): 155-168.

Gonzalez-Arno M.T., Engelmann, F., Huet, C., Urra, C. 1993. Cryopreservation of encapsulated apices of sugarcane: Effect of freezing procedure and histology. *Cryoletters* 14:303-308

Grospietch, M., Stodulkova, E., Zamecnik, J. 1999. Effect of osmotic stress on the dehydration tolerance and cryopreservation of *Solanum tuberosum* shoot tips. *CryoLetters* 20: 339-346.

Hardeman, D. 2006. Cryopreservation of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) and oca (*Oxalis tuberosa* (Mol.). Stageverslag van zijn werk in het Labo voor tropische plantenteelt. Katholieke Universiteit Leuven, België.

Huang, J.C., Sun, M. 2000. Genetic diversity and relationships of sweet potato and its wild relatives in *Ipomoea* series Batatas (Convolvulaceae) as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) and restriction analysis of chloroplast DNA. *Theor. Appl. Genet* 100: 1050-1060

Hirai, D. 2001. Studies on cryopreservation of vegetatively propagated crops by encapsulation-vitrification method. Report of Prefectural Kitami Agricultural Experiment station of Hokkaido 99: 1-58.

Hirai, D., Sakai, A. 2001. Recovery growth of plants cryopreserved by encapsulation-vitrification. *Bull Hokkaido Prefect Agric Exp Stn* 80: 55-64.

Hirai, D., Sakai, A. 2003. Simplified Cryopreservation of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] by optimizing conditions of osmoprotection. *Plant Cell Reports* 21: 961-966.

Hoekstra, F.A. 1995. Collecting pollen for genetic resources conservation. En: *Collecting Plant Genetic Diversity: Technical guidelines* (Guarino, L., Rao, V.R. and Reid, R., eds.). CAB International. Wallingford. Pag 527–550

Howell S.H., Lall S., Che P. 2003. Cytokinins and shoot development. *Trends Plant Science* 8:453–459.

Huamán, Z. 1999. Sweetpotato Germplasm Management (*Ipomoea batatas*) – Training Manual. International Potato Center (CIP). Lima. Perú

Huamán, Z., Zhang D.P. 1997. Sweetpotato. En: Fuccillo, D., et al. (eds). *Biodiversity in trust – conservation and use of plant genetic resources in CGIAR Centers*. Cambridge University Press, Cambridge, UK. P. 29-38

Hughes, K.W. 1981. *In vitro* ecology: exogenous factors affecting growth and morphogenesis in plant tissue cultures. *Environ. Exp. Bot.* 21: 281–288

Kaczmarczyk, A., Rokka V.-M., Keller E.R.J. (2011) Potato Shoot Tip Cryopreservation. A Review. *Potato Research* 54: 45-79

Kartha K.K., Leung N.L., Mroginski L.A. 1982. *In vitro* growth responses and plant regeneration from cryopreserved meristems of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). 2. *Pflanzenphysiol.* 107: 133-140.

Kartha K.K. 1985. *Cryopreservation of Plant Cells and Organs*. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida.

Keller, E.R.J., M. Dreiling. 2003 Potato cryopreservation in Germany – using the droplet method for the establishment of a new large collection. *Acta Hortic.* 623: 193-200

Kim, H.h., Yoon, J.W., Park, Y.E., Cho, E.G., Sohn, J.K., Kim, T.S., Engelmann F. 2006. Cryopreservation of cultivated varieties and wild species: critical factors in droplet-vitrification. *CryoLetters* 27: 223-234.

Mabberely, D.J. 1987. *The plant book*. Cambridge University Press.

Magoon, M.L., Krishnan, R., Vijaya Bai, K. 1970. Cytological evidence on the origin of sweet potato, *Theor. Appl. Genet.* 40: 360–366.

Mari S., Engelmann F., Chabrillange N., Huet C., Michaux-Ferrière N. 1995. Histo-cytological study of coffee (*Coffea racemosa* and *C. sessiliflora*) apices of *in vitro* plantlets during their cryopreservation using the encapsulation-dehydration technique. *CryoLetters* 16:289-298.

Maxted, N., Ford-Lloyd, B.V., Hawkes, J.G. 1997. Complementary conservation strategies. Pp. 15–39 in Plant Genetic Conservation: the in situ approach (Maxted, N., Ford-Lloyd, B.V. and Hawkes, J.G., eds.). Chapman and Hall, London, UK.

MEGlobal. 2009. Material Safety Data Sheet. Ethylene Glycol.

En: http://www.meglobal.biz/media/product_guides/MEGlobal_MEG.pdf

Última consulta: 14/Abril/2012

Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*. 15: 473-479

Nishiyama, I., Sakamoto, S. 1975. Evolutionary autopoloidy in the sweet potato (*Ipomoea batatas*) and its progenitors. *Euphytica* 24: 197-208

Panis, B., Strosse, H., Van den Hende, S., Swennen, R. 2002. Sucrose preculture to simplify cryopreservation of banana meristem cultures. *CryoLetters* 23: 375-383.

Panis, B., Lombardi, M. 2005. Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). International Workshop: “The role of biotechnology for the characterisation and conservation of crop, forestry, animal and fishery genetic resources”. 5 de 7 de marzo 2005. FAO. Turin (Italia). Consultado al 30 de agosto del 2010 en: www.fao.org/biotech/docs/panis.pdf

Pegg, D.E. 2007. Principles of cryopreservation. *Methods in Molecular Biology*. Vol 368, 39-57.

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

Pennycooke, J.C., Towill, L.E. 2001. Medium alterations improve regrowth of sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam.) shoot tips cryopreserved by vitrification and encapsulation-dehydration. *CryoLetters* 22: 381-389.

Plessis, P., Steponkus P.L. 1996. Cryopreservation of sweet potato shoot-tips. *Cryobiology* 1996; 33: 655-656

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

Porcu, E. 2001. Oocyte Criopreservation. En: Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z (eds). *Textbook of Assisted Reproductive Techniques: Laboratory and Clinical Perspectives*. London, UK.

Rao, N.K., Jackson, M.T. 1996. Seed production environment and storage longevity of japonica rices (*Oryza sativa* L.). *Seed Science Research* 6:17-21.

Reed, B.M., F. Engelmann, M.E. Dulloo and J.M.M. Engels. 2004. Technical guidelines for the management of field and *in vitro* germplasm collections. IPGRI Handbooks for Genebanks No. 7. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.

Roca, W., Mroginski L.A.. 1991. Cultivo de tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. Capítulo 32: Crioconservación de germoplasma. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Colombia. pp 715-730.

Rossel, G., Kriegner, A., Zhang, D.P. 2000. From Latin America to Oceania : Th historic dispersal of sweet potato re-examined using AFLP. CIP Program Report 1999-2000, p. 315-321.

Roy, K.-M. 2002. Sulfones y sulfóxidos. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Wiley-VCH. Weinheim. Germany.

Sakai, A., Engelmann, F. 2007. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review. *CryoLetters* 28(3), 151-172.

Sakai, A., Kobayashi, S., Piyama, I. 1990. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. Var. *Brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Report* 9: 30-33.

Sakai A. 1966. Survival of a plant tissue at super-low temperature IV cell survival with rapid cooling and rewarming. *Plant Physiol* 41:1050–1054.

Schnabel-Preikstas, B., Earle, E.D., Steponkus, P.L. 1992. Cryopreservation of sweet potato shoot tips by vitrification. *Cryobiology* 29: 738-739.

Scottez, C., Chevreau, E., Godard, N., Arnaud, Y., Duron, M., Dereuddre J. 1992. Cryopreservation of cold-acclimated shoot tips of pear *in vitro* cultures alter encapsulation-dehydration. *Cryobiology* 29: 691-700.

Sevilla, P.R., Holle, O.M. 2004. Recursos Geneticos Vegetales. Luis Leon Asociados S.R.L. Peru

Soap and Detergent Association (SDA). 1990. Glycerine & Oleochemical Division. Glycerine: an overview. En: [http://www.aciscience.org/docs/Glycerine - an overview.pdf](http://www.aciscience.org/docs/Glycerine_-_an_overview.pdf)

Última consulta: 26/Junio/2012

Shahidul, I. 2007. Medicinal and Nutritional Qualities of Sweetpotato Tops and Leaves. University of Arkansas. Cooperative Extension Program. FSA 6135.

En: http://www.uaex.edu/Other_Areas/publications/PDF/FSA-6135.pdf

Última consulta: 07/Feb/2012

Shibli, R.A., Shatnawi M.A., Subaih W.S., Ajlouni M.M. 2006. *In Vitro* Conservation and Cryopreservation of Plant Genetic Resources: A review. World Journal of Agricultural Sciences 2 (4): 372-382. [http://www.idosi.org/wjas/wjas2\(4\)/3.pdf](http://www.idosi.org/wjas/wjas2(4)/3.pdf) .Ultima consulta: 04/Abril/2012

Shiotani, I., Kawase, T. 1989. Genomic structure of the sweet potato and hexaploids in *Ipomoea trifida* (H.B.K.) Don. Jpn. J. Breeding 39:57-66.

Srisuwan, S., Sihachakr, D., Silkak-Yakovlev, S. 2006. The origin and evolution of sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.) and its wild relatives through the cytogenetic approaches. Plant Science 171: 424-433.

Thorpe, T.A. 1994. Morphogenesis and regeneration. In: Vasil IK & Thorpe TA (eds) Plant Cell and Tissue Culture (pp. 17–36). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands

Towill, L.E., Jarret R.L. 1992. Cryopreservation of sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam.) shoot tips by vitrification. Plant Cell Reports 11: 175-178.

Uemura M., Sakai A. 1980. Survival of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) shoot apices frozen to the temperature of liquid nitrogen. Plant Cell Physiol 21:85–94.

Uragami, A., Sakai, A., Magai, M. 1990. Cryopreservation of dried axillary buds from plantlets of *Asparagus officinalis* L. grown *in vitro*. Plant Cell Report 9: 328-331.

Verleije, M. 2008. Cryopreservatie van zoete bataat (*Ipomoea batatas* L.). Bélgica. Universidad Católica de Leuven. Facultad de Bioingeniería. Belgica.

Withers, L., Engelmann, F. 1997. *In vitro* conservation of plant genetic resources. In: Altman A (ed) Agricultural biotechnology. Marcel Dekker, Inc., Nueva Cork. pp 57-88.

Withers L.A., King P.J. 1980. A simple freezing unit and routine cryopreservation methods for plant cell cultures. *CryoLetters* 1:213–220

Withers L.A. 1975. Freeze-preservation of cultures cells and tissues. En: Thorpe, TA (ed) *Frontiers of Plant Tissue Culture*. International Association of Plant Tissue Culture, University of Calgary, Calgary, Alberta, Canada, pp. 297–309.

Wood C. B., Pritchard H. W., Miller A. P. 2000. Simultaneous preservation of orchid seed and its fungal symbiont using encapsulation-dehydration is dependent on moisture content and storage temperature. *CryoLetters* 21: 125-136

Wowk, B. How cryoprotectants work. 2007. Alcor Life Extension Foundation. *Cryonics*. Special edition. 3rd Quarter 2007. Volume 28:3. En: <http://www.alcor.org/cryonics/cryonics0703.pdf>

Zhang, D., Cervantes, J., Huamán, Z., Carey, E., Ghislain, M. 2000a. Assessing genetic diversity of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) cultivars from tropical America using AFLP. *Genetic Resources and Crop Evolution* 47: 659-665

En: <http://www.springerlink.com/content/189152624255415m/fulltext.pdf>

Última consulta: 09/FEB/2012

Zhang, D., Carbajulca, D., Ojeda, L., Rossel, G., Milla, S., Herrera, C., Ghislain, M. 2000b. Microsatellite Analysis of Genetic Diversity in Sweetpotato Varieties from Latin America. Programm Report 1999-2000. International Potato Center (CIP)

En: http://www.cipotato.org/publications/program_reports/99_00/37microsatla.pdf

Última consulta: 09/FEB/2012

Zhao, Y., Wu, Y., Engelmann, F., Zhou, M. 2001. Cryopreservation of axillary buds of grape (*Vitis vinifera*) *in vitro* plantlets. *CryoLetters* 22: 321-328.

Zhmakin, A.I. 2009. Fundamentals of criobiology. Physical Phenomena y Mathematical Models. Springer-Verlag. Berlin.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1: ANOVA del porcentaje de sobrevivencia de ápices (*PSA*) de seis genotipos (GT) de camote (CIP 442794, CIP 440669, CIP 420665, CIP 420952, CIP 420964, CIP187019.1). Los ápices han sido pre-cultivados por 24 horas en medio MPCC (ver anexo 7.3) con 12 diferentes concentraciones de sacarosa (SAC) (0.00M-0.60M). Se criopreservó los ápices vía el método de la vitrificación en la gota pequeña de PVS2 (LS: 20 min, PVS2: 15 min: RS: 20 min). La tabla de ANOVA muestra valores *PSA* transformados vía arcsin [raíz(x)].

| Fuente de variación | GL | SC | CM | Valor F | Valor p ¹ | |
|---------------------------------|-----|----------|---------|---------|----------------------|----|
| Genotipo (GT) | 5 | 9.80535 | 1.96107 | 67.05 | <0.001 | ** |
| Concentración de sacarosa (SAC) | 11 | 8.07405 | 0.734 | 25.1 | <0.001 | ** |
| GT x SAC | 55 | 2.61615 | 0.04757 | 1.63 | 0.012 | * |
| Error experimental | 140 | 4.0948 | 0.02925 | | | |
| TOTAL | 211 | 24.83448 | | | | |

p (prueba de Bartlett): 0.319

p (prueba de Ryan-Joiner): 0.081

¹ **: diferencias significativas para $p < 0.01$

*: diferencias significativas para $p < 0.05$

ANEXO 2: ANOVA del porcentaje de re-brotamiento de ápices (*PRA*) de seis genotipos (GT) de camote (CIP 442794, CIP 440669, CIP 420665, CIP 420952, CIP 420964, CIP187019.1). Los ápices han sido pre-cultivados por 24 horas en medio MPCC (ver anexo 7.3) con 12 diferentes concentraciones de sacarosa (SAC) (0.00M-0.60M). Se criopreservó los ápices vía el método de la vitrificación en la gota pequeña de PVS2 (LS: 20 min, PVS2: 15 min: RS: 20 min). La tabla de ANOVA muestra valores *PSA* transformados vía arcsin [raíz(x)].

| Fuente de variación | GL | SC | CM | Valor F | Valor p ² | |
|---------------------------------|-----|----------|---------|---------|----------------------|------|
| Genotipo (GT) | 5 | 6.13479 | 1.22696 | 39.94 | <0.001 | ** |
| Concentración de sacarosa (SAC) | 11 | 7.15422 | 0.65038 | 21.17 | <0.001 | ** |
| GT x SUC | 55 | 1.87596 | 0.03411 | 1.11 | 0.309 | N.S. |
| Error experimental | 140 | 4.30068 | 0.03072 | | | |
| TOTAL | 211 | 19.69992 | | | | |

p (prueba de Bartlett): 0.053

p (prueba de Ryan-Joiner): > 0.1

² **: diferencias significativas para $p < 0.01$

NS: sin diferencias significativas ($p = 0.309$)

ANEXO 3: Comparación de medias (Tukey, $\alpha=95\%$) del porcentaje de sobrevivencia de ápices (PSA) de seis genotipos de camote (CIP 442794, CIP 440669, CIP 420665, CIP 420952, CIP 420964, CIP187019.1), pre-cultivados por 24 horas con diferentes concentraciones de sacarosa (0.00M – 0.60M) previo a su criopreservación vía el método de vitrificación en la gota pequeña (LS: 20 min, PVS2: 15 min, RS: 20 min). La tabla muestra datos originales (sin transformación de arcsin [raiz]). SE: Error estándar.

| Concentración de sucrosa (SUC) | CIP 442794 ('TIS 2357') | | CIP 440669 ('Cinitavo') | | CIP 420665 ('Trujillano') | | CIP 420952 ('Chiipe Morado') | | CIP 420964 ('Colorado') | | CIP 187019.1 ('Tacna') | |
|--------------------------------|-------------------------|--------|-----------------------------|--------|-----------------------------|--------|------------------------------|--------|-----------------------------|--------|-----------------------------|--------|
| | PSA ¹ | ± SE | PSA ¹ | ± SE | PSA ¹ | ± SE | PSA ¹ | ± SE | PSA ¹ | ± SE | PSA ¹ | ± SE |
| 0.00 M | 66.0 ^{abcde} | ± 8.3 | 38.9 ^{defghijklmn} | ± 11.4 | 24.2 ^{hijklmn} | ± 7.3 | 1.2 ⁿ | ± 1.2 | 0.0 ⁿ | ± 0.0 | 0.0 ⁿ | ± 0.0 |
| 0.05 M | 83.4 ^{abcde} | ± 4.5 | 64.7 ^{abcde} | ± 4.8 | 59.3 ^{abcde} | ± 15.4 | 50.0 ^{bcde} | ± 12.5 | 26.0 ^{ghijklmn} | ± 9.1 | 43.2 ^{defghijklmn} | ± 11.8 |
| 0.10 M | 87.0 ^{abcd} | ± 5.5 | 75.9 ^{abcde} | ± 10.3 | 44.2 ^{cde} | ± 10.3 | 37.7 ^{defghijklmn} | ± 14.6 | 37.8 ^{defghijklmn} | ± 15.7 | 62.7 ^{abcde} | ± 12.2 |
| 0.15 M | 87.3 ^{abcd} | ± 5.6 | 76.7 ^{abcde} | ± 5.4 | 62.6 ^{abcde} | ± 11.5 | 41.2 ^{defghijklmn} | ± 4.0 | 51.6 ^{abcde} | ± 7.2 | 53.7 ^{abcde} | ± 1.9 |
| 0.20 M | 96.1 ^{ab} | ± 2.3 | 87.2 ^{abcd} | ± 3.4 | 67.1 ^{abcde} | ± 5.6 | 37.0 ^{defghijklmn} | ± 14.6 | 45.3 ^{cde} | ± 13.9 | 65.5 ^{abcde} | ± 1.7 |
| 0.25 M | 95.8 ^a | ± 4.2 | 81.5 ^{abcde} | ± 1.9 | 45.0 ^{cde} | ± 7.1 | 49.0 ^{cde} | ± 14.0 | 35.6 ^{defghijklmn} | ± 6.8 | 54.9 ^{abcde} | ± 8.0 |
| 0.30 M | 81.5 ^{abcde} | ± 11.9 | 80.4 ^{abcde} | ± 8.5 | 64.3 ^{abcde} | ± 11.7 | 68.3 ^{abcde} | ± 3.7 | 42.0 ^{defghijklmn} | ± 9.9 | 33.3 ^{efghijklmn} | ± 7.7 |
| 0.35 M | 96.3 ^a | ± 3.7 | 79.8 ^{abcde} | ± 11.1 | 85.1 ^{abcde} | ± 4.2 | 54.5 ^{abcde} | ± 11.1 | 53.1 ^{abcde} | ± 12.2 | 43.2 ^{defghijklmn} | ± 9.6 |
| 0.40 M | 78.5 ^{abcde} | ± 7.0 | 68.4 ^{abcde} | ± 11.1 | 84.2 ^{abcde} | ± 7.1 | 68.5 ^{abcde} | ± 5.8 | 25.6 ^{hijklmn} | ± 9.9 | 53.7 ^{abcde} | ± 1.9 |
| 0.45 M | 93.5 ^{abc} | ± 3.4 | 38.1 ^{defghijklmn} | ± 7.0 | 72.7 ^{abcde} | ± 16.3 | 21.7 ^{ijklmn} | ± 1.3 | 27.4 ^{efghijklmn} | ± 2.2 | 24.4 ^{ghijklmn} | ± 6.5 |
| 0.50 M | 78.2 ^{abcde} | ± 3.4 | 41.2 ^{defghijklmn} | ± 5.9 | 41.1 ^{defghijklmn} | ± 12.3 | 21.8 ^{ijklmn} | ± 12.8 | 8.0 ^{klmn} | ± 8.0 | 27.8 ^{efghijklmn} | ± 2.4 |
| 0.60 M | 47.0 ^{abcde} | ± 3.0 | 39.1 ^{defghijklmn} | ± 4.8 | 17.9 ^{ijklmn} | ± 6.9 | 3.7 ^{mn} | ± 3.7 | 1.9 ^{mn} | ± 1.9 | 10.5 ^{lmn} | ± 3.8 |

¹ Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas para $p \leq 0.05$ (n=81)

ANEXO 4: Comparación de medias (Tukey, $\alpha=95\%$) del porcentaje de re-brotamiento de ápices (*PRA*) de seis genotipos de camote (CIP 442794, CIP 440669, CIP 420665, CIP 420952, CIP 420964, CIP187019.1), pre-cultivados por 24 horas con diferentes concentraciones de sacarosa (0.00M – 0.60M) previo a su criopreservación vía el método de vitrificación en la gota pequeña (LS: 20 min, PVS2: 15 min, RS: 20 min). La tabla muestra datos originales (sin transformación de arcsin [raiz]). SE: Error estándar.

| Concentración de sucrosa (SUC) | CIP 442794 ('TIS 2357') | | CIP 440669 ('Cinitavo') | | CIP 420665 ('Trujillano') | | CIP 420952 ('Chilpe Morado') | | CIP 420964 ('Colorado') | | CIP 187019.1 ('Tacna') | |
|--------------------------------|----------------------------|--------|----------------------------|-------|----------------------------|--------|------------------------------|--------|----------------------------|--------|-----------------------------|--------|
| | <i>PRA</i> ¹ | ± SE | <i>PRA</i> ¹ | ± SE | <i>PRA</i> ¹ | ± SE | <i>PRA</i> ¹ | ± SE | <i>PRA</i> ¹ | ± SE | <i>PRA</i> ¹ | ± SE |
| 0.00 M | 47.34 ^{abcdefghi} | ± 5.7 | 12.9 ^{ghijk} | ± 9.2 | 7.6 ^{hijk} | ± 5.9 | 0.0 ^k | ± 0.0 | 0.0 ^k | ± 0.0 | 0.0 ^k | ± 0.0 |
| 0.05 M | 70.9 ^{abcd} | ± 6.8 | 35.6 ^{bcdefghijk} | ± 8.7 | 38.3 ^{bcdefghijk} | ± 14.2 | 38.1 ^{bcdefghijk} | ± 8.0 | 15.6 ^{efghijk} | ± 6.3 | 26.5 ^{cdefghijk} | ± 8.6 |
| 0.10 M | 71.5 ^{abcd} | ± 6.3 | 61.6 ^{abcdef} | ± 6.4 | 32.3 ^{cdefghijk} | ± 14.9 | 31.0 ^{cdefghijk} | ± 12.8 | 24.6 ^{defghijk} | ± 15.9 | 38.6 ^{abcdefghijk} | ± 4.4 |
| 0.15 M | 66.7 ^{abcde} | ± 13.0 | 46.0 ^{bcdefghi} | ± 5.7 | 51.7 ^{bcdefgh} | ± 17.8 | 36.9 ^{bcdefghijk} | ± 1.2 | 35.4 ^{bcdefghijk} | ± 5.8 | 38.3 ^{bcdefghijk} | ± 6.2 |
| 0.20 M | 80.1 ^{abc} | ± 6.4 | 59.4 ^{abcdef} | ± 9.2 | 37.0 ^{bcdefghijk} | ± 11.1 | 30.6 ^{cdefghijk} | ± 12.5 | 32.8 ^{cdefghijk} | ± 10.5 | 46.1 ^{bcdefghi} | ± 5.1 |
| 0.25 M | 86.7 ^{ab} | ± 6.2 | 63.0 ^{abcdef} | ± 1.9 | 31.5 ^{cdefghijk} | ± 6.2 | 40.9 ^{abc defghijk} | ± 15.3 | 23.7 ^{defghijk} | ± 6.6 | 38.9 ^{bcdefghijk} | ± 11.6 |
| 0.30 M | 70.0 ^{abcde} | ± 11.1 | 69.7 ^{abcde} | ± 9.6 | 52.0 ^{bcdefgh} | ± 7.6 | 57.5 ^{abcdefg} | ± 4.3 | 30.7 ^{cdefghijk} | ± 10.0 | 21.0 ^{defghijk} | ± 6.5 |
| 0.35 M | 91.1 ^a | ± 2.6 | 61.1 ^{abcdef} | ± 8.5 | 71.4 ^{abcd} | ± 4.7 | 44.6 ^{abc defghlj} | ± 8.4 | 39.5 ^{bcdefghijk} | ± 8.9 | 38.3 ^{bcdefghijk} | ± 14.2 |
| 0.40 M | 60.9 ^{abcdef} | ± 2.9 | 51.9 ^{bcdefgh} | ± 6.8 | 67.9 ^{abcde} | ± 14.3 | 54.1 ^{bcdefgh} | ± 5.0 | 21.9 ^{defghijk} | ± 9.1 | 38.0 ^{bcdefghijk} | ± 6.1 |
| 0.45 M | 71.0 ^{abcd} | ± 6.5 | 26.7 ^{cdefghijk} | ± 6.0 | 59.7 ^{abcdeñ} | ± 17.2 | 17.7 ^{defghijk} | ± 3.1 | 15.4 ^{efghijk} | ± 4.6 | 16.6 ^{defghijk} | ± 4.5 |
| 0.50 M | 50.0 ^{bcdefgh} | ± 7.7 | 21.5 ^{defghijk} | ± 5.2 | 29.6 ^{cdefghijk} | ± 16.4 | 16.4 ^{ijk} | ± 12.6 | 6.0 ^{fghijk} | ± 6.0 | 19.0 ^{defghijk} | ± 6.7 |
| 0.60 M | 27.4 ^{bcdefghijk} | ± 3.4 | 17.7 ^{defghijk} | ± 4.4 | 11.4 ^{fghijk} | ± 2.3 | 1.2 ^{jk} | ± 1.2 | 0.0 ^{ljk} | ± 0.0 | 7.4 ^{ghijk} | ± 3.7 |

¹ Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas para $p \leq 0.05$ (n=81)

ANEXO 5: ANOVA del porcentaje de sobrevivencia de ápices (*PSA*) de seis genotipos (GT) de camote (CIP 442794, CIP 420701, CIP 420665, CIP 420952, CIP 420964, CIP187019.1). Los ápices han sido pre-cultivados por 24 horas en medio MPCC con 0.35M de sacarosa y posteriormente crioprotegidos por diferentes tiempos con PVS2 (15min, 30 min, 45 min, 60 min) aplicando el método de la vitrificación en la gota pequeña de PVS2 (LS: 20 min, RS: 20 min). La tabla de ANOVA muestra valores *PSA* transformados vía arcsin [raíz(x)].

| Fuente de variación | GL | SC | CM | Valor F | Valor p ¹ | |
|--|----|---------|---------|---------|----------------------|----|
| Genotipo (GT) | 5 | 1.78012 | 0.35602 | 10.44 | <0.001 | ** |
| Tiempo de crioprotección con PVS2 (PVS2) | 3 | 0.49325 | 0.16442 | 4.82 | 0.005 | ** |
| GT x PVS2 | 15 | 0.49176 | 0.03278 | 0.96 | 0.508 | NS |
| Error experimental | 48 | 1.63677 | 0.03410 | | | |
| TOTAL | 71 | 4.40189 | | | | |

p (prueba de Bartlett): 0.426

p (prueba de Ryan-Joiner): > 0.1

¹ **: diferencias significativas para $p < 0.01$
 NS : sin diferencias significativas ($p = 0.508$)

ANEXO 6: ANOVA del porcentaje de re-brotamiento de ápices (*PRA*) de seis genotipos (GT) de camote (CIP 442794, CIP 420701, CIP 420665, CIP 420952, CIP 420964, CIP187019.1). Los ápices han sido pre-cultivados por 24 horas en medio MPCC con 0.35M de sacarosa y posteriormente crioprotegidos por diferentes tiempos con PVS2 (15min, 30 min, 45 min, 60 min) aplicando el método de la vitrificación en la gota pequeña de PVS2 (LS: 20 min, RS: 20 min). La tabla de ANOVA muestra valores *PRA* transformados vía arcsin [raíz(x)].

| Fuente de variación | GL | SC | CM | Valor F | Valor p ¹ | |
|--|----|---------|---------|---------|----------------------|----|
| Genotipo (GT) | 5 | 1.98132 | 0.39626 | 9.67 | <0.001 | ** |
| Tiempo de crioprotección con PVS2 (PVS2) | 3 | 0.84855 | 0.28285 | 6.90 | 0.001 | ** |
| GT x PVS2 | 15 | 0.60284 | 0.04019 | 0.98 | 0.489 | NS |
| Error experimental | 48 | 1.96725 | 0.04098 | | | |
| TOTAL | 71 | 5.39996 | | | | |

p (prueba de Bartlett): 0.555

p (prueba de Ryan-Joiner): > 0.1

¹ **: diferencias significativas para $p < 0.01$
 NS : sin diferencias significativas ($p = 0.508$)

ANEXO 7: Comparación de medias (Tukey, $\alpha=95\%$) del porcentaje de sobrevivencia (*PSA*) y re-brotamiento de ápices (*PRA*) de seis genotipos de camote (CIP 442794, CIP 420665, CIP 420952, CIP 420701, CIP 420964, CIP187019.1), pre-cultivados por 24 horas en medio MPCC suplementado con 0.35M de sacarosa y posteriormente crioprotegidos por diferentes tiempos con PVS2 (15min, 30 min, 45 min, 60 min) aplicando el método de la vitrificación en la gota pequeña de PVS2 (LS: 20 min, RS: 20 min). La tabla muestra datos originales (sin transformación de arcsin [raíz]). SE: Error estándar.

| Tiempo de crioprotección con PVS2 (en minutos) | GENOTIPOS | | | | | |
|--|--|--|---|---|--|--|
| | CIP 442794 ('TIS 2357') | CIP 420665 ('Trujillano') | CIP 420952 ('Chilpe Morado') | CIP 420701 ('Pierna de Oso') | CIP 420964 ('Colorado') | CIP 187019.1 ('Tacna') |
| 15 | <i>PSA</i> ¹ ± SE 85.1 ^{ab} ± 6.6 | <i>PSA</i> ¹ ± SE 75.0 ^{abc} ± 10.9 | <i>PSA</i> ¹ ± SE 57.0 ^{abc} ± 4.6 | <i>PSA</i> ¹ ± SE 56.7 ^{abc} ± 8.3 | <i>PSA</i> ¹ ± SE 33.6 ^{bc} ± 6.2 | <i>PSA</i> ¹ ± SE 31.8 ^c ± 7.3 |
| 30 | 84.7 ^{ab} ± 4.5 | 96.3 ^a ± 2.1 | 80.3 ^{abc} ± 2.3 | 75.1 ^{abc} ± 3.2 | 63.0 ^{abc} ± 7.7 | 51.7 ^{abc} ± 8.9 |
| 45 | 78.9 ^{abc} ± 6.4 | 80.0 ^{abc} ± 7.4 | 67.0 ^{abc} ± 8.5 | 56.0 ^{abc} ± 6.0 | 55.6 ^{abc} ± 9.3 | 69.9 ^{abc} ± 6.9 |
| 60 | 81.1 ^{abc} ± 9.3 | 66.0 ^{abc} ± 10.0 | 64.4 ^{abc} ± 18.1 | 67.0 ^{abc} ± 5.6 | 42.2 ^{bc} ± 25.2 | 30.9 ^c ± 4.7 |
| 15 | <i>PRA</i> ¹ ± SE 66.3 ^{ABC} ± 13.8 | <i>PRA</i> ¹ ± SE 70.0 ^{ABC} ± 15.5 | <i>PRA</i> ¹ ± SE 33.4 ^{BC} ± 5.6 | <i>PRA</i> ¹ ± SE 45.9 ^{ABC} ± 5.7 | <i>PRA</i> ¹ ± SE 15.0 ^C ± 3.6 | <i>PRA</i> ¹ ± SE 24.4 ^{BC} ± 7.9 |
| 30 | 74.3 ^{AB} ± 8.5 | 92.5 ^A ± 4.3 | 72.5 ^{ABC} ± 4.2 | 71.3 ^{ABC} ± 3.6 | 56.8 ^{ABC} ± 10.5 | 43.7 ^{ABC} ± 9.7 |
| 45 | 70.2 ^{ABC} ± 9.7 | 76.5 ^{AB} ± 8.5 | 40.8 ^{BC} ± 19.0 | 51.4 ^{ABC} ± 7.1 | 40.7 ^{ABC} ± 7.4 | 62.4 ^{ABC} ± 2.6 |
| 60 | 70.0 ^{ABC} ± 15.4 | 57.2 ^{ABC} ± 8.9 | 52.0 ^{ABC} ± 18.3 | 56.6 ^{ABC} ± 10.6 | 26.8 ^{BC} ± 15.6 | 24.5 ^{BC} ± 4.0 |

¹ Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas para $p \leq 0.05$ (n=81)

ANEXO 8: ANOVA del porcentaje de sobrevivencia de ápices (*PSA*) de 24 genotipos (*GT*) de camote. Se pre-cultivaron los ápices por 24 horas en medio MPCC suplementado con 0.35M de sacarosa. Posteriormente se crioprotegieron los ápices por 30 minutos con PVS2, aplicando el método de la vitrificación en la gota pequeña de PVS2 (LS: 20 min, RS: 20 min).

| Fuente de variación | GL | SC | CM | Valor F | Valor p ¹ |
|---------------------|----|---------|---------|---------|----------------------|
| Genotipo (GT) | 23 | 2.35819 | 0.10253 | 3.41 | <0.001 ** |
| Error experimental | 48 | 1.44244 | 0.03005 | | |
| TOTAL | 71 | 3.80063 | | | |

p (prueba de Bartlett): 0.490

p (prueba de Ryan-Joiner): >0.100

¹ **: diferencias significativas para $p < 0.01$

ANEXO 9: ANOVA del porcentaje de re-brotamiento de ápices (*PRA*) de 24 genotipos (*GT*) de camote. Se pre-cultivaron los ápices por 24 horas en medio MPCC suplementado con 0.35M de sacarosa. Posteriormente se crioprotegieron los ápices por 30 minutos con PVS2, aplicando el método de la vitrificación en la gota pequeña de PVS2 (LS: 20 min, RS: 20 min).

| Fuente de variación | GL | SC | CM | Valor F | Valor p ¹ |
|---------------------|----|---------|---------|---------|----------------------|
| Genotipo (GT) | 23 | 2.09300 | 0.09100 | 3.59 | <0.001 ** |
| Error experimental | 48 | 1.21633 | 0.02534 | | |
| TOTAL | 71 | 3.30933 | | | |

p (prueba de Bartlett): 0.490

p (prueba de Ryan-Joiner): >0.100

¹ **: diferencias significativas para $p < 0.01$

ANEXO 10: Comparación de medias (Tukey, $\alpha=95\%$) del porcentaje de sobrevivencia (*PSA*) y re-brotamiento de ápices (*PRA*) de 24 genotipos de camote, pre-cultivados por 24 horas en medio MPCC suplementado con 0.35M de sacarosa y posteriormente crioprotegidos por 30 minutos con PVS2 aplicando el método de la vitrificación en la gota pequeña de PVS2 (LS: 20 min, RS: 20 min). SE: Error estándar.

| Genotipo(GT) | | <i>PSA</i> | ± | SE | <i>PRA</i> | ± | SE |
|---------------|----------------------------|---------------------|---|------|---------------------|---|------|
| CIP 422656 | ('Huambachero') | 73.0 ^a | ± | 4.0 | 59.1 ^{AB} | ± | 3.0 |
| CIP 420051 | ('Chinchano') | 70.6 ^a | ± | 8.6 | 66.1 ^A | ± | 8.7 |
| CIP 421070 | ('Ramon Camacho UNPRG 49') | 61.8 ^{ab} | ± | 4.2 | 54.9 ^{AB} | ± | 9.3 |
| CIP 442056 | ('9 Catty Variety') | 59.5 ^{ab} | ± | 7.0 | 58.4 ^{AB} | ± | 5.8 |
| CIP 420040 | ('Negrito Del Ihuanco') | 58.8 ^{ab} | ± | 6.8 | 54.1 ^{AB} | ± | 9.1 |
| CIP 400103 | ('Senorita') | 53.3 ^{abc} | ± | 7.7 | 48.9 ^{ABC} | ± | 8.0 |
| CIP 421132 | ('Blanco de Chilca') | 51.6 ^{abc} | ± | 12.6 | 43.8 ^{ABC} | ± | 7.2 |
| CIP 400077 | ('Colorada') | 50.4 ^{abc} | ± | 5.1 | 41.3 ^{ABC} | ± | 1.2 |
| CIP 440449 | ('American') | 48.2 ^{abc} | ± | 10.4 | 34.4 ^{ABC} | ± | 7.1 |
| CIP 441038 | ('Kengi') | 45.4 ^{abc} | ± | 15.7 | 40.7 ^{ABC} | ± | 18.0 |
| CIP 401205 | - | 45.0 ^{abc} | ± | 9.3 | 39.3 ^{ABC} | ± | 10.6 |
| CIP 420335 | ('Bisambra') | 45.0 ^{abc} | ± | 12.1 | 36.0 ^{ABC} | ± | 10.2 |
| CIP 400060 | ('Coloroda') | 40.2 ^{abc} | ± | 9.8 | 34.5 ^{ABC} | ± | 9.1 |
| CIP 420872 | ('Amarillo') | 39.5 ^{abc} | ± | 6.1 | 34.9 ^{ABC} | ± | 3.4 |
| CIP 420746 | ('Quilikano') | 38.0 ^{abc} | ± | 12.1 | 28.6 ^{ABC} | ± | 14.6 |
| CIP 400002 | ('Morado') | 31.9 ^{abc} | ± | 23.0 | 21.3 ^{ABC} | ± | 17.2 |
| CIP 421062 | ('Boca De Chisco NP-31') | 29.0 ^{abc} | ± | 8.5 | 27.9 ^{ABC} | ± | 7.6 |
| CIP 441103 | - | 23.6 ^{abc} | ± | 8.8 | 15.8 ^{BC} | ± | 6.8 |
| CIP 420027 | ('Zapallo') | 23.2 ^{abc} | ± | 11.4 | 19.8 ^{ABC} | ± | 11.9 |
| CIP 420269 | ('Napa') | 22.2 ^{abc} | ± | 2.9 | 13.3 ^{BC} | ± | 3.9 |
| CIP 420033 | ('Zapallo o Costeno') | 21.1 ^{abc} | ± | 8.0 | 17.8 ^{ABC} | ± | 4.8 |
| CIP 400048 | ('Colorada') | 19.4 ^{abc} | ± | 12.9 | 16.0 ^{ABC} | ± | 11.0 |
| CIP 421061 | ('Pampa Culebra NP-30') | 11.4 ^{bc} | ± | 6.5 | 9.2 ^{BC} | ± | 4.6 |
| CIP 400059 | ('Blanca') | 2.5 ^c | ± | 0.1 | 1.7 ^C | ± | 0.1 |
| Media general | | 40.2 | ± | 8.9 | 34.1 | ± | 8.1 |

ANEXO 11: Medios de cultivo utilizados en la criopreservación de camote vía el método de vitrificación en la gota pequeña de PVS2

| Tipo de medio | Medio de propagación <i>in vitro</i> de camote (MPC) | Medio de pre-cultivo (MPCC) | Solución de carga (LS) | Solución de vitrificación de plantas 2 (PVS2) |
|---------------|--|--|---|---|
| Composición | Sales MS ² 4.33 g/l Pantotenato de calcio 2 mg/l Nitrato de calcio 100 mg/l L-arginina 100 mg/l Ácido ascórbico 200 mg/l Putrescina HCl 20 mg/l Sacarosa 30 g/l Phytigel 3 g/l | Sales MS ² 4.33 g/l Pantotenato de calcio 2 mg/l Nitrato de calcio 100 mg/l L-arginina 100 mg/l Ácido ascórbico 100 mg/l Putrescina HCl 20 mg/l Sacarosa ³ 0.35 M Phytigel 3 g/l | Sales MS ² 4.33 g/l Pantotenato de calcio 2 mg/l Nitrato de calcio 100 mg/l L-arginina 100 mg/l Ácido ascórbico 200 mg/l Putrescina HCl 20 mg/l Glicerol 2.0 M Sacarosa 0.4M | Sales MS ² 4.33 g/l Pantotenato de calcio 2 mg/l Nitrato de calcio 100 mg/l L-arginina 100 mg/l Ácido ascórbico 200 mg/l Putrescina HCl 20 mg/l Glicerol 3.26 M Etilenglicol (EG) 2.42 M Dimetilsulfóxido (DMSO) 1.9 M Sacarosa 0.4 M |
| pH | 5.7 | 5.7 | 5.7 | 5.7 |
| Procedimiento | (a) Pesar 4.33 g de sales MS y disolver en 600 ml de agua desmineralizada-destilada. (b) Agregar 30 g de sacarosa y agitar hasta disolver. (c) Agregar 1 ml de las soluciones stock de pantotenato de calcio, nitrato de calcio, L-arginina, ácido ascórbico y putrescina-HCl. Agitar. (d) Completar a un volumen de 1000 ml con agua desmineralizada-destilada. (e) Medir pH y ajustar a 5.7. (f) Agregar 3.0 g de phytigel y calentar medio en la microondas (100% de intensidad por 10 minutos, haciendo una pausa a los 7 minutos para agitar). (g) Dispensar en tubos de ensayo (25 x 150 mm). Tapar tubos. Autoclavar medio por 20 minutos a 121 °C y 15 lb. (h) Guardar refrigerado (4°C) por un tiempo máximo de 1 mes. | (a) Pesar 4.33 g de sales MS y disolver en 600 ml de agua desmineralizada-destilada. (b) Agregar 119.7g de sacarosa. Agitar. (c) Agregar 1 ml de las soluciones stock de pantotenato de calcio, nitrato de calcio, L-arginina y putrescina-HCl. Agregar 0.5 ml de la solución stock de ácido ascórbico. Agitar. (d) Completar a un volumen de 1000 ml con agua desmineralizada-destilada. (e) Medir pH y ajustar a 5.7. (f) Colocar 6.0 g de agar en una botella de vidrio autoclavable (de 1 litro). Vaciar medio de cultivo en botella. Autoclavar medio por 20 minutos a 121 °C y 15 lb. (g) Dispensar 25 ml de medio por placa Petri estéril (en cámara de flujo laminar). (h) Guardar refrigerado (4°C) por un tiempo máximo de 1 mes. | (a) Pesar 2.17 g de sales MS y disolver en 175 ml de agua desmineralizada-bidestilada (agua destilada MQ). (b) Agregar 68.4 g de sacarosa y agitar hasta disolver. (c) Agregar 0.5 ml de las soluciones stock de pantotenato de calcio, nitrato de calcio, L-arginina, ácido ascórbico y putrescina-HCl. Agitar. (d) Agregar 73.7 ml de glicerol. Agitar. (e) Completar a un volumen de 500 ml con agua desmineralizada-bidestilada (agua destilada MQ) (f) Medir pH y ajustar a 5.7. (g) Filtrar al vacío (en cámara de flujo laminar). (h) Dispensar 45 ml de solución por tubo Eppendorf estéril de 50 ml (en cámara de flujo laminar). (i) Guardar refrigerado (4°C) por un tiempo máximo de 1 mes. | (a) Pesar 2.17 g de sales MS y disolver en 175 ml de agua desmineralizada-bidestilada (agua destilada MQ). (b) Agregar 68.4 g de sacarosa y agitar hasta disolver. (c) Agregar 0.5 ml de las soluciones stock de pantotenato de calcio, nitrato de calcio, L-arginina, ácido ascórbico y putrescina-HCl. Agitar. (d) Agregar 120 ml de glicerol, 67.4 ml de EG, y 68.2 ml de DMSO. Agitar. (e) Completar a un volumen de 500 ml con agua desmineralizada-bidestilada (agua destilada MQ) (f) Medir pH y ajustar a 5.7 (g) Filtrar al vacío (en cámara de flujo laminar). (h) Dispensar 45 ml de solución por tubo Eppendorf estéril de 50 ml (en cámara de flujo laminar). (i) Guardar refrigerado (4°C) por un tiempo máximo de 1 mes. |

² Sales basales de Murashige y Skoog (1962). Proveedor Caisson.

³ En ensayo 1 se evaluó 12 concentraciones de sacarosa (0.00-0.60M). En los ensayos 2 y 3 se utilizó una concentración de sacarosa de 0.35M.

ANEXO 12: Medios de cultivo utilizados en la criopreservación de camote vía el método de vitrificación en la gota pequeña (contin.)

| Tipo de medio | Solución de descongelamiento (RS) | Medio de recuperación 1 (MRC-1) | Medio de recuperación 2 (MRC-2) | Medio de recuperación 3 (MRC-3) |
|---------------|---|--|--|--|
| Composición | <p>Sales MS² 4.33 g/l Pantotenato de calcio 2 mg/l Nitrato de calcio 100 mg/l L-arginina 100 mg/l Ácido ascórbico 200 mg/l Putrescina HCl 20 mg/l Sacarosa 1.2 M</p> | <p>Sales MS² 4.33 g/l Pantotenato de calcio 2 mg/l Nitrato de calcio 100 mg/l L-arginina 100 mg/l Ácido ascórbico 100 mg/l Putrescina HCl 20 mg/l Ácido giberélico 10 mg/l Agua de coco 10 ml/l Sacarosa 0.3 M Agar 6 g/l</p> | <p>Sales MS² 4.33 g/l Pantotenato de calcio 2 mg/l Nitrato de calcio 100 mg/l L-arginina 100 mg/l Ácido ascórbico 100 mg/l Putrescina HCl 20 mg/l Ácido giberélico 10 mg/l Agua de coco 10 ml/l Sacarosa 0.1 M Agar 6 g/l</p> | <p>Sales MS² 4.33 g/l Pantotenato de calcio 2 mg/l Nitrato de calcio 100 mg/l L-arginina 100 mg/l Ácido ascórbico 100 mg/l Putrescina HCl 20 mg/l Ácido giberélico 10 mg/l Agua de coco 10 ml/l Sacarosa 30 g/l Agar 6 g/l</p> |
| pH | 5.7 | 5.7 | 5.7 | 5.7 |
| Procedimiento | <p>(a) Pesar 2.2 g de sales MS y disolver en 175 ml de agua desmineralizada-bidestilada (agua destilada MQ). (b) Agregar 205.3 g de sacarosa y agitar hasta disolver. (c) Agregar 0.5 ml de las soluciones stock de pantotenato de calcio, nitrato de calcio, L-arginina, ácido ascórbico y putrescina-HCl. Agitar. (d) Agregar 73.7 ml de glicerol. Agitar. (e) Completar a un volumen de 500 ml con agua desmineralizada-bidestilada (agua destilada MQ). (f) Medir pH y ajustar a 5.7. (g) Filtrar al vacío (en cámara de flujo laminar). (h) Dispensar 45 ml de solución por tubo Eppendorf estéril de 50 ml (en cámara de flujo laminar). (i) Guardar refrigerado (4°C) por un tiempo máximo de 1 mes.</p> | <p>(a) Pesar 4.33 g de sales MS y disolver en 600 ml de agua desmineralizada-destilada. (b) Agregar 102.6 g de sacarosa y agitar hasta disolver. (c) Agregar 1 ml de las soluciones stock de pantotenato de calcio, nitrato de calcio, L-arginina, ácido ascórbico y putrescina-HCl. Agitar. (d) Completar a un volumen de 980 ml con agua desmineralizada-destilada. (e) Medir pH y ajustar a 5.7. (f) Colocar 6.0 g de agar en una botella de vidrio autoclavable (de 1 litro). Vaciar el medio de cultivo en la botella. Autoclavar medio por 20 minutos a 121 °C y 15 lb. (g) Cuando la temperatura del medio ha bajado a 35 a 40 °C, agregar bajo condiciones asépticas 10 ml de solución stock de ácido giberélico y 10 ml de agua de coco. Homogenizar medio. Dispensar 25 ml de medio por placa Petri estéril. (h) Guardar refrigerado (4°C) por un tiempo máximo de 1 mes.</p> | <p>(a) Pesar 4.33 g de sales MS y disolver en 600 ml de agua desmineralizada-destilada. (b) Agregar 34.2 g de sacarosa y agitar hasta disolver. (c) Agregar 1 ml de las soluciones stock de pantotenato de calcio, nitrato de calcio, L-arginina, ácido ascórbico y putrescina-HCl. Agitar. (d) Completar a un volumen de 980 ml con agua desmineralizada-destilada. (e) Medir pH y ajustar a 5.7. (f) Colocar 6.0 g de agar en una botella de vidrio autoclavable (de 1 litro). Vaciar medio de cultivo en botella. Autoclavar medio por 20 minutos a 121 °C y 15 lb. (g) Cuando la temperatura de medio ha bajado a 35 a 40 °C, agregar bajo condiciones asépticas 10 ml de solución stock de ácido giberélico y 10 ml de agua de coco. Homogenizar medio. Dispensar 25 ml de medio por placa Petri estéril. (h) Guardar refrigerado (4°C) por un tiempo máximo de 1 mes.</p> | <p>(a) Pesar 4.33 g de sales MS y disolver en 600 ml de agua desmineralizada-destilada. (b) Agregar 30 g de sacarosa y agitar hasta disolver. (c) Agregar 1 ml de las soluciones stock de pantotenato de calcio, nitrato de calcio, L-arginina, ácido ascórbico y putrescina-HCl. Agitar. (d) Completar a un volumen de 980 ml con agua desmineralizada-destilada. (e) Medir pH y ajustar a 5.7. (f) Colocar 6.0 g de agar en una botella de vidrio autoclavable (de 1 litro). Vaciar medio de cultivo en botella. Autoclavar medio por 20 minutos a 121 °C y 15 lb. (g) Cuando la temperatura de medio ha bajado a 35 a 40 °C, agregar bajo condiciones asépticas 10 ml de solución stock de ácido giberélico y 10 ml de agua de coco. Homogenizar medio. Dispensar 25 ml de medio por placa Petri estéril. (h) Guardar refrigerado (4°C) por un tiempo máximo de 1 mes.</p> |

² Sales basales de Murashige y Skoog (1962). Proveedor Caisson.

ANEXO 13: Medios de cultivo utilizados en la criopreservación de camote vía el método de vitrificación en la gota pequeña de PVS2
(Continuación)

| Tipo de Solución Stock | Pantotenato de calcio | Nitrato de calcio | Putrescina | L-arginina | Ácido ascórbico | Ácido giberélico | Agua de coco |
|------------------------|--|---|--|--|---|--|---|
| Composición | Pantotenato de calcio (2.0 mg/ml) | Nitrato de calcio (100 mg/ml) | Putrescina HCl (20 mg/ml) | L-arginina (100 mg/ml) | Ácido ascórbico (200 mg/ml) | Ácido giberélico (1 mg/ml) | Agua de coco |
| Procedimiento | (a) Pesar 0.2 g de pantotenato de calcio. (b) Disolver en 100 ml de agua desmineralizada - destilada. Vaciar en frasco de plástico. (c) Etiquetar con nombre de compuesto, concentración (mg/ml) y fecha de preparación. (d) Guardar refrigerado a 4°C por un tiempo máximo de 1 mes. | (a) Pesar 10 g de nitrato de calcio. (b) Disolver en 100 ml de agua desmineralizada-destilada. Vaciar en frasco de plástico. (c) Etiquetar con nombre de compuesto, concentración (mg/ml) y fecha de preparación. (d) Guardar refrigerado a 4°C por un tiempo máximo de 1 mes. | (a) Pesar 2 g de putrescina (b) Disolver en 100 ml de agua desmineralizada-destilada. Vaciar en frasco de plástico. (c) Etiquetar con nombre de compuesto, concentración (mg/ml) y fecha de preparación. (d) Guardar refrigerado a 4°C por un tiempo máximo de 1 mes. | (a) Pesar 10 g de L-arginina. (b) Disolver en 100 ml de agua desmineralizada - destilada. Vaciar en frasco de plástico. (c) Etiquetar con nombre de compuesto, concentración (mg/ml) y fecha de preparación. (d) Guardar refrigerado a 4°C por un tiempo máximo de 1 mes. | (a) Pesar 20 g de ácido ascórbico. (b) Disolver en 100 ml de agua desmineralizada -destilada. (c) Vaciar en frasco de plástico. (d) Etiquetar con nombre de compuesto, concentración (mg/ml) y fecha de preparación. (e) Guardar refrigerado a 4°C por un tiempo máximo de 1 mes. | (a) Pesar 0.1 g de ácido giberélico. (b) Disolver en 5-10 ml de etanol (96%). (c) Completar el volumen a 100 ml con agua desmineralizada-destilada. (d) Esterilizar vía filtración en vacío (e) Vaciar en frascos de plástico estériles. Tapar. Sellar con Parafilm. (f) Etiquetar con nombre de compuesto, concentración (mg/ml) y fecha de preparación. (g) Guardar refrigerado a 4°C por un tiempo máximo de 1 mes. | (a) Abrir cocos y vaciar su agua en un vasos de precipitación de plástico (4 litros) (b) Homogenizar solución de agua de coco. Filtrar por gasa quirúrgica. (c) Vaciar en frascos de plástico de 1 litro y almacenar congelado (en oscuridad) por un tiempo máximo de 6 meses. (d) Descongelar el volumen requerido. (e) Esterilizar vía filtración en vacío (f) Vaciar en frascos de plástico estériles. Tapar. Sellar con Parafilm. (g) Etiquetar con nombre de compuesto, concentración (mg/ml) y fecha de preparación. (h) Guardar refrigerado a 4°C en oscuridad (envuelto en papel platino) por un tiempo máximo de 1 mes. |

ANEXO 14: Características generales de los 31 genotipos criopreservados vía el método de vitrificación en la gota pequeña de PVS2 (ensayos 1, 2 y 3)

| Numero de accesión | Nombre de accesión | Número del colector / Código del mejorador | Estado biológico | País de origen | Latitud geográfica de lugar de colecta | Longitud geográfica de lugar de colecta |
|-----------------------|---------------------------|--|-------------------|--------------------------|---|--|
| CIP 187019.1 | Tacna | TN89.131 | Variedad mejorada | CIP | - | - |
| CIP 400002 | Morado | DLP 613 | Variedad Nativa | Ecuador | -0.83 | -80.66 |
| CIP 400048 | Colorada | DLP 3973 | Variedad Nativa | Argentina | -27.5 | -58.83 |
| CIP 400059 | Blanca | DLP 4010 | Variedad Nativa | Argentina | -28.46 | -59.08 |
| CIP 400060 | Colorada | DLP 4013 | Variedad Nativa | Argentina | -28.43 | -59.08 |
| CIP 400077 | Colorada | DLP 4048 | Variedad Nativa | Argentina | -27.33 | -55.5 |
| CIP 400103 | Senorita | DLP 4124 | Variedad Nativa | Argentina | -26.98 | -55.13 |
| CIP 401205 | Unknown | CATIE 9257 | Variedad Nativa | México | 24.55 | -98.9166 |
| CIP 420027 | Zapallo | DLP 1914 | Variedad Nativa | Perú | -7.75 | -78.16 |
| CIP 420033 | Zapallo o Costeño | ARB 445 | Variedad Nativa | Perú | -7.55 | -78.14 |
| CIP 420040 | Negrillo Del Ihuanco | RCB IN-146 | Variedad Nativa | Perú | -13 | -76 |
| CIP 420051 | Chinchano | DLP 352 | Variedad Nativa | Perú | -17.33 | -70.83 |
| CIP 420269 | Napa | DLP 3163 | Variedad Nativa | Perú | -4.61 | -80.21 |
| CIP 420335 | Bisambra | RCB IN-139 | Variedad Nativa | Perú | -15 | -75 |
| CIP 420665 | Trujillano | DLP 905 | Variedad Nativa | Perú | -7.33 | -77.66 |
| CIP 420701 | Pierna de Oso | DLP 1113 | Variedad Nativa | Perú | -7.66 | -79.08 |
| CIP 420746 | Quilikano | DLP 1950 | Variedad Nativa | Perú | -7.58 | -78.7 |
| CIP 420872 | Amarillo | DLP 2698 | Variedad Nativa | Perú | -11.75 | -76.91 |
| CIP 420952 | Chilpe Morado | DLP 3466 | Variedad Nativa | Perú | -7.83 | -78.16 |
| CIP 420964 | Colorado | DLP 3488 | Variedad Nativa | Perú | -8.23 | -76.13 |
| CIP 421061 | Pampa Culebra NP-30 | I01401 | Variedad Nativa | Perú | - | - |
| CIP 421062 | Boca De Chisco NP-31 | I01402 | Variedad Nativa | Perú | - | - |
| CIP 421070 | Ramon Camacho UNPRG 49 | I01423 | Variedad Nativa | Perú | - | - |
| CIP 421132 | Blanco de Chilca | RCB IN-180 | Variedad Nativa | Perú | -12.5 | -76.5 |
| CIP 422656 | Huambachero | INIA 306 | Variedad Nativa | Perú | - | - |
| CIP 440449 | American | I01457 | Variedad Nativa | Islas Cook | - | - |
| CIP 440669 | Cinitavo | I00207 | Variedad Nativa | Filipinas | - | - |
| CIP 441038 | Kengi | I00870 | Variedad Nativa | Papúa Nueva Guinea | - | - |
| CIP 441103 | Unknown | I01358 | Variedad Nativa | Papúa Nueva Guinea | - | - |
| CIP 442056 | 9 Catty Variety | I01087 | Variedad Nativa | Taiwán | - | - |
| CIP 442794 | TIS 2357 | IITA-CL 286 | Línea | Nigeria | - | - |