



**Crioconservación de yemas de *Physalis peruviana*  
(ecotipo Colombia) por encapsulación-deshidratación**

**Alexandra Pineda Muñoz**

**TRABAJO DE GRADO**  
**Presentado como requisito parcial**  
**para optar al título de Bióloga**

**DIRECTOR**  
**Sandra Constantino**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**CARRERA DE BIOLOGÍA**  
**BOGOTÁ, D.C.**  
**JULIO DE 2012**



**Crioconservación de yemas de *Physalis peruviana*  
(ecotipo Colombia) por encapsulación-deshidratación**

**Alexandra Pineda Muñoz**

---

**INGRID SCHULER**  
Decana Académica  
Facultad de Ciencias

---

**ANDREA FORERO**  
Directora de Carrera  
Facultad de Ciencias



**Crioconservación de yemas de *Physalis peruviana*  
(ecotipo Colombia) por encapsulación-deshidratación**

**Alexandra Pineda Muñoz**

---

**SANDRA CONSTANTINO**  
Directora  
Facultad de Ciencias

---

**PILAR MÁRQUEZ**  
Jurado  
Facultad de Ciencias

## **NOTA DE ADVERTENCIA**

### **Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946**

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al laboratorio de Cultivo de Tejidos y la Unidad de Biotecnología Vegetal de la P.U.J. por acogerme y permitirme desarrollar este proyecto.

A mi Directora Sandra Constantino por creer en este proyecto y en mí, por su infinita paciencia y constante apoyo a lo largo del proceso; sus colaboraciones al igual que las de Weimar Sandoval fueron una parte fundamental en el desarrollo de esta investigación.

A la profesora Lucia Ana Díaz que desde un inicio apoyó el proyecto y nos brindó su colaboración.

A Dios por permitirme la correcta realización y culminación de este proyecto.

A mi madre y mi novio por su amor y paciencia, por apoyarme y acompañarme a lo largo de este proceso, y por darme la fuerza para seguir adelante. Mario, Angie, Sebas, Nata, Ñeko, Mike, por estar siempre ahí gracias, gracias, gracias.

A mi padre por su constante apoyo, fuerza y amor, por enseñarme siempre a dar más y nunca rendirme y ante nada por compartir conmigo esta pasión llamada ciencia.

## TABLA DE CONTENIDO

Resumen .....	1
1. Introducción.....	2
2. Problema de Investigación .....	3
2.1. Justificación y planteamiento del problema .....	3
2.2. Preguntas de Investigación .....	4
3. MARCO TEÓRICO .....	4
3.1. Generalidades de Physalis peruviana .....	4
3.2. Conservación de Recursos Fitogenéticos .....	5
3.3. Crioconservación.....	6
3.4. Encapsulación-deshidratación .....	6
3.5. Física del Agua a Bajas Temperaturas .....	8
4. OBJETIVOS.....	8
4.1. Objetivo General .....	8
4.2. Objetivos Específicos .....	9
5. METODOLOGÍA.....	9
5.1. Obtención de Material Vegetal.....	9
5.2. Mantenimiento del Cultivo y Multiplicación .....	9
5.3. Precultivo y Aclimatación de Yemas .....	10
5.4. Encapsulación de Yemas.....	11
5.5. Osmoprotección y Deshidratación Osmótica de Yemas Encapsuladas.....	11
5.6. Determinación del Contenido de Humedad de las Cápsulas .....	12
5.7. Desección por Evaporación de Yemas Encapsuladas.....	12
5.8. Inmersiones en Nitrógeno Líquido .....	13
5.9. Reactivación .....	14
5.9.1. Descongelamiento-calentamiento.....	14
5.9.2. Rehidratación.....	14
5.9.3. Postcultivo .....	14
5.10. Diagrama de flujo de la secuencia metodológica de pasos realizados para la evaluación de crioconservación por encapsulación-deshidratación de yemas apicales de p. peruviana.....	15
6. RESULTADOS .....	15
6.1. Precultivo y aclimatación de yemas .....	16
6.2. Viabilidad de yemas encapsuladas .....	19

6.3. Osmoprotección de yemas encapsuladas.....	20
6.4. Deseccación de las cápsulas en cabina de aire de flujo laminar.....	21
6.5. Inmersión en Nitrógeno Líquido .....	24
6.6. Reactivación de las yemas.....	26
7. DISCUSIÓN.....	27
7.1. Precultivos Escalonados y Osmoprotección Sacarosa.....	27
7.2. Importancia del Cultivo a Bajas Temperaturas en la Aclimatación al Frío.....	29
7.3. Deseccación y Mínimo Contenido de Agua de las Yemas Encapsuladas.....	30
7.5. Crioconservación por encapsulación-deshidratación de Physalis peruviana.....	32
7.4. Reactivación de Yemas Crioconservadas.....	35
8. CONCLUSIONES.....	36
9. Recomendaciones.....	38
10. Bibliografía.....	39
ANEXO 1 .....	45
ANEXO 2.....	49
ANEXO 3.....	50
ANEXO 4.....	51

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Porcentaje de rebrote de las yemas encapsuladas a lo largo del tiempo .....	16
Figura 2. Tasas de % de rebrote a lo largo del tiempo de las yemas encapsuladas y tratadas con diferentes precultivos suplementados con concentraciones escalonados de sacarosa.....	17
Figura 3. Porcentaje de yemas vivas posterior a la inmersión en nitrógeno líquido en diferentes tratamientos de incubación.....	18
Figura 4. Porcentaje de rebrote de yemas encapsuladas en ácido algínico al 3% a lo largo de 20 días de crecimiento <i>in vitro</i> .....	20
Figura 5. Contenido de humedad de las yemas encapsuladas y osmoprotegidas con sacarosa.....	21
Figura 6. Curva de deshidratación de los explantes de <i>Physalis peruviana</i> encapsulados e incubados por 24h en medio líquido enriquecido con sacarosa 0.75M y 1.0M.....	23
Figura 7. Curva de deshidratación de yemas incubadas en medio enriquecido con sacarosa .....	23
Figura 8. Porcentaje de rebrote a lo largo del tiempo de yemas desecadas por diferentes tiempos de exposición a flujo de aire estéril en la cabina de flujo de aire laminar.....	24
Figura 9. Porcentaje de rebrote de las yemas encapsuladas-deshidratadas inmersas en nitrógeno y no inmersas a lo largo del tiempo.....	25
Figura 10. Porcentaje de rebrote de las yemas encapsuladas deshidratadas precultivadas, mostrando los efectos de la rehidratación posterior a la inmersión en nitrógeno líquido sobre el rebrote de las yemas.....	25
Figura 11. Porcentaje de rebrote de las yemas inmersas en nitrógeno y cultivadas posteriormente en condiciones de penumbra y en medio de regeneración (M&S suplementado con diferentes concentraciones de BAP).....	26

## Resumen

En el laboratorio de Cultivos de Tejidos en la Pontificia Universidad Javeriana, sede Bogotá, se evaluó una técnica de crioconservación de yemas apicales para una muestra de *Physalis peruviana* ecotipo Colombia, mediante la metodología de encapsulación-deshidratación. El proceso se realizó y evaluó en diferentes etapas: precultivos, encapsulación, deshidratación (osmoprotección con sacarosa), desecación (cabina de flujo de aire laminar), inmersión en nitrógeno líquido, calentamiento y rehidratación, y postcultivo de las yemas encapsuladas. Se evaluaron diferentes tratamientos escalonados de precultivos en medios enriquecidos con sacarosa, obteniendo los mejores resultados (54% rebrote) con dos precultivos de dos días cada uno, con concentraciones de 0.087M y 0.174M respectivamente. Los precultivos fueron además evaluados en condiciones normales de incubación (25°C y 16h fotoperiodo), en penumbra (25°C y poca entrada de luz) y en frío (4°C y oscuridad), obteniendo los mejores resultados en frío. Las cápsulas precultivadas aumentaron las tasas de rebrote en hasta 20% con relación a aquellas sin precultivos, y en condiciones de frío y oscuridad aumentaron hasta un 100% el rebrote y regeneración de las yemas. Para la deshidratación y osmoprotección se evaluaron dos concentraciones de sacarosa 0.75M y 1.0M en medio líquido por 24h. En ausencia de precultivos con sacarosa las altas concentraciones del tratamiento osmoprotector resultaron tóxicas en las yemas, inhibiendo su rebrote y futura regeneración. Los precultivos permitieron el acondicionamiento de las yemas al tratamiento osmoprotector, que se logró exitosamente con una concentración de 0.75M de sacarosa disminuyendo en  $\approx 16\%$  el contenido de humedad inicial de las cápsulas. El secado en cabina de flujo de aire laminar en las cápsulas fue de 3:00h, logrando un contenido final de humedad de  $\approx 15\%$  en las cápsulas. Las yemas precultivadas, encapsuladas y deshidratadas, fueron inmersas en nitrógeno líquido, y posteriormente descongeladas al baño de María a 38°C para su posterior cultivo. La rehidratación de las cápsulas, posterior a su calentamiento aumentó en hasta 30% las tasas de rebrote de las yemas, pero la reactivación y regeneración de éstas posterior a la inmersión en nitrógeno líquido sólo fue posible con medio de regeneración suplementado con BAP en condiciones de penumbra, durante 5 días previo al cultivo en condiciones normales de multiplicación. Se obtuvo un porcentaje de rebrote del 100% de las yemas crioconservadas, además del crecimiento directo sin la formación de callo en todos los casos. Los resultados obtenidos demuestran la eficacia de la técnica de encapsulación-deshidratación en una herbácea de clima tropical, y sirven como punto de partida para el establecimiento de futuros protocolos.

## 1. Introducción

Los recursos genéticos vegetales se han visto afectados por diferentes factores que han generado su erosión genética, resultando en la reducción continua de la variabilidad de genes disponibles para utilización en el mejoramiento genético<sup>1</sup>. Una preocupación a nivel mundial por la pérdida de estos recursos genéticos valiosos ha estimulado la formación de programas de conservación de recursos genéticos vegetales, tanto de importancia agropecuaria como de especies silvestres, endémicas o amenazadas<sup>2</sup>.

La crioconservación es actualmente el único procedimiento para el almacenamiento a largo plazo de recursos genéticos vegetales, por lo cual es utilizada exitosamente para la formación de colecciones de germoplasma vegetal<sup>3</sup>. Implica la conservación de yemas o tejidos vegetales a muy bajas temperaturas (-196°C), en las cuales todos los procesos metabólicos son detenidos, asegurando el mantenimiento y preservación de la variabilidad original de las poblaciones, con la menor pérdida de información posible<sup>4</sup>. Adicionalmente, éstas no requieren de mayores cuidados, ahorran los procedimientos de subcultivos posteriores y el riesgo de variación somaclonal es reducido<sup>5</sup>. Una de las técnicas de crioconservación mejor aplicadas es la técnica de encapsulación-deshidratación basada en la tecnología de semillas artificiales. La técnica desarrollada por Fabre y Dereuddre en 1990,<sup>6</sup> consiste en la inclusión de ápices en esferas de alginato, las cuales son tratadas con altas concentraciones de sacarosa, seguido de deshidratación física en cabina de flujo de aire laminar y su posterior inmersión en nitrógeno líquido<sup>6</sup>.

*Physalis peruviana* (uchuva) es la segunda fruta de mayor exportación en Colombia<sup>7</sup>. Es considerada una fruta con propiedades medicinales, y es altamente apetecida en el comercio internacional, lo que ha generado un aumento considerable en el cultivo de la especie a lo largo de la última década<sup>7</sup>. La disminución de la variabilidad genética, consecuencia de la agricultura comercial moderna, genera la pérdida de variedades que se sabe poseen una diversidad genética elevada<sup>1</sup>. Ya que la especie crece de manera silvestre en el país, y que éste es un recurso genético valioso, y fuente de variabilidad, resulta de gran importancia el desarrollo y optimización de técnicas de crioconservación que aseguren la conservación a largo plazo de la variabilidad genética de la especie en el país.

El presente estudio se enfocó en optimizar la técnica de encapsulación-deshidratación para yemas apicales de *P. peruviana* ecotipo Colombia, provenientes de semillas germinadas y micropropagadas *in-vitro*, con el fin de establecer un protocolo preliminar de crioconservación para la especie.

## **2. Problema de Investigación**

### **2.1. Justificación y planteamiento del problema**

Hasta ahora, la mayoría de actividades en conservación *ex situ* de la biodiversidad de plantas a nivel mundial se han enfocado en especies de cultivos agrícolas. Sin embargo, la conservación de especies silvestres, endémicas, y amenazadas también se ha convertido en tema de interés<sup>3</sup>. *P. peruviana*, al igual que otras especies silvestres, ha tenido una aproximación tradicional hacia la conservación de tipo *in situ*, complementada con algunas accesiones de germoplasma en forma de semillas almacenadas a bajas temperaturas<sup>8</sup>. Sin embargo, ahora es reconocido que las técnicas *ex situ* pueden eficientemente ser utilizadas para complementar los métodos *in situ*, y pueden representar la única opción para la conservación a largo plazo<sup>2,3</sup>.

En la conservación *ex situ*, la crioconservación asegura la conservación óptima y rentable a largo plazo de germoplasma de especies vegetales<sup>3</sup>. La mayoría de sistemas experimentales empleados en la crioconservación (suspensiones celulares, callos, ápices, embriones) contienen altas cantidades de agua celular y son por lo tanto extremadamente sensibles a daños por congelamiento; las células deben ser deshidratadas artificialmente para protegerlas de daños causados por la cristalización de agua intracelular en hielo<sup>9</sup>.

La técnica de encapsulación-deshidratación provee una herramienta hasta ahora exitosa para la crioconservación de especies de origen tropical y templado<sup>5,10</sup>; las limitaciones se basan en la optimización de técnicas, ya que aunque existen algunos pasos en común al establecer una colección *in vitro* (iniciación del cultivo, mantenimiento y manipulación, almacenamiento), cada especie requiere de la estandarización de un protocolo específico<sup>3</sup>. Crítico para el desarrollo de protocolos de crioconservación es el control o evasión de formación de cristales de hielo intracelular<sup>8</sup>. Esto ocurre cuando las propiedades térmicas del sistema hacen energéticamente posible para las moléculas de agua que se unan para formar puentes de hidrógeno suficientes para

constituir cristales de hielo. La formación de hielo intra y extracelular afecta las propiedades estructurales, osmóticas y coligativas de las células además de la integridad de los tejidos<sup>8</sup>.

Dado que el ecotipo Colombia de *P. peruviana* es el más apetecido en el comercio internacional entre las variedades de uchuva, y que éste crece de manera silvestre en el país, se considera que es un valioso recurso genético, patrimonio de la nación, para el cual se deberían establecer mayores aproximaciones para su manejo y conservación. La optimización de la técnica de encapsulación-deshidratación para la conservación *ex situ* de la uchuva es una primera aproximación hacia progresos importantes en la conservación a largo plazo del germoplasma vegetal en el país.

## **2.2. Preguntas de Investigación**

Debido a que no existen protocolos establecidos, las preguntas fundamentales que se presentan para el establecimiento de un protocolo viable para la críoconservación de la especie *P. peruviana* son:

¿Cuál es el contenido mínimo de humedad que toleran las yemas de uchuva encapsuladas sin perder la capacidad de regeneración?

¿Existen diferencias en las tasas de supervivencia y regeneración entre yemas de uchuva encapsuladas-deshidratadas sumergidas en nitrógeno líquido y sin sumergir?

## **3. MARCO TEÓRICO**

### **3.1. Generalidades de *Physalis peruviana***

La uchuva (*Physalis peruviana*) es una de las principales frutas de exportación en Colombia. El país es el primer productor mundial, seguido por Sudáfrica, con su principal centro de producción en el departamento de Cundinamarca con más de 270 hectáreas de cultivo, (80% de la producción nacional) concentrado especialmente en los municipios de Granada y Sylvania<sup>11</sup>. *Physalis peruviana* es una solanácea originaria de los Andes suramericanos, donde crece de manera silvestre en las zonas tropicales y subtropicales, con altitudes entre los 1500 y 3000 m.s.n.m<sup>12,13</sup>. Se caracteriza principalmente por sus frutos, bayas amarillas encerradas dentro de un cáliz, con altos niveles de minerales, Fe y P, y, vitaminas A y C<sup>7</sup>. Aún no se han seleccionado variedades

para cultivo ni mejoramiento de la especie, y sólo se reconocen ecotipos o plantas procedentes de Colombia, Kenia y Sudáfrica, que se diferencian por tamaño, color y sabor del fruto, forma del cáliz y porte de la planta. La uchuva colombiana se caracteriza por tener una mejor coloración y mayor contenido de azúcares, lo que la hace más apetecible en los mercados internacionales<sup>12</sup>.

### **3.2. Conservación de Recursos Fitogenéticos**

Colombia presenta planes de conservación con aproximaciones de tipo *in situ* y *ex situ*; para la conservación *in situ* existen varios programas promovidos y manejados tanto por el Estado como por entidades privadas, organizaciones no gubernamentales y comunidades indígenas y locales. Las actividades estatales están representadas por el sistema de Áreas protegidas (PASINAP) en las cuales se incluyen las áreas protegidas propiamente dichas, y las áreas de manejo especial<sup>13</sup>. La conservación en el campo presenta grandes desventajas, limitando la eficacia y amenazando la seguridad de los recursos genéticos vegetales conservados de esta manera<sup>3</sup>. Con la promulgación del Convenio de Diversidad Biológica y la formulación del Régimen Común de Acceso a los Recursos Genéticos de los países de la Comunidad Andina de Naciones, Colombia inicia la formación del Sistema de Bancos de Germoplasma de la Nación para la Alimentación y Agricultura (SBGNAA) iniciando planes de conservación *ex situ*. Colombia conserva *ex situ* cerca de 85,000 accesiones<sup>8</sup>. En 1994, los recursos genéticos vegetales fueron transferidos por el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) a la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA), para que esta entidad los administrara. Estos recursos son inventariados y organizados según parámetros y recomendaciones internacionales a través del Programa Nacional de Recursos Genéticos Vegetales de CORPOICA. Hasta el presente, la conservación y manejo del germoplasma se ha financiado con recursos estatales. Un 55% de los materiales conservados por CORPOICA corresponden a especies nativas y el 45% restante a especies foráneas<sup>13,8</sup>.

Las redes latinoamericanas de recursos fitogenéticos REDARFIT y TROPIGEN tienen un punto focal en Colombia que es, actualmente, CORPOICA. Se ha creado un Banco Base Nacional de germoplasma en CORPOICA con el fin de garantizar la colección de todas las especies y variedades y su conservación<sup>8</sup>. La principal prioridad en la conservación de material genético vegetal cubre dos áreas: una, las colecciones de especies de importancia económica y social y otra, el complejo de especies relacionadas que está representada en los genotipos silvestres y

asilvestrados, en las cultivariedades y en los materiales que sirvieron de progenitores. De estos, *Physalis peruviana* es conservada en CORPOICA con accesiones conservadas en forma de semillas por la técnica de mínimo crecimiento<sup>8</sup>.

### **3.3. Crioconservación**

La crioconservación consiste en el almacenamiento de muestras a muy bajas temperaturas con el fin de almacenarlas a largo plazo<sup>3</sup>. A bajas temperaturas como las del nitrógeno líquido -196°C, el metabolismo de las células se detiene y las muestras pueden ser almacenadas por largos periodos de tiempo sin alteraciones genéticas ni disminuciones significativas en la viabilidad de los tejidos<sup>5</sup>. La aplicación de la crioconservación en plantas es relativamente reciente, con los primeros reportes exitosos publicados en 1960 por Sakai<sup>15</sup>. El primer protocolo se estableció en 1980, el cual incluía un pretratamiento con crioprotectores y una tasa de enfriamiento controlada, y fue aplicado a varias especies de origen templado<sup>16,17</sup>. Posteriormente se desarrollaron protocolos basados en la vitrificación. La vitrificación puede ser definida como la solidificación de un líquido no por medio de cristalización sino por el aumento extremo de la viscosidad durante el enfriamiento<sup>18</sup>, durante el proceso la solución pasa a un estado amorfo similar al vidrio, lo que se logra por medio de la reducción intra y extracelular de agua congelable, ya sea por exposición de los tejidos vegetales a altas concentraciones de mezclas de crioprotectores o por desecación física y osmótica, seguido de un enfriamiento rápido. Con la formación de hielo extracelular, los contenidos de las células se mantienen sin congelarse y en un punto de sobrefusión, protegidas de la formación de hielo por la membrana plasmática y las altas concentraciones de solutos intracelulares<sup>19</sup>.

### **3.4. Encapsulación-deshidratación**

Dentro de las técnicas de crioconservación, la encapsulación-deshidratación ha sido ampliamente utilizada; este método fue originalmente desarrollado para especies que presentaban semillas recalcitrantes difíciles de almacenar, pero fue adaptado posteriormente para la crioconservación de yemas de pera y papa<sup>20</sup>. La técnica fue desarrollada por Fabre y Dereuddre<sup>6</sup> como una aproximación criogénica para la producción de semillas artificiales de *Solanum phureja*, y fue posteriormente adaptada para *Ribes* spp., y como tal ha sido exitosamente aplicada en crioconservación de ápices de numerosas especies de origen tropical y templado<sup>3,5,9</sup>. Los explantes son encapsulados en alginato, precultivados en medio líquido enriquecido con sacarosa,

parcialmente desecados en cámara de flujo de aire laminar a un contenido de agua de alrededor de 20% (peso fresco) para rápidamente ser sumergidos en nitrógeno líquido. La supervivencia es alta y la recuperación del crecimiento de las muestras crioconservadas es generalmente rápida y directa<sup>3</sup>.

La encapsulación en alginato resulta beneficiosa para la supervivencia de las yemas al aumentar la resistencia de los tejidos vegetales a la desecación y congelamiento<sup>21</sup>. La técnica protege a los explantes de condiciones que son generalmente dañinas en las muestras no encapsuladas, como lo son las altas concentraciones de sacarosa y la desecación hasta bajos contenidos de agua<sup>10,16</sup>.

El protocolo inicialmente adaptado para especies de *Solanum phureja* por Fabre y Dereuddre en 1990<sup>21</sup>, ha sido aplicada adicionalmente por Benson et al (1996)<sup>22</sup> a 6 especies más de papa, y Boufaria et al (1996)<sup>23</sup> lo han optimizado para accesiones diploides y tetraploides de *S. tuberosum*. y ha sido aplicada a más de 70 especies a nivel mundial<sup>10</sup>.

El fundamento crioprotector de la técnica es el aumento de la concentración de solutos (aditivos crioprotectores, particularmente la inclusión de azúcares) a un grado tan avanzado, que la viscosidad celular aumenta a un punto en el cual al ser expuestas a temperaturas criogénicas, vidrio en lugar de hielo es formado<sup>19,20, 21,22</sup>. El proceso involucra la creación de un estado vitrificado amorfo metaestable, caracterizado por la temperatura de transición a vidrio, punto térmico en el cual el vidrio es formado; este puede ser térmicamente inestable y es posible la desvitrificación por medio del descongelamiento y calentamiento de las muestras<sup>19,20, 24</sup>. Se puede lograr el estado de vitrificación de los solutos intracelulares por medio de la manipulación de técnicas de deshidratación y aditivos crioprotectores, particularmente con la inclusión de azúcares<sup>19,20</sup>.

Para la especie *P. peruviana*, actualmente se cuenta con accesiones almacenadas en colecciones de germoplasma en CORPOICA<sup>25</sup> por la técnica de mínimo crecimiento, pero no se cuenta aun con accesiones crioconservadas, dada la falta de recursos y la inexistencia de protocolos establecidos. Dado que la crioconservación provee el único método seguro y rentable para el almacenamiento a largo plazo de recursos genéticos<sup>3</sup>, es de vital importancia establecer un protocolo de conservación de la especie.

### **3.5. Física del Agua a Bajas Temperaturas**

La viabilidad del material biológico almacenado a  $-196^{\circ}\text{C}$  es esencialmente independiente del periodo de almacenamiento. Ninguna reacción térmica ocurre en sistemas acuosos a temperaturas del nitrógeno líquido<sup>19</sup>. Una razón es que el agua líquida no existe bajo  $-130^{\circ}\text{C}$ . Los únicos estados físicos que sí existen son cristalinos o vitrificados, en los cuales la viscosidad es tan alta que la difusión es insignificante<sup>19,20</sup>. Adicionalmente, a  $-196^{\circ}\text{C}$  la energía térmica es insuficiente para que ocurran reacciones químicas. Las únicas reacciones que pueden ocurrir en los sistemas acuosos almacenados a  $-196^{\circ}\text{C}$ , son los procesos fotofísicos como la formación de radicales libres<sup>19</sup>.

Contrario a lo que se creería, la dificultad para las células durante el almacenamiento en nitrógeno líquido, no es su habilidad a sobrellevar las bajas temperaturas, sino la letalidad de la zona intermedia de temperatura ( $-15^{\circ}\text{C}$  a  $-60^{\circ}\text{C}$ ) por la cual las células deben pasar dos veces en el proceso, una durante el enfriamiento y otra durante el calentamiento<sup>7</sup>. En esta zona intermedia de temperatura, las propiedades térmicas del sistema hacen energéticamente posible que las moléculas de agua formen puentes de hidrógeno y se unan para constituir cristales de hielo<sup>19,20</sup>. La formación de hielo intra y extracelular, afecta las propiedades estructurales, osmóticas y coligativas de las células además de la integridad de los tejidos<sup>9,18</sup>. Es crítico para el desarrollo de protocolos de crioconservación el control o evasión de formación de cristales de hielo intracelular. La mayoría de sistemas experimentales empleados en la crioconservación contienen altas cantidades de agua celular y son por lo tanto extremadamente sensibles a daños por congelamiento; las células deben ser deshidratadas artificialmente para protegerlas de daños causados por la cristalización de agua intracelular en hielo<sup>19,20</sup>.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo General**

- Desarrollar un protocolo preliminar de crioconservación por encapsulación-deshidratación de yemas de *Physalis peruviana*.

## 4.2. Objetivos Específicos

- Comparar diferentes condiciones de precultivo que permitan el óptimo acondicionamiento de las yemas de *P. peruviana* previo a la encapsulación-deshidratación
- Evaluar el rebrote de las yemas de *Physalis peruviana* encapsuladas en alginato y su regeneración en plántulas a lo largo del tiempo
- Evaluar el efecto de la osmoprotección con sacarosa en las tasas de rebrote y regeneración de las yemas encapsuladas
- Determinar el tiempo de desecación de las yemas encapsuladas de *Physalis peruviana* para lograr un contenido de humedad  $\approx 20\%$
- Comparar el porcentaje de rebrote de las yemas de *P. peruviana* crioconservadas por la técnica de encapsulación-deshidratación con los brotes no crioconservados

## 5. METODOLOGÍA

En el laboratorio de Cultivos de Tejidos en la Pontificia Universidad Javeriana, sede Bogotá, se evaluó una técnica de crioconservación de yemas apicales para una muestra de *Physalis peruviana* ecotipo Colombia, mediante la metodología de encapsulación-deshidratación.

### 5.1. Obtención de Material Vegetal

Para la obtención de las semillas de uchuva, se tomaron frutos maduros con diámetros  $\approx 2\text{cm}$  procedentes del departamento de Cundinamarca, adquiridos en un mercado local. Las semillas fueron extraídas de los frutos y desinfectadas superficialmente con hipoclorito de sodio 2.5% y lavadas con agua estéril para ser inmediatamente inoculadas. La siembra de las semillas fue realizada en frascos de vidrio con 20ml de medio sólido Murashige & Skoog con vitaminas<sup>23</sup> (M&S) suplementado con 30g/l de sacarosa (0.087M). Las semillas fueron sembradas a una densidad de 5 semillas por frasco, e incubadas a 25°C con un fotoperiodo de 16 horas luz.

### 5.2. Mantenimiento del Cultivo y Multiplicación

Una vez las plántulas alcanzaron las 6 semanas de cultivo *in vitro*, se realizó la micropropagación por medio de cortes de yemas apicales y segmentos nodales de las plántulas, los cuales fueron posteriormente inoculados en medio M&S con vitaminas<sup>26</sup>; subcultivos posteriores fueron realizados periódicamente.

### 5.3. Precultivo y Aclimatación de Yemas

Con el fin de acondicionar los explantes para la crioconservación, diferentes condiciones de precultivos fueron evaluados en las yemas. Para esto se tomaron plantas de 20-30 días de crecimiento *in vitro* y se realizaron cortes apicales de segmentos de 0.3-0.5mm en los cuales se incluyeran los ápices, las yemas apicales fueron posteriormente sometidas a tratamientos con concentraciones de sacarosa escalonados disueltos en medio M&S sólido<sup>26</sup>.

Se evaluaron tres concentraciones escalonadas de sacarosa: 0.087M, 0.174M y 0.348M dejando los explantes por dos días en cada una previo a pasar a la siguiente. Los tratamientos correspondieron a: un precultivo de 0.087M de sacarosa por dos días; dos precultivos sucesivos de 0.087M y 0.174M de sacarosa por dos días cada uno; y tres precultivos sucesivos de 0.087M a 0.174M a 0.348M de sacarosa por dos días cada uno. Los resultados fueron evaluados por medio de una comparación múltiple de Dunnett para la determinación del mejor tratamiento de precultivo para las yemas.

Una vez establecido el tratamiento de precultivo con sacarosa a utilizar, éste fue evaluado para determinar un método de aclimatación al frío para las yemas. Para esto, las yemas fueron expuestas a diferentes condiciones de incubación, donde se evaluaron: control en condiciones normales de incubación a 25°C y 16h fotoperiodo; penumbra en incubación a 25°C con poca entrada de luz; y oscuridad y frío a 4°C sin la entrada de luz. Para lograr las condiciones de penumbra, los frascos en incubación fueron cubiertos con papel kraft superficialmente para evitar la entrada directa de luz hacia las plántulas. Las condiciones de frío y oscuridad se lograron por medio del cultivo de las yemas en una nevera sin luz a 4°C durante todo el proceso.

Adicionalmente se registraron datos de porcentaje de rebrote de las yemas a lo largo del tiempo en cada uno de los tratamientos. En todos los ensayos se utilizaron 3 réplicas con 5 cápsulas cada una. El éxito de dicha técnica se determinó por medio del % de cápsulas rebrotadas por medio de la ecuación 1:

Ecuación 1      %Cr = (Cápsulas Rebrotadas/ Total Cápsulas) \*100

Donde %Cr es el porcentaje de cápsulas rebrotadas.

#### **5.4. Encapsulación de Yemas**

Las yemas obtenidas por medio de la realización de cortes de ápices de las plántulas crecidas *in vitro* fueron dispuestas en una solución de Acido Algínico al 3% disuelto en medio M&S líquido. Con ayuda de una micropipeta de 1000 $\mu$ L con puntas estériles cortadas a un radio de 1.5mm, las yemas en la solución de ácido algínico fueron tomadas y dejadas caer gota a gota, con cada gota conteniendo una yema, en una solución de cloruro de calcio dihidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) a una concentración de 100mM. Para permitir la correcta polimerización de las gotas en cápsulas, éstas fueron dejadas en la solución de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  por 30 minutos o hasta que se tornaran opacas. Las cápsulas fueron después lavadas con agua estéril e inoculadas en medio M&S con vitaminas<sup>26</sup>.

Para evaluar la viabilidad de la técnica de encapsulación y la capacidad de las yemas para emerger de las cápsulas, éstas fueron incubadas a 25°C con un fotoperiodo de 16 horas luz, y se registró el porcentaje de rebrote (ecuación 1) y futura regeneración de las plántulas a lo largo del tiempo.

#### **5.5. Osmoprotección y Deshidratación Osmótica de Yemas Encapsuladas**

Con el fin de determinar la concentración de sacarosa más apropiada para la osmoprotección de las yemas, se tomaron plántulas de 20 días de crecimiento *in vitro* y se realizaron cortes obteniendo yemas apicales que fueron encapsuladas. Estas fueron posteriormente incubadas en medio M&S líquido suplementado con sacarosa por 24 horas y dejadas en un agitador orbital a 4rpm en incubación. Tres concentraciones de sacarosa fueron evaluadas: 0.087M (control), 0.75M y 1.0M respectivamente. Se determinó el porcentaje de humedad final de las yemas encapsuladas en los diferentes tratamientos de sacarosa por medio de la ecuación 2. Las diferencias entre los porcentajes de humedad final de los tratamientos fueron evaluadas por medio de una prueba Kruskal-Wallis, y se realizó una prueba de comparación múltiple de Dunn para evaluar las diferencias entre todos los tratamientos y el control.

Adicionalmente, se incubaron las cápsulas en medio M&S sólido con concentraciones normales de sacarosa tras el tratamiento de 24 horas. Se evaluó el porcentaje de rebrote de las yemas (ecuación 1) en los tres tratamientos (0.75M, 1.0M y control), y se registró su posterior regeneración en plántulas. Las diferencias en el porcentaje de rebrote de los tratamientos fueron evaluadas por medio de una prueba Kruskal-Wallis, y se realizó una prueba de comparación múltiple de Dunn para evaluar las diferencias entre todos los tratamientos y el control.

## 5.6. Determinación del Contenido de Humedad de las Cápsulas

Para determinar el porcentaje de pérdida de agua de las cápsulas posterior a los tratamientos con sacarosa, se tomaron los valores de peso fresco y seco a las 0 y 24 horas de tratamiento y se realizaron las siguientes ecuaciones:

Para la determinación del contenido inicial de humedad de las cápsulas ( $H_0$ ) se utilizó la ecuación 2:

Ecuación 2       $\%H_0 = (\text{Peso seco} / \text{Peso fresco}) * 100$

\*Donde  $\%H_0$  es el porcentaje de humedad inicial

Para los porcentajes de pérdida de humedad en las cápsulas después de los tratamientos de sacarosa, se utilizó la ecuación 3:

Ecuación 3       $\%Hp = [(\text{Peso fresco} - \text{Peso seco}) / \text{Peso fresco}] * 100$

\*Donde  $\%Hp$  es el porcentaje de pérdida de agua

El valor de % de humedad final de las cápsulas ( $H_1$ ) después del tratamiento con sacarosa se utilizó la ecuación 4:

Ecuación 4       $\%H_1 = \%H_0 - \%Hp$

\*Donde  $\%H_0$  es el porcentaje de humedad inicial obtenido en la ecuación 2, y  $\%Hp$  es el porcentaje de pérdida de agua obtenido en la ecuación 3.

## 5.7. Deseccación por Evaporación de Yemas Encapsuladas

Las yemas encapsuladas fueron expuestas a flujo de aire estéril en la cabina de aire laminar para realizar desecación por evaporación hasta un contenido de agua de alrededor de 20% peso fresco. Para la determinación del tiempo de desecación se realizó una curva de secado con cada uno de los tratamientos de sacarosa 0.75, 1.0M y el control (0.087M de sacarosa). Esta consistió en el secado de las cápsulas a lo largo de 5 horas, tomando muestras cada 1 hora de las cápsulas, y pesándolas bajo condiciones de asepsia. Adicionalmente para obtener el peso seco de las

cápsulas, una muestra de éstas fue secada en un horno de secado a 100°C por 5 horas y posteriormente pesadas.

El valor de agua perdida en las cápsulas después de un tiempo  $x$  de secado ( $H_p$ ) se calculó por medio de la siguiente ecuación (ecuación 3):

$$\%H_p = [(Peso fresco - Peso seco) / Peso fresco] * 100$$

Y el valor de % de agua de las cápsulas en un tiempo  $x$  de secado ( $H_2$ ) se obtuvo por medio de la siguiente ecuación (ecuación 4):

$$\%H_2 = H_1 - H_p$$

\*Donde  $H_1$  es el porcentaje de agua de las cápsulas y  $\%H_p$  es el porcentaje de pérdida de agua obtenido en las ecuaciones anteriores.

Las cápsulas fueron posteriormente inoculadas en medio sólido M&S con vitaminas<sup>26</sup> para evaluar el porcentaje de rebrote de las yemas, y la regeneración de las plántulas a lo largo del tiempo. Las diferencias entre los tratamientos de sacarosa 0.75M, 1.0M y el control fueron evaluados por medio de una prueba Kruskal-Wallis y se compararon entre si por medio de una comparación múltiple de Dunn.

### **5.8. Inmersiones en Nitrógeno Líquido**

Para la crioconservación o almacenamiento en nitrógeno líquido a -196°C, las yemas precultivadas, encapsuladas, osmoprotegidas y desecadas, fueron introducidas en crioviales estériles en una densidad de 5 cápsulas por criovial y sumergidas directamente en nitrógeno líquido por 10 minutos. Es importante que la inmersión fuera realizada lo más rápido posible, de tal manera que las muestras alcanzaran el enfriamiento rápido, y se lograra prevenir la formación de cristales de hielo en las células. Todos los tratamientos crioconservados manejaron un control sin inmersión en nitrógeno líquido, y cada uno tuvo tres repeticiones respectivamente. Se realizaron pruebas de significancia entre los tratamientos crioconservados y no crioconservados y comparaciones entre las yemas inmersas y no inmersas en nitrógeno líquido.

## **5.9. Reactivación**

### **5.9.1. Descongelamiento-calentamiento**

Después de inmersas las cápsulas en el nitrógeno líquido, los crioviales fueron retirados rápidamente y descongeladas al baño de María por 2 minutos a 38°C. El calentamiento de las muestras debe ser realizado lo mas rápido posible para evitar el fenómeno de recristalización del agua, en el cual el hielo se derrite y reforma en cristales más grandes y dañinos para las células.

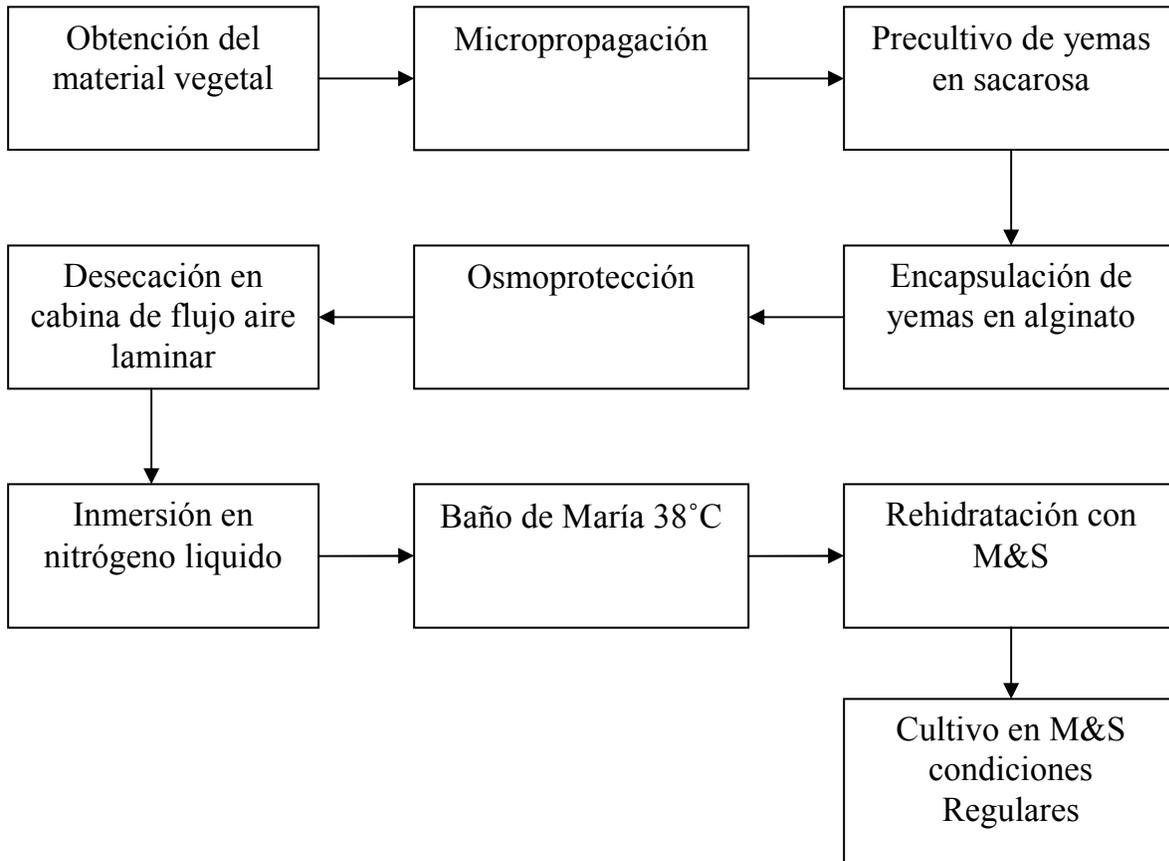
### **5.9.2. Rehidratación**

Las cápsulas fueron rehidratadas posteriormente al calentamiento con medio M&S con vitaminas líquido por 5 minutos. Posteriormente fueron inoculadas en medio M&S con vitaminas sólido e incubadas por 20 días para la determinación del porcentaje de rebrote y la evaluación de la regeneración de las yemas a lo largo del tiempo. Se evaluaron las diferencias de los porcentajes de rebrote de las yemas rehidratadas y sin rehidratar por medio de una prueba *t* no pareada.

### **5.9.3. Postcultivo**

En una muestra de yemas inmersas en nitrógeno líquido, descongeladas y rehidratadas, se evaluó el rebrote de las yemas en medios de regeneración. Estos consistieron en cuatro tratamientos de medio M&S suplementado con citoquininas y dos con sacarosa. Cuatro concentraciones de BAP fueron evaluadas, 0mg/L (control), 0.15mg/L, 0.30mg/L y 0.45mg/L, y dos concentraciones de sacarosa 0.174M y 0.087M respectivamente. Éstas fueron incubadas a 25°C y 16 horas de fotoperiodo (control), y en penumbra: a 25°C y poca entrada de luz, previo al cultivo en condiciones normales de multiplicación, en M&S con vitaminas a 25°C y 16 horas de fotoperiodo. Las diferencias de los tratamientos fueron evaluadas por medio de una prueba de Kruskal-Wallis, y se realizó una comparación múltiple de Dunn entre todos los tratamientos y el control.

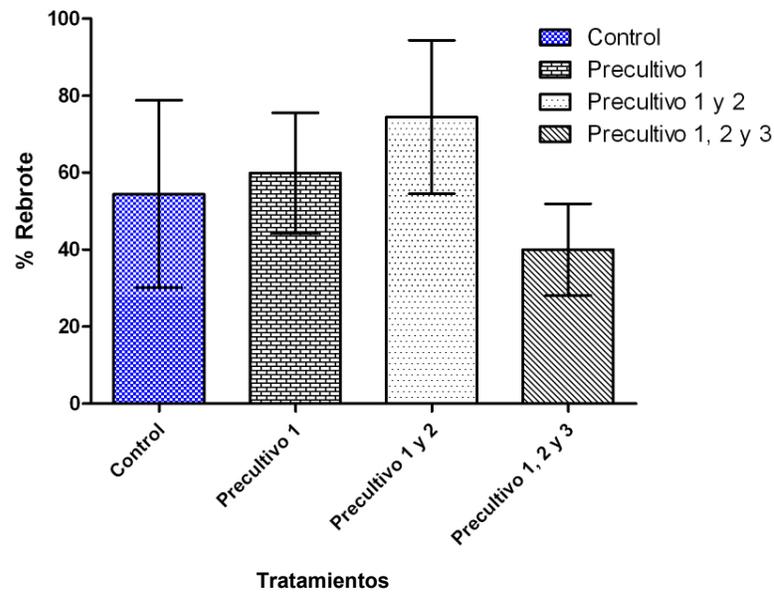
**5.10. Diagrama de flujo de la secuencia metodológica de pasos realizados para la evaluación de crioconservación por encapsulación-deshidratación de yemas apicales de *p. peruviana*.**



**6. RESULTADOS**

En el laboratorio de Cultivos de Tejidos en la Pontificia Universidad Javeriana, sede Bogotá, se evaluó una técnica de crioconservación de yemas apicales para una muestra de *Physalis peruviana* ecotipo Colombia, mediante la metodología de encapsulación-deshidratación. Los ensayos realizados de manera independiente permitieron en sumatoria la formación de un protocolo preliminar de crioconservación para una accesión de la *P. peruviana* proveniente al departamento de Cundinamarca.

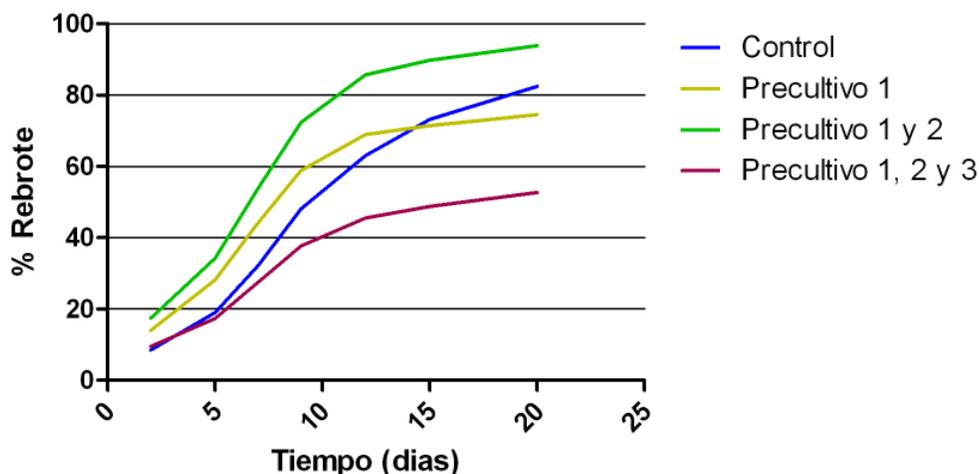
## 6.1. Precultivo y aclimatación de yemas



**Figura 1.** Porcentaje de rebrote de las yemas encapsuladas y tratadas con diferentes precultivos suplementados con sacarosa después de 15 días de cultivo *in vitro*. Control 1: 0.087M; Precultivo 2: 0.087M y 0.174M. Precultivo 3: 0.087M, 0.174M y 0.348M.

Se evaluaron tratamientos de precultivos de las yemas en medio M&S sólido suplementado con sacarosa en concentraciones escalonadas de 0.087M, 0.174M y 0.348M respectivamente, evaluando la viabilidad de las yemas con uno, dos y tres precultivos por dos días cada uno, previo a la encapsulación y deshidratación de las cápsulas. Se realizó una comparación múltiple de Dunnett la cual estableció que los diferentes tratamientos presentaban una diferencia significativa con el control ( $p < 0.023$ ), a excepción del *precultivo 1* el cual no presentaba una diferencia significativa con éste. Esto se debe a que la concentración de sacarosa utilizada en el *precultivo 1* era la misma que la del control, y la diferencia de éstos sólo se basó en el corte e incubación de las yemas, lo cual se esperaba no fuera a afectarlas en términos de rebrote. Los altos porcentajes de rebrote permitieron establecer que la mejor secuencia de precultivos son los *precultivos 1 y 2* con concentraciones de 0.087M y 0.174M de sacarosa respectivamente aplicadas de forma escalonada. La realización de dos precultivos escalonados aumentó el porcentaje de rebrote a valores superiores a 70% mientras el control presentó alrededor de 50% (figura 1). Los precultivos evaluados demostraron además que no necesariamente el hecho de realizar más

precultivos implicaba mejores resultados, ya que la viabilidad de las yemas disminuyó cuando un tercer precultivo fue adicionado, por lo cual para los ensayos posteriores se realizaron solo dos precultivos con concentraciones de 0.087M y 0.174M respectivamente.



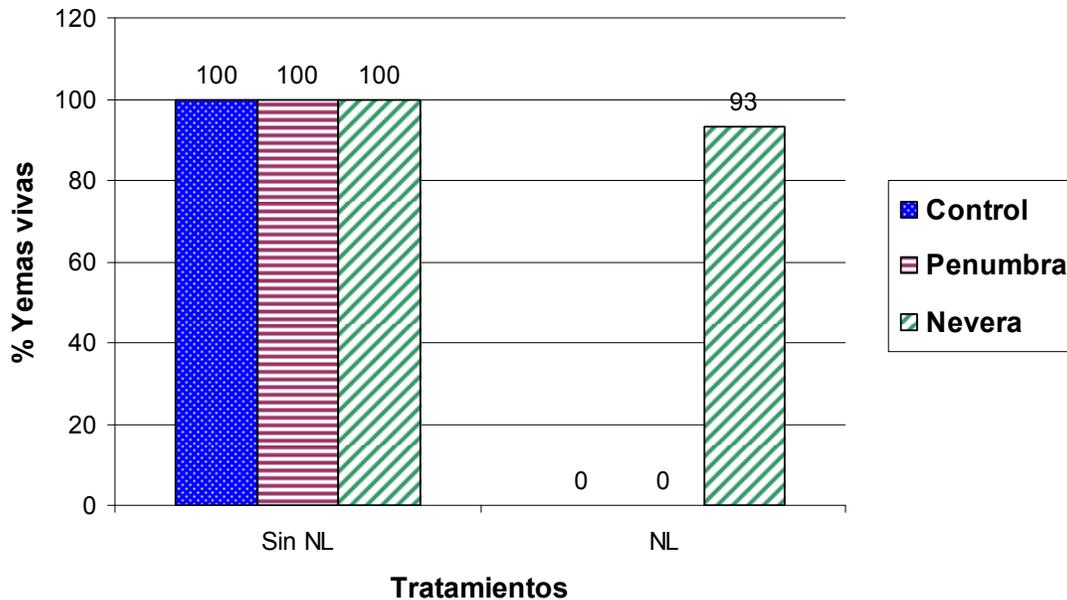
**Figura 2.** Tasas de % de rebrote a lo largo del tiempo de las yemas encapsuladas y tratadas con diferentes precultivos suplementados con concentraciones escalonadas de sacarosa.

Los resultados permiten establecer que el precultivo escalonado de las yemas en medios suplementados con sacarosa aumenta la viabilidad de las yemas, y el porcentaje de rebrote de éstas tras los tratamientos de encapsulación-deshidratación.

Adicionalmente se observó a lo largo del tiempo un aumento en las tasas de rebrote de las yemas (figura 2) obteniendo el mayor porcentaje de rebrote con dos precultivos de sacarosa de 0.087M y 0.174M respectivamente, alcanzando hasta un 90% de rebrote de yemas en el día 20, mientras el control presentaba: 86%, el precultivo 1: 73% y el precultivo 1, 2 y 3: 53% de rebrote.

La secuencia de precultivos escalonados 1 y 2 fue evaluada en diferentes condiciones de incubación para lograr la aclimatación al frío de las yemas, previo a la inmersión en nitrógeno líquido. Se sometieron las yemas a tres tratamientos de incubación: 1) *Control* con condiciones regulares de incubación a 25°C con 16 horas de fotoperiodo; 2) *penumbra* a 25°C con poca entrada de luz; y 3) *Nevera* a 4°C con oscuridad total.

Se obtuvieron los mejores resultados en términos de porcentaje de rebrote posterior a la inmersión en nitrógeno líquido con el cultivo en frío de las yemas, el cual no presentó diferencias significativas en términos de rebrote con el tratamiento control ( $p>0.155$ ). Los valores de porcentaje de rebrote posterior al tratamiento en frío demuestran ser efectivos como método de aclimatación de las yemas sin causar efectos significativos en el rebrote de las yemas.



**Figura 3.** Porcentaje de yemas vivas posterior a la inmersión en nitrógeno líquido en diferentes tratamientos de incubación: *Control*: condiciones regulares de incubación a 25°C con 16 horas de fotoperiodo; 2) *penumbra* a 25°C con poca entrada de luz; y 3) *Nevera* en 4°C con oscuridad total.

Inicialmente lo que se observó al alterar las condiciones de incubación de las yemas, fueron variaciones en el crecimiento, ya que las yemas incubadas en penumbra y en incubación regular aumentaron sus tamaños hasta más del doble respecto a las de frío. Las yemas desarrollaron rápidamente un callo durante el proceso de los precultivos, haciendo difícil la posterior encapsulación y no permitiendo su correcta deshidratación al presentar una aparente acumulación de agua en sus tejidos a lo largo del proceso, que posteriormente se evidenció en la formación de cristales de hielo al ser retiradas del nitrógeno líquido. Las cápsulas incubadas en penumbra no sobrevivieron a los procedimientos posteriores, por lo cual se descartó la posibilidad de utilizar dichas condiciones de precultivo en el protocolo.

Las yemas cultivadas en condiciones normales de incubación, aunque no desarrollaron callo durante el proceso, si continuaron su crecimiento organizado a lo largo de los precultivos, habiendo casi duplicado su tamaño e iniciado la diferenciación de primordios foliares antes de la encapsulación. Estas yemas, posterior a su inmersión en nitrógeno líquido, aunque no presentaron cristales de hielo, tampoco tuvieron la capacidad de rebrotar y antes de transcurridas 24 horas habían muerto. Las yemas incubadas en frío y oscuridad en cambio no aumentaron en tamaño ni desarrollaron callo durante la realización de los precultivos, y posterior a su inmersión en nitrógeno líquido lograron la viabilidad por tres días pero no tuvieron la capacidad de rebrotar y murieron. Lo anterior indicó la necesidad de tratamientos posteriores en medios de regeneración.

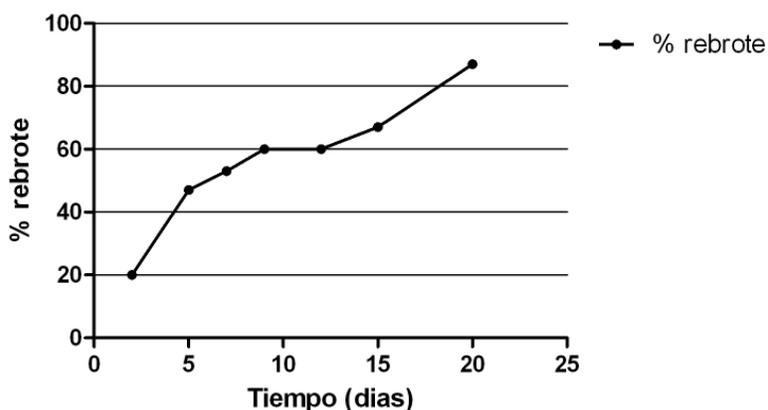
Los resultados permitieron establecer las condiciones óptimas de precultivo no solo en función de las concentraciones de sacarosa utilizadas para suplementar el medio, sino también en la temperatura y cantidad de luz que reciben las yemas durante el proceso. Se tomaron como condiciones óptimas de incubación, el cultivo en frío y oscuridad, incubando todos los tratamientos posteriores en una nevera a 4°C sin luz.

## **6.2. Viabilidad de yemas encapsuladas**

El material *in vitro* fue sincronizado por medio del cultivo de tejidos y procedimientos de precultivo. Se utilizaron siempre yemas apicales, las cuales fueron relativamente homogéneas en términos de tamaño, composición celular, estado fisiológico y respuesta al crecimiento, permitiendo así tener una respuesta uniforme en los tratamientos. Las yemas encapsuladas y cultivadas en medio M&S empezaron a rebrotar desde el segundo día, y a los 7 días presentaban 53% de rebrote. El índice de rebrote de las yemas aumentó hasta 87% en el día 20, como se observa en la figura 4.

La morfología externa de los brotes fue normal y semejante a los parentales. Las yemas rebrotaron normalmente sin la formación de callos y su aspecto fue además vigoroso. Los resultados reflejan la alta viabilidad de yemas posterior al procedimiento de encapsulación, permitiendo así el uso de la técnica para el protocolo de crioconservación. El proceso de rebrote de las yemas se registró desde la inoculación hasta la obtención de plántulas de 20 días, identificando descriptores importantes en el desarrollo en estos tiempos, tales como la emergencia de las cápsulas a los dos días, primordios foliares expuestos a los 5 días, primer nudo visible a los

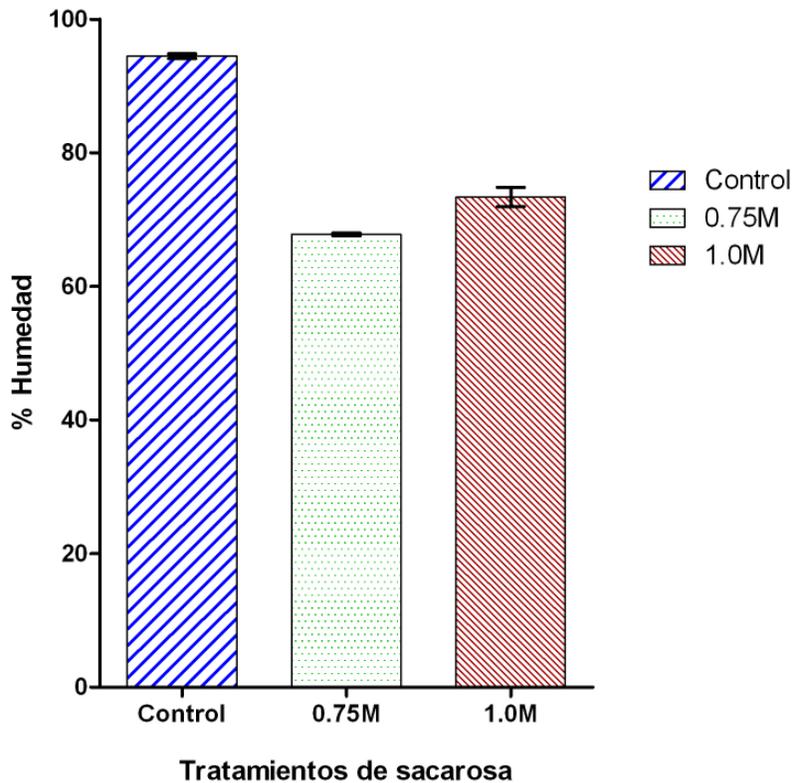
7 días, enraizamiento a los 9 días y la continuidad del crecimiento para la formación de plántulas a lo largo del tiempo.



**Figura 4.** Porcentaje de rebrote de yemas encapsuladas en ácido alginico al 3% a lo largo de 20 días de crecimiento *in vitro*.

### 6.3. Osmoprotección de yemas encapsuladas

Para la deshidratación y osmoprotección se evaluaron dos concentraciones 0.75M y 1.0M en medio líquido enriquecido con sacarosa por 24 horas. El tratamiento de osmoprotección solo fue significativo ( $p < 0.0093$ ) en términos de porcentaje de humedad con el tratamiento de 0.75M de sacarosa que logró disminuir en  $\approx 16\%$  el contenido de humedad inicial de las cápsulas. Los tratamientos 1.0M y el control en cambio, no disminuyeron significativamente el porcentaje de humedad. El tratamiento por 24h con medio M&S líquido suplementado con sacarosa 0.75M en agitación redujo el contenido de humedad inicial de las cápsulas de un 93.6% a un 68.9% como se observa en la figura 5, mientras el tratamiento con sacarosa 1.0M solo hasta el 78%.



**Figura 5.** Contenido de humedad de las yemas encapsuladas y osmoprotegidas con tratamientos de medio líquido suplementado con 0.75M y 1.0M de sacarosa después de 24h en agitación.

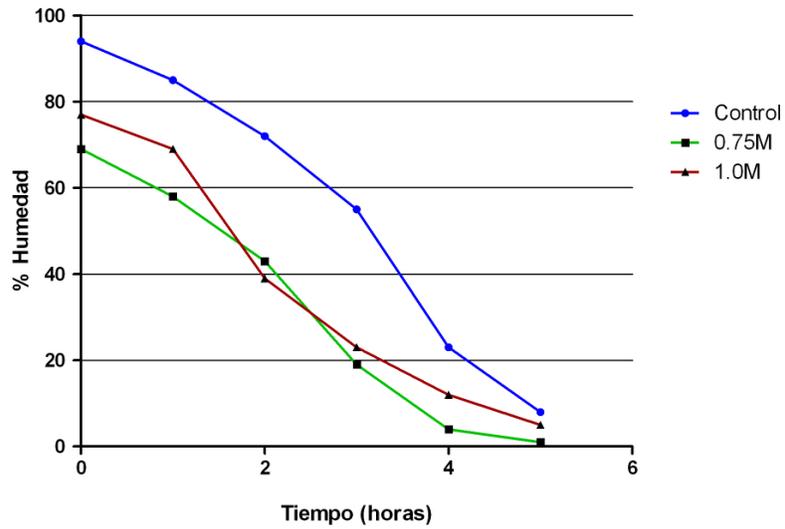
Tras este procedimiento se obtuvieron porcentajes de rebrote de las cápsulas de alrededor de 30%. Por lo cual se estableció el requerimiento de precultivos previo a la encapsulación e incubación de yemas en sacarosa 0.75M. En ausencia de precultivos, las altas concentraciones de sacarosa resultaron tóxicas en las yemas, disminuyendo su rebrote y futura regeneración. Los precultivos permitieron el acondicionamiento de las yemas al tratamiento osmoprotector, y fueron necesarios para aumentar la sobrevivencia de las yemas.

#### **6.4. Dsecación de las cápsulas en cabina de aire de flujo laminar**

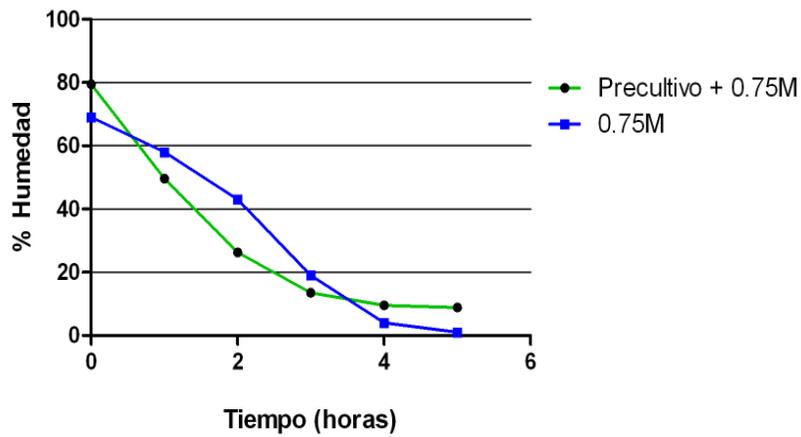
Las cápsulas osmoprotegidas fueron expuestas a flujo de aire estéril a temperatura ambiente en la cabina de aire laminar para su desecación. Los tiempos de exposición para obtener un contenido de humedad de  $\approx 15\%$  en las cápsulas fueron de 3:30 horas (en la figura 6) para el tratamiento suplementado con 0.75M de sacarosa, mientras para el tratamiento de 1.0M fue de 4:00 horas. Aunque a las 3 y 4 horas se obtenía el mínimo contenido viable de agua establecido por varios

autores, al inocular las yemas para evaluar las tasas de rebrote y su regeneración posterior al tratamiento, se identificó que aquellas cápsulas sometidas a tiempos de deshidratación superiores al contenido mínimo viable (4 y 5 horas) aunque con contenidos de humedad muy bajos (5-10%) mantenían la viabilidad y capacidad de rebrote, algunas por la vía indirecta por medio de la formación de callo. Las yemas se mantuvieron con regeneración directa por medio del rebrote normal hasta una deshidratación del 13%. Los resultados permiten reevaluar lo planteado por varios autores <sup>2,3,10,15,16,19</sup> que establecen el mínimo contenido de humedad de las yemas para mantenerse viables en alrededor del 20%. La alta tolerancia a la desecación de *P. peruviana*, demuestra la alta complejidad de los mecanismos fisiológicos y adaptativos de las especies tropicales, que no siempre responden a patrones de comportamiento de especies de zonas templadas, por lo que se hace énfasis en la necesidad de realizar mayores estudios que describan dichos fenómenos fisiológicos, además del establecimiento de protocolos de especies que sirvan como modelo para otras.

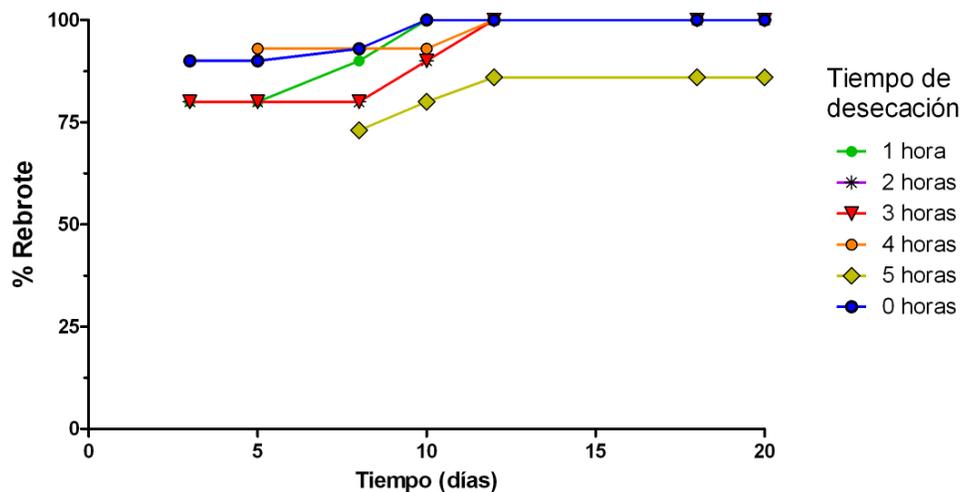
Dado que se necesitó de la realización de precultivos suplementados con sacarosa, para el acondicionamiento de las yemas a osmoproteger, se realizó la curva de deshidratación en cámara de flujo de aire laminar de las yemas precultivadas, encapsuladas y osmoprotegidas, con el fin de evaluar si las diferencias presentes en la desecación de las yemas al incluir este paso. Esta curva (figura 6) a diferencia de la obtenida con las yemas sin precultivos (Figura 7), permitió identificar una disminución en el tiempo de secado (de 3:30 a 2.30h). Se observó que las yemas precultivadas, aunque iniciaban la desecación con un porcentaje de humedad mayor (79%) al obtenido sin precultivos (69%), la pérdida de agua era más rápida.



**Figura 6.** Curva de deshidratación de los explantes de *Physalis peruviana* encapsulados e incubados por 24h en medio líquido enriquecido con sacarosa 0.75M y 1.0M.



**Figura 7.** Curva de deshidratación de yemas precultivadas y sin precultivar encapsuladas de *Physalis peruviana* tras ser incubados por 24h en medio líquido enriquecido con sacarosa 0.75M.

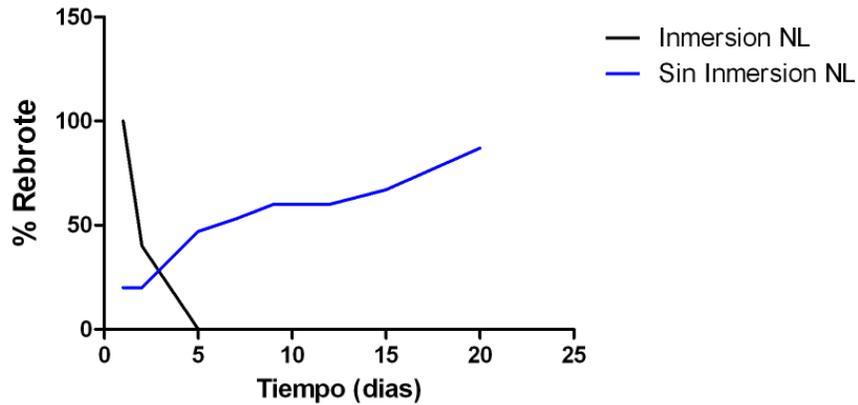


**Figura 8.** Porcentaje de rebrote a lo largo del tiempo de yemas desecadas por diferentes tiempos de exposición a flujo de aire estéril en la cabina de flujo de aire laminar.

Las yemas desecadas en la cabina de flujo de aire laminar fueron posteriormente inoculadas en medio M&S registrado el % de rebrote a lo largo del tiempo hasta los 20 días. Las yemas lograron en todos los casos el 100% de regeneración a excepción de aquellas cápsulas expuestas a 5 horas de desecación, las cuales presentaron 83% (figura 8). Adicional a las tasas de rebrote, se identificó la formación de callo en los tratamientos de mayor exposición a desecación (4 y 5 horas). Los resultados sugieren que aunque a los porcentajes de rebrote se mantienen altos en estos casos, ya hay daño en los tejidos, impidiendo la regeneración por crecimiento organizado de los tejidos.

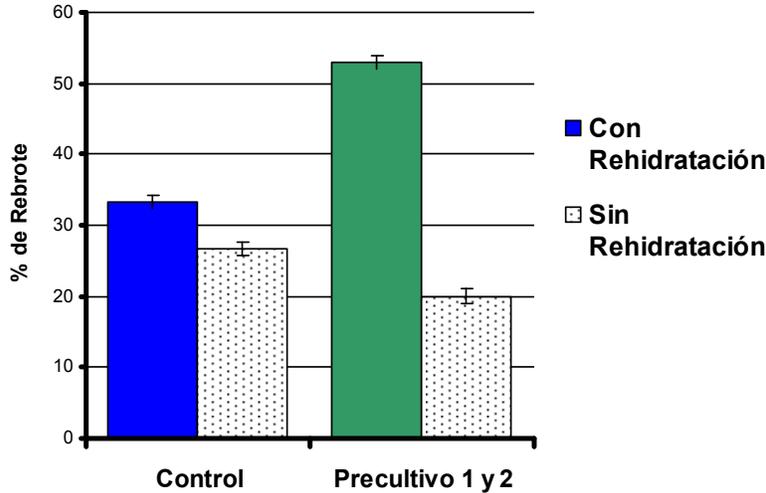
### 6.5. Inmersión en Nitrógeno Líquido

Las inmersiones en nitrógeno líquido de las yemas precultivadas, encapsuladas y deshidratadas fueron realizadas por 10 minutos. Las cápsulas, posterior a su inmersión, fueron retiradas del nitrógeno y calentadas rápidamente al baño de María. Los primeros dos días seguidos a las inmersiones en nitrógeno se observaron las yemas verdes y turgentes indicando la viabilidad de los tejidos, sin embargo, al tercer día las yemas empezaron a tornar blancas y murieron (figura 9). Lo anterior implica la muerte de las yemas posterior a su cultivo y no posterior a su congelamiento. La falta de capacidad regenerativa del tejido resultó efecto del tratamiento post-congelamiento, y por lo tanto requirió de mayores tratamientos para lograr la reactivación del tejido.



**Figura 9.** Porcentaje de rebrote de las yemas encapsuladas-deshidratadas inmersas en nitrógeno y no inmersas a lo largo del tiempo.

Las yemas precultivadas, sacadas del nitrógeno líquido, y descongeladas al baño de María a 38°C, fueron rehidratadas posteriormente con medio M&S líquido por 5 minutos antes de la inoculación en M&S sólido. Esto generó un aumento la viabilidad de un 10-30% respecto a los valores obtenidos en los casos donde no fueron rehidratadas, sin importar la presencia o no de precultivo (figura 10).

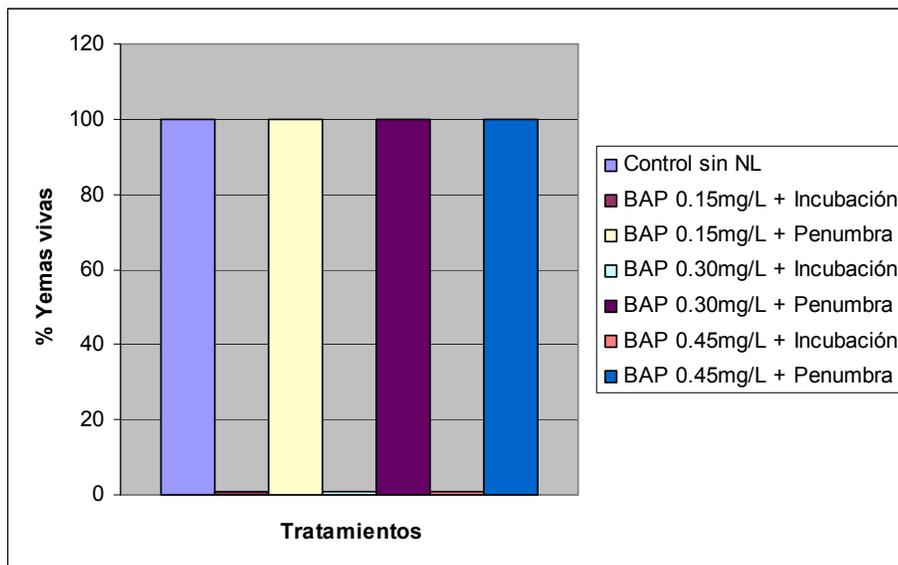


**Figura 10.** Porcentaje de rebrote de las yemas encapsuladas deshidratadas precultivadas, mostrando los efectos de la rehidratación posterior a la inmersión en nitrógeno líquido sobre el rebrote de las yemas. *Control 1: 0.087M; Precultivo 2: 0.087M y 0.174M.*

La rehidratación de las cápsulas posterior a su calentamiento aumentó las tasas de rebrote de las yemas (figura 10) respecto a las no rehidratadas, pero aun así no aumento la corta viabilidad de las yemas, por lo cual tratamientos posteriores son requeridos.

## 6.6. Reactivación de las yemas

La reactivación y posterior regeneración de las yemas crioconservadas sólo fue posible por medio del cultivo en medio M&S con vitaminas suplementado con BAP y en condiciones de penumbra, previo al cultivo regular (Figura 11). La importancia de la suplementación del medio con BAP, reguladores asociados a la división celular, radica en la capacidad de regeneración de los tejidos posterior a los tratamientos.



**Figura 11.** Porcentaje de rebrote de las yemas inmersas en nitrógeno y cultivadas posteriormente en condiciones de penumbra y en medio de regeneración (M&S suplementado con diferentes concentraciones de BAP).

Los resultados demostraron además, que la concentración empleada de BAP no afectaba los resultados, esto debido seguramente a que las concentraciones en los tres tratamientos fueron relativamente similares y presentaron una diferencia de 0.15mg/L entre ellos. Los resultados mostraron además que aun en la presencia de BAP las yemas expuestas a la luz no rebrotaron y murieron. Por lo cual es crítico para la viabilidad de las yemas y el éxito de la crioconservación la incubación de las yemas en condiciones de penumbra por 5 días previo al cultivo al cultivo en condiciones regulares de multiplicación.

Con este tratamiento de BAP suplementado en bajas concentraciones en el medio de cultivo posterior a las inmersiones en nitrógeno líquido, y la poca entrada de luz los primeros días de crecimiento *in vitro*, se obtuvo un porcentaje de rebrote del 100% de las yemas crioconservadas (figura 11), además del crecimiento directo sin la formación de callo en todos los casos. La

viabilidad de las yemas posterior a la inmersión en nitrógeno líquido, demostró la no formación de hielo en los tejidos, y por lo tanto el éxito de los procedimientos llevados a cabo, evidenciándose en la regeneración de las yemas posterior a los procedimientos de criopreservación.

## **7. DISCUSIÓN**

Además de los procedimientos realizados para el acondicionamiento de las yemas, es importante resaltar que los resultados obtenidos son dependientes también de la edad del explante, y por ende se debe asegurar explantes homogéneos dentro de la muestra para permitir obtener también resultados homogéneos. Se recomienda el uso de yemas apicales y no axilares, ya que la zona meristemática de los ápices de la cual se origina el crecimiento organizado, está compuesta por una población pequeña relativamente homogénea de células que se dividen activamente y que por sus pocas vacuolas y su alta relación nucleocitoplasmática<sup>3,19</sup> son más susceptibles a tolerar los procesos de desecación que células altamente vacuoladas y diferenciadas<sup>19</sup>. Halmagyi y colaboradores<sup>27</sup> demostraron en sus estudios que el estado de las yemas puede influenciar los resultados de regeneración. En este estudio, aunque no se evaluaron las diferencias en las respuestas de los diferentes tipos de explantes a los tratamientos, en todos los casos se utilizaron yemas apicales de plántulas de 20-25 días de crecimiento *in vitro*.

### **7.1. Precultivos Escalonados y Osmoprotección Sacarosa**

Dado que la criopreservación induce un alto estrés en los tejidos de las plantas, el uso de crioprotectores en las yemas a congelar es necesario. En este estudio se demostró la crioprotección que brindaron los precultivos escalonados y el tratamiento osmoprotector con sacarosa en las yemas de *P. peruviana* sometidas a criopreservación. Sin los precultivos con sacarosa y sin un tratamiento osmoprotector la criopreservación de las yemas encapsuladas de *P. peruviana* no fue posible y éstas no sobrevivieron los procedimientos de inmersión en nitrógeno líquido y murieron en su posterior cultivo. Los resultados negativos en la sobrevivencia de las yemas encapsuladas que no recibieron tratamiento de precultivo ni osmoprotección con sacarosa 0.75M, son resultado de esto. Los fenómenos osmoprotectores desencadenados por las altas concentraciones de sacarosa inician con el aumento de la osmolaridad en las soluciones de los

precultivos y posteriormente con la osmoprotección en solución líquida a 0.75M, las cuales causan deshidratación celular y reducción de agua congelable en los tejidos. La sacarosa como un compuesto que promueve el movimiento osmótico es comúnmente suplementada en los medios de cultivo en experimentos de criopreservación<sup>28</sup>. Los tratamientos con sacarosa en los precultivos escalonados de 0.087M y 0.174M permitieron la tolerancia de las yemas al tratamiento osmoprotector con sacarosa 0.75M, sin estos precultivos el tratamiento osmoprotector resultaba tóxico en las yemas.

La osmoprotección en solución líquida concentrada aplicada a las yemas previo la desecación y criopreservación permitió a las yemas la capacidad de tolerar la deshidratación y las bajas temperaturas del nitrógeno líquido, logrando finalmente cápsulas sin la formación de cristales de hielo. La sacarosa es un crioprotector comúnmente empleado en la criopreservación, que además de aumentar la tolerancia a la deshidratación contribuye al mantenimiento de la viabilidad de los tejidos<sup>29</sup>.

Aunque principalmente es utilizada para deshidratar por ósmosis, la sacarosa también entra a las células y permite actuar como agente protector generando la estabilización de las membranas y proteínas durante la desecación<sup>29,30</sup>. Ningún agente crioprotector adicional a la sacarosa fue utilizado, demostrando la efectividad de esta como agente protector para la criopreservación de *P. peruviana*.

Existen varias razones por las cuales la sacarosa actúa como agente protector en las yemas encapsuladas de *P. peruviana*. Los tejidos permeados por la sacarosa durante el precultivo de las yemas, alcanzan un equilibrio en las concentraciones intracelulares, y sufren un estrés por deshidratación leve además de una acumulación de sacarosa en los tejidos, estimulando cambios metabólicos en las células de las plantas<sup>28,29,31</sup>, adicionalmente el precultivo en medio enriquecido con sacarosa genera el aumento de compuestos crioprotectores endógenos tales como azúcares y alcoholes derivados de azúcares<sup>32</sup> que ayudan a las yemas a tolerar los efectos de la deshidratación y posterior inmersión en nitrógeno líquido. La suma de estos crioprotectores al interior de las células de las yemas aumenta la estabilidad de la membrana plasmática para tolerar varios estreses impuestos por el congelamiento, y aceleran el proceso de recuperación posterior al calentamiento de las muestras<sup>33</sup>.

A lo largo de los ensayos el precultivo y el tratamiento osmótico con altas concentraciones de sacarosa fueron pasos críticos para la viabilidad de las muestras críoconservadas. Ya que la sacarosa aumenta las concentraciones intracelulares de solutos y actúa como el principal agente de tolerancia a la desecación<sup>34</sup> las yemas sin precultivos en sacarosa no sobrevivieron la críoconservación. Otros autores han demostrado también la eficacia en el aumento de la tolerancia a la desecación con el uso de precultivos en medios suplementados con concentraciones de sacarosa<sup>35,36</sup> Suzuki y colaboradores<sup>37,38</sup> reportaron además que cuando se realizaban precultivos escalonados y pasos sucesivos de cultivo en concentraciones altas de sacarosa, aumentaba el porcentaje de sobrevivencia de las yemas inmersas en nitrógeno líquido.

## **7.2. Importancia del Cultivo a Bajas Temperaturas en la Aclimatación al Frío**

Los tratamientos precultivados con sacarosa en concentraciones escalonadas, a 4°C y en oscuridad total, lograron la óptima aclimatación al frío de las yemas encapsuladas, y permitieron su posterior críoconservación. La tolerancia al congelamiento también es inducida por medio de la aclimatación al frío, la cual se puede lograr por medio del cultivo de las yemas a temperaturas bajas, por encima de la temperatura de fusión del agua<sup>28</sup>. La aclimatación al frío se encuentra asociada con muchas alteraciones fisiológicas y bioquímicas, incluyendo alteraciones de membrana, cambios en la composición proteínica, aumento en contenidos de azúcares, cambios en las concentraciones de hormonas y alteraciones en la expresión de genes<sup>28, 39,40,41,42</sup>. La mayoría de las plantas no toleran las temperaturas menores a -3°C durante su periodo de crecimiento, pero cuando aclimatadas al frío toleran temperaturas mucho menores a los -3°C<sup>43</sup>.

Los resultados demostraron al igual que otros estudios<sup>44</sup> que se aumenta la regeneración de las yemas después de alternar las temperaturas de precultivo. La aclimatación al frío es utilizada como pretratamiento para la críoconservación de varias plantas crecidas *in vitro*. Las condiciones utilizadas para la aclimatación al frío incluyen bajas temperaturas constantes y/o oscuridad total<sup>45</sup>. Otros estudios que demuestran la efectividad de la aplicación de tratamientos que sirven para la aclimatación al frío previo a la críoconservación, son los realizados en algunas especies de papa y pera, que reflejan una alta sobrevivencia de yemas aclimatadas críoconservadas posteriormente regeneradas<sup>46</sup>.

Diferentes autores 28, 45, 47 plantean que las bajas temperaturas, alteraciones en fotoperiodo y estrés osmótico pueden inducir la aclimatación al frío y por lo tanto la tolerancia al congelamiento en las plantas. En este estudio sólo con una combinación de los tres factores: bajas temperaturas (4°C); oscuridad y estrés osmótico, aplicados a las yemas en el precultivo, se logró la aclimatación al frío e inducción de la tolerancia al congelamiento de las yemas encapsuladas de *P. peruviana*. En algunas especies el efecto de la aclimatación al frío puede ser complementado e incluso remplazado por la incubación en soluciones de sacarosa<sup>48</sup> pero en este estudio se demostró que para el caso de *P. peruviana* los dos tratamientos son necesarios para una correcta aclimatación.

### **7.3. Desección y Mínimo Contenido de Agua de las Yemas Encapsuladas**

Los daños causados por congelamiento son irreversibles en las células. La cristalización del hielo solo puede ser prevenida por medio de la reducción celular del contenido de agua estrictamente hasta un mínimo<sup>49</sup> de tal forma que se minimice o evite la formación de hielo<sup>50</sup>. La desecación es por lo tanto un componente fundamental para las estrategias de crioconservación<sup>50</sup>.

La reducción del contenido de agua a un nivel crítico es necesaria para la crioconservación exitosa por medio de encapsulación-deshidratación dado que las células no pueden tener agua congelable en sus tejidos o esta se cristalizará en hielo. Las cápsulas sin tratamientos osmoprotectores, o que eran precultivadas y osmoprotegidas pero no sufrían desecación suficiente en la cabina de flujo de aire laminar, produjeron abundantes cristales de hielo, y terminando el proceso de calentamiento, el hielo aun era visible en las cápsulas. La crioconservación de los tejidos solo puede ser exitosa si la formación intracelular de hielo es evitada, dado que causa daños irreversibles a la membrana celular destruyendo su semipermeabilidad<sup>51</sup>.

En la naturaleza, algunas especies de plantas adoptan sistemas donde la formación de hielo a temperaturas inferiores a cero puede ser evitada por medio de la síntesis de sustancias específicas tales como azúcares, prolina y proteínas, que disminuyen el punto de congelamiento de las células resultando en el superenfriamiento<sup>51</sup>, pero lograr evitar la formación de hielo mientras se mantiene un contenido de agua viable en las células al manejar temperaturas tan bajas como las del nitrógeno líquido no es posible, y se requiere de mayor desecación de las yemas.

Las yemas encapsuladas que fueron desecadas por exposición a flujo de aire estéril en cabina de flujo de aire laminar lograron el rebrote hasta un valor mínimo de humedad del 8%. Por debajo de estos valores de humedad las yemas aunque no formaron cristales de hielo seguido el proceso de congelamiento, no tuvieron la capacidad de rebrotar y posteriormente murieron. Esto demostró que así se logre un mínimo viable en el contenido de agua de las yemas (8%) éstas no necesariamente sobreviven los procesos de inmersión de en nitrógeno líquido sin tratamientos crioprotectores. Esto se debe a que aunque se requiere de una remoción de toda el agua potencialmente congelable en las yemas, la desecación debe ser suficiente para deshidratar las cápsulas sin exceder el mínimo contenido de agua viable en las células, con el fin de evitar los efectos citotóxicos causados por la deshidratación extrema<sup>49</sup>. Se requiere de procesos físicos que aumenten las concentraciones de las soluciones celulares y disminuyan artificialmente los contenidos de agua celular, brindando además protección a los tejidos como los tratamientos con sacarosa, de tal forma que al enfriarse los solutos internos estos puedan entrar en un estado acuoso transitorio similar al vidrio y no formen cristales de hielo<sup>51</sup>.

Se estableció por los resultados obtenidos el mínimo contenido viable de agua de las yemas encapsuladas en 8% para tratamientos de cultivo *in vitro*, y se sugiere una desecación solo hasta el 15% para tratamientos de crioconservación. Se sugiere que el contenido de humedad de las yemas encapsuladas sea de 15% y no de 8% para los procedimientos de crioconservación ya que con los tratamientos osmoprotectores utilizados por debajo del 15% de humedad en las cápsulas el agua ya no es cristalizable dada la alta concentración de solutos intracelulares. Desecar los tejidos hasta porcentajes menores puede resultar en la pérdida de viabilidad de los tejidos sin haber una necesidad real de llevar las cápsulas hasta tal punto de desecación

Los contenidos de humedad de las cápsulas a las 4 horas fueron del  $\approx 8\%$ , por lo que se estableció que mayor desecación y menores valores en el porcentaje de humedad son inviables para los tejidos de *Physalis peruviana*. Varios autores han establecido en sus estudios un mínimo viable de contenido de humedad de las yemas de 0.7g H<sub>2</sub>O/g peso seco<sup>49,51,29</sup>, pero los resultados obtenidos con *P. peruviana* en los ensayos realizados demuestran un mínimo contenido viable menor con valores de 0.03g H<sub>2</sub>O/g peso seco. Los tejidos de la mayoría de las especies no toleran la pérdida de agua celular excesiva requerida para la crioconservación sin un impacto significativo en la viabilidad<sup>3,4</sup>, pero las especies ubicadas en el trópico se ven sometidas

constantemente a condiciones de estrés por deshidratación, lo que podría generar una mayor tolerancia en los tejidos a la desecación, generando así una disminución en el valor mínimo de contenido de agua viable en las yemas. Este valor puede sin embargo variar entre las especies e incluso variedades de plantas, principalmente dada la variación en la tolerancia a la deshidratación en las mismas<sup>52</sup>.

Las yemas precultivadas en sacarosa lograron una recuperación completa después de la desecación hasta las 4 horas de exposición en cabina de flujo de aire laminar. Posterior a las 4 horas de desecación, las yemas aunque rebrotaron en su mayoría, lo hicieron por medio de la vía indirecta de crecimiento generando callos en todos los casos. Lo anterior indicó que posterior a las 4 horas de exposición de las cápsulas a la cabina de flujo de aire laminar, hay daño celular en las yemas efecto de la desecación extrema. Los precultivos de las yemas con sacarosa generan un estrés osmótico asociado a la pérdida de agua en las cápsulas<sup>53</sup>, que causa un aumento en la producción de ácido abscísico (ABA) y prolina<sup>37</sup> como también un aumento en el contenido total de proteínas<sup>54</sup>. La tolerancia a la desecación inducida por medio del aumento en el metabolismo adaptativo y la alta producción de ABA, genera la activación de expresión de genes que llevan a la tolerancia a varios estreses<sup>39,55</sup>. El metabolismo adaptativo y la producción incrementada de ABA, genera un aumento en la acumulación de biomoléculas y proteínas, aminoácidos y algunos azúcares<sup>56</sup> que a su vez generan una tolerancia al estrés causado por la desecación y bajas temperaturas durante la crioconservación.

### **7.5. Crioconservación por encapsulación-deshidratación de *Physalis peruviana***

La crioconservación por encapsulación deshidratación en una accesión de *Physalis peruviana* proveniente de semillas germinadas y micropropagadas *in vitro* fue lograda exitosamente. Se obtuvo un 100% de rebrote de las yemas crioconservadas por esta técnica frente a un 0% de rebrote en las muestras crioconservadas sin tratamiento previo (control).

Varios autores han aceptado el 53% como mínimo de rebrote estándar para la mayoría de los protocolos establecidos para germoplasma vegetal<sup>57</sup>. Los resultados obtenidos en este estudio superaron significativamente este valor ya que permitieron el 100% de rebrote de las yemas crioconservadas, demostrando ser una técnica exitosa para el establecimiento de un protocolo preliminar de crioconservación para *Physalis peruviana* por encapsulación-deshidratación.

Las yemas precultivadas, encapsuladas, osmoprotegidas y desecadas fueron crioconservadas en nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}$  y reactivadas posteriormente por medio del calentamiento, rehidratación y postcultivo. Esta técnica permitió evaluar las diferencias entre las yemas crioconservadas y sin crioconservar, observando variaciones no en el porcentaje de rebrote de las yemas, sino en la tasa a la cual esto ocurre. Algunos estudios han demostrado disminución en los porcentajes de rebrote posterior a la crioconservación<sup>22</sup>, pero no hacen diferenciación entre los tiempos de rebrote diferenciales entre yemas crioconservadas y sin crioconservar; estudios más profundos se sugieren para la correcta comprensión de las consecuencias directas de la técnica en las tasas y tiempos de rebrote de las yemas.

Tanto las muestras crioconservadas como aquellas sin crioconservar rebrotaron en su totalidad, pero aquellas inmersas en nitrógeno líquido retrasaron el inicio del rebrote de las yemas en hasta 7 días. Este retraso en el rebrote y crecimiento de las yemas causó que pasados 15 días posteriores al cultivo de las cápsulas crioconservadas, estas presentaran hasta ahora el desarrollo de la primer hoja visible, mientras los controles presentaban ya el desarrollo de dos hojas adultas y un primordio foliar. El retraso en el crecimiento de las yemas puede resultar efecto del estrés por bajas temperaturas y deshidratación causado por los procesos de crioconservación, y es consecuencia directa de las inmersiones en nitrógeno líquido. Los brotes y plántulas desarrolladas a partir de yemas encapsuladas crioconservadas fueron similares a los parentales en términos de tamaño, forma y coloración y aparentemente no presentaban variaciones respecto a las yemas no crioconservadas. Los tiempos de realización de este proyecto no permitieron evaluaciones posteriores en el desarrollo de las plántulas crioconservadas, por lo que se recomienda la realización de estudios futuros que evalúen las características de plántulas de *Physalis peruviana* obtenidas a partir de brotes crioconservados.

Los resultados de sobrevivencia sobre las yemas encapsuladas no tratadas, son principalmente efecto de las bajas temperaturas que este maneja al realizar las inmersiones en nitrógeno líquido. Si las yemas encapsuladas son inmersas en el nitrógeno sin previa deshidratación, el agua intracelular se congelara para formar cristales de hielo que resultan en el rompimiento de membranas y la muerte celular. Aun sin se lograra que las yemas no se murieran por efecto de los cristales de hielo, estas lo harían posteriormente por deshidratación dado que no hay agua disponible en el sistema, o por las concentraciones citotóxicas de los solutos al interior de las

células. Por esto, es resaltado el papel que juega la sacarosa en la aclimatación al frío, osmoprotección y la resistencia de las yemas a la desecación y posterior inmersión en nitrógeno líquido.

Se establecieron como condiciones óptimas para lograr la aclimatación al frío de las yemas la realización de dos precultivos en medio M&S suplementado con concentraciones escalonadas de sacarosa de 0.087M por dos días seguido de 0.0174M por dos días, incubados en la nevera a 4°C en oscuridad total durante el todo el periodo. Sin estas condiciones de precultivo, las yemas criopreservadas murieron algunas por la excesiva cantidad de agua que posteriormente se cristalizaba en hielo, y otras por la excesiva desecación sin tratamiento osmoprotector. En todos los casos se requirió de tratamientos con sacarosa para la criopreservación y fue el único crioprotector utilizado a lo largo del proceso.

Las yemas precultivadas encapsuladas en alginato fueron exitosamente osmoprotectadas con un tratamiento de medio líquido suplementado con sacarosa 0.75M en agitación por 24, horas también en frío y oscuridad. Este tratamiento no solo redujo el contenido de humedad de las cápsulas a un contenido de humedad de 79%, sino que adicionalmente brinda a las yemas encapsuladas una osmoprotección para los procesos de desecación y congelamiento posteriores. Las yemas que no fueron osmoprotectadas por medio con sacarosa 0.75M y fueron criopreservadas no toleraron los procedimientos de criopreservación y murieron, haciendo evidente la necesidad de dicho tratamiento.

La desecación realizada en cabina de flujo de aire laminar a temperatura ambiente por tres horas permitió lograr un contenido de  $\approx 15\%$  de humedad final en las cápsulas, momento en el cual las cápsulas fueron inmersas en nitrógeno líquido. Las cápsulas que fueron desecadas a porcentajes mayores al 20% o menores al 10% no sobrevivieron las inmersiones en nitrógeno líquido.

La rehidratación de las cápsulas, posterior a su calentamiento permitió aumentar las tasas de rebrote de las yemas, pero no es un paso crítico para la sobrevivencia de las mismas. Adicionalmente se hace énfasis en la importancia de las condiciones de cultivo posterior al retiro de las muestras del nitrógeno líquido que de no ser en penumbra causaran la muerte de las yemas criopreservadas.

#### 7.4. Reactivación de Yemas Crioconservadas

Las cápsulas retiradas del nitrógeno y calentadas al baño de María 38°C fueron posteriormente rehidratadas con medio M&S líquido. El cultivo de las yemas en medio suplementado con BAP y bajo condiciones de penumbra por 5 días permitió la sobrevivencia de las yemas crioconservadas, y su posterior cultivo en medio M&S normal en incubación a 25°C con 16 horas de fotoperiodo su posterior regeneración en plántulas.

El BAP es una citoquinina ampliamente utilizada en el cultivo de tejidos. La suplementación del medio de cultivo con BAP permitió, a diferencia del control, la sobrevivencia de las yemas en los días posteriores a la inmersión en nitrógeno líquido tal como lo mencionan otros autores<sup>58,63,64</sup>. El BAP por ser una fitohormona que induce la división celular y promover el desarrollo apical de los tejidos, resultó apropiada para la reactivación del crecimiento de las yemas posterior a la crioconservación<sup>58</sup>. Varios autores reportan la formación de callo tras la aplicación de BAP en el medio de cultivo de las yemas<sup>63,65</sup>; sin embargo para el caso de *P. peruviana* los tratamientos suplementados con BAP estimularon el crecimiento organizado y no causaron la formación de callo.

Se ha documentado previamente el uso de citoquininas en el medio para favorecer la inducción y multiplicación de los tejidos<sup>58,63,64</sup>. Aunque algunos autores<sup>63,64</sup> plantean que la mejor concentración a utilizar de BAP en el medio de cultivo es de 0.5mg/L a 1.0mg/L, los resultados en *P. peruviana* en este estudio permitieron establecer que concentraciones menores arrojan resultados positivos, sin la formación de callo en todos los casos. Los resultados del alto porcentaje de rebrote, y la regeneración directa de las yemas tratadas con M&S suplementado con BAP indican que concentraciones menores a 0.45mg/L suplementado en el medio de cultivo permiten la reactivación del crecimiento.

Los resultados positivos obtenidos con el medio de regeneración fueron solo posibles en condiciones de penumbra por 5 días posterior a la inmersión en nitrógeno líquido. Las cápsulas incubadas por periodos prolongados en estas condiciones resultaron letales para las yemas, al igual que la sobre exposición a la luz. La incubación en condiciones de luminosidad regulares resultó en la oxidación de las yemas. Las yemas requieren de un proceso lento de “aclimatación” a las condiciones regulares de fotoperiodo para evitar la muerte de las yemas.

Se puede atribuir los altos valores de sobrevivencia de las yemas bajo condiciones de penumbra en medio suplementado con BAP a diferencia de los controles en función de la relación citoquininas-luz. Las yemas sin BAP no sobrevivieron, como tampoco aquellas incubadas en condiciones de luminosidad. Los efectos del tipo y cantidad de radiación recibida por las plantas bajo diferentes concentraciones de BAP sobre el crecimiento, pigmentación, y desarrollo de las plántulas ha sido estudiada por diferentes autores en varias especies, donde se ha demostrado la dependencia de la luz en los efectos de las citoquininas<sup>63,64,65</sup>. En condiciones de oscuridad se despliega el estrés oxidativo causado no solo por los altos niveles de radicales libres sino también por una pérdida de la capacidad antioxidante<sup>66</sup>. Autores citan como los tejidos que son incubados en medios suplementados con citoquininas como BAP durante la oscuridad muestran un efecto retardante en la senescencia, asociado a la retención de la estructura de los cloroplastos, del contenido inicial de clorofila y de los contenidos de proteínas. El BAP además reduce la degradación de la proteína de la clorofila a y b y las subunidades de la Rubisco<sup>65,66</sup>. El cultivo de las yemas en condiciones de penumbra es necesario por unos días para evitar la muerte por oxidación de las yemas críoconservadas, pero sin la adición de BAP, estas no sobreviven este procedimiento tampoco. El BAP brinda la protección y capacidad de los tejidos a reactivar su metabolismo y continuar su crecimiento.

La metodología de encapsulación-deshidratación permitió la sobrevivencia de las yemas de *Physalis peruviana* posterior a la críoconservación, el protocolo preliminar, propone el uso de precultivos escalonados con sacarosa en frío previo a la osmoprotección, y la rehidratación y cultivo en medio de regeneración posterior al descongelamiento de las muestras, adicional a lo propuesto por Fabre y Dereudre (1990). La realización de dichos pasos es primordial para lograr la sobrevivencia de las yemas. El protocolo preliminar (ANEXO 1) es una primera aproximación hacia la críoconservación de *P. peruviana* y sirve como punto de partida para el establecimiento de futuros protocolos.

## **8. CONCLUSIONES**

Se logró establecer un protocolo preliminar de críoconservación para *Physalis peruviana* por medio de la técnica de encapsulación deshidratación.

Se encontraron resultados significativos entre los diferentes tratamientos de precultivos evaluados, obteniendo los mejores resultados con la realización de dos precultivos en concentraciones escalonadas de sacarosa bajo condiciones de frío y oscuridad.

Solo el tratamiento osmoprotector de las yemas encapsuladas en medio M&S líquido suplementado con 0.75M de sacarosa por 24 horas en agitación presento diferencias significativas con el control.

Los altos niveles de sacarosa líquida utilizados como agentes osmoprotectores resultan tóxicos en las yemas en la ausencia de precultivos escalonados, por lo cual se requiere de la realización de precultivos escalonados con sacarosa previo a la osmoprotección.

Las condiciones de precultivo y postcultivo son determinantes en el éxito de la técnica de encapsulación-deshidratación en *P. peruviana*.

El tiempo de desecación en cabina de flujo de aire laminar para obtener un contenido mínimo de agua viable en las yemas fue de 3:30h en yemas encapsuladas sin precultivos, y de 3:00h en yemas encapsuladas y precultivadas.

Se encontraron resultados significativos entre los diferentes tratamientos de precultivos evaluados, obteniendo los mejores resultados con la realización de dos precultivos en concentraciones escalonadas de sacarosa bajo condiciones de frío y oscuridad.

Los altos niveles de sacarosa líquida utilizados como agentes osmoprotectores resultan tóxicos en las yemas en la ausencia de precultivos escalonados.

Se estableció como mínimo contenido viable de agua de las yemas encapsuladas el 8% para tratamientos de cultivo *in vitro*, y del 15% para tratamientos de criopreservación.

Se requiere de medio suplementado con BAP y de la poca entrada de luz para la sobrevivencia de las yemas criopreservadas por encapsulación-deshidratación de *Physalis peruviana*

La técnica de encapsulación-deshidratación para una muestra de *Physalis peruviana* ecotipo Colombia, resulto efectiva, permitiendo la sobrevivencia y futuro rebrote de las yemas encapsuladas.

## 9. Recomendaciones

Evaluar viabilidad celular post inmersiones en NL y su relación con los porcentajes de rebrote en los diferentes post cultivos. Dado que los protocolos de crioconservación no incluyen la inmersión en nitrógeno líquido y descongelamiento de las muestras, sino también el cultivo *in vitro* y proceso de regeneración, cambios fenotípicos y genómicos pueden ocurrir por variación somaclonal. La verificación de plantas fieles a los parentales posterior a la crioconservación es por lo tanto necesaria.

Dada la variación natural que se presenta entre las especies, se sugiere además la evaluación del protocolo en otras accesiones del ecotipo Colombia de *Physalis peruviana*, como también en otros ecotipos, para así obtener un protocolo estandarizado para la especie.

## 10. Bibliografía

1. FAO. 1996. Estado de la diversidad. En: Informe sobre el estado de los recursos fitogenéticos en el mundo. FAO, Roma. En: <http://www.fao.org/FOCUS/S/96/06/more/report-s.htm>.
2. Paunescu, A. 2009. Biotechnology for Endangered Plant Conservation: a critical overview. Rom. Biotchnol. Lett., Vol 14(1): 4095-4103.
3. Engelmann, F. 2010. Use of Biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. In vitro cell. Dev. Biol. Plant. DOI: 10.1007/s11627-010-9327-2
4. Engelmann, F., & Engels, J.M. 2002. Technologies and strategies for *ex situ* conservation. In: managing plant genetic Diversiti. Rao, R., Brown, A., Jackson, M. Wallingford, CAB International, IPGRI, pp. 89-104.
5. Gonzalez-Arno, M. & Engelmann, F. 2006. Cryopreservation of plant germplasm using the encapsulation-dehydration technique: review and case study on sugarcane. Cryoletters 24: 155-168
6. Fabre, J. Dereuddre, J. 1990. Encapsulation-dehudration: a new approach to cryopreservation of Solanum shoot-tips. Cryoletters, 11:413-426
7. Fischer G, Miranda D, Piedrahita W, Romero J. 2000. Avances en cultivo, poscosecha y exportación de la uchuva *Physalis peruviana* L. en Colombia. Primera Edición. Santa Fe de Bogotá. Colombia. 221p
8. Valencia, A., Lobo, M., Ligarreto, A. 2010. Estado del arte de los recursos genéticos vegetales en Colombia: Sistema de Bancos de Germoplasma. Corpoica Cienc. Tecnol. Agropecu. 11 (1):85-94
9. Mazur, P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and applications. Aner. J. Physiol. 247:125-147.
10. Engelmann, F., Gonzalez-Arno, M., Wu, W., Escobar, R. 2008. Development of encapsulation-dehydration. In: Reed, B. Plant cryopreservation: a practical guide. Springer, Berlin. Pp 59-76.
11. Mazorra M., Quintana A. 2003. Desarrollo del fruto y aspectos anatómicos de las estructuras reproductivas de la uchuva (*Physalis peruviana* L.) en la zona de Subia

- (Cundinamarca). [Trabajo de Grado] Bogotá: Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.
12. Trillos G. O, Cotes T. J, Medina C. C, Lobo A. M, Navas A. 2008. Caracterización morfológica de cuarenta y seis accesiones de uchuva (*Physalis peruviana* L.), en Antioquia (Colombia). Revista Brasileira de Fruticultura. 30 (3): 708-715.
  13. Restrepo A. M., Cortés M, y Márquez C. J. 2009. Uchuvas (*Physalis peruviana* L.) mínimamente procesadas fortificadas con vitamina E. VITAE. 16 (1): 19 – 30.
  14. Valencia, A., Lobo, M., Ligarreto, A. 2010. Estado del arte de los recursos genéticos vegetales en Colombia: Sistema de Bancos de Germoplasma. Corpoica Cienc. Tecnol. Agropecu. 11 (1):85-94
  15. Sakai, A., Kobayachi, S., Oiyama, I. 1990. Cryopreservation of nuclear cells of navel orange (*Citrus sinensis* Obs. Var. brasiliensis Tanaka) by vitrification. Plant Cell Rep. 9:30-33
  16. Engelmann, F. 1997. Importance of desiccation for the cryopreservation of plant recalcitrant seed and vegetatively propagated species. Plant Genet. Resour. Newsl. 112: 9-18.
  17. Kartha, K. & Engelmann, F. 1994. Cryopreservation and germplasm storage. In Vasil, U., Thorpe, T. Plant cell and tissue culture. Kluwer, Dordrecht. Pp 195-230.
  18. Fahy, G., MacFarlane, D., Angell, C. Meryman, H. 1984. Vitrification as an approach to cryopreservation. Cryobiology 21: 407-426.
  19. Benson, E. 2008. Cryopreservation of phytodiversity: a critical appraisal of theory and practice. Critical rev. In Sci. 27:144-219
  20. Ozkavukcu, S. & Erdemli, E. 2003. Cryopreservation: Basic knowledge and biophysical effects. Journal of Ankara medical school. Vol 24, No. 4: 189-196
  21. Dereuddre, J., Scottez, C., Arnaud, Y., Duron, M. 1990. Resistance of alginate coated axillary shoot tips of pear tree (*Pyrus communis* L. Beurre Hardy) *in vitro* plantlets to dehydration and subsequent freezing in liquid nitrogen: effect of previous cold hardening. CR Academic Sciences Paris III 310: 317-323.
  22. Benson, E.E., Wilkinson, M., Todd, A., Ekuere, U., Lyon, J. 1996. Developmental competence and ploidy stability in plants regenerated from cryopreserved potato shoot-tips. CryoLetters 17: 119-128

23. Boufaria, S., Jelti, N., Lairy, G., Blanc, A., Bonnel, E., Dereudre, J. 1996. Cryopreservation of potato shoot tips by encapsulation-dehydration. *Potato Res* 39: 69-78.
24. Dereuddre, J., Hassen, M., Nlandin, S., Kaminski, M. 1991. Resistance of alginate-coated somatic embryos of carrot (*Daucus carota* L) to desiccation and freezing in liquid nitrogen: 2. Thermal analysis. *Cryoletters* 12: 135-148
25. Knudsen, H. 2000. Directorio de Colecciones de Germoplasma en América Latina y el Caribe. Primera edición. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI), Roma, Italia.
26. Murashige, T., Skoog, F. 1962 a Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15(3): 473-497.
27. Halmagyi, A., Deliu, C., Coste, A. 2005. Plant regrowth from potato shoot-tip cultures after vitrification droplet method. *CryoLetters* 26:313-322.
28. Lambardi, M., Osudogru, E.A. Benelli, C. 2008. Cryopreservation of embryogenic cultures. *En: Reed, B.M. Plant cryopreservation, A Practical Guide.* Springer Sciences+Business Media, LLC. pp. 177-210
29. Dumet, D., Engelmann, F., Chabrilange, N., Duval, Y., Dereuddre, J. 1993. Importance of sucrose for the acquisition of tolerance to desiccation and cryopreservation of oil palm somatic embryos. *CryoLetters* 14: 243-250
30. Thomashow, M.F. 1998 Role of cold-responsive genes in plant freezing tolerance. *Plant physiology*, 118: 1-7.
31. Turner, S.R., Senaratna, T., Touchell, D.H., Bunn, E., Dixon, K.W., Tan, B. 2001. Stereochemical arrangement of hydroxyl groups in sugar and polyalcohol molecules as an important factor in effective cryopreservation. *Plant Sci.* 48: 489-497
32. Sakai, A., Engelmann, F. 2007. Vitrification, Encapsulation-vitrification and Droplet-vitrification: A Review. *CryoLetters* 28: 151-172.
33. Uemura, M., Minami, A., Kawamura, Y. 2009. Effect of low temperatures and cryoprotectants on plant plasma membranes. 1<sup>st</sup> international symposium on cryopreservation in horticultural species, Leuven, Belgium. pp.15
34. Suzuki, M., Ishikawa, M., Okuda, H., Nosda, K., Kishimoto, T., Nakamura, T., Ogiwara, I., Shimura, I., Akihama, T. 2006. Physiological changes in gentian axillary buds during

- two step preculture with sucrose that conferred high levels of tolerance to desiccation and cryopreservation. *Annals Botany* 97: 1073-1081
35. Niino, T., Sakai, A. 1994. Cryopreservation of alginate-coated in vitro-grown shoot tips of apple, pear and mulberry, *Plant Sci.* 87: 199-206
  36. Suzuki, M., Niino, T., Akihama, T. 1994. Cryopreservation of shoot tips of kiwi fruit seedling by the alginate encapsulation-dehydration technique, *Plant Tissue Culture Lett.* 11: 122-12
  37. Suzuki, M., Ishikawa, M., Akihama, T. 1998. A novel preculture method for the induction of desiccation tolerance in gentian axillary buds for cryopreservation. *Plant Science* 135: 59-76.
  38. Suzuki, M., Ishikawa, M., Akihama, T. 2005. Cryopreservation of encapsulated gentian axillary buds following 2-step preculture with sucrose and desiccation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 83: 115-121
  39. Guy, C.L., 1990. Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolisms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 41, 187-223.
  40. Chen, H.H., Li, P.H., Brenner, M.I. 1983. Involvement of abscisic acid in potato cold acclimation. *Plant physiology* 73: 71-75
  41. Steponkus, P.L. Dowgert, M.F., Kamm, W.J. 1983. Destabilization of the plasma membrane of isolated plant protoplasts during freeze-thaw cycle: the influence of cold acclimation. *Cryobiology* 20:448-465.
  42. Lee, S. P., & Chhen, T.H. Molecular biology of plant cold hardiness development en: *Advances in Plant Cold Hardiness* Li & Christensson, Eds., CRC Press. Florida USA. pp 1-29.
  43. Yelenosky, G., Guy, C. 1989. Freezing tolerance of citrus, spinach and petunia leaf tissue. *Plant physiology* 89: 444-451
  44. Kaczmarczyk, A., Rutten, T., Melzer, M., Keller, E.R.J. 2008. Ultrastructural changes associated with of cryopreservation of potato (*Solanum tuberosum*) shoot tips. *CryoLetters* 29: 145-156
  45. Chang, Y., & Reed, B. 2000. Extended alternating-temperature cold acclimation and culture duration improve shoot cryopreservation. *Cryobiology* 40: 311-322

46. Reed, B.M. 2001. Implementing cryogenic storage of clonally propagated plants. *Cryo-Letters* 22, 97-104.
47. Weiser, C.J. 1970. Cold resistance and acclimation in woody plants. *HortScience* 5: 403-410.
48. Dumet, D., Grapin, A., Bailly, C., Dorion, N. 2002. Revisiting crucial steps of an encapsulation/desiccation based cryopreservation process: importance of thawing method in the case of *Pelargonium* meristems. *Plant Science* 163: 1121-1127
49. Kaviani, B. 2010. Cryopreservation by encapsulation-dehydration for the long-term storage of some important germplasms: seed of lily [*Lilium ledebourii* (Baker) Bioss.], embryonic axe of Persian lilac (*melia azadarach* L.) and tea (*Camellia sinensis* L.). *Plant Omics Journal* 6, 177-182.
50. Mazur, P. 2004. Principles of cryobiology. *En*: Fuller, B.J., Lane, N., Benson, E.E., Life in a Frozen State. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 3-65
51. Panis, B., & Lambardi, M. 2005. Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). *The Role of Biotechnology*, 2005(1): 43-54.
52. Grospietsch, M., Stodulkova, E., Zamecnik, J. 1999. Effects of osmotic stress on the dehydration tolerance and cryopreservation of *Solanum tuberosum* shoot tips. *CryoLetters* 20: 339-346
53. Wang, Q., Tanne, E., Arav, A., Gafny, R. 2000. Cryopreservation of *in vitro* grown shoot tips of grapevine by encapsulation-dehydration. *Plant Cell Tissue Org. Culture*. 63: 41-46.
54. Sejio, G. 2000. Effects of preculture with sucrose and ABA on cell suspensions water status and it's relation with vitrification resistance. *Brazilian Journal of Plan Physiology* 12, 166-180.
55. Panis, B., Strosse, H., Van den Hende, S., Swennen, R., 2002. Sucrose preculture to simplify cryopreservation of banana meristem cultures.
56. Browse, J., Xin, A., 2001. Temperature sensing and cold acclimation. *Current Opinion in Plant Bioolgy* 4, 241-246.
57. Nayyar, H., Bains, T.S., Kumar, S., 2004. Chilling stressed chickpea seedlings: effect of cold acclimation, calcium and abscisic acid on cryoprotective solutes and oxidative damage. *Environmental and Experimental Botany* 54, 275-285.

58. Dussert, S., Engelmann, F., Chabrilange, N., Duval, Y., Dereuddre, J. 1993. Importance of sucrose for the acquisition of tolerance to desiccation and cryopreservation of oil palm somatic embryos. *CryoLetters* 14: 243-250
59. Araykia, E., & Hamidogli, Y. 2010. Comparison of kinetin and 6-Banzil amino purine effect on in vitro micro tuberization of two cultivars of potato (*Solanum tuberosum* L.). *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, 8(6): 710-714
60. Saadat, Y.A. and Hennerty, M.J. (2002) Factors affecting the shoot multiplication of Persian walnut (*Juglans regia* L.). *Scientia Horticulturae* 95, pp. 251-260.
61. Chen, L., Wang, Y., Xu, C., Zhao, M. and Wu, J. (2006) *In vitro* propagation of *Lychnis senno* Siebold et Zucc., a rare plant with potential ornamental value. *Scientia Horticulturae* 107, pp. 183-186.
62. Matu, E.N., Lindsey, K.L. and Van Staden, J. (2006) Micropropagation of *Maytenus senegalensis* (Lam.) Excell. *South African Journal of Botany* 72, pp. 409-415.
63. Harish MC, Rajeevkumar S, Sathishkumar R. 2010. Efficient *in vitro* callus induction and regeneration of different tomato cultivars of India. *Asian Journal of Biotechnology*, 2 (3): 178-184.
64. Jatoi SA, Sajid GM, Sappal HU, Baloch MS, Quraishi A, Anwar R [Internet]. 2001. Differential *in vitro* response of tomato hybrids against a multitude of hormonal regimes. *Journal of Biological Sciences*, 1 (12): 1141-1144.
65. Buschmann, C. & Hartmut, H. 2008. The effect of cytokinins on growth and pigment accumulation of radish seedlings (*Raphanus sativus* L.) grown in the dark and at different light quanta fluence rates. *Photosynthesis and Photobiology* Vol 35, No. 2: 219-221
66. Zavaleta-Mancera, H.A., Lopez-Delgado, H., Loza-Tavera, H., Mora-Herrera, M., Trevilla-Garcia, C., Vargas-Suarez, M. & Ougham, H. 2007. Cytoquinin promotes catalase and ascorbate peroxidase activities and preserves the chloroplast integrity during dark-senescence.

## ANEXO 1

### **Protocolo preliminar de crioconservación por encapsulación-deshidratación de *Physalis peruviana* ecotipo Colombia**

Pineda-Muñoz, A. 2012

#### **MATERIALES**

##### **Día 1: Materiales para el aislamiento de yemas y Precultivo 1**

1. Estuche de disección estéril
2. Cajas de petri estériles
3. Medio de cultivo M&S con vitaminas (Murashige Skoog 1962) enriquecido con 0.087M de sacarosa (precultivo 1).
4. Plantas crecidas *in vitro* para la obtención de yemas
5. Nevera sin luz a 4°C.

##### ***Preparar previamente***

1. Plántulas de 20-25 días de crecimiento *in vitro*
2. Precultivo 1

##### **Día 3: Materiales para el Precultivo 2**

1. Pinzas estériles
2. Cajas de petri estériles
3. Medio de cultivo M&S con vitaminas (Murashige Skoog 1962) enriquecido con 0.174M de sacarosa.
4. Yemas precultivadas *in vitro* en el precultivo 1
5. Nevera sin luz a 4°C.

##### ***Preparar previamente***

1. Precultivo 2

### **Día 5: Materiales para la Encapsulación y Osmoprotección de yemas**

1. Pinzas estériles
2. Cajas de petri estériles
3. Papel secante estéril
4. Micropipeta de 1000 $\mu$ L
5. Puntas de micropipeta de 1000 $\mu$ L estériles previamente cortadas a un radio de 1.5mm
6. Acido algínico diluido al 3% en medio M&S líquido
7. Cloruro de Calcio dihidratado disuelto en agua estéril a 100mM
8. Agua estéril
9. Medio M&S líquido suplementado con 0.75M se sacarosa
10. magnetos para agitación estériles
11. Agitador orbital
12. Nevera sin luz a 4°C.

#### ***Preparar previamente***

1. Puntas de micropipeta cortadas
2. Acido algínico diluido al 3% en M&S líquido
3. Cloruro de Calcio dihidratado disuelto en agua estéril a 100mM
4. Medio M&S líquido suplementado con 0.75M se sacarosa

### **Día 6: Materiales para la Dsecación, Inmersión en nitrógeno líquido, Calentamiento y Postcultivo de las yemas encapsuladas**

1. Pinzas estériles
2. Cajas de petri estériles
3. Papel secante estéril
4. Papel kraft
5. Cabina de flujo de aire laminar
6. Crioviales estériles
7. Nitrógeno Líquido
8. Agua a 38°C
9. Medio M&S líquido enriquecido con 0.087M de sacarosa

10. Medio de cultivo M&S con vitaminas (Murashige Skoog 1962) enriquecido con 0.087M de sacarosa y 0.30mg/L d BAP (postcultivo 1).

***Preparar previamente***

1. Medio M&S líquido enriquecido con 0.087M de sacarosa
2. Postcultivo 1

**Día 10: Materiales para el Cultivo e incubación**

1. Pinzas estériles
2. Cajas de petri estériles
3. Medio de cultivo M&S con vitaminas (Murashige Skoog 1962) enriquecido con 0.087M de sacarosa postcultivo 2.
4. cuarto de incubación a 25°C y 16 horas de fotoperiodo

***Preparar previamente***

1. Postcultivo 2

**PROCEDIMIENTO**

El procedimiento tiene una duración de 10 días.

**Día 1**

Realizar cortes de yemas apicales para en las plántulas de 20-25 días de cultivo *in vitro* de 2mm de largo, e inocularlas en el precultivo 1.

Incubar en la nevera sin luz a 4°C por dos días.

**Día 3**

Remover las yemas del precultivo 1 transferirlas al precultivo 2.

Incubar en la nevera sin luz a 4°C por dos días.

**Día 5**

1. Remover las yemas del precultivo 2 y depositarlas en la solución de ácido algínico al 3%. Tomar las yemas con la micropipeta y depositarlas gota a gota en la solución de cloruro

de calcio dihidratado y dejar reposar por 30 minutos. Lavar las cápsulas superficialmente con agua estéril y secar el exceso de agua con papel secante.

2. Depositar las yemas encapsuladas en M&S 0.75M líquido junto con el magneto para agitación. Dejar las yemas encapsuladas en agitación orbital en la nevera sin luz a 4°C por 24 horas.

### **Día 6**

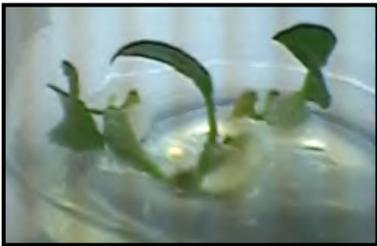
1. Retirar las yemas encapsuladas del tratamiento M&S 0.75M líquido y retirar los excesos de medio superficialmente con papel secante estéril.
2. En la cabina de flujo de aire laminar ubicar las cápsulas en cajas de petri distribuidas uniformemente (una sola capa de cápsulas que no se toquen unas a otras ni los bordes de las cajas) y desecarlas por 3 horas a temperatura ambiente (15% humedad final en las cápsulas).
3. Introducir cápsulas en crioviales en una densidad no mayor a 5 capsulas por criovial.
4. Introducir los crioviales rápidamente en nitrógeno líquido.
5. Retirar los crioviales del nitrógeno líquido y transferirlos rápidamente a agua a 38°C para su calentamiento al baño de María por 2 minutos.
6. Retirar las capsulas de los crioviales y transferirlas a M&S líquido 0.087M de sacarosa por 5 minutos para permitir la rehidratación.
7. Inocular las cápsulas en Postcultivo 1 por 5 días en cuarto de incubación cubriendo superficialmente las muestras con papel kraft para evitar la entrada directa de luz.

### **Día 10**

Transferir las cápsulas del postcultivo 1 al postcultivo 2, y dejar en condiciones regulares de propagación.

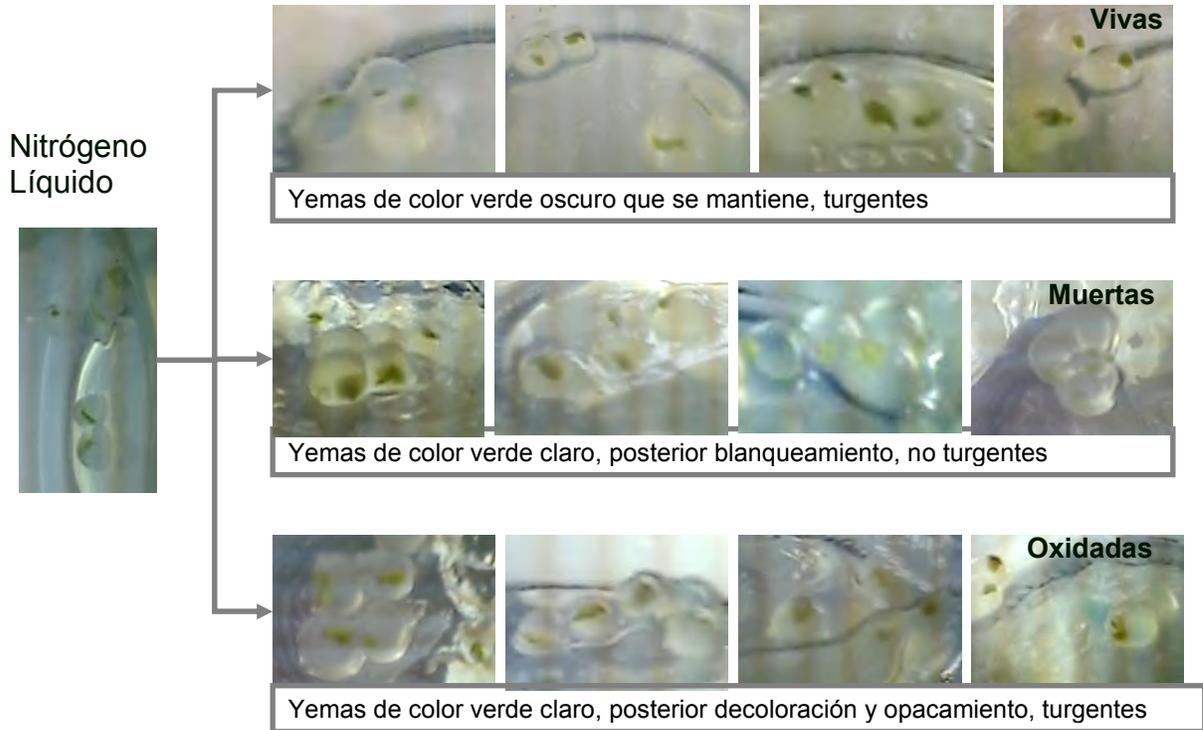
## ANEXO 2.

### Registro fotográfico con descriptores morfológicos de rebrote y futura regeneración en plántulas de yemas encapsuladas de *Physalis periviana* ecotipo Colombia

		
<p><b>Día 0.</b> Cápsulas inoculadas.</p>	<p><b>Día 2.</b> Yemas empiezan a emerger de las capsulas.</p>	<p><b>Día 5.</b> Primordios foliares y primeras hojas.</p>
		
<p><b>Día 7.</b> Yemas emergidas, dos hojas por yema y hojas más grandes.</p>	<p><b>Día 9.</b> Plántulas en crecimiento. Alargamiento del tallo. Enraizamiento. Primordios foliares</p>	<p><b>Día 12.</b> Plántulas en crecimiento. Alargamiento del tallo. Enraizamiento Hojas adultas y jóvenes</p>
		
<p><b>Día 15.</b> Plántulas en crecimiento. Alargamiento del tallo. Dos nudos Hojas adultas y jóvenes.</p>	<p><b>Día 18.</b> Plántulas en crecimiento. Alargamiento del tallo. Dos nudos Hojas adultas y jóvenes</p>	<p><b>Día 21.</b> Plántulas en crecimiento. Alargamiento del tallo. tres nudos Hojas adultas y jóvenes</p>

### ANEXO 3

Identificación del estado de las yemas en los días posteriores a la inmersión en nitrógeno líquido.



## ANEXO 4

### Análisis estadístico de las variables evaluadas

**1. Comparación entre los tratamientos de precultivo respecto al control, se realizó una comparación múltiple de Dunnett con los valores de porcentaje de rebrote de las yemas.**

Table Analyzed	% Rebrote Precultivos				
One-way analysis of variance					
P value	0.0230				
P value summary	*				
Are means signif. different? (P < 0.05)					
Number of groups	4				
F	5.595				
R squared	0.6772				
ANOVA Table	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	19.58	3	6.528		
Residual (within columns)	9.333	8	1.167		
Total	28.92	11			
Dunnett's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
Control vs Precultivo 1	2.667	3.024	Yes	*	0.1270 to 5.206
Control vs Precultivo 1 y 2	0.6667	0.7559	No	ns	-1.873 to 3.206
Control vs Precultivo 1, 2 y 3	3.000	3.402	Yes	*	0.4603 to 5.540



**3. Comparación entre tratamientos de medio suplementado con sacarosa líquida y el control por medio de una prueba de Kruskal-Wallis y una comparación múltiple de Dunnet.**

Table Analyzed	% Humedad 24h sacarosa		
Kruskal-Wallis test			
P value	0.0093		
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation		
P value summary	**		
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes		
Number of groups	3		
Kruskal-Wallis statistic	9.35		
Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	Significant? P < 0.05?	Summary
Control vs 0.75M	7.50	Yes	**
Control vs 1.0M	4.50	No	ns
0.75M vs 1.0M	-3.00	No	ns

**4. Comparación para la determinación de diferencias significativas entre yemas precultivadas-deshidratadas entre rehidratadas y no rehidratadas por medio de un análisis de varianza.**

Table Analyzed	rebrote rehidratación precultivos	
Column A	Con Rehidratación	
vs	vs	
Column B	Sin Rehidratación	
Unpaired t test		
P value	0.0132	
P value summary	*	
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes	
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	
t, df	t=4.24 df=4	
How big is the difference?		
Mean ± SEM of column A	53.3 ± 6.67 N=3	
Mean ± SEM of column B	13.3 ± 6.67 N=3	
Difference between means	40.0 ± 9.43	
95% confidence interval	13.8 to 66.2	
R squared	0.818	