

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Crioconservación *in-vitro* de yemas apicales de naranjilla (*Solanum quitoense* var. *quitoense*) por vitrificación

Pedro José González Portilla

Tesis de grado presentada como requisito para la obtención del título de Licenciado en
Biotecnología

Quito

Diciembre 2007

**Universidad San Francisco de Quito
Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

HOJA DE APROBACION DE TESIS

**Crioconservación in-vitro de yemas apicales de naranjilla (*Solanum
quitoense* var. *quitoense*) por vitrificación**

Pedro José González Portilla

Maria de Lourdes Torres, PhD.
Director de Tesis y
Miembro del Comité de Tesis

Venancio Arahana, PhD.
Miembro del Comité de Tesis

Hugo Valdevenito, PhD.
Miembro del Comité de Tesis

Estela De La Torre, PhD.
Decana del Colegio de
Ciencias Biológicas y Ambientales

Quito, Diciembre de 2007

DERECHOS DE AUTOR

© Derechos de autor
Pedro José González Portilla
2007

DEDICATORIA

Este trabajo de tesis lo dedico a mi familia,
ya que gracias a su esfuerzo y apoyo pude
llevar a cabo todos mis estudios de una manera
satisfactoria. Gracias por el cariño, la comprensión
y la oportunidad de estudiar que me brindaron.

AGRADECIMIENTOS

La vida esta llena de sorpresas, oportunidades y malos momentos también. Uno, como ser humano, debe saber discernir entre lo bueno y lo malo que se le presenta en la vida diaria; y, por ende, saber aprovechar lo mejor de cada situación. Hay momentos que son difíciles para un estudiante, otros que son muy gratos; sin embargo, el presentar un proyecto final es el momento más importante para un futuro profesional debido a que representa el primer paso para comenzar a crecer en el nuevo mundo laboral.

Quiero agradecer a mis Padres, quienes con gran esfuerzo y dedicación han luchado porque yo tenga la mejor educación posible. Sin su ayuda no hubiera logrado estar ahora en este punto de mi vida; además que han sido ustedes quienes me dieron esta gran oportunidad de educarme en la Universidad San Francisco de Quito. Gracias por siempre mantener la confianza en mí, y también por siempre mantener el núcleo familiar unido, lo cual representó un pilar fundamental para mi formación como profesional y como persona. Gracias a mi hermana, quien tuvo que aguantar momento de iras, de estrés y frustración; y a pesar de todo siempre estuvo a mi lado. Y gracias a todos los miembros de mi familia, quienes siempre han estado atentos de mi desarrollo como profesional, y más que nada, a mi desarrollo como persona.

Agradezco también a todos mis profesores, quienes con gran responsabilidad supieron impartir todos sus conocimientos, sin egoísmo alguno y siempre pensando en el bienestar de nosotros como estudiantes. Especialmente agradezco a María de Lourdes Torres, Coordinadora de Biotecnología, quien nos ha tratado a todos los estudiantes como a sus segundos hijos. Gracias por mantener siempre la puerta abierta y por depositar la confianza en mí para realizar mi proyecto final en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal

de la universidad. A Venancio Arahana, Co-director del Laboratorio, quien siempre estuvo atento y oportuno para cualquier duda que tuviera durante la realización de mi proyecto.

Un agradecimiento especial para Andrea Arias, quien siempre se mantuvo a mi lado desde el principio de mi proyecto final. Fue la persona que más me ayudó en los momentos complicados de la investigación, siempre estuvo para apoyarme, así como para hacer crítica constructiva para el desarrollo del proyecto. Gracias por soportar los peores cambios de carácter, por ayudarme a superar los malos momentos cuando los resultados no salían, y gracias por vivir conmigo una de las experiencias más fortificantes de mi vida en todo este período en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal.

Agradezco a todos mis compañeros y amigos del laboratorio y de la carrera de Biotecnología. El encontrarse y poder trabajar en un ambiente donde uno se siente a gusto y querido por los compañeros es, definitivamente, el pilar fundamental para poder desarrollar cualquier actividad adecuadamente. Gracias a todos por ayudarme, por apoyarme y más que nada por compartir conmigo todos los días de este largo recorrido que resultó realizar el proyecto final.

Finalmente, agradezco a todas las personas allegadas a mí. Amigos de siempre, quienes desde pequeños hemos compartido tantas historias, y esta ha resultado ser una más que hemos pasado con alegría y con eficiencia. Quiero hacer una mención a Daisy, parte del personal del laboratorio, quien hace posible que tengamos todos los materiales y equipos listos para el uso diario; y quine aguanta cada necesidad o capricho que tengamos al momento de preparar los experimentos.

RESUMEN

En este estudio se crioconservaron yemas apicales de naranjilla, *Solanum quitoense* var. *quitoense*, por medio de vitrificación. Los ápices (1 – 3 mm.), extraídos de plántulas cultivadas in-vitro por 5 semanas, se sembraron en diferentes medios de pre-cultivo (MS con 0.4M, 0.5M, 0.6M y 0.7M sacarosa) por 7 días bajo 16/8 horas de fotoperiodo a 23°C. Al iniciar la vitrificación, las yemas se trataron con una solución 2M Glicerol + 0.4M sacarosa a 26°C por 25 minutos, para evitar estrés osmótico. Luego, éstas fueron deshidratadas con la solución PVS2, probándose dos temperaturas de incubación: 4°C y 26°C por 60 minutos. A continuación, las yemas se introdujeron en nitrógeno líquido. A los 10 días fueron descongeladas y sembradas en un medio de post-cultivo (MS con BAP 0.1 mgL⁻¹, IBA 0.05 mgL⁻¹ y GA3 0.1 mgL⁻¹). El mejor tratamiento fue con pre-cultivo en MS 0.5M sacarosa y con incubación a 4°C por 60 minutos para vitrificar. Las yemas sobrevivientes, brotaron en un medio MS basal, a los 15 días del descongelamiento y la recuperación osciló entre 50% y 95%. Las plantas regeneradas presentaron apariencia normal después de subcultivadas. Estas plantas vivas, fueron aclimatadas hasta la etapa de invernadero. Este estudio representa un protocolo base para la crioconservación de yemas apicales de naranjilla por medio de vitrificación, lo que abre posibilidades para la conservación ex situ de esta especie.

ABSTRACT

In vitro-grown shoot tips of naranjilla (*Solanum quitoense* var. *quitoense*) were cryopreserved by vitrification. Shoot tips (1 - 3 mm) from 5 week-old *in vitro*-grown plantlets were excised and pre-cultured on different culture mediums (MS + 0.4M, 0.5M, 0.6M and 0.7M of sucrose) for 7 days under a 16/8 hour photoperiod at 23 °C. These explants were treated in a 2 mL cryo-tube with a solution of 2M glycerol and 0.4M sucrose at 26°C for 25 minutes and where then dehydrated with 1 mL of pre-cooled PVS 2 solution at 4°C and 26°C for 60 minutes. Treated shoot tips were kept in liquid nitrogen for 10 days. Post-thaw culture of vitrified shoot tips was carried on a MS medium with BAP 0.1 mgL⁻¹, IBA 0.05 mgL⁻¹ and GA3 0.1 mgL⁻¹. The best treatment was MS + 0.5M sucrose as the pre-culture medium, and where the samples were treated with PVS 2 at 4°C for 60 minutes. Cryopreserved shoot tips, resumed growth 15 days after thawing. The recovery percentages of the thawed shoot tips were between 50% and 95%. The developed plantlets presented a normal physiology; and were acclimatized up to a greenhouse phase. This study has established an effective protocol for the cryopreservation of naranjilla shoot tips by vitrification.

TABLA DE CONTENIDO

<i>DERECHOS DE AUTOR</i>	<i>i</i>
<i>DEDICATORIA</i>	<i>iv</i>
<i>AGRADECIMIENTOS</i>	<i>v</i>
<i>RESUMEN</i>	<i>vii</i>
<i>ABSTRACT</i>	<i>viii</i>
1. Introducción	1
1.1. Diversidad Genética.....	1
1.2. Conservación de Germoplasma <i>in vitro</i>	2
1.2.1. Bancos de semillas.....	3
1.2.2. Cultivo <i>in vitro</i> de tejidos.....	4
1.2.3. Crioconservación.....	4
1.2.3.1. Desecación.....	6
1.2.3.2. Precultivo.....	7
1.2.3.3. Desecación - Precultivo.....	7
1.2.3.4. Gota Congelada.....	8
1.2.3.5. Encapsulación - Deshidratación.....	8
1.2.3.6. Encapsulación – Vitricación.....	9
1.2.3.7. Vitricación.....	9
1.3. La Naranja.....	13
1.3.1. Generalidades.....	13
1.3.2. Cultivo de Naranja a nivel mundial.....	15
1.3.3. Cultivo de naranja en el Ecuador.....	16
2. Objetivo General	21
3. Objetivos Específicos	21
4. Área de Estudio	21
5. Justificación	22
6. Materiales	23
6.1. Material Vegetal.....	23
6.1.1. Extracción de semillas.....	23
6.1.2. Esterilización de semillas.....	23
6.1.3. Siembra <i>in vitro</i> de semillas de naranja.....	23
6.2. Extracción de yemas apicales de naranja.....	23
6.3. Pre-tratamiento de yemas apicales de naranja.....	24
6.4. Vitricación de yemas apicales de naranja.....	24
6.5. Congelamiento de explantes.....	24
6.6. Descongelamiento de explantes.....	24
6.7. Post-tratamiento de yemas apicales de naranja.....	25
6.8. Subcultivo de explantes.....	25
6.9. Aclimatación.....	25
7. Metodología	25
7.1. Recolección de Material Vegetal.....	26
7.2. Extracción de semillas.....	26
7.3. Esterilización de semillas.....	27
7.4. Siembra <i>in vitro</i> de semillas de naranja.....	27
7.5. Extracción de yemas apicales de naranja.....	28
7.6. Pre-tratamiento de yemas apicales.....	28

7.7. Vitrificación y congelamiento de explantes	29
7.8. Descongelamiento de explantes	31
7.9. Post-tratamiento de explantes.....	32
7.10. Subcultivo de las plantas recuperadas	33
7.11. Enraizamiento y aclimatación de plantas	34
8. Resultados.....	36
8.1. Pre-tratamiento.....	37
8.2. Vitrificación	39
8.3. Post-tratamiento	40
8.4. Brotación.....	41
8.5. Aclimatación	41
9. Discusión.....	44
9.1. Conservación de diversidad genética	44
9.2. Pre-Tratamiento	46
9.3. Vitrificación	48
9.4. Post-Tratamiento y Aclimatación	50
10. Conclusiones	52
11. Recomendaciones	54
12. Bibliografía	55
13. Tablas.....	58
14. Figuras	61
15. Anexos.....	75

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

13. Tablas	58
Tabla 1. Resumen de variantes utilizadas en el Protocolo de Crioconservación de naranjilla	58
Tabla 2. Metodología de aclimatación de plantas regeneradas después de la crioconservación.....	59
Tabla 3. Resultados de los primeros 5 procesos de aclimatación a bolsas de siembra.	60
14. Figuras	61
Figura 1. Resultados generales del proyecto en base a la supervivencia de los explantes después de cada proceso de crioconservación.	61
Figura 2. Resultados de supervivencia para el primer experimento.	62
Figura 3. Resultados de supervivencia de explantes del segundo experimento.	63
Figura 4. Resultados de supervivencia para el experimento 3.	64
Figura 5. Resultados de supervivencia del experimento 8.....	65
Figura 6. Resultados de supervivencia del experimento 9.....	66
Figura 7. Resultados experimento 10 del proyecto.....	67
Figura 8. Resumen de resultados promedio para los 4 medios de pre-tratamiento exitosos en el proyecto.	68
Figura 9. Tamaño de plantas para comenzar aclimatación	69
Figura 10. Tamaño de plantas listas para traspaso a bolsas	70
Figura 11. Plantas pequeñas aclimatadas exitosamente.....	71
Figura 12. Grupo de plantas en proceso de aclimatación en cuarto de cultivo	72
Figura 13. Planta de dos semanas de aclimatación	73
Figura 14. Planta de tres semanas de aclimatación.....	73
Figura 15. Plantas muerta tras el proceso de aclimatación	74

1. Introducción

La agricultura y la ciencia moderna son cada vez más dependientes la una de la otra. Las técnicas utilizadas para el desarrollo, producción y manejo de las miles de especies cultivadas en todo el planeta, son cada vez más precisas y más efectivas, sea cual sea el fin del cultivo. Muchas de estas técnicas son parte de la biotecnología moderna, la cual ha abierto nuevos campos, tanto de investigación como de producción y comercialización. Un campo que ha tenido alto resurgimiento en los últimos años ha sido el de la conservación de germoplasma a nivel de todas las especies, y esto se ha relacionado directamente con la diversidad genética de todas las especies vegetales que se cultivan en el mundo.

1.1. Diversidad Genética

La conservación de los recursos genéticos es un tema de enorme importancia en todos los foros de discusión ambiental del mundo (Takagi et al., 1997). La erosión genética en la mayoría de cultivos importantes, se ha transformado en una preocupación tanto para los agricultores como para los investigadores de diferentes áreas y en diferentes regiones del planeta; siendo la recuperación del germoplasma lo primordial debido a su importancia en el mejoramiento de las especies económicamente utilizables para los pueblos (Lambardi et al, 2000). Debido a esto, se ha visto un rápido incremento en el número de accesiones de germoplasma que se está conservando en los bancos de genes nacionales e internacionales de cada región. El número sube cada vez más, y el principal reto entonces, es desarrollar los protocolos más eficientes posibles para conservación a largo plazo (Engelmann, 1997). Cabe recalcar que la conservación vegetal a largo plazo, no solo está siendo desarrollada en el ámbito agrícola, sino también en el médico. Por cientos de años los conocimientos científicos para la medicina, han tenido como base el conocimiento ancestral de la

medicina natural. Las plantas, de las cuales se sacan los principios activos de algunos medicamentos, están siendo conservadas en bancos de genes; presentando los mismos problemas de conservación a largo plazo que en la rama agrícola (Dixit et al, 2004).

La conservación del ambiente es un tema de discusión que ha tomado fuerza en las dos últimas décadas, destacándose los esfuerzos en situaciones como el cuidado de bosques primarios, de la amazonía, de especies en peligro de extinción y de sistemas ecológicos por ejemplo. En el campo de la agricultura, los esfuerzos por conservar fueron escasos; más que nada porque los agricultores tradicionales o las grandes transnacionales, se han enfocado en el mejoramiento de las especies agrícolas ya explotadas, y han dejado de lado las variedades silvestres. Esto ha traído como resultado la erosión genética de una inmensa cantidad de especies de vegetales; que ahora se las explora para el fitomejoramiento. Los investigadores buscan y tratan de conseguir las variedades tradicionales que han existido por años de manera silvestre y que se han perdido por la poca importancia económica que se les ha dado. De hecho se estima que en la actualidad, alrededor de 100.000 plantas están en peligro de extinción en su hábitat silvestre; lo cual representa casi un tercio de las especies de plantas a nivel mundial (Panis & Lambardi, 2005).

1.2. Conservación de Germoplasma *in vitro*

La conservación de germoplasma comprende varias estrategias importantes en la toma de decisiones sobre los protocolos más adecuados a utilizarse, dependiendo tanto de la finalidad como de la experiencia que se tenga con la especie utilizada. Es decir, es muy diferente una conservación enfocada para un banco de germoplasma a una enfocada al mejoramiento de una variedad mediante el cruce con la especie que se preserva. Sea cual sea el proceso, es importante definir aspectos básicos de las plantas: como el ciclo de vida

natural, tamaños de los individuos y modo de manejo del cultivo en un área de conservación (Scocchi & Rey, 2004). La conservación de las plantas en su lugar de origen o hábitat naturales, conocido como conservación *in situ*, requiere del manejo de parques naturales, grandes organizaciones y grandes sumas de dinero. Este tipo de conservación puede dar frutos en los casos de la conservación de ecosistemas enteros o de lugares que representan reservas de agrobiodiversidad para una región o un país; sin embargo, en el caso de la conservación centrada a una especie en sí, es mucho más complicado que se pueda mantener o rescatar esta especie en su lugar de origen. Debido a esto existen otros métodos de conservación conocidos como los métodos *ex situ*; y que representan una opción en el manejo controlado de una o muchas especies en lugares más pequeños y mejor optimizados; como son: bancos de semillas, bancos de cultivo *in vitro*, colecciones en jardines botánicos o viveros, entre los principales (Scocchi & Rey, 2004). Ya que la conservación *ex situ* necesita de tratamientos dirigidos para guardar el germoplasma, se lo relaciona también con la conservación *in vitro*; la cual se basa en trabajos en laboratorios y con sistemas controlados de asepsia.

1.2.1. Bancos de semillas

El banco de semillas es uno de los métodos más utilizados y más óptimos para la conservación de germoplasma. Una de las principales ventajas es que permite almacenar grandes cantidades de material, de una manera económica; incrementando así la variabilidad genética guardada. El International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI) recomienda la desecación de las semillas entre un 3-7% de humedad y su almacenamiento a temperaturas de -18°C . Algo que se debe tomar en cuenta en este método, es que no todas las semillas se pueden almacenar, debido a la pérdida de viabilidad de algunas de ellas por la desecación; estas semillas son conocidas como “recalcitrantes”. Las semillas de especies tropicales y subtropicales se encuentran mayormente en este grupo de semillas

problemáticas; como muchos frutales, palmeras o el cacao (Scocchi & Rey, 2004). Además existen especies como la caña de azúcar o la papa, las cuales no pueden ser conservadas por este método porque su propagación es vegetativa. Por último, las semillas que si resultan viables después de la desecación y se las puede almacenar por este método, son conocidas como “ortodoxas”; y entre esas están el arroz, tomate y tabaco (Scocchi & Rey, 2004).

1.2.2. Cultivo *in vitro* de tejidos

El cultivo *in vitro* de tejidos ha dado paso a un nuevo grupo de tecnologías para conservar plantas; esta técnica parte del principio de la totipotencialidad de las células de las plantas (Scocchi & Rey, 2004). Este método es el óptimo para la conservación de las plantas que tienen semillas recalcitrantes y por lo tanto deben ser propagadas vegetativamente. Las investigaciones de este tipo se realizan desde hace tres décadas en centros especializados como el CIAT y el CIP en Sudamérica; y básicamente, lo que se tiene ahora son genotipos conservados manteniendo plantas en cultivo *in vitro*.

Sin embargo, este método también tiene ciertos contratiempos, y uno de esos es lo trabajoso que puede resultar mantener muchos individuos en permanentes sub-cultivos en los laboratorios. Es por esto que se trabaja con ciertos protocolos de retardamiento del crecimiento de las plantas en el cultivo *in vitro*; lo cual se basa en rebajar las condiciones óptimas del un medio de cultivo y condiciones físicas a un nivel mínimo para el desarrollo lento, más controlado de las plantas. (Scocchi & Rey, 2004).

1.2.3. Crioconservación

La crioconservación es la alternativa con mejor perspectiva para la conservación de germoplasma por largos períodos. Esta se basa en el congelamiento a temperaturas ultra bajas de nitrógeno líquido (-196°C), donde los procesos bioquímicos y físicos de las plantas se detienen. Tomando en cuenta este principio, los beneficios de esta técnica sobre

las técnicas tradicionales son varios, siendo: la conservación por un período indefinido de tiempo, la manipulación fácil y rápida de las muestras y los bajos costos de mantenimiento, las principales ventajas para fomentar esta técnica (Scocchi & Rey, 2004; Wang et al., 2005).

La crioconservación de tejidos biológicos puede ser exitosa solo si se logra evadir la formación de cristales intracelulares en el proceso de congelamiento. Esta es la clave de toda técnica de congelamiento de células vegetales, debido a que los daños causados por estos cristales son irreversibles al afectar directamente a la semi-permeabilidad de las membranas celulares (Panis & Lambardi, 2005).

En la naturaleza, existen casos de plantas que viven en lugares que alcanzan temperaturas sumamente bajas en ciertas épocas del año. Debido a esto, las mismas plantas han aprendido a combatir el peligro de la formación de cristales por la congelación del agua que poseen en sus propios tejidos. Así entonces, estas plantas evitan la formación de cristales intracelulares mediante la síntesis de ciertas azúcares, prolinas y proteínas (Panis & Lambardi, 2005). Dado que estos casos son comunes en algunas plantas que se desarrollan en condiciones extremas, se han tratado de reproducir los mismos eventos en laboratorios, con condiciones más controladas y a la vez con temperaturas más extremas como la del nitrógeno líquido.

La aplicación de estos métodos biotecnológicos para la conservación, no ha sido totalmente exitosa en todas las especies. Por esto es que las investigaciones en la actualidad están encaminadas a desarrollar tecnologías precisas con el fin de abarcar el mayor espectro de especies vegetales; ya sea que tengan o no una importancia económica actual para los agricultores de las diferentes regiones.

De las plantas que se investigan actualmente, las que tal vez han dado más dificultad para la aclimatación a los procesos de crioconservación son las plantas tropicales

y subtropicales. (Wang et al., 2005). Esto es muy lógico desde el punto de vista de la genética, ya que estas plantas son las que menos exposición al frío tienen en sus condiciones normales de reproducción; lo cual podría implicar que no dispongan de los genes necesarios para adaptarse a bajas temperaturas. Por evolución, estas plantas pueden vivir en condiciones extremas de humedad por ejemplo, más no necesariamente de frío; es por esto que los esfuerzos en la conservación de estas plantas está tomando importancia en varios centros de investigación (Panis & Lambardi, 2005).

En teoría, la crioconservación representa por ahora la única técnica realmente efectiva para la conservación de plantas a largo plazo; ya que según la literatura, esta técnica ofrece la posibilidad de mantener el material vegetal almacenado mucho tiempo sin correr riesgos de variación somaclonal y cambios fisiológicos en las plantas (Hirai and Sakai, 1999; Sakai, 2000; Matsumoto et al., 2001). Gracias a estas ventajas, no compartidas por otras técnicas, se han desarrollado métodos de crioconservación bastante efectivos y con un amplio espectro de aplicación. Estos métodos varían entre si, debido a factores como: especie con que se trabaja, disponibilidad de recursos, cantidad de individuos por evento y más que nada, por la tasa de eficiencia que arroja cada uno de estos diferentes métodos (Matsumoto et al., 1994; Takagi et al., 1997; Charoensub et al., 1999; Thinh et al., 1999; Sakai, 2000).

1.2.3.1. Desección

La base para todo proceso de crioconservación, es que el tejido que se vaya a utilizar sea deshidratado previamente de cualquier manera para que no se formen los cristales intracelulares que rompen las membranas y afectan a la integridad de las células (Wang et al., 2005). El proceso de desecación es un procedimiento simple que se lo puede realizar en cualquier cámara de flujo. Está diseñado para emplearse en semillas, las cuales de por si tienen una resistencia natural al flujo de aire por el ectodermo que presentan. El

método en si, consta de someter a la semilla a una corriente de aire, como en un flujo laminar, o a una cámara hermética que contenga sílica gel. Una vez que la semillas alcance los niveles óptimos de agua, alrededor de 3 a 7% (IPGRI), se lo somete directamente al nitrógeno líquido (Scocchi & Rey, 2004).

1.2.3.2. *Precultivo*

Esta técnica se caracteriza por el uso de sustancias conocidas como crioprotectores. Los ejemplos más utilizados son: la sacarosa para meristemas de *Musa spp.*, el PEG, DMSO y glicerol para embriones cigóticos, anteras, meristemas y semillas de algunas especies como *Oriza spp.* y algunas frutas tropicales (Scocchi & Rey, 2004; Engelmann, 1991). Es importante diferenciar entre dos tipos de crioprotectores: los penetrantes en la célula y los no penetrantes. El uso de cada uno de estos depende estrictamente de la metodología de crioconservación y del material vegetal que se esté utilizando (Panis & Lambardi, 2005). Por ejemplo, el PEG constituye un criopreservante no penetrante por su alto peso molecular; mientras que el DMSO o el Glicerol son criopreservantes penetrantes, aunque también son tóxicos para la célula.

1.2.3.3. *Desecación - Precultivo*

Esta metodología es la unión de las dos técnicas descritas anteriormente. Esta técnica se aplica principalmente en frutos tropicales de muy difícil propagación como el coco. Consiste en utilizar crioprotectores, como algunos azúcares, para un pre-tratamiento de las muestras; luego se las deseca a un porcentaje medio y se las somete a un enfriamiento rápido y directo en nitrógeno líquido. La clave de este proceso está en la duración del mismo. En algunos casos el proceso puede durar pocas horas; sin embargo, en el caso de *Elaeis guineensis*, el proceso dura hasta 7 días (Panis & Lambardi, 2005; Scocchi & Rey, 2004).

1.2.3.4. Gota Congelada

Este método ha sido probado en muchos cultivos esperando que sea la solución para la conservación de los mismos; sin embargo, los resultados han sido bastante esquivos a lo esperado. Una de las pocas especies que ha tenido un verdadero éxito es la papa, *Solanum tuberosum*, con la cual se han estandarizado algunos protocolos (Schäfer-Menuhr et al, 1996). La base del proceso está en un tratamiento de precultivo con DMSO de 2 a 3 horas en un medio líquido; luego se forma una gota que se suspende sobre papel aluminio, la cual por último se la sumerge en nitrógeno líquido (Schäfer-Menuhr et al, 1997).

Hasta el momento se conoce que los resultados exitosos que se han obtenido son de un 50% de recuperación de los explantes. Según la literatura se han probado alrededor de 140 variedades de *Solanum tuberosum*, con las cuales se han obtenido tales porcentajes (Wagner et al, 2003)

1.2.3.5. Encapsulación - Deshidratación

Esta técnica es una de las de mayor aplicación para protocolos de crioconservación, básicamente por su facilidad y la seguridad de protección al explante; aunque para muchas especies no ha dado resultados (Panis & Lambardi, 2005). La técnica se compone de dos pasos fundamentales; primero, el explante a ser tratado se coloca en una matriz base de alginato de sodio. Esta matriz es polimerizada con cloruro de calcio, formando así la cápsula de gel alrededor del explante y el crioprotector, generalmente sacarosa, utilizada en altas concentraciones (0.5M a 1.5M). Posteriormente, se somete al explante encapsulado a la deshidratación, la cual se realiza con la exposición del explante a una corriente de aire controlada en un flujo laminar o con la desecación en una caja hermética con sílica gel (Scocchi & Rey, 2004). Por último, se sumerge la cápsula en el nitrógeno líquido; en este caso puede ser un descenso lento de temperatura o una inmersión rápida como en las otras técnicas descritas (Hirai & Sakai, 1999).

En casos donde los explantes provienen de plantas adaptadas naturalmente al frío, se ha visto que una exposición a bajas temperaturas previa al tratamiento de crioconservación ha incrementado los resultados de recuperación y supervivencia de los explantes encapsulados. Las investigaciones recomiendan que la exposición sea de varias semanas antes del inicio de la encapsulación (Scocchi & Rey, 2004).

1.2.3.6. Encapsulación – Vitricación

Este representa tal vez el método más utilizado en la crioconservación tradicional. El desarrollo de esta técnica se originó de pruebas con especies subtropicales, las cuales no respondían bien ni a la vitricación por si sola ni a la encapsulación – deshidratación. La vitricación es un proceso que se basa en la utilización de sustancias vitrificantes en un cóctel, el cual funciona como crioprotector y deshidratante. La solución más conocida es la PVS2 (Sakai et al, 1990). Los explantes son encapsulados como en la técnica descrita anteriormente, la variación es que no se someten a deshidratación sino a vitricación; luego de lo cual son sumergidos directamente en nitrógeno líquido.

Las ventajas en este caso se presentan en un 30% más de recuperación en comparación a la vitricación o a la encapsulación por si solas; básicamente, porque las cápsulas de alginato ayudan a que la toxicidad de las sustancias criopreservantes disminuya significativamente y, en su caso, estas sustancias incrementan ampliamente la protección a los explantes congelados (Scocchi & Rey, 2004).

1.2.3.7. Vitricación

Como ya se dijo, la vitricación es un proceso que implica una mezcla de soluciones de crioconservación, de las cuales la mayoría penetran en la célula; sin embargo, siempre se tiene en el cóctel, soluciones que no penetren la célula. De manera general, estas mezclas de soluciones proporcionan a la célula una protección total, tanto dentro de ella como por fuera (Panis & Lambardi, 2005). La técnica en si, se base en una

serie de pre-tratamientos a los cuales son sometidos los explantes que se quiere conservar. Existen diferentes soluciones de vitrificación, pero la PVS2 es la más utilizada a nivel mundial; esta contiene: 30% Glicerol, 15% etilenglicol, 15% DMSO y 0.4M sacarosa (Sakai et al, 1990). Esta solución representa la base de la gran mayoría de experimentos de vitrificación, y a la cual se la hacen algunos cambios según las necesidades específicas de las variedades con las que se trabaje. Luego de estos pre-tratamientos con soluciones vitrificantes, mantenidas por lo general a 0°C para evitar toxicidad (Scocchi & Rey, 2004), las muestras se sumergen directamente en nitrógeno líquido o a veces se puede realizar un descenso lento y controlado de la temperatura.

Hay apreciaciones importantes con este método, pero la más importante tal vez es que estas soluciones vitrificantes son tóxicas para las plantas y, debido a esto, el tiempo de exposición a ellas debe ser controlado dependiendo del tamaño y tipo de explante con el que se esté trabajando (Sakar & Naik, 1998).

En la vitrificación, los pasos más importantes del proceso son seis: precultivo del material seleccionado, deshidratación, habituación al frío, almacenamiento en nitrógeno líquido, descongelamiento y rehidratación, y pruebas de supervivencia y recuperación de plantas. Para el primer paso de precultivo de material, lo más importante es enfocarse en que parte de la planta es la que se desea crioconservar. Ya que el objetivo final de todo el proceso es obtener plantas completas, se debe tomar en cuenta el tipo de tejido con el que se puede completar este objetivo con mayor eficacia (Scocchi & Rey, 2004). Además se debe definir la finalidad del proceso de crioconservación, es decir, si se quiere formar un banco de germoplasma, tal vez el conservar semillas sería lo mejor, pero si se busca conservar una variedad específica para un experimento, se debería tratar con meristemas, por ejemplo. Una vez seleccionado el tipo de material a crioconservar, se debe definir el protocolo que se va a utilizar para comenzar el precultivo de los explantes con los

tratamientos adecuados (Engelmann, 1997). Como segundo paso, la deshidratación, representa como ya se ha dicho el paso más importante para una vitrificación exitosa. La importancia radica en que, sea cual fuere el explante que se eligió para vitrificar, se lo debe deshidratar al máximo posible para que toda el agua libre dentro de la célula desaparezca o sea reemplazada por sustancias que no vayan a formar cristales intracelulares, también conocidas como criopreservantes penetrantes (Wang et al., 2005). El tercer paso parecería ser el más crítico, sin embargo, con los avances en la investigación y con todos los protocolos que se han desarrollado, la habituación al frío solo representa un paso de transición. La vitrificación es una buena técnica ya que no se necesita de aparatos sofisticados que puedan controlar el descenso de la temperatura de forma definida. En la vitrificación, el paso de congelamiento se trata de una sola sumergida rápida, de los explantes con medio de cultivo, en el nitrógeno líquido; lo cual impulsa a que la célula forme una masa fina de sustancias congeladas en su interior, y no los letales cristales (Fahy et al., 1984; Hirai and Sakai, 1999; Lambardi et al., 2000; Sakai, 2000; Touchell et al., 2002). El cuarto paso, que comprende el almacenamiento en el nitrógeno líquido, simplemente se trata del uso de tanques de nitrógeno en los cuales se puedan guardar los explantes. En el caso de la vitrificación, se puede utilizar tanques de 20, 50 o más kilogramos de nitrógeno líquido de capacidad; siempre y cuando el recipiente tenga siempre la cantidad mínima requerida de nitrógeno líquido. Los explantes se guardan en criotubos, junto con las soluciones criopreservantes (PVS2) y se colocan directamente los criotubos en las canastillas del tanque; se introducen las canastillas al nitrógeno líquido y se cierre el tanque. Los explantes permanecerán ahí el tiempo necesario para cada experimento, siendo de unas horas a varios años los rangos que se manejan (Wagner et al., 2003). En el quinto paso, el descongelamiento y la rehidratación de los explantes, la metodología que se use influye mucho en el desarrollo de la investigación. Una vez que se

sacan los criotubos del tanque de nitrógeno líquido, se procede inmediatamente a llevar los mismos a baño maría a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (Wang et al., 2005; Hirai and Sakai, 1999; Sakar & Naik, 1998). Este tipo de descongelamiento rápido, tiene la misma finalidad que el enfriamiento rápido; no se quiere la formación del más mínimo cristal que pueda dañar las paredes de las células (Wang et al., 2005). Tras el descongelamiento, se procede a sembrar el tipo de explante que sea en diferentes medios de post-cultivo, los cuales están preparados según los requerimientos de la técnica utilizada y del objetivo del proyecto. Sin embargo, la gran mayoría de medios contienen sales basales MS, diferentes mezclas de hormonas y otras soluciones que ayudan a la rehidratación y cuidado de los explantes que fueron estresados por el frío (Engelmann, 1991). Lo más común que se utiliza son: medios semi-sólidos MS; hormonas vegetales como ácido giberélico, IBA, BAP; y en algunos casos se usan azúcares como fuentes de carbono para las plantas (Sakar & Naik, 1998; Lambardi et al., 2000; Wang et al., 2005; Hirai and Sakai, 1999). Algo que es sumamente importante en la vitrificación, es que tras descongelar se debe retirar toda la solución criopreservante y para esto se debe hacer lavados con medios líquidos altos en sacarosa a los explantes; esto básicamente por la toxicidad que representa la PVS2 para cualquier explante a temperatura ambiente (Takagi et al., 1997). Una vez que los explantes se siembran en los medios respectivos, comienza el proceso de recuperación de las plantas, el cual es largo en algunas especies; primero se medirá supervivencia de los explantes y después se tomarán datos de crecimiento hasta el punto en que se tengan plantas que puedan vivir por si solas en sembríos normales (Engelmann, 1997; Sakar & Naik, 1998). Esto comprende el último paso de todo el proceso de crioconservación. Entre el período de supervivencia hasta la aclimatación y siembra de las plantas en invernaderos; se toman un serie de datos correspondientes a los intereses de las investigaciones y de las futuras aplicaciones de las técnicas de crioconservación utilizadas.

La vitrificación es el método más utilizado en la actualidad para la crioconservación de explantes meristemáticos (Matsumoto et al., 1994; Takagi et al., 1997; Hirai and Sakai, 1999; Lambardi et al., 2000; Tsukazaki et al., 2000); es la técnica que más futuro tiene debido a la facilidad de manejo y a los bajos costos que esta representa para un laboratorio en relación a otras técnicas. En relación a las desventajas, la principal es la toxicidad que causa a los explantes por a la exposición a sustancias como el DMSO, glicerol, etilenglicol, entre otras (Dixit et al, 2004). Sin embargo, se ha logrado la solución a este problema en muchas especies, especialmente en las tropicales, para las cuales las otras técnicas son demasiado agresivas. En la vitrificación se requiere un control bastante cuidadoso en los tiempos de exposición de los explantes a las soluciones, así como en el procedimiento de descongelamiento para que los lavados a los mismos sean eficientes y se elimine algún efecto de intoxicación por residuos de la mezcla criopreservante (Dixit et al, 2004).

1.3. La Naranjilla

1.3.1. Generalidades

La familia Solanaceae es una de las más importantes a nivel mundial debido a todos los beneficios que brinda a la humanidad (Heiser, 1993). Esta familia comprende una gran cantidad de especies que forman parte de la dieta diaria de la mayoría de habitantes de América del Sur. Entre los productos más comunes de estas especies se encuentran la papa, el tomate, el pimiento; y en lo que respecta a frutas, el pepino dulce, el tomate de árbol y la naranjilla, los cuales son originarios de la región tropical del continente (Heiser, 1993).

La naranjilla es una fruta que ha sido cultivada en las vertientes de la Cordillera Occidental y Oriental de los Andes de Ecuador, Colombia y Perú (Vélez, 1988). No se conoce exactamente desde cuando se ha cultivado esta fruta, pero existen datos desde

mediados del siglo XVII en donde los registros muestran que ya se consumía esta fruta, que algunos escritores la llamaban “néctar de los dioses” o “la fruta dorada de los Andes” (National Academy, 1999). Sin embargo, a pesar de ser una fruta de condiciones organolépticas muy llamativas, no se ha desarrollado o explotado de manera que alcance mercados extranjeros y pueda competir como un producto de exportación (Heiser, 1993).

La naranjilla es un arbusto perenne, de cerca de 2 metros de altura; las hojas son de color verde oscuro y con filos lila, con muchas ramificaciones o venas interiores (Heiser, 1993). Los frutos de la naranjilla se destacan por su color amarillo fuerte o anaranjado; por lo cual el nombre dado por los españoles de “naranjilla” (Whalen, Costish & Heiser, 1981). Las naranjillas son frutos redondos y con muchas vellosidades en su cáscara; poseen una pulpa de color verde durante todo su período de madurez, el diámetro de los frutos en el estado de cultivo es de 5 cm. aproximadamente (Whalen, Costish & Heiser, 1981). La zona de cultivo de la naranjilla varía entre los 1000 y los 2200 metros de altura sobre el nivel del mar; siendo estas zonas preferentemente cálidas de temperaturas de 18°C a 20°C, con humedad moderada y días cortos (Soria, 1997; Heiser & Anderson, 1999; Meneses, 1988). La fruta como tal, se utiliza en su gran mayoría para la fabricación de jugos, y el sabor exótico es algo inconfundible y muy peculiar de esta especie; además de ser rica en vitamina A y C, hierro y niacina (Salick, 1989; Romero-Castañeda, 1961).

La naranjilla es una planta con poca variabilidad intraespecífica en sus principales características, tanto organolépticas, morfológicas y fisiológicas. Se conocen dos variedades principales: la *Solanum quitoense* var. *quitoense* y la *Solanum quitoense* var. *septentrionale*, que se diferencian porque la primera no tiene espinos en el tallo y la otra si los tiene (Soria, 1997; Castañeda, 1992). La primera variedad ha sido cultivada en el Ecuador y poco en Colombia; mientras que la otra se ha cultivado en Colombia y otros países como Venezuela, Costa Rica, Guatemala y Perú (Heiser, 1993).

Para ser una planta domesticada, es bastante llamativo el hecho de la poca variabilidad genética; las plantas que se cultivan en el Ecuador son relativamente indefensas en los cultivos a los ataques de nemátodos, mientras que en otros sectores los frutos son demasiado pequeños y muy espinosos para su comercialización (Schultes & Romero-Castañeda, 1962).

1.3.2. Cultivo de Naranjilla a nivel mundial

Los principales cultivos, a parte del Ecuador, se encuentran en sus países vecinos y en menos cantidad en países de la misma región. Colombia es el segundo productor en importancia de la naranjilla, la cual se la conoce como “lulo” en aquel país; y la variedad que se cultiva mayormente es la *Solanum quitoense* var. *septentrionale* (Heiser & Anderson, 1999). En Colombia, esta fruta tiene importancia económica a nivel del consumo interno en Antioquia, Cundinamarca y en el Valle del Cauca; en donde el potencial básicamente se concentra en la elaboración de mermeladas y jugos (Meneses, 1988). El manejo de este cultivo se ha basado muy poco en el mejoramiento hasta la fecha; algunos intentos de cruces exitosos se han realizado, pero los resultados aun no han solucionado los problemas del cultivo para optimizar la producción. Además el gran problema de la naranjilla a nivel general de cultivo, es el ataque de plagas que no se han podido controlar (Castañeda, 1992). En Colombia, los esfuerzos por la exportación del producto han brindado resultados positivos parciales; así se ha promocionado el “lulo” a Europa y Estados Unidos. Sin embargo, la producción nunca logró abastecer la demanda exterior, lo cual derivó en la pérdida de las vías de comercialización que se habían logrado en un principio. Vale destacar, que la Federación de Cafeteros es la que ha hecho los mayores esfuerzos para la exportación, sin resultados contundentes (Castañeda, 1992).

Los adelantos en el mejoramiento de la fruta se han realizado a paso lento; pues la problemática natural del cultivo con plagas y enfermedades, además de la dificultad de

encontrar híbridos estables para la exportación, ha llevado a que los agricultores pierdan el interés en la producción masiva de este producto (Vélez, 1988; Heiser & Anderson, 1999).

1.3.3. Cultivo de naranjilla en el Ecuador

En el Ecuador se ha cultivado la naranjilla desde épocas coloniales; sin embargo, la naranjilla tradicional ya no se encuentra en el mercado actualmente. La poca variabilidad intraespecífica llevó, hace varios años, a que los agricultores hagan cruces de la naranjilla tradicional (*S. quitoense*) y la naranjilla jíbara que se encuentra en el Oriente del país (*S. sessiliflorum*) (Soria, 1989). Los resultados de este cruce, hace más de 20 años, dio la “naranjilla de jugo” que se comercializa hoy en los mercados ecuatorianos, con ciertas modificaciones. El cruce de aquel tiempo, salió desde la provincia de Pastaza y se difundió rápidamente por la escasez del cultivo en aquella época, esto hizo que a través del tiempo, se cultive esta nueva variedad. Ésta, que resultó ser un verdadero híbrido interespecífico ya que no se reproducía por semillas, presentó a la vez algunas características favorables para su cultivo como: 1) adaptabilidad a condiciones de zonas más bajas del cultivo, ampliando la zona de producción, 2) presentó cierta resistencia a las plagas comunes del cultivo, y 3) el fruto resultó más duro, aunque menos jugoso que la naranjilla tradicional, lo cual ayudó a la vigencia del producto en buenas condiciones después de su transporte a los mercados de las ciudades (Soria, 1989).

Con el paso del tiempo, los cultivos de naranjilla fueron decayendo por el agotamiento de áreas de cultivo idóneas, debido a que estos terrenos fueron infestados por nemátodos. Sin embargo, la investigación por parte de ciertos agricultores, dio frutos tomando como base al híbrido “naranjilla de jugo” y mejorando tanto la producción como el cultivo en sí. Por ejemplo, cuando se utilizó 2-4D para eliminar maleza en un cultivo de Mera, se obtuvieron accidentalmente frutas de mayor tamaño, por lo cual se optó por esta

opción como estrategia de mejoramiento durante pocos años, hasta que se comprobó que los residuos de 2-4D en el fruto eran excesivos y perjudiciales para la salud (Soria, 1997).

Actualmente, más del 90% del producto que se comercializa en el país es el híbrido Puyo con los frutos agrandados por la acción del 2-4D. Sin embargo, esta hormona es perjudicial para la salud de los consumidores, y esta es la mayor razón por la cual no se ha podido iniciar un plan de exportación a Estados Unidos, ya que los residuos de la hormona exceden a lo permitido por la FDA (Soria, 1997; National Research Council, 1999).

Tras los inconvenientes con la desaparición de la naranjilla tradicional y con la problemática del riesgo a la salud que constituía el uso de hormonas en el cultivo de la naranjilla para su mejoramiento, se originó la necesidad de investigar nuevas variedades de la plantas para poder darle un valor económico real al cultivo. Se probaron muchos cruces con colaboración del Dr. Heiser de la Universidad de Indiana, de lo cual se logró al final de un largo proceso el híbrido Palora (Soria, 1997). Desde el logro de este híbrido hasta la actualidad, no se han hecho mayores investigaciones más que las llevadas por el INIAP para mantener la poca variabilidad existente en el país, por lo cual, la actual comercialización en el país de “naranjilla” se basa en un 60% del híbrido Puyo y 35% del híbrido Palora (Fiallos, 2000).

El cultivo de naranjilla en el Ecuador, pasa por una fase de transición, sin saberse si se logrará algún buen resultado. El cultivo como tal, representa un importantísimo rubro económico para los agricultores de la zona oriental del país, debido a las condiciones agroecológicas ideales que se presentan ahí; además que el producto tiene una gran aceptación y demanda en el medio nacional, con una potencial demanda internacional. Sin embargo, el cultivo debe ser llevado de una manera organizada si se quiere llegar a la exportación algún momento. En la actualidad existen, aproximadamente, 12000 ha de cultivo de naranjilla en el Ecuador, de las cuales ni siquiera la mitad está cultivada con el

hibrido INIAP- Palora, siendo éste el de alto rendimiento por su resistencia y valor del fruto (Fiallos, 2000; ECORAE, 2001). Si a esto se suma que las técnicas de cultivo utilizadas en el país no prestan la debida atención a reglas fitosanitarias; se puede llegar a lo que pasó hace 20 años cuando las áreas de cultivo apropiadas para la naranjilla se agotaron por plagas y enfermedades producidas por el cultivo de variedades susceptibles (ECORAE, 2001); lo cual afectaría directamente a cualquier intención futura de comercializar la fruta al exterior.

Por último, la investigación en el área agrícola ha aumentado en los últimos años en el país, lo cual ha ayudado que se preste atención a especies importantes y que no han sido explotadas en el país como el ají, el pimiento, el tomate de árbol, el mango y la naranjilla, entre otros (ECORAE, 2001). Pero a pesar de esto, todavía hace falta que estos productos sean incluidos en proyectos para la exportación en los próximos años, lo que incrementaría el interés y por consiguiente los fondos para la investigación y desarrollo de estos cultivos. En el caso específico de la naranjilla, se debe lidiar con diferentes problemas que ya se han hablado aquí, como: la falta de variabilidad intraespecífica, la pérdida de variedades silvestres, el mal manejo de residuos hormonales y el ataque de plagas a variedades sin resistencia a éstas. En estos dos últimos puntos se debe trabajar ampliamente, ya que representan los retos a superar en vista a una posible entrada a la comercialización internacional (Soria, 1997). En el caso de las enfermedades, muchas son ocasionadas por hongos como la antracnosis, fusariosis, y otras por bacterias, virus, nemátodos y lepidópteros; se debe comenzar por un manejo serio de los cultivares en base al recambio del monocultivo por variantes igual de interesantes como la naranjilla (Navarro, 1988). Además se debe crear conciencia en los pequeños agricultores sobre el uso de plantas sanas y de variedades que presenten resistencia a algunas de las enfermedades como la INIAP – Palora (Fiallos, 2000). La utilización de herbicidas, fungicidas, insecticidas, etc.; son parte

del manejo de cualquier cultivo, pero si se quiere entrar en un proceso de exportación los usos de estos productos químicos deben ser restringidos y además se debe incentivar las buenas prácticas de agricultura para no tener que depender directamente de químicos que resultan costosos para los agricultores (ECORAE, 2001). El desarrollo de nuevas variedades sería una ayuda inmensa para poder exportar la fruta; sin embargo, esto presenta dos problemas básicos que son la poca variabilidad con que cuenta la especie y la pérdida de las condiciones organolépticas de la fruta (Samaniego, 1997). Con los sistemas de producción actuales, se habla que los cultivares de las zonas orientales del Ecuador que están dedicados a la producción masiva, mantienen cultivos con una densidad de siembra de alrededor de 4000 plantas/ha.; en los cuales se ha podido manejar un buen estado fitosanitario (Jiménez, 1982). Con esto como referencia, se habla que en la década del 40 cada planta tenía una producción de hasta 800 frutos completando dos años de producción; esto antes de que las plagas ataquen al sistema radicular. En la actualidad, se tienen datos de una producción por planta de 40 frutos, debido a la incidencia de enfermedades y de contaminación aérea.; con lo cual se estaría hablando de una producción global de 7.2 ton/ha-año (INIAP, 2000). Con resultados así suena casi lógico que no se pueda competir con un mercado tan exigente como el internacional, a pesar que la demanda existe y no se tiene rivales directos en ese rubro de exportación.

La tarea es difícil, y se debe comenzar por la investigación en laboratorios para incentivar la producción de las variedades existentes y el desarrollo de nuevas para competir. Para esto se necesitan bancos de germoplasma actualizados y dispuestos a brindar facilidades a los investigadores del país para desarrollar un plan de trabajo conjunto a nivel nacional. La empresa privada puede incursionar directamente en la producción a gran escala de esta fruta, pero se necesitan protocolos científicos confiables que puedan ayudar tanto a la producción como al almacenamiento de variedades

importantes; considerando que la variabilidad genética de la naranjilla no brinda las facilidades para la producción de híbridos estables. Por esto, la importancia de poder almacenar cada variedad nueva, ya sean producidas por cruzamiento o por transformación genética, para lo cual procesos como la crioconservación sobresalen como herramientas importantes en la producción masiva. Más aun, cuando se sabe que si se obtiene híbridos interespecíficos que no se pueden reproducir sexualmente, nace otra vez la problemática de mantener las plantas por reproducción asexual con el riesgo de que enfermedades ataquen y devasten plantaciones que en un caso así representarían las plantaciones bases para sacar las variedades de producción. Por esto un sistema de crioconservación *in vitro* podría ser la principal herramienta en vista a mantener todos los híbridos con posible potencial económico y de exportación a salvo de las enfermedades en cada ciclo de producción.

En esta investigación, se hicieron varios experimentos de crioconservación con naranjilla *Solanum quitoense* var. *quitoense*. Se probaron algunos protocolos de crioconservación que habían sido utilizados en otras especies de Solanáceas o de frutas tropicales. El fin era probar que la crioconservación es una herramienta viable para el almacenamiento de naranjilla, además de abrir un camino para la investigación con todas las variedades de naranjilla que tengan importancia económica para la exportación en un futuro.

2. Objetivo General

- Estandarizar un protocolo de crioconservación *in vitro* de yemas apicales de naranjilla, mediante vitrificación.

3. Objetivos Específicos

- Determinar el tamaño óptimo de los explantes que serán sometidos al proceso de crioconservación.
- Definir la edad óptima de los explantes cultivados *in vitro* para el momento de la crioconservación.
- Analizar las concentraciones adecuadas de sacarosa para el pre-tratamiento de las yemas apicales de naranjilla.
- Definir el tiempo y la temperatura de exposición de los explantes a las soluciones de vitrificación, antes del congelamiento.
- Determinar que hormonas vegetales serán las adecuadas para el post-cultivo de los explantes descongelados.
- Estandarizar un método de aclimatación a invernadero de las plantas que han sobrevivido el proceso de crioconservación.

4. Área de Estudio

El proyecto se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal, el cual es parte del Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales de la Universidad San Francisco de Quito. Además se utilizó el Cuarto de Cultivo de la misma área de la Universidad, el cual tuvo condiciones controladas estándares durante todo el proyecto.

5. Justificación

Es muy importante que la investigación en el país en áreas como la agricultura, se adapte a las nuevas tecnologías que se están utilizando a nivel mundial. La biotecnología es una de las mejores herramientas que se tiene en la actualidad para el mejoramiento de variedades y especies, para la industrialización de procesos agronómicos, para el incremento de producción en todos los aspectos, y en este caso para la conservación de germoplasma a largo plazo. Debido a que el Ecuador es uno de los países mega diversos del planeta, resulta primordial que se le de atención a la conservación de nuestro germoplasma; ya sea para tener bancos genéticos y guardar la variabilidad o para tener el acceso a nuestros recursos genéticos. Como se expuso anteriormente, el cultivo de la naranjilla tiene un enorme potencial para la economía del país; sin embargo, se requiere de la industrialización del proceso de cultivo para que los mercados extranjeros se abran a esta fruta. En la actualidad ya se ha perdido la naranjilla tradicional o silvestre de los campos del país, por lo cual las opciones de mejoramiento se reducen cada vez más.

Este proyecto, representa una nueva opción para los agricultores que quieran realmente producir variedades de exportación. El desarrollar un protocolo de crioconservación de naranjilla, es una herramienta tanto para el almacenamiento de variedades ya producidas como para la conservación de otras que se están investigando y de las cuales se dificulta su mantenimiento *in vitro*.

La estandarización de un protocolo de crioconservación en naranjilla, es un proyecto pionero para el país. Este proyecto representa una tentativa trascendental para conservar recursos fitogenéticos. Es importante recalcar que a la naranjilla no se le ha dado la importancia suficiente a nivel de programas de conservación y mejoramiento. Sin embargo, la importancia económica que este fruto ha adquirido en los mercados internacionales, es un llamado de atención a los sectores públicos y privados para invertir en el desarrollo de este cultivo andino. Es por esto que la estandarización del protocolo para crioconservación de naranjilla representa un avance significativo para cualquier plan de uso y preservación de este frutal nativo.

6. Materiales

6.1. Material Vegetal

Se utilizó frutos de naranjilla, *Solanum quitoense* var. *quitoense*, adquiridos en mercados de la ciudad de Quito, de los cuales se extrajeron las semillas y se usaron como material base para el resto de la investigación. Estas semillas fueron germinadas *in vitro* y las plántulas obtenidas de ellas sirvieron para extraer los explantes de yemas apicales para la investigación.

6.1.1. Extracción de semillas

- Frutos de naranjilla de mercados de la ciudad de Quito
- Tamices
- Papel absorbente

6.1.2. Esterilización de semillas

- Cámara de flujo laminar (LABCONCO Purifier Clean Bench)
- Solución de Alcohol 70%
- Solución de hipoclorito de sodio 2.5%
- Tween 20
- Agua destilada estéril

6.1.3. Siembra *in vitro* de semillas de naranjilla

- Medio MS (Murashige & Skoog, 1962) 30 g L⁻¹ de sacarosa, 7g L⁻¹ de agar y pH 5.8.
- Cajas petri de vidrio estériles

6.2. Extracción de yemas apicales de naranjilla

- Estereomicroscopio (WARD'S Natural Science Establishment)
- Plántulas de naranjilla de 30 días de edad

6.3. Pre-tratamiento de yemas apicales de naranjilla

- Medio MS (Murashige & Skoog, 1962) 0.4M de sacarosa, 6g L⁻¹ de agar y pH 5.8
- Medio MS (Murashige & Skoog, 1962) 0.5M de sacarosa, 6g L⁻¹ de agar y pH 5.8
- Medio MS (Murashige & Skoog, 1962) 0.6M de sacarosa, 6g L⁻¹ de agar y pH 5.8
- Medio MS (Murashige & Skoog, 1962) 0.7M de sacarosa, 6g L⁻¹ de agar y pH 5.8

6.4. Vitricación de yemas apicales de naranjilla

- Criotubos de 2 mL (Quality Scientific Plastics: 2.0 mL Conical Screw Cap Microtube)
- Solución de carga LS (Matsumoto et al., 1994): 2M glicerol, 0.4M sacarosa.
- Solución PVS2 (Sakai et al., 1990): 30% Glicerol, 15% etilenglicol, 15% DMSO (Dimetilsulfóxido) y 0.4M sacarosa, disuelto en MS líquido.
- Micropipetas y puntas estériles
- Refrigerador (LAB-Line 33YL)

6.5. Congelamiento de explantes

- Tanque de nitrógeno líquido de 20 Kg. (MVE Spectrum 20)
- Material vegetal listo en criotubos.

6.6. Descongelamiento de explantes

- Baño María 40 °C. Equipo especificaciones
- Solución MS líquido 1.2M de sacarosa
- Solución MS líquido 0.8M de sacarosa
- Solución MS líquido 0.4M de sacarosa

6.7. Post-tratamiento de yemas apicales de naranjilla

- Medio MS (Murashige & Skoog, 1962) 30 g L⁻¹ de sacarosa, 0.1 mg L⁻¹ de BAP, 0.05 mg L⁻¹ de IBA, 0.1 mg L⁻¹ de GA₃ y 5 g L⁻¹ de agar (Wang et al., 2005; modificado).

6.8. Subcultivo de explantes

- Medio MS (Murashige & Skoog, 1962) 30 g L⁻¹ de sacarosa, 7 g L⁻¹ de agar y pH 5.8.
- Frascos de vidrio estériles

6.9. Aclimatación

- Vasijas pequeñas
- Frascos estériles
- Tierra estéril (Agro Terra Potting Mix; Canterbury Research S.A.)
- Bolsas de siembra negras
- Agua

7. Metodología

Se realizaron 10 experimentos sucesivos con el fin de estandarizar el protocolo de vitrificación para la naranjilla. Se fueron realizando cambios en el protocolo original basados en los resultados que cada experimento iba arrojando.

Se comenzó con varias hipótesis, las cuales se fueron desechando y, de esta manera, puliendo el protocolo final que se ratificó con los resultados obtenidos. Se cubrieron varios puntos críticos en el desarrollo del proyecto; en cada paso o etapa de investigación se trató de definir las mejores opciones para el ensamblaje de un protocolo eficaz. A continuación se describe uno a uno los pasos del proyecto, destacando cada

cambio probado en cada uno de los 10 experimentos. Al final del proyecto se reunieron las mejores variantes para probarlas en los últimos experimentos; haciendo repeticiones con un mismo protocolo para sustentar los resultados.

7.1. Recolección de Material Vegetal

El material vegetal que se utilizó en este proyecto fueron frutos de naranjilla comprados en diferentes mercados de la ciudad de Quito, escogidos especialmente por aspecto y tamaño. Las frutas que se tomaron eran las que mejor apariencia tenían, es decir, estas no estaban golpeadas o maltratadas, tenían alrededor de 5 cm. de diámetro, eran casi totalmente amarillas, estaban bien lavadas y conservadas. Además se preguntó la fecha de estancia en percha, la cual no fue mayor de dos días.

7.2. Extracción de semillas

Una vez adquiridas las naranjillas, se procedió a la extracción de las semillas en el laboratorio de la USFQ. Todas las naranjillas fueron lavadas con jabón, se secaron con papel secante y se retiraron todas las vellosidades que cubren naturalmente a la fruta.

Cada fruta fue cortada por la mitad, y entonces se sacó toda la pulpa con una cuchara de metal. A la pulpa se la puso sobre un cernidor grande de metal, el cual estaba previamente lavado con jabón. Con agua de la llave se comenzó a lavar y a separar la pulpa de las semillas con el objetivo que después de este proceso todas las semillas quedaran en el cernidor libres de pulpa y demás impurezas. Fue importante usar mucha agua para limpiar correctamente a las semillas y ver que estas no queden pegadas entre si, ya que ahí quedan restos de pulpa que pueden ser una fuente de contaminación final. Por último, se colocaron las semillas en papel secante y se las dejó por dos días hasta que estuvieran completamente secas.

7.3. Esterilización de semillas

Después de los dos días de secado, las semillas fueron esterilizadas y sembradas; y constituyeron el material madre para cada experimento. El protocolo de esterilización que se utilizó es el que se usa normalmente en la Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito. Todo el proceso se realizó dentro de la cámara de flujo laminar. Primero se introdujeron las semillas seleccionadas en un vaso de precipitación limpio, en el cual se añadió alcohol potable al 70%. Se usó lo suficiente como para que las semillas estuvieran completamente cubiertas. Aquí se las dejó por 3 minutos agitando cada minuto. Utilizando un cernidor, previamente esterilizado y flameado con alcohol en el mechero, se descartó todo el alcohol al 70% y se hizo un lavado de las semillas con agua destilada estéril. Después del lavado, se introdujeron las semillas en otro vaso de precipitación limpio con una solución de hipoclorito de sodio al 2.5% con unas 4 gotas del detergente Tween 20; y se dejó las semillas por 20 minutos para una esterilización eficaz. Se agitó unas 10 veces por lo menos durante los 20 minutos para que todas las semillas entraran en contacto con la solución. Luego, se descartó la solución de hipoclorito con detergente de la misma manera que se hizo con el alcohol; para esto el cernidor fue flameado otra vez antes de usarse. A las semillas se las lavó 5 veces con agua destilada estéril. Para descartar el agua de cada lavado se flameó cada vez el cernidor. Por último, después del quinto lavado, se colocaron las semillas sobre papel secante previamente esterilizado y se procedió a sembrarlas en los medios de cultivo.

7.4. Siembra *in vitro* de semillas de naranjilla

El proceso de siembra de semillas se realizó en la cámara de flujo laminar. Las semillas que habían sido esterilizadas en el paso anterior, fueron tomadas una a una y colocadas en el medio de cultivo. El medio que se utilizó fue un MS (Murashige & Skoog, 1962) con 30 g L⁻¹, 7 g L⁻¹ de agar, pH 5.8; medio que fue previamente repartido en frascos

de vidrio con tapa y esterilizado en autoclave por 15 minutos a 121°C. Se sembró entre 15 y 20 semillas por frasco, con una separación adecuada entre cada una. Después se taparon los frascos con Plastic Wrap marca Diamond y se sellaron con una liga.

7.5. Extracción de yemas apicales de naranjilla

Para la extracción de las yemas apicales, se utilizaron plántulas, obtenidas de semillas, con un promedio de 5 semanas de edad, y de 10 cm. de altura. Dentro de la cámara de flujo laminar, se tomaron una por una las plantas donadoras y en una caja petri de vidrio estéril se las fue colocando bajo un estereomicroscopio, el cual estaba previamente desinfectado con alcohol. Con el estereomicroscopio en lente 3X, se cortó la yema apical de cada una de las plantas; se utilizaron pinzas y bisturís extremadamente finos y estériles. El tamaño de los explantes varió entre 1 y 3 mm., dependiendo del desarrollo de la planta. Luego de cada extracción, se colocó cada explante en un medio de pre-tratamiento.

7.6. Pre-tratamiento de yemas apicales

El cultivo de las yemas apicales se hizo inmediatamente después de extraídas de las plantas donadoras. Fue importante realizar lo más rápido posible, tanto la extracción de la yema como su cultivo, debido a que los explantes eran muy sensibles a la desecación.

Para el pre-tratamiento de los explantes, se utilizaron medios MS (Murashige & Skoog, 1962) con 5 g L⁻¹ de agar, pH 5.8 y diferentes concentraciones de sacarosa; desde 0.09M que es la cantidad normal en un medio MS basal, hasta 1M de sacarosa en distintos rangos. Al principio se probaron 7 concentraciones: 0.09M, 0.3M, 0.4M, 0.5M, 0.6M, 0.7M y 1M; de las cuales se escogieron 4 finales porque presentaron los mejores resultados, siendo éstas: 0.4M, 0.5M, 0.6M, 0.7M de sacarosa. Las yemas se sembraron en cajas petri de plástico que contenían los medios descritos. Se sembraron 10 explantes por caja como promedio. Las cajas petri fueron selladas con parafilm y llevadas al cuarto de

cultivo por una semana; donde las condiciones fueron de 24°C de temperatura constante y se utilizó un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, con focos fluorescentes de luz blanca.

Para el inicio del proyecto, se utilizaron 5 medios de pre-tratamiento (Tabla 1) para determinar la eficiencia de cada uno; buscándose diferencias representativas entre los explantes que se sembraron en uno u otro medio. En los dos primeros experimentos, se utilizaron los medios MS (Murashige & Skoog, 1962) con 5 g L⁻¹ de agar, pH 5.8 y: 0.09M, 0.3M, 0.4M, 0.7M y 1M de sacarosa. Todos estos medios fueron preparados, autoclavados y repartidos por separado en cajas petri de plástico. En los dos experimentos se repitieron las concentraciones de sacarosa para lograr descartar los que no daban resultados. Para el segundo experimento se utilizaron también, algunas yemas axilares como explantes para observar las diferentes respuestas a los tratamientos. Debido a los malos resultados en este experimento, se modificó básicamente la concentración de sacarosa que se utilizaba, buscando optimizar resultados. Se utilizaron entonces 0.4M y 0.7M de sacarosa hasta el séptimo experimento, luego del cual se introdujeron dos concentraciones más que correspondían a 0.5M y 0.6M de azúcar. Para el experimento 8, se sembraron yemas apicales de 5 semanas de edad, pero esta vez repartidas en medios MS (Murashige & Skoog, 1962) con 5 g L⁻¹ de agar y 5.8 pH, suplementados con: 0.4M, 0.5M, 0.6M y 0.7M de sacarosa respectivamente; ya que los medios suplementados con 0.09M, 0.3M y 1M de sacarosa nunca dieron buenos resultados y fueron descartados. Los experimentos 9 y 10, fueron réplicas del anterior para comprobar la eficacia de las concentraciones de 0.5M y 0.6M de sacarosa.

7.7. Vitrificación y congelamiento de explantes

Se probaron diferentes combinaciones de tratamientos en este paso, básicamente de temperaturas (Tabla 1).

Después de 7 días de pre-tratamiento, se sacaron las cajas del cuarto de cultivo y se llevaron a la cámara de flujo laminar. Al igual que en el paso anterior, esto se debe hacer lo más rápido posible para evitar desecación de los explantes. Se utilizaron criotubos de 2 mL de capacidad, en los cuales se colocó 1 mL de la solución de carga LS (Matsumoto et al., 1994): 2M glicerol, 0.4M sacarosa. En cada tubo con solución LS se añadieron 5 yemas apicales, se taparon los tubos y se los dejó reposando en gradillas dentro de la cámara de flujo laminar por 25 minutos a la temperatura ambiente del laboratorio. Luego, con una micropipeta estéril de 1000 μ L se retiró toda la solución LS y se desechó en un frasco de descarte. Después, se añadió en los mismos tubos 1 mL de solución PVS2 (Sakai et al., 1990): 30% Glicerol, 15% etilenglicol, 15% DMSO (Dimetilsulfóxido) y 0.4M sacarosa, disuelto en MS líquido; se agitó cada tubo cerrado para que los explantes entraran en contacto con la solución criopreservante, y se dejaron los tubos en gradillas dentro del refrigerador por una hora. Se hizo un par de ensayos para comprobar si la temperatura a la que se dejaban los explantes durante esa hora influía en la toxicidad de la solución PVS2 sobre las yemas. Se habla de toxicidad principalmente porque el DMSO es un compuesto que penetra en las células de las plantas y sus efectos a temperatura ambiente son mucho más nocivos que a bajas temperaturas, ocasionando la muerte celular en la mayoría de tejidos (Sarkar & Naik, 1998). Por último, se llevaron los tubos conteniendo los explantes al tanque de nitrógeno líquido en donde se guardaron en las canastillas sumergidas en el líquido.

Como se expuso anteriormente, antes del congelamiento en los experimentos 1 y 2, se guardaron la mitad de los explantes, en la solución PVS 2, a 4 °C en un refrigerador durante 60 minutos, mientras que la otra mitad se conservó en la misma solución a temperatura ambiente por una hora. Al final de estos 60 minutos de espera, se llevaron los dos grupos de explantes, a congelar directamente en el nitrógeno líquido. En el segundo

experimento, solo la mitad de explantes que se cultivaron en el medio MS suplementado con 0.7M de sacarosa fueron los que se trataron 60 minutos en temperatura ambiente antes del congelamiento; mientras que todos los demás de las 4 concentraciones de sacarosa restantes, fueron tratados los 60 minutos a 4 °C. Se tomo esta decisión por los resultados que se obtuvieron el en anterior experimento. Para los siguientes experimentos, desde el tercero en adelante, se utilizó ya solo un tipo de tratamiento para todos los explantes independientemente del medio de pre-tratamiento del que provenían. El tratamiento fue de 60 minutos de incubación con PVS2 a 4 °C antes del congelamiento en nitrógeno líquido.

7.8. Descongelamiento de explantes

Después de una semana en nitrógeno líquido, se sacaron los criotubos del tanque y se hizo un descongelamiento rápido en baño maría a 40 °C; en donde se los dejó por un minuto aproximadamente. Después se colocaron los tubos en una gradilla y se los llevó a la cámara de flujo laminar, en donde se realizó los lavados de los explantes. Con una micropipeta estéril, se sacó toda la solución PVS2 de cada criotubo y se cambió por una solución de MS líquido con una concentración de 1.2M de sacarosa; se agitaron los tubos suavemente para que los explantes entren en contacto con la solución. Después de 15 minutos, se sacó con la micropipeta la solución y se reemplazó con una solución MS líquido con 0.8M de sacarosa, y se hizo el mismo procedimiento que con la anterior. A los 15 minutos, se extrajo esta solución y se reemplazó por la última que era una solución MS con 0.4M de sacarosa, en la cual también se dejaron 15 minutos los explantes. Estas tres soluciones eran de lavado para los explantes y para rehidratarlos después del congelamiento. Por último, se removió la solución, y se traspasaron los explantes a un medio semi-sólido para el post-tratamiento.

7.9. Post-tratamiento de explantes

Después del último lavado descrito en el paso anterior, se sembraron los explantes en el medio de post-tratamiento: MS (Murashige & Skoog, 1962) 30 g L⁻¹ de sacarosa, 0.1 mg L⁻¹ de BAP, 0.05 mg L⁻¹ de IBA, 0.1 mg L⁻¹ de GA₃ y 5 g L⁻¹ de agar (Wang et al., 2005; modificado). Este procedimiento se realizó rápido porque los explantes aun se encontraban débiles, y la exposición larga a la última solución de lavado y al aire de la cámara de flujo laminar podían causar una desecación inminente. Luego de que se sembraron alrededor de 10 explantes por caja, se selló cada una con parafilm y se cubrieron con papel aluminio, para crear oscuridad interna. Se guardaron las cajas o grupos de cajas cubiertos con papel aluminio en una incubadora con temperatura controlada de 25 °C por tres días. Luego de los cuales se pasaron al cuarto de cultivo para que continúen con el crecimiento normal; bajo condiciones controladas de luminosidad con un fotoperíodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad.

En el primer experimento, se probó el medio de post-tratamiento pero sin ácido giberélico para la recuperación de los explantes. Este medio fue luego modificado para la estandarización del protocolo (Tabla 1). Para el segundo experimento, los explantes fueron cultivados en el medio de post-tratamiento ya con las tres hormonas vegetales descritas; especialmente con GA₃ como el componente nuevo. Se decidió aumentar el ácido giberélico porque se vio que los explantes que sobrevivieron en el anterior proceso no lograron elongarse normalmente. A más de esto, los explantes no se trataron con los tres días de oscuridad en este experimento, básicamente por un desfase en el proceso. En el experimento 3, se dividieron los explantes entre los dos medios de post-tratamiento probados en los anteriores experimentos. La mitad de explantes se sembraron en el medio sin el suplemento de GA₃ y la otra mitad se sembró en el medio con GA₃ (Wang et al., 2005; modificado). Desde el experimento 4 en adelante, se utilizó solo el medio de post-

tratamiento que contenía GA₃, por los resultados obtenidos en el experimento anterior. Además se incubó por 3 días en oscuridad a 25 °C como temperatura constante antes de pasarlos a las condiciones de luminosidad controlada del cuarto de cultivo.

7.10. Subcultivo de las plantas recuperadas

Los explantes que sobrevivieron, fueron subcultivados en un nuevo medio de post-tratamiento suplementado con GA₃ (Wang et al., 2005; modificado), luego del primer mes de cultivo *in vitro*. En este primer subcultivo, simplemente se separaron a un medio fresco los explantes vivos de los explantes muertos. Una vez que los explantes, en el medio de cultivo fresco, comenzaron a brotar; se hizo otro subcultivo de los retoños en un período entre 15 a 30 días después del primer subcultivo. Para lo cual, se llevaron las cajas petri a la cámara de flujo laminar, en donde se abrieron una por una y se traspasaron los explantes que mostraban crecimiento de plántulas con al menos dos hojas, a un medio MS (Murashige & Skoog, 1962) 30 g L⁻¹ de sacarosa, 7 g L⁻¹ de agar y 5.8 pH. El procedimiento consistió en sacar las pequeñas plántulas de las cajas petri, cortar en la zona inferior del tallo y sembrar en el medio de cultivo. Por cada frasco, se sembraron entre 5 o 10 plántulas; luego de lo cual se selló el frasco con plastic wrap y una liga. Este proceso se repitió durante todo el proyecto, cada vez que se veía un brote en alguno de los explantes. En muchos casos, no existían brotes en todos los explantes de una misma caja, por lo cual se volvía a sellar la caja para que los demás explantes sigan cultivándose hasta el brote de alguna plántula. Existieron casos en que algunos explantes formaron callosidades, por lo cual se hicieron trasposos de estos explantes a otro medio fresco igual al medio citado en el post-cultivo; con el objetivo que las hormonas frescas tengan una mayor acción sobre estos explantes.

Una vez realizado el subcultivo de las plántulas, se continuó con el cultivo de éstas en los frascos con el medio MS ya citado. La incubación se la realizó en el mismo cuarto

de cultivo y con las mismas condiciones de luz y temperatura descritas anteriormente. La rotulación de los frascos era muy importante para no perder el seguimiento de cada planta durante el resto del proceso.

La razón por la cual se optó por utilizar un medio de post-cultivo con la hormona vegetal GA₃, fue porque en el primer experimento, a los 30 días del descongelamiento, se hizo el primer subcultivo de los explantes que presentaban retoños. Se los pasó a un medio igual al descrito, pero se le añadió 0.1 mg L⁻¹ de GA₃, con lo cual se vieron resultados. En este primer experimento, a los retoños que mostraban al menos dos hojas se los subcultivó a un medio MS hasta que comenzaron a enraizar a los 10 días después del traspaso; sin embargo, no se pudo continuar por problemas de contaminación. En los siguientes experimentos, se estandarizó un parámetro de subcultivos; el cual consistió de hacer el primer subcultivo al mismo medio de post-cultivo a los 30 días después del descongelamiento, mientras que el segundo subcultivo se lo hacía a los 15 días a un medio de enraizamiento MS sin hormonas.

7.11. Enraizamiento y aclimatación de plantas

A las plántulas subcultivadas, se las dejó enraizar y crecer en el medio MS (Murashige & Skoog, 1962) 30 g L⁻¹ de sacarosa, 7 g L⁻¹ de agar y 5.8 pH. Luego de 2 meses, las plantas estuvieron listas para ser pasadas a tierra. Se tomaron las plantas de mayor tamaño, alrededor de 7 cm., indistintamente la fecha de subcultivo, y se procedió a traspasar cada planta a una vasija de barro con tierra estéril. El proceso consistió en extraer delicadamente cada planta del frasco con medio de cultivo, lavar las raíces con agua destilada estéril hasta que no quede ningún resto de agar, y con pinzas sembrar en la vasija con tierra. Cabe resaltar varios puntos en este proceso: primero, la vasija con tierra humedecida va introducida en un frasco de vidrio largo con agua potable en la base, el cual va recubierto con papel aluminio en la boca y se autoclava por 15 minutos a 121 °C.

Segundo, todo el proceso de trasplante se lo realizó en la cámara de flujo laminar; tercero, se sacó cada planta del medio de cultivo con mucho cuidado para que las raíces no se rompieran; y cuarto, una vez sembrada la planta en la tierra se introdujo la vasija en el frasco, se añadió agua de la llave en el fondo del frasco (2 cm. de agua) y se selló el frasco con plástico para mantener la humedad. Por último, se rotularon los frascos de acuerdo al debido seguimiento que se le dio a cada planta y se llevaron al cuarto de cultivo con las condiciones controladas.

Después de tres días del traspaso a tierra, se hicieron dos huecos, con un lápiz, en el plástico de cada frasco. Se continuó haciendo huecos cada día hasta el día 15 después de la siembra para reducir la humedad interna del frasco; siempre tomando en cuenta que exista agua en el fondo del frasco de vidrio. A los 15 días se sacó el plástico por completo y las plantas quedaron expuestas al aire normal y a la luz del cuarto de cultivo. En este paso fue muy importante el chequear que las plantas tengan siempre agua en el fondo del frasco de vidrio para que no exista deshidratación.

Una semana después del retiro del plástico, se transplantaron a bolsas negras de siembra. Se transplantó cada planta a una bolsa, usando como base la misma tierra que tenía en la vasija; y en una bandeja se llevó cada grupo de bolsas al cuarto de cultivo bajo las mismas condiciones de luz y temperatura controladas. Durante una semana no se volvió a regar con agua ninguna planta; y a los tres días se apagó el foco de luz blanca fluorescente de la repisa del cuarto de cultivo. Para finalizar, se movieron pequeños grupos de plantas a un invernadero para la exposición periódica al ambiente natural.

8. Resultados

Los resultados alcanzados en el presente proyecto, fueron los esperados en relación a la estandarización de un proceso de crioconservación para la naranjilla. Basados en los objetivos, se puede decir que se buscaban resultados concisos y experimentalmente reproducibles logrados a través del protocolo base que se presentó en este trabajo (Figura 1). A continuación se presentarán los resultados del protocolo general, con lo cual se llegó a estandarizar un método efectivo de crioconservación para la naranjilla común.

Como se pudo ver en la metodología, el proyecto estuvo dividido en experimentos, en los cuales se fueron probando variantes para diferentes etapas del protocolo. De manera general, se probaron 3 variantes específicas las cuales fueron: medios de pre-tratamiento de explantes, metodología de vitrificación y medios de post-tratamiento. De acuerdo a los resultados que se fueron obteniendo de cada una de estas tres variantes, se fue estandarizando el protocolo final para la crioconservación de la naranjilla.

Las primeras etapas para la metodología general del proyecto, fueron iguales para todos los experimentos y además eran parte de protocolos estandarizados por años en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito. Es decir, la extracción de semillas de los frutos de naranjilla, la esterilización y la siembra *in vitro* de las mismas; fueron procesos de rutina en los cuales no existieron problemas ni de contaminación ni de germinación del material madre para el proyecto. Al igual que en estas primeras etapas, para la extracción de yemas apicales se siguió el procedimiento teniendo siempre como referencia que los explantes debían tener entre 1 y 3 mm. de tamaño. Esto resultó importante porque en ciertos casos se comprobó que los explantes que tenían desde 5 mm. para adelante la crioconservación no era posible por visibles daños del tejido. Se vio tejido necrosado en las zonas más lejanas del meristemo, desencadenando en una muerte rápida del resto del explante.

8.1. Pre-tratamiento

En los dos primeros experimentos realizados, se usaron 5 medios de pre-tratamiento con diferentes concentraciones de azúcar. La concentración de 0.09M de sacarosa, representa la misma concentración que en un medio MS basal para cultivo *in vitro*. Los resultados fueron nulos en las concentraciones de 0.09M, 0.3M y 1M de sacarosa (Figuras 2 y 3). Los explantes en 0.09M y 0.3M se mantuvieron verdes por un par de días en el proceso post-congelamiento, sin embargo, al tercer día aproximadamente comenzaron a necrosarse. En la concentración de 1M de sacarosa, los explantes ya se vieron afectados por deshidratación antes del congelamiento, lo cual derivó en la muerte instantánea después del proceso de vitrificación. En las concentraciones que si se vio supervivencia y brotación de plántulas fueron en 0.4M y 0.7M de sacarosa; en las cuales se obtuvo un 50% y 45% de supervivencia de los explantes respectivamente en el primer experimento (Figura 2), mientras que en el segundo experimento los resultados bajaron, con 0.4M los explantes tuvieron una supervivencia de 29% y con 0.7M de sacarosa, los explantes tuvieron un 27% de supervivencia (Figura 3).

En base a estos primeros resultados, en los 5 siguientes experimentos solo se utilizaron las dos concentraciones que habían resultado exitosas. Entre los diferentes experimentos, los resultados cambiaron, en algunos casos por problemas de contaminación y en otros por problemas de deterioro de las soluciones utilizadas. Sin embargo, como se puede ver en la Figura 1, los porcentajes de supervivencia de los explantes en 0.7M fueron siempre mayores que en 0.4M. En el experimento 5, existió contaminación en todos los explantes provenientes de 0.7M, por lo cual el porcentaje de supervivencia fue de 0%. En los experimentos 6 y 7 los resultados fueron nulos debido a que las soluciones utilizadas se

habían deteriorado y todos los explantes murieron después del descongelamiento; lo cual demostró que todas las soluciones para el proceso se deben renovar máximo cada 3 meses.

El experimento 8 fue uno de los mejores de todo el proyecto, y en él se probaron dos nuevas concentraciones de sacarosa para medios de pre-tratamiento (Figura 5). Ya que se había trabajado con las dos concentraciones de 0.4M y 0.7M de sacarosa, y se habían visto ligeras diferencias ya sea en morfología de las plantas como en porcentajes de supervivencia; se decidió utilizar las concentraciones intermedias para analizar posibles mejoras en el protocolo. Por lo tanto, se utilizaron los 4 medios de pre-tratamiento y se obtuvieron resultados exitosos. En la concentración de 0.4M de sacarosa, los explantes presentaron un 65% de supervivencia que representa el porcentaje más alto en esta concentración para todo el proyecto. En la concentración de 0.5M de sacarosa, se alcanzó un porcentaje de 83% de supervivencia, con lo cual se podía asumir una gran mejora con esta cantidad de sacarosa en el pre-tratamiento. En el caso de 0.6M de sacarosa, el porcentaje de supervivencia fue de 70%, Vale decir que en estas dos concentraciones no existieron múltiples brotes como en la de 0.7M, además que la morfología de estas plántulas fue normal, y sin formación de callos. Por último, la concentración de 0.7M de sacarosa, presentó los mismos resultados que en los experimentos previos, dando un 60% de supervivencia.

Los dos últimos experimentos consistieron en una réplica exacta del experimento No. 8. Se siguieron los pasos con la mayor precisión posible para tratar de emular los resultados obtenidos. En el experimento 9 (Figura 6), los resultados mostraron mucha relación con el experimento No. 8, pues los explantes provenientes de las concentraciones 0.4M, 0.6M y 0.7M tuvieron un comportamiento similar. De hecho, la supervivencia de los explantes fue de 64%, 70% y 64% respectivamente. Pero en lo que respecta a la concentración de 0.5M de sacarosa, se alcanzó el número más alto de supervivencia de

todo el proyecto, con un 95%; lo cual nos da a entender que es la concentración más adecuada para este protocolo en naranjilla. Para el último experimento (Figura 7), los explantes provenientes de 0.4M y 0.7M, presentaron otra vez similares porcentajes, de 50% para 0.4M y de 56% para 0.7M. Los porcentajes en estos dos grupos mejoraron en el transcurso del proyecto. Sin embargo, en este caso los explantes de la concentración 0.5M mostraron una menor adaptación en relación al anterior experimento dando como resultado un 63% de supervivencia en la concentración de 0.6M el 70%.

8.2. Vitrificación

La segunda variante importante fue la del cultivo con la solución vitrificante PVS2 antes del congelamiento. Esta variante se probó durante los dos primeros experimentos. En el experimento 1, los explantes en 0.4M de sacarosa como medio de pre-tratamiento, tuvieron una mejor respuesta a 4 °C de temperatura con un 80% de supervivencia contra un 20% con temperatura de 25 °C (Figura 2). Mientras que los explantes en 0.7M de sacarosa, respondieron mejor a 25 °C con un 60% de supervivencia contra un 25% de 4 °C (Figura 2). Basados en estos resultados, para el segundo experimento todos los explantes se trataron a 4°C por una hora excepto una mitad tomada al azar de los explantes provenientes de 0.7M de sacarosa; con el afán de probar los resultados que se presentaron en el experimento anterior. En este caso, los resultados bajaron de manera general (Figuras 2 y 3), y los resultados para los explantes provenientes de 0.7M de sacarosa y cultivados a 25 °C, fueron relativamente bajos en este tratamiento. Desde el tercer experimento, se utilizó para todos los explantes el mismo tratamiento de incubación de 4 °C por 60 minutos. Los resultados se muestran en la Figura 1, en donde se puede observar que las plantas reaccionaron bien a este tratamiento, mientras que en el caso de los explantes de 0.7M de

sacarosa los porcentajes subieron en relación de las dos primeras pruebas con 25 °C de incubación.

8.3. Post-tratamiento

Por último, una variante más en este proyecto fue el medio de post-tratamiento que se utilizó. Una vez que los explantes fueron congelados y descongelados satisfactoriamente y con el mismo procedimiento para todos, se decidió probar entre dos medios para obtener resultados de brotación adecuados. En el primer experimento se utilizó un medio MS (Murashige & Skoog, 1962) con 30 g L⁻¹ de sacarosa, 0.1 mg L⁻¹ de BAP, 0.05 mg L⁻¹ de IBA, 5 g L⁻¹ de agar y pH 5.8. En este medio los explantes sobrevivieron, pero no brotaron, por lo que se decidió transferirlos a los 21 días al mismo medio más 0.1 mg L⁻¹ de GA₃ para inducir la brotación y elongamiento de plántulas. Una vez que se hizo un primer subcultivo al medio suplementado con GA₃ los explantes comenzaron a brotar. Para el experimento 2 se procedió a utilizar desde el principio el medio de post-tratamiento MS (Murashige & Skoog, 1962) con 30 g L⁻¹ de sacarosa, 0.1 mg L⁻¹ de BAP, 0.05 mg L⁻¹ de IBA, 0.1 mg L⁻¹ de GA₃, 5 g L⁻¹ de agar y pH 5.8; el cual dio una mejor adaptación a las plántulas que lograron sobrevivir. Se obtuvo un porcentaje más bajo que en el experimento anterior, sin embargo la cantidad de brotes y de plántulas que se obtuvieron fue mucho mayor (Figuras 3 y 8). Con los resultados parciales de los dos primeros experimentos, se decidió realizar el tercer experimento de forma comparativa entre los dos medios. Los resultados en este caso fueron positivos con porcentajes de 20% para los explantes provenientes de 0.4M sacarosa, y de 66% para los explantes provenientes de 0.7M (Figura 4). Para este punto ya se tenían conclusiones importantes en relación del medio a utilizarse. Desde el experimento 4 hasta el final del proyecto se utilizó solamente el medio

suplementado con GA3, lo cual significó mejores resultados especialmente en los últimos experimentos del proyecto (Figura 1).

8.4. Brotación

En relación a los resultados de supervivencia, se analizaron los parámetros de brotación de plántulas de los explantes que sobrevivieron al congelamiento. Según los resultados alcanzados, se pudo relacionar directamente la cantidad de brotes de plántulas con el medio de post-tratamiento. Una vez que se utilizó el medio con ácido giberélico como medio de recuperación, la brotación y la supervivencia de los brotes se mantuvieron casi constantes para todos los explantes independientemente de la concentración de sacarosa de la cual provenían. Los resultados que se muestran en la Figura 8, muestran que los porcentajes de brotación y por ende de supervivencia de los brotes se mantuvieron alrededor de 85%, formando así plántulas que después serían aclimatadas hasta la etapa de invernadero.

8.5. Aclimatación

En el proceso de aclimatación de las plantas a un nuevo sustrato como la tierra, se siguió un mismo protocolo con casi ninguna variación de experimento a experimento. El período de enraizamiento y elongación de las plantas, antes del traspaso a tierra, tuvo una duración de dos meses aproximadamente para cada planta.

Después de analizar los resultados de supervivencia y de brotación de los explantes crioconservados, se procedió a pasar a los explantes que tuvieran el tamaño, de alrededor de 2 centímetros, a un medio de enraizamiento. El medio fue un MS (Murashige & Skoog, 1962) con 30 g L⁻¹ de sacarosa, 7 g L⁻¹ de agar y pH 5.8. En este medio las plántulas comenzaron a enraizar aproximadamente a los 12 días de sembradas; nunca pasaron más

de 15 días para que una planta enraíce. El proceso de cultivo en este medio de enraizamiento y elongación promedió alrededor de los 2 meses para la gran mayoría de plantas; sin embargo, hubo casos en que se necesitó cambiar de medio dentro de estos 2 meses debido a problemas de crecimiento de las plántulas. Los problemas variaron entre el retardo de elongación de algunas plantas, el desarrollo arbustivo de hojas y en muchos casos la diferencia de desarrollo de una planta a otra dentro del mismo frasco de cultivo; lo cual ocasionó que al aclimatar unas plantas, las que todavía no se encontraban listas tuvieron que ser transferidas a otro frasco con medio de cultivo nuevo. En estos casos, las raíces fueron cortadas para el cultivo *in vitro*, por lo que se tuvo que esperar por lo menos un mes más para el desarrollo de raíces grandes y para el crecimiento de la planta con el fin de aclimatarla. Estos desfases ocasionaron que dentro de cada proceso de aclimatación estén mezcladas plantas de todos los experimentos que resultaron exitosos.

Se programaron 10 procesos de aclimatación con un promedio de 13 plantas por cada proceso. Las plantas fueron escogidas por el tamaño que presentaban en el momento de la aclimatación; donde el parámetro fue todas las plantas que llegaban al tope del frasco de cultivo, alrededor de 5 centímetros, y presentaban hojas grandes y tallos duros, como la mostrada en la Figura 9. Los resultados de este primer traspaso son los indicados en la Tabla 2. Se observó que en todos los procesos de aclimatación y con todas las plantas cualquiera sea su origen, la aclimatación y adaptación fueron totalmente exitosos; con porcentajes de 99% de aclimatación en frascos.

Para el segundo paso de aclimatación, paso de plantas a bolsas con tierra, se utilizaron casi todas las plantas que habían cumplido un período de 3 semanas de adaptación en las vasijas dentro de los frascos. Para esto, se tomó como parámetro las plantas que tuvieran un crecimiento aproximado de 10 cm., hojas grandes y tallos fuertes y poco suculentos. Las tres plantas que se muestran en la Figura 10, son ejemplos de plantas

en perfecto estado para el traspaso a tierra. Sin embargo, como se observa en la Figura 11, algunas plantas de menor tamaño que no avanzaron a crecer lo suficiente, también fueron trasplantadas con resultados exitosos, los cuales se muestran en la Tabla 3.

Después del traspaso a las bolsas de tierra, todas las plántulas fueron dejadas 2 días en el cuarto de cultivo con condiciones de luz controladas. Pero al parecer la intensidad de la luz fue demasiado fuerte, lo cual causó desecamiento prematuro de las plantas, por lo cual al tercer día se apagó la luz de todas las repisas donde se encontraban las mismas. Ahí permanecieron por dos semanas para asegurar una buena adaptación al ambiente natural.

Por último, todas las plantas en bolsas se colocaron en bandejas y se las mantuvo en el mismo cuarto de cultivo con el fin de aclimatarlas en condiciones lo más similares posibles. Para todas las plántulas, como se muestra en las Figuras 12. La importancia de la humedad de la tierra y del ambiente fue clave en este punto; debido a que el ambiente de la zona donde se encuentra la USFQ es seco y caliente en relación al clima donde se cultivan naranjillas normalmente. Por esto, una vez que se aseguró el bienestar de las plantas en condiciones parcialmente controladas, se introdujeron, progresivamente, una por una las plantas a invernaderos situados bajo sombra de árboles. Es importante recalcar la sombra, ya que la naranjilla crece naturalmente en campos de la Cordillera Oriental del Ecuador bajo sombra ocasionada por árboles grandes en medio de las plantaciones. Las plantas más grandes y fuertes se muestran en las Figuras 14 y 15; además de una planta muerta que no resistió el proceso de aclimatación, mostrada en la Figura 16.

9. Discusión

9.1. Conservación de diversidad genética

La conservación de germoplasma es un tema de mucho debate en la actualidad. Con el ritmo acelerado que ha avanzado la agricultura en el mundo, los presentes retos de la conservación ya no solo se enfocan a preservar el ambiente tal y como está en la naturaleza, sino a rescatar toda la diversidad genética de cada región del planeta. El objetivo de algunos centros de investigación es conservar un banco de genes de especies prioritarias, con la mayor diversidad posible para poder utilizar esto como una herramienta ya sea para mejoramiento genético o para rescate de especies en peligro de extinción. Lógicamente esta conservación debe ser a largo plazo, y es aquí donde la crioconservación juega un rol muy importante, siendo una técnica innovadora que puede garantizar la seguridad de los bancos de germoplasma al rededor del mundo (Panis & Lambardi, 2005). En el caso de la naranjilla, una vez que se ha confirmado que la “naranjilla tradicional” ya no existe en el Ecuador (Segovia, 2001), la conservación de la poca diversidad genética que hay de esta especie es fundamental para el futuro que este cultivo pueda tener. En este caso, la crioconservación se presenta como una gran alternativa para centros de investigación, debido a que es la mejor manera de evitar problemas fisiológicos o de variaciones somaclonales en las variedades que se conserven (Hirai & Sakai, 1999; Matsumoto et al., 2001); problemas que en bancos de semillas y bancos de cultivo *in vitro* suelen ser comunes con el paso de los años.

El proyecto estuvo compuesto de varios experimentos de crioconservación con el objetivo de probar todas las variantes que pudieran haber sido útiles para la eficacia del protocolo final. Para estandarizar un protocolo es necesario hacer el suficiente número de repeticiones de un proceso para eliminar toda duda con respecto a los errores o aciertos que se puedan tener. En este caso, los 10 experimentos realizados parecen suficientes como

para determinar un protocolo con condiciones estándares por lo menos para la variedad común de naranjilla que se comercializa en todos los mercados de Quito.

Para el protocolo que se logró estandarizar, existieron antecedentes de otros dos protocolos que se trataron de adaptar a la naranjilla. Estos protocolos previamente probados, eran originalmente optimizados para *Solanum tuberosum* (Sarkar & Naik, 1998); la cual pertenece a la misma familia de la naranjilla. Sin embargo, nunca se alcanzaron resultados importantes. A partir de esto, se utilizó un protocolo desarrollado para frutas tropicales, especializado para *Carica papaya L.*, el cual fue modificado hasta lograr los resultados que se han descrito anteriormente. A pesar de la relación taxonómica que tienen la papa y la naranjilla, se notó que las diferencias existentes entre las dos especies a nivel de condiciones de cultivo son las que determinaron que un protocolo de papaya fuera más adecuado para la naranjilla. La papa, en condiciones naturales, es una especie que está mucho más adaptada a bajas temperaturas y hasta a heladas en diferentes épocas del año. Mientras que la naranjilla es una fruta sub-tropical, la cual no tiene contacto con condiciones extremas de frío en su ambiente natural. Partiendo desde esa diferencia, la adaptación de la papa a un proceso de crioconservación es mucho más probable que la naranjilla. Debido a esto, se optó por la opción de usar el protocolo de Wang, et al., 2004, desarrollado para papaya, como metodología base para la ejecución del proyecto; dando énfasis a ciertos puntos discutidos a continuación. Se destacó la importancia del uso de un proceso eficiente de pre-tratamiento con sacarosa, lo determinante que resulta la temperatura de exposición de los explantes a las soluciones criopreservantes y la eficacia del GA₃ como una hormona reguladora para el post-cultivo de las plantas.

Los procesos de extracción, esterilización y de siembra de semillas; son protocolos estandarizados que se han venido utilizando en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de

la Universidad San Francisco de Quito por varios años, por lo cual los resultados de estos pasos estaban optimizados.

La primera decisión que se tomó para la crioconservación fue la edad de los explantes, en este caso las yemas apicales, la cual fue de 5 semanas de edad. Este tiempo se tomó desde que se sembraron las semillas en el medio de cultivo hasta el día en que se extrajeron las yemas apicales de las plantas; lo cual funcionó bien y se relaciona con procedimientos de Wang et al. (2005) y Sarkar & Naik (1998). Esta edad representa un período natural en el cual las yemas apicales de las plantas tienen un tamaño adecuado para su extracción y sus células están en un proceso de desarrollo importante según describen Hirai & Sakai (1999). Basándose en los resultados que se obtuvieron desde el comienzo del proyecto, la edad de 5 semanas para la extracción de yemas fue la que se utilizó durante todo el proceso con el fin de no introducir nuevas variantes al protocolo en este aspecto. Las yemas apicales son las partes de las plantas de mayor potencial de regeneración entre todos los órganos. La totipotencialidad de las células meristemáticas que se encuentran en la yema apical, representa un factor clave para que la recuperación de los explantes tenga el mayor éxito posible.

9.2. Pre-Tratamiento

La segunda variante que se analizó en el proyecto, fue el pre-tratamiento de los explantes para su adaptación al proceso de vitrificación; para evitar el estrés que representa un proceso así para cualquier material vivo. En los experimentos se probaron varios medios de pre-tratamiento de las yemas apicales, basado en que el principio de pre-tratar a los explantes es esencial para el desarrollo post-congelamiento de cualquier tejido. Según Sarkar & Naik (1998); el proceso de pre-tratamiento consiste en incrementar efectivamente la concentración celular de solutos y así evitar la desecación prematura. La sacarosa fue la

fuente principal de pre-tratamiento, por lo cual se determinó que tanto la falta de sacarosa como el exceso de la misma son negativos para los explantes de naranjilla. Se observó que a bajos niveles de sacarosa (0.09M) antes del congelamiento, las plantas no desarrollaban ninguna resistencia a la deshidratación con soluciones criopreservantes; esto se evidenció por el necrosamiento de los explantes una vez que salían del congelamiento. Por otro lado, en concentraciones altas de sacarosa (1M), la deshidratación que sufrieron los explantes antes de la exposición a las soluciones criopreservantes fue extrema; hasta el punto que las yemas estaban deshidratadas antes de comenzar el proceso de crioconservación. Con las concentraciones adecuadas de sacarosa, se logró que los explantes reaccionaran positivamente al proceso de congelación, desarrollando tolerancia a la misma durante la crioconservación. Al final del proyecto, 4 concentraciones de sacarosa fueron las que aportaron resultados positivos para la supervivencia y para la brotación de plántulas desde los explantes descongelados; las cuales fueron 0.4M, 0.5M, 0.6M y 0.7M de sacarosa. Al parecer, según se puede comparar con investigaciones en otras solanáceas u otras frutas sub-tropicales (Sarkar & Naik, 1998; Wang et al., 2005; Hirai & Sakai, 1999), usar altas concentraciones de sacarosa es la forma más eficaz de adaptar a las plantas a un proceso de tanto estrés osmótico como representa este tipo de congelación, debido a la concentración de solutos que se logra acumular dentro de la célula; lo cual lógicamente deshidrata al explante de una manera controlada. Ciertos aspectos variaron entre los resultados de los explantes que provenían de diferente concentración de sacarosa; desde diferencias en el porcentaje de supervivencia, hasta la presencia de múltiples brotes en la más alta concentración, algo que concuerda con resultados expuestos por Sakar & Naik (1998) en la investigación realizada en papa. A pesar de las variaciones que se describieron en los resultados, no se pudo discriminar entre ninguna de estas 4 concentraciones finales debido a que la diferencia en resultados no era totalmente determinante a favor de una u otra

concentración, básicamente porque todas presentaban resultados con altos porcentajes supervivencia y brotación para todas las etapas del proyecto. Se podría discutir a favor de la concentración de 0.5M de sacarosa como la más representativa en los resultados del proyecto debido a que en un experimento alcanzó el mayor porcentaje de supervivencia de todos los experimentos realizados. Sin embargo, en los dos últimos experimentos los resultados se equipararon entre las 4 concentraciones de sacarosa (0.4M, 0.5M, 0.6M y 0.7M) por lo cual todas representan una buena opción para la investigación. La concentración de 0.5M de sacarosa, es la intermedia de todo el rango que se probó en el proyecto; y mostró resultados óptimos para un proceso de estandarización, alcanzando 95% de supervivencia tras el descongelamiento. Se puede determinar entonces a esta concentración como la óptima para futuros trabajos de criopreservación en naranjilla; sin embargo, se debe tomar en cuenta la variación que se presentó desde 95% de supervivencia en un experimento hasta 70% en otra. Esto se podría atribuir a algún error humano al ejecutar los diferentes métodos en todo el experimento. Es decir, al momento de la manipulación de los explantes, se pudo haber introducido una variante que haya afectado al desempeño del proceso en esta concentración; tomando en cuenta que en las demás concentraciones se mantuvieron estables los resultados.

9.3. Vitrificación

Es crítico tener un proceso de pre-tratamiento bien definido, debido a que la verdadera etapa de estrés del proceso comienza con los pasos de preparación para el congelamiento, lo cual se realiza en dos horas aproximadamente. Como ya se ha dicho, el tratamiento de vitrificación somete a las células de los explantes a un estrés osmótico de alto grado; tanto por la acción de las soluciones criopreservantes como por el congelamiento en sí de cada célula en nitrógeno líquido (Matsumoto et al., 1994; Escobar

et al., 1997; Takagi et al., 1997). Por este motivo, en el protocolo utilizado fue crucial que el proceso de exposición de los explantes a sustancias como el DMSO, glicerol y etilenglicol; fuera totalmente controlado y más que nada lo suficientemente corto como para que no exista intoxicación, pero lo suficientemente largo como para que exista una deshidratación adecuada de los explantes. Este punto tiene mucha importancia, ya que a pesar de que la solución PVS2 es la criopreservante, todos sus componentes siguen siendo naturalmente tóxicos y extraños para una planta. Es decir, el DMSO por ejemplo, es una sustancia que a temperatura ambiente durante 1 hora comienza a quemar las membranas celulares y a deshidratar rápidamente los explantes. Por esto, se utilizaron dos estrategias unidas para este efecto; la primera, fue la exposición a glicerol mediante la solución LS (Matsumoto et al., 1994): 2M glicerol, 0.4M sacarosa y dH₂O hasta 100 mL, y segundo, fue el mantener las soluciones LS y la PVS2 (Sakai et al., 1990): 30% Glicerol, 15% etilenglicol, 15% DMSO (Dimetilsulfóxido) y 0.4M sacarosa, disueltos en MS líquido; a 4°C de temperatura. Estas dos estrategias juntas determinaron que los explantes se vean afectados en una mínima expresión con respecto a las soluciones utilizadas. La solución LS, adaptó de buena manera a los explantes a la exposición de la siguiente solución (PVS2), la cual ya poseía DMSO como un ingrediente activo. Sin embargo, el uso de PVS2 a bajas temperaturas, ha demostrado ser la mejor manera para someter a los explantes a la vitrificación (Matsumoto et al., 1994; Takagi et al., 1997; Lambardi et al., 2000; Matsumoto et al., 2001) en diferentes especies; ya que la baja temperatura reduce la acción nociva del DMSO sobre las membranas celulares, pero todavía cumple la función de reemplazar el agua del explante por esta mezcla de alcoholes de la cual se compone la PVS2. Según los resultados de este estudio, el período de una hora de exposición de los explantes a la PVS2 funcionó bien desde el principio, por lo cual no se probó otros tiempos para el protocolo. Los porcentajes de supervivencia son exitosos para este protocolo, los

cuales concuerdan con protocolos probados en papaya o papa (Wang et al., 2005; Sarkar & Naik, 1998). Sin embargo no se descarta que se puedan tratar otros tiempos de exposición con el fin de mejorar los resultados.

En este estudio, el período de congelamiento de las yemas fue de 10 días, con más de 60% de supervivencia. Se podría asumir, según resultados obtenidos en papaya (Wang et al., 2005), en zanahoria (Dereuddre et al., 1991) y en caña de azúcar (Martínez-Montero et al., 1998; González-Arno et al., 1999); donde si se extiende el período de congelamiento a un año o más, los resultados no deben variar y la viabilidad de los explantes se debe mantener de forma tal que los porcentajes de supervivencia y de brotación de plántulas sea constante. De hecho, los explantes una vez que entran en el nitrógeno líquido, comienzan una etapa de latencia indefinida o prolongada, la cual puede durar desde horas hasta años. Esto es posible porque las células de los explantes están protegidas por sustancias criopreservantes que penetran en las mismas, con lo cual se forma un escudo exterior e interior de protección. Sin embargo, se requiere comprobación experimental.

9.4. Post-Tratamiento y Aclimatación

En lo que corresponde a los procesos de post-tratamiento y aclimatación, se destaca el uso de hormonas y la necesidad de sombra y moderada humedad para las plantas. Primero, el medio utilizado para el post-tratamiento de las plantas contenía tres hormonas vegetales, las cuales ayudaron en la brotación de yemas y elongación de pequeñas plántulas. El enraizamiento se dio en un medio MS basal sin hormonas. Las tres hormonas que se utilizaron {6-bencilaminopurina (BAP), ácido 3-indol-butírico (IBA) y ácido giberélico (GA_3)}; ayudaron a los explantes a sobrevivir y a generar nuevas plántulas casi sin la formación de callo. De estas tres hormonas, GA_3 fue la más importante; cuya función

de elongamiento de las células de los explantes fue la que ayudó a que crezcan después de un subcultivo, pues se pudo constatar que el medio de post-tratamiento sin GA₃ no desarrolló plántulas; y es que a pesar de que se trabaja con yemas apicales, cuya capacidad de brotación es muy alta, necesitan de algo extra para desarrollarse después del estrés al que se someten en la crioconservación. De manera general, el proceso de post-tratamiento y aclimatación demoraron alrededor de 3 meses en promedio, por lo cual se tuvo que analizar constantemente los progresos o retrocesos en los resultados de cada set de plantas. Dentro de lo que correspondió al proceso de aclimatación en sí, se tuvo mucho cuidado en la cantidad de agua que se administró a las plantas. Debido a que la zona de Cumbayá representa significativas diferencias con las zonas naturales de siembra de la naranjilla, no se pudo llevar a las plantas a invernaderos normales ya que era un ambiente demasiado seco para la naranjilla. Por lo tanto, se adaptaron invernaderos con condiciones más controladas de humedad en el ambiente y los cuales proporcionaban la suficiente sombra para las plantas. Se notó claramente que el exceso de agua era más agresivo que la falta del mismo líquido; por lo que se regaban las plantas cada vez que se veía la superficie de la tierra seca. En lo que se refiere a las plantas que se traspasaron a bolsas, se vio que el porcentaje de supervivencia fue bastante aceptable; sin embargo, las plantas que presentaban alturas de promedio de 5 cm. no lograban sobrevivir de manera general. Debido a esto, es muy aconsejable que en el caso de la naranjilla, las plantas cumplan con características fundamentales en tallos, hojas y tamaño. Una apariencia fuerte de su tallo; quiere decir, que el tallo debe ser grueso y fuerte, pero poco succulento, para que en el momento de la aclimatación no existe pérdida de turgencia del tallo y la planta se mantenga erguida. Hojas grandes pero no en gran cantidad, debido a que muchas hojas aumentan la tasa de evapo-transpiración, y por ende se deshidratan las plantas. El tamaño promedio de la planta de 10 cm. de altura, porque a este tamaño se obtuvieron las

características del tallo y de las hojas que se buscaban. Tallos gruesos, hojas grandes y una altura de 10cm, fueron los parámetros que mejor funcionaron para la aclimatación de estas plantas de naranjilla; siempre tomando en cuenta que el exceso de agua en las plantas sembradas en bolsas no es recomendable para la aclimatación. Además se notó que demasiada intensidad de luz sobre las plantas causaba problemas en la adaptación; en muchos casos se vio desecación de las hojas, y en otros casos se vio que los filos de las hojas se quemaron cuando había mucha intensidad de luz en las estanterías del cuarto de cultivo. Estos parámetros de cantidades de agua y luz que se han obtenido con estos resultados, son comparables directamente con las condiciones naturales que necesitan las naranjillas para desarrollarse (Soria, 1997); pues en el casos de los campos de cultivo, las naranjillas crecen bajo la sombra de árboles grandes y de amplio dosel.

10. Conclusiones

Se logró estandarizar un protocolo de crioconservación de yemas apicales de naranjilla por el método de vitrificación; el cual por el momento es eficaz para la naranjilla común que se comercializa en los mercados de Quito; lo que demuestra que es factible crioconservar la naranjilla en nitrógeno líquido y que esta técnica es una buena opción para los bancos de germoplasma de este frutal andino.

Se definió que la edad de 5 semanas de cultivo *in vitro* de las plantas donadoras de las yemas apicales, era el tiempo óptimo para la extracción de los explantes para ser sometidos al pre-tratamiento en medios de cultivo específicos. Los explantes que se utilizaron tuvieron un promedio entre 1 y 3 mm. de tamaño, los cuales siempre fueron extraídos con ayuda de un estereomicroscopio en lente 3X.

Se demostró que altas concentraciones de sacarosa son indispensables para el pre-tratamiento de explantes; siendo en este caso las concentraciones de 0.4M, 0.5M, 0.6M y

0.7M de sacarosa las concentraciones que dieron resultados positivos. No se puede hacer un proceso de vitrificación sin antes someter los explantes a un método de pre-tratamiento, con lo cual el material vegetal pueda adaptarse a la desecación y a la exposición de soluciones tóxicas como el DMSO.

Definitivamente, la exposición de los explantes a las soluciones criopreservantes debe hacerse siempre con un control de la temperatura del proceso. Se definió que a 4 °C, la acción de la solución PVS2 era muchos menos agresiva sobre los explantes que a temperatura ambiente. Además el tiempo promedio más conveniente para la exposición a la solución LS fue de 25 minutos a temperatura ambiente, mientras que para la solución PVS2 fue de 60 minutos a 4 °C.

Se determinó que el medio de post-tratamiento MS (Murashige & Skoog, 1962) con 30 g L⁻¹ de sacarosa, 0.1 mg L⁻¹ de BAP, 0.05 mg L⁻¹ de IBA, 0.1 mg L⁻¹ de GA₃, 5 g L⁻¹ de agar y pH 5.8 (Wang et al., 2005; modificado); fue el más adecuado para la recuperación de los explantes tras el proceso de descongelamiento. La importancia de la hormona GA₃ fue determinante en este medio, ya que ayudó a los retoños a elongarse antes del traspaso al medio de enraizamiento. Además la incubación de los explantes por 3 días a temperatura constante de 25 °C y sometidos a oscuridad total, justo después del congelamiento, expresó resultados positivos para la recuperación de los explantes.

Con el proceso de aclimatación de todas las plántulas desarrolladas de las yemas apicales congeladas, se pudieron concluir algunos parámetros importantes para el traspaso a tierra. Se debe tener plántulas de alrededor de 10 cm. de altura para el inicio de la aclimatación. Estas plantas deben tener hojas grandes y tallos gruesos, pero no deben tener demasiada cantidad de hojas; para cuidar que no exista deshidratación. Las plantas deben permanecer en la primera etapa de aclimatación, en frascos, alrededor de 3 semanas antes del traspaso a bolsas. Una vez traspasadas a bolsas; se deben mantener en un lugar con

sombra, con humedad ambiental controlada y el riego de las plantas debe ser esporádico. Es decir, para la naranjilla es preferible que la tierra esté ligeramente seca a que exista exceso de agua.

11. Recomendaciones

Este proyecto representa una base para futuras investigaciones en este campo de conservación de la naranjilla. Es importante dar un seguimiento a estos resultados y fomentar la investigación en nuevos parámetros sobre el mismo protocolo base que se ha logrado estandarizar en este estudio, para que la metodología logre abarcar todas las variedades de naranjilla descritas en el Ecuador.

Con respecto a la sacarosa y las concentraciones utilizadas, se debe determinar la eficiencia para las demás variedades de naranjilla existentes en el país. Es decir, una vez que se tiene este protocolo, se debería iniciar una investigación diferenciando variedades con el fin de conservar todo el germoplasma existente de esta especie.

Otro aspecto, y tal vez el más importante, es la investigación más a fondo sobre la viabilidad de los explantes a través del tiempo de crioconservación. Sería muy importante plantear un nuevo proyecto con parámetros de crioconservación de mínimo 6 meses hasta uno o dos años de duración dentro del nitrógeno líquido. Con los resultados que se obtengan de estos estudios se podrá definitivamente determinar el éxito del protocolo y se podría plantear un plan de conservación a largo plazo por medio de vitrificación. Lógicamente, junto con la investigación en largos períodos de tiempo se debe adjuntar el estudio de la mayor cantidad de variedades que se pueda obtener; para así tener un marco lo más completo posible para poder aplicar a una futura conservación del germoplasma de naranjilla por medio de crioconservación.

12. Bibliografía

1. Charoensub, R., S. Phansiri, A. Sakai, and W. Yongmanitchai. "Cryopreservation of cassava *in vitro*-grown shoot tips cooled to -196°C by vitrification". Cryo-Letters. 20 (1999): 89-94.
2. Dixit et al., 2004 documento Venancio
3. Engelmann F. "Importance of desiccation for the cryopreservation of recalcitrant seed and vegetatively propagated species". Plant Genetic Resources Newsletter. 112 (1997): 9-18.
4. Engelmann, F. "*In vitro* conservation of tropical plant germplasm-a review". Euphytica. 57 (1991): 227-243.
5. Fahy, G.M., D.R. MacFarlane, C.A. Angell, and H.T. Meryman. "Vitrification as an approach to cryopreservation". Cryobiology. 21 (1984): 407-426.
6. Fiallos J. "Naranjilla: INIAP – Palora. Híbrido interespecífico de alto rendimiento". Boletín divulgativo Granja Experimental Palora. 276 (2000).
7. Heiser C (1985) Ethnobotany of the naranjilla (*Solanum quitoense*) and its relatives. Econ Bot 39: 4-11
8. Heiser C (1993) The naranjilla (*Solanum quitoense*), the cocona (*Solanum sessiliflorum*) and their hybrid. In: Gustafson J et al. (ed) Gene conservation and exploitation. Plenum Press, New York
9. Heiser C (2001) Interspecific hybridization and the improvement of the naranjilla (*Solanum quitoense*). In: Van den Berg R, Barendse G, Van der Weerden G and Mariani C (ed) Solanaceae V: advances in taxonomy and utilization. Nijmegen University Press, Nijmegen
10. Hirai, D. and A. Sakai. "Cryopreservation of *in vitro*-grown axillary shoot-tip meristems of mint (*Mentha spicata* L.) by encapsulation vitrification". Plant Cell Reports 19 (1999): 150-155.
11. Jiménez, J. "Apuntes sobre el cultivo de la naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) en la zona centro oriental del Ecuador". 1º Conferencia internacional de naranjilla. INIAP. 16 (1982).
12. Lambardi, M., A. Fabbri, and A. Caccavale. "Cryopreservation of white poplar (*Populus alba* L.) by vitrification of *in vitro*-grown shoot tips". Plant Cell Reports. 19 (2000): 213-218.
13. Matsumoto, T., A. Sakai, and K. Yamada. "Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) by vitrification and subsequent high plant regeneration". Plant Cell Reports. 13 (1994): 442-446.

14. Matsumoto, T., K. Mochida, H. Itamura, and A. Sakai. "Cryopreservation of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb) by vitrification of dormant shoot tips". Plant Cell Reports 20 (2001): 398-402.
15. Meneses H. A. "Ecofisiología, propagación y manejo del cultivo de lulo". 1° seminario nacional del cultivo de lulo. 12 (1988).
16. Mix-Wagner G., H. M. Schumacher, R.J. Cross. "Recovery of potato apices after several years of storage in liquid nitrogen". Cryo-Letters. 24 (2003): 33-41.
17. National Research Council (1989) Naranjilla (Lulo). In: Ruskin F (ed) Lost crops of the Incas: little-known plants of the Andes with promise for worldwide cultivation. National Academy Press, Washington D.C.
18. Navarro, R. "Enfermedades del Lulo". 1° Seminario nacional del cultivo de lulo. 12 (1988).
19. Panis, B., M. Lambardi. "Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees)". The Role Of Biotechnology. (2005).
20. Romero-Castañeda, R. "El lulo: una fruta de importancia económica". Agricultural Tropical. 17 (1961): 214 – 218.
21. Sakai A, Kobayashi S, Oiyama I. "Cryopreservation of nucellar cells of naval orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrication". Plant Cell Reports. 9 (1990): 30-35.
22. Sakai, A. "Development of cryopreservation techniques". En F. Engelmann and H. Takagi (eds.), Cryopreservation of tropical plant germplasm current research progress and application. Japan International Research Centre for Agricultural Sciences, Tsukuba/International. Plant Genetic Resources Institute Rome. (2000): 1-7.
23. Salick, J. "Cocona (*Solanum sessiliflorum*) production and breeding potentials of the peach-tomato, in: 'New Crops for Food and Industry'". Wickens, G. and Day, P., eds. Chapman and Hall. Londres (1989).
24. Samaniego, V. "El cultivo de la naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) en la zona de Pastaza en el Ecuador". 1° Conferencia internacional de naranjilla. INIAP. 17 (1982).
25. Sarkar D, PS. Naik. "Cryopreservation of Shoot Tips of Tetraploid Potato (*Solanum tuberosum* L.) Clones by Vitrication". Annals of Botany. 82 (1998): 455-461.
26. Schäfer-Menuhr A, H.M. Schumacher, G. Mix-Wagner. "Long-term storage of potato varieties by cryopreservation of shoot-tips in liquid nitrogen". Plant Genetic Resources Newsletter. 111 (1997): 19-24.

27. Schäfer-Menuhr A, Muller E, Mix-Wagner G. "Cryopreservation: an alternative for the long-term storage of old potato varieties". Potato Research. 39 (1996): 507-513.
28. Scocchi A., H. Rey. "Conservación de Germoplasma *in vitro*". En V. Echenique, C. Rubinstein, L. Mroginski (eds.), Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Buenos Aires, Argentina. (2004): 179-185
29. Schultes, R. y Romero-Castañeda, R. "Edible fruits of *Solanum* in Colombia" Bot. Mus. Leaf. Universidad de Harvard. 19 (1962): 235 – 286.
30. Soria J (1997) Mejoramiento genético de la "naranjilla" (*Solanum quitoense* Lam.) mediante cruzamientos interespecíficos. In: Ríos M and Pedersen H (ed) Uso y manejo de recursos vegetales. Abya-Yala, Quito
31. Takagi, H., N. Tien-Thanh, O.M. Islam, T. Senboku, and A. Sakai. "Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) by vitrification: 1 investigation of basic conditions of the vitrification procedure". Plant Cell Reports. 16 (1997): 594-599.
32. Thanh, N.T., H. Takagi, and S. Yashima. "Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of banana (*Musa* spp.) by vitrification method". Cryo-Letters. 20 (1999): 163-174.
33. Touchell, D.H., V.L. Chiang, and C.J. Tsai. "Cryopreservation of embryogenic cultures of *Picea mariana* (black spruce) using vitrification". Plant Cell Reports. 21 (2002): 118-124
34. Tsukazaki, H., M. Mii, K. Tokuhara, and K. Ishikawa. "Cryopreservation of Doritaenopsis suspension culture by vitrification". Plant Cell Reports. 19 (2000): 1160-1164.
35. Vélez A. "Plagas y otros insectos del lulo o naranjilla(*Solanum quitoense* Lam.) en Colombia". 1º seminario nacional del cultivo de lulo. 12 (1988).
36. Wang, Y.L., M.J. Fan, S.I. Liaw. "Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of papaya (*Carica papaya* L.) by vitrification". Botanical Bulletin of Academia Sinica. 46 (2005): 29-34
37. Whalen M, Costich D, and Heiser C (1981) Taxonomy of *Solanum* section *Lasiocarpa*. Gentes Herb 12: 41-129

13. Tablas

Experimento	Pre-tratamiento	Vitrificación	Congelamiento	Descongelamiento	Post-tratamiento	Aclimatación	
1	5 medios MS basal suplementados con: 0.09M, 0.3M, 0.4M, 0.7M y 1M de sacarosa	<ul style="list-style-type: none"> LS: 2M glicerol, 0.4M sacarosa; por 25 min. a 23°C ½ explantes: PVS2 60 min. a 25°C, y ½ PVS2 60 min. a 4°C. 	Todos los explantes fueron sometidos a congelamiento rápido en Nitrógeno Líquido después de los 60 minutos de tratamiento con PVS2.	<p>Todos los explantes:</p> <ul style="list-style-type: none"> Descongelamiento rápido en baño María 40 °C por 1 minuto. Descarte solución PVS2 3 Lavados consecutivos de 15 minutos cada uno con soluciones MS líquido con 1.2M, 0.8M y 0.4M de sacarosa respectivamente. 	MS con 30 g L ⁻¹ de sacarosa, 0.1 mg L ⁻¹ de BAP, 0.05 mg L ⁻¹ de IBA, 5 g L ⁻¹ de agar y pH 5.8	<p>Todos los explantes que sobrevivieron:</p> <ul style="list-style-type: none"> 1° subcultivo a los 30 días en medio de post-cultivo a un medio igual 2° subcultivo a los 15 días a medio MS basal. A los 2 meses traspasó a tierra. 1 mes después, traspaso a invernadero. 	
2		Solo ½ explantes 0.7M en PVS2 por 60 min. a 25°C.			MS 30 g L ⁻¹ de sacarosa, 0.1 mg L ⁻¹ de BAP, 0.05 mg L ⁻¹ de IBA, 0.1 mg L ⁻¹ de GA ₃ y 5 g L ⁻¹ de agar		
3	2 medios MS basal suplementados con: 0.4M y 0.7M de sacarosa.	Tratamiento exitoso:			½ MS con GA ₃ ½ MS sin GA ₃		
4		<ul style="list-style-type: none"> LS por 25 minutos a 25°C. PVS2 por 60 minutos a 4°C. 					
5							
6							
7							
8							4 medios MS basal suplementados con: 0.4M, 0.5M, 0.6M y 0.7M de sacarosa
9							
10							

Tabla 1. Resumen de variantes utilizadas en el Protocolo de Crioconservación de naranjilla

En esta tabla se puede observar las diferentes variantes evaluadas en cada etapa del proyecto en los 10 experimentos realizados. Además se observa que en las etapas de congelamiento y descongelamiento no hubo variaciones.

Aclimatación de plántulas a frascos		
Proceso	# de plantas	Origen
1	9	0.4M, 3° exp. = 3 plantas 0.7M, 4° exp. = 5 plantas 0.4M, 8° exp. = 1 planta
2	9	0.7M, 4° exp. = 9 plantas
3	9	0.7M, 4° exp. = 9 plantas
4	11	0.7M, 4° exp. = 4 plantas 0.5M, 8° exp. = 5 plantas 0.7M, 8° exp. = 2 plantas
5	11	0.7M, 3° exp. = 2 plantas 0.7M, 4° exp. = 3 plantas 0.4M, 5° exp. = 1 planta 0.6M, 8° exp. = 5 plantas
6	16	0.4M, 2° exp. = 6 plantas 0.7M, 3° exp. = 10 plantas
7	12	0.7M, 4° exp. = 12 plantas
8	16	0.7M, 4° exp. = 10 plantas 0.4M, 5° exp. = 6 plantas
9	18	0.4M, 5° exp. = 2 plantas 0.4M, 8° exp. = 4 plantas 0.6M, 8° exp. = 7 plantas 0.6M, 10° exp. = 5 plantas
10	20	0.5M, 9° exp. = 20 plantas

Tabla 2. Metodología de aclimatación de plantas regeneradas después de la crioconservación. En esta tabla se observa el número total de plantas obtenidas en cada experimento. También se puede observar el origen, es decir el medio de cultivo, del cual provino cada planta aclimatada.

Aclimatación de plántulas a bolsas de siembra				
Proceso No.	# Plantas	Origen	Supervivencia	Tamaño plántula
1	2	0.4M, 3°exp.	No	4 cm.
	1	0.4M, 3°exp.	Si	11 cm.
	1	0.7M, 4°exp.	No	7 cm.
	2	0.7M, 4°exp.	Si	10± cm.
	1	0.7M, 4°exp.	Si	8 cm.
	1	0.7M, 4°exp.	Si	11 cm.
	1	0.4M, 8°exp.	Si	10± cm.
2	2	0.7M, 4°exp.	No	4 cm.
	3	0.7M, 4°exp.	No	5 cm.
	1	0.7M, 4°exp.	Si	7 cm.
	1	0.7M, 4°exp.	No	7 cm.
	1	0.7M, 4°exp.	Si	6 cm.
	1	0.7M, 4°exp.	No	2 cm.
3	1	0.7M, 4°exp.	Si	11 cm.
	3	0.7M, 4°exp.	Si	9 cm.
	2	0.7M, 4°exp.	Si	7 cm.
	1	0.7M, 4°exp.	Si	6 cm.
	1	0.7M, 4°exp.	No	5 cm.
	1	0.7M, 4°exp.	No	No se traspasó
4	2	0.7M, 4°exp.	Si	7 cm.
	2	0.7M, 4°exp.	Si	8 cm.
	1	0.7M, 4°exp.	Si	9 cm.
	1	0.5M, 8°exp.	No	5 cm.
	1	0.5M, 8°exp.	Si	6 cm.
	2	0.5M, 8°exp.	Si	9 cm.
	1	0.7M, 8°exp.	Si	10 cm.
	1	0.7M, 8°exp.	Si	6 cm.
5	1	0.7M, 3°exp.	Si	8 cm.
	1	0.7M, 3°exp.	Si	6 cm.
	1	0.7M, 4°exp.	Si	11 cm.
	1	0.7M, 4°exp.	Si	10 cm.
	1	0.7M, 4°exp.	Si	9 cm.
	1	0.4M, 5°exp.	No	4 cm.
	1	0.6M, 8°exp.	Si	11 cm.
	1	0.6M, 8°exp.	Si	9 cm.
	2	0.6M, 8°exp.	Si	7 cm.
	1	0.6M, 8°exp.	Si	6 cm.

Tabla 3. Resultados de los primeros 5 procesos de aclimatación a bolsas de siembra.

Esta tabla muestra la relación existente entre el tamaño de las plantas aclimatadas (cm) y la supervivencia de las mismas en los procesos del 1 al 5. Se puede observar, claramente, que las plantas de tamaño entre 6 y 11 cm sobrevivieron en su mayoría, mientras que las plantas por debajo de este rango de tamaño murieron.

14. Figuras

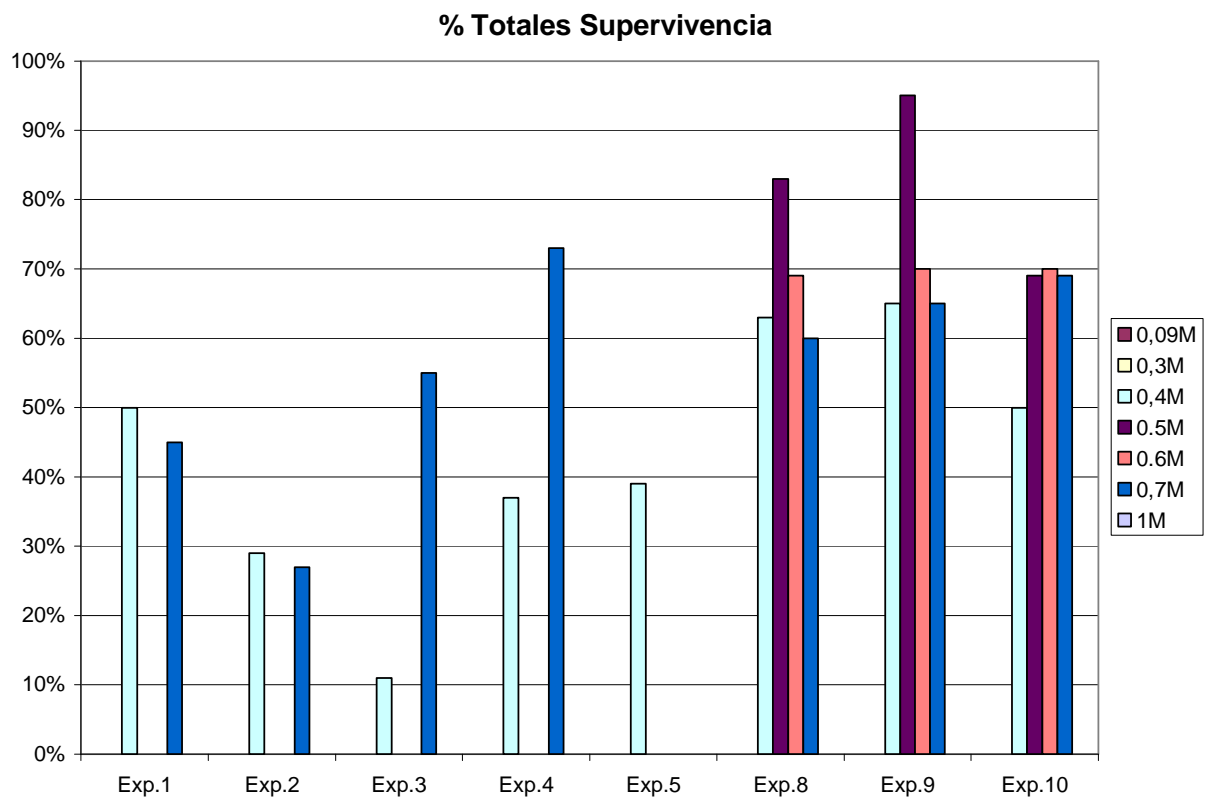


Figura 1. Resultados generales del proyecto en base a la supervivencia de los explantes después de cada proceso de criopreservación.

En esta figura se muestran los porcentajes en cada experimento según la concentración de sacarosa que se probó en cada proceso. En los 5 primeros experimentos se puede observar con la concentración de 0,4 M de sacarosa alcanzaron un máximo de 50% de supervivencia, mientras que con la concentración 0,7 M de sacarosa se logró un máximo de supervivencia de 72%. Por otro lado, se observa que en los tres últimos experimentos el máximo porcentaje de supervivencia (95%) se alcanza con la concentración 0,5 M de sacarosa.

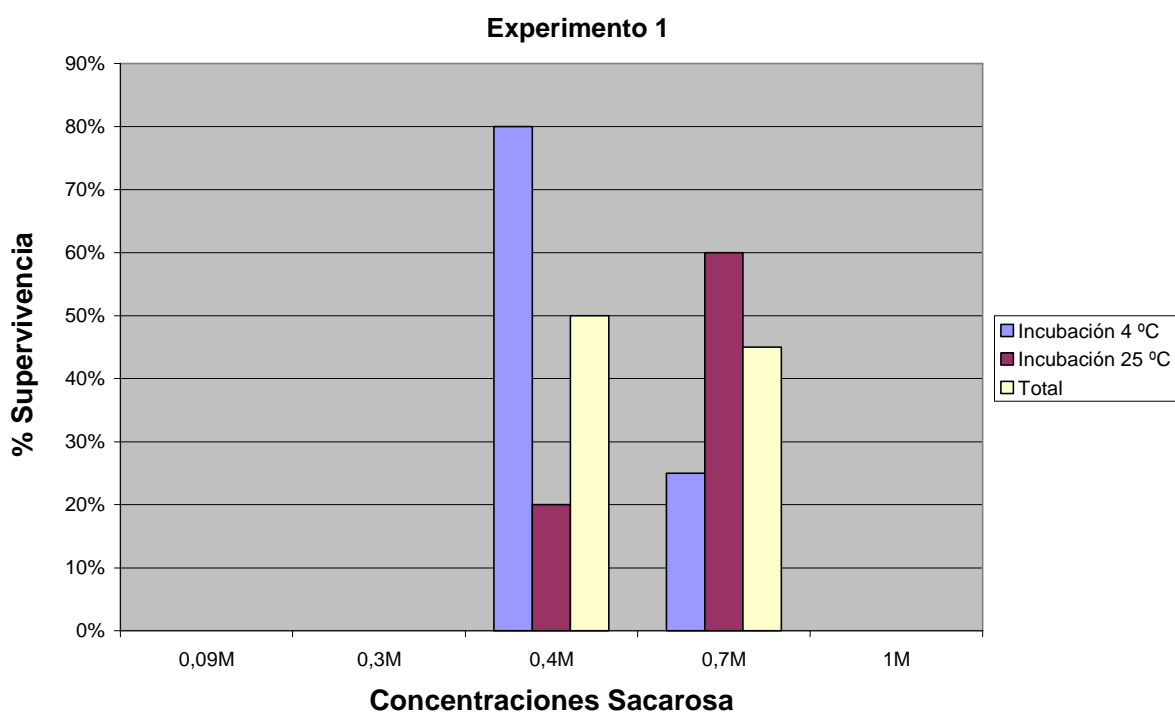


Figura 2. Resultados de supervivencia para el primer experimento.

En esta figura se observa claramente que, en el experimento 1, solo se obtuvo supervivencia con las concentraciones de 0.4M y 0.7M de sacarosa. También se observa que, cuando la concentración de sacarosa es baja, la incubación a 4°C favorece la supervivencia (80%). Por otro lado, cuando la concentración de sacarosa es de 0.7M se obtiene un porcentaje mayor de supervivencia (60%) cuando los explante son incubados a temperatura ambiente.

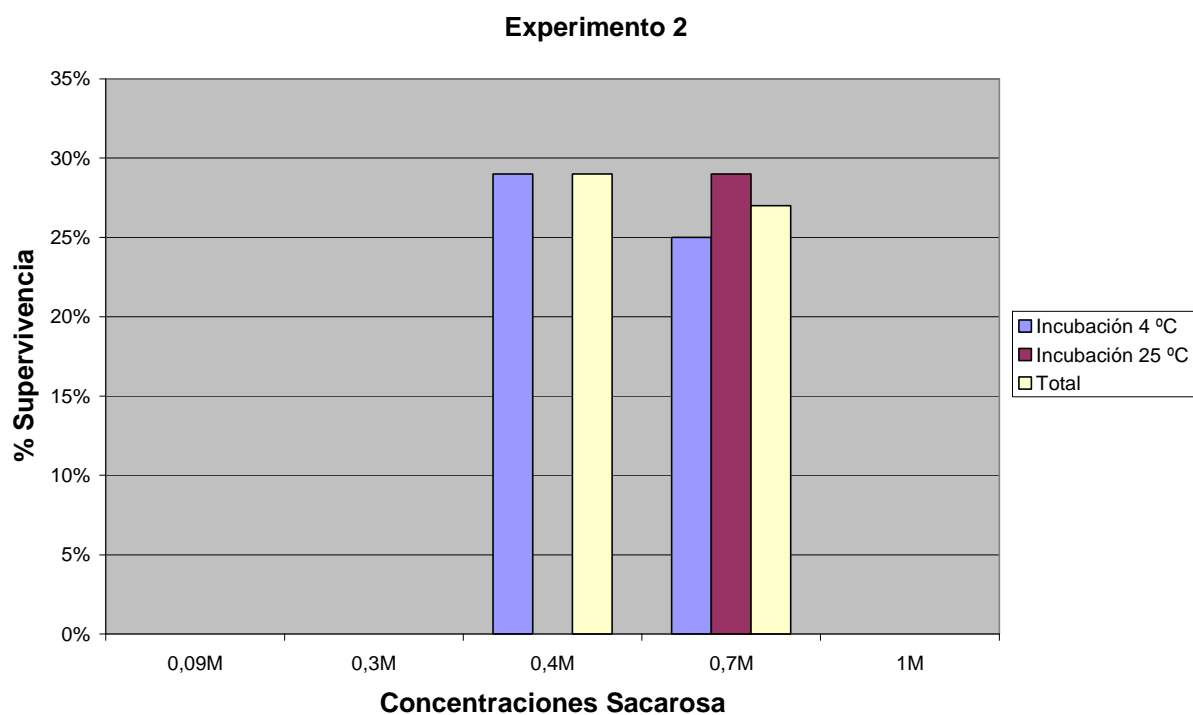


Figura 3. Resultados de supervivencia de explantes del segundo experimento.

En esta figura se observa que, para el experimento 2, la incubación a 4°C favorece la supervivencia de explantes cuando estos son cultivados en 0,4M de sacarosa. Por otro lado, los explantes cultivados en 0,7M de sacarosa tienen un porcentaje de supervivencia ligeramente mayor cuando son incubados a 25°C.

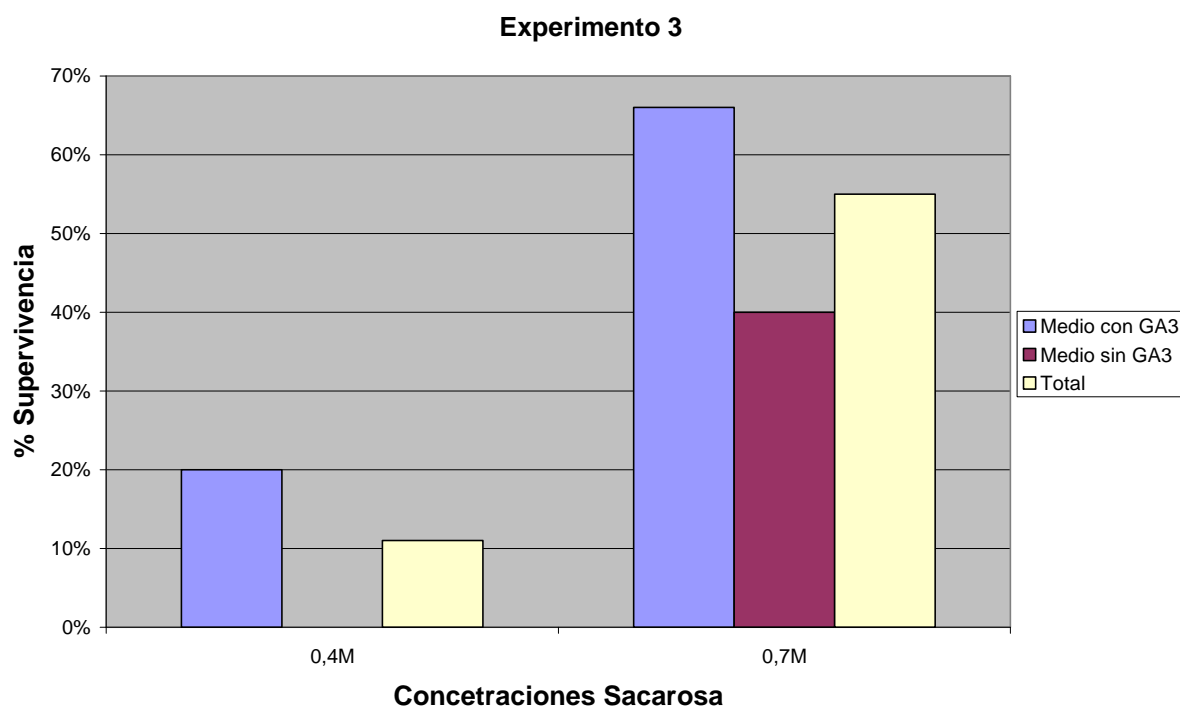


Figura 4. Resultados de supervivencia para el experimento 3.

En esta figura se observa que, para el experimento 3, el medio de cultivo suplementado con ácido giberélico (post-tratamiento) logra un mayor porcentaje de supervivencia tanto en los explantes provenientes de medios de cultivo con 0.4M y 0.7M de sacarosa.

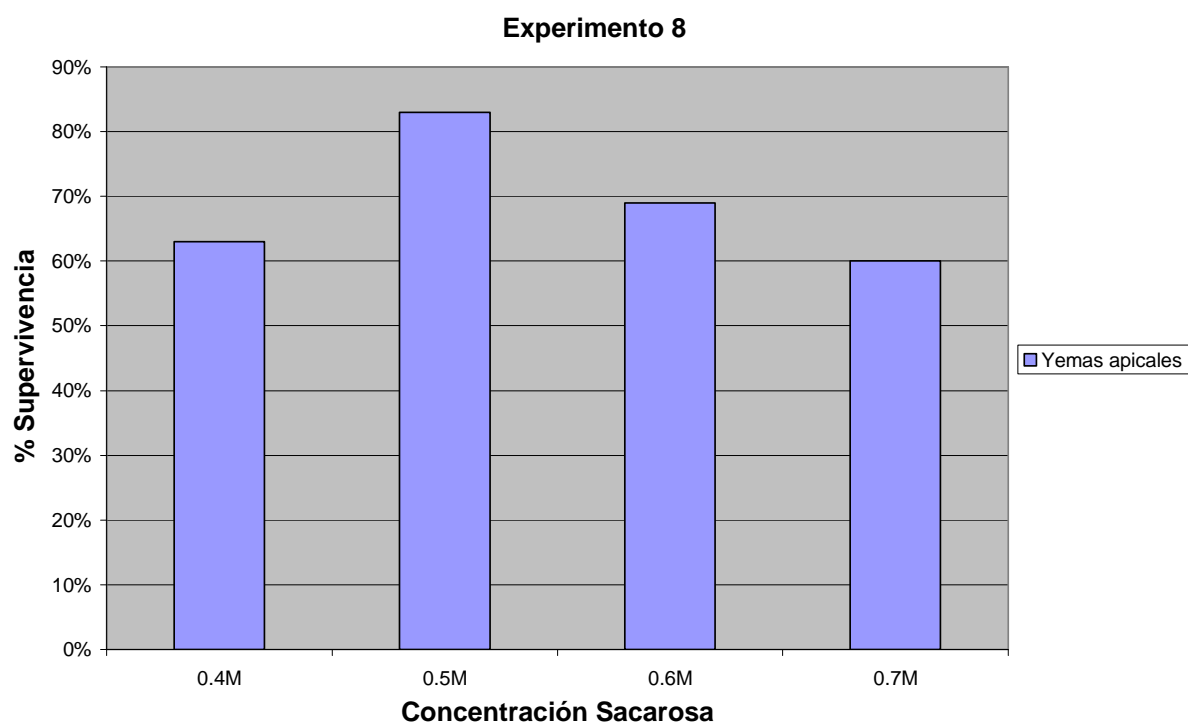


Figura 5. Resultados de supervivencia del experimento 8

En esta figura se muestra los diferentes resultados de supervivencia en relación a las concentraciones de sacarosa utilizadas en los medios de pre-tratamiento. Se puede observar que en la concentración 0.5M de sacarosa se obtuvo el mayor porcentaje de supervivencia (83%).

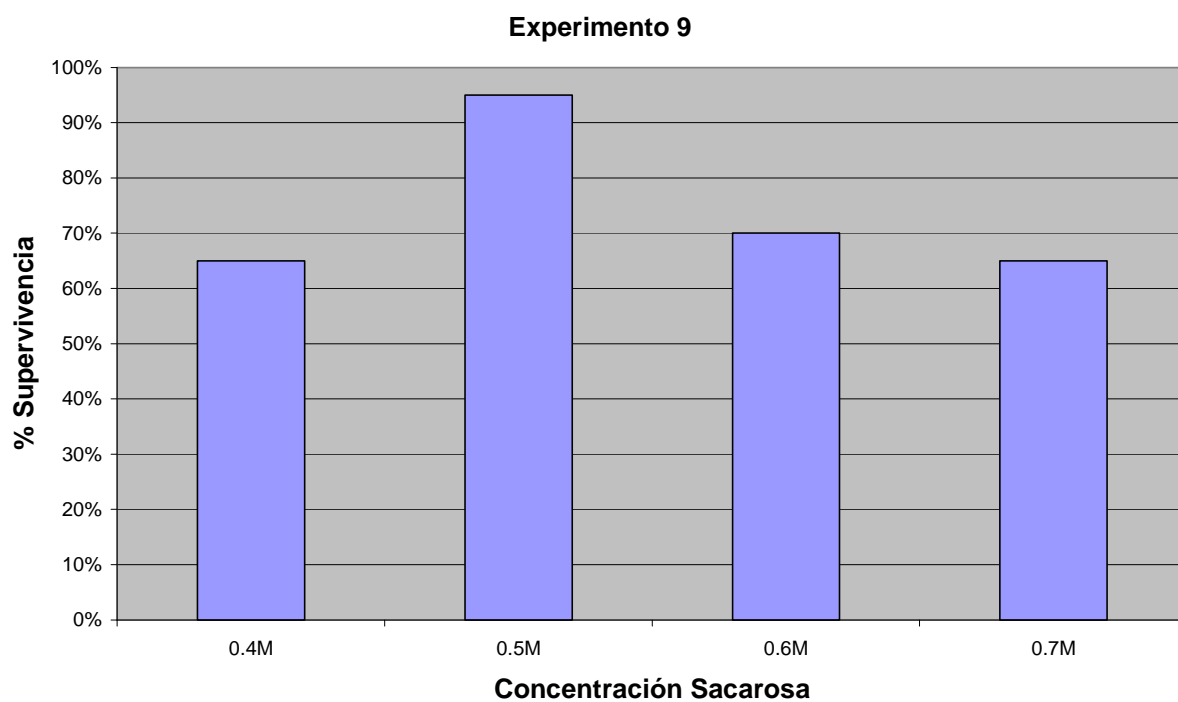


Figura 6. Resultados de supervivencia del experimento 9

En esta figura se muestra los diferentes resultados de supervivencia en relación a las concentraciones de sacarosa utilizadas en los medios de pre-tratamiento. Se puede observar que en la concentración 0.5M de sacarosa se obtuvo el mayor porcentaje de supervivencia (95%). Por otro lado se observa que en las demás concentraciones analizadas se obtuvo un porcentaje máximo de 70%.

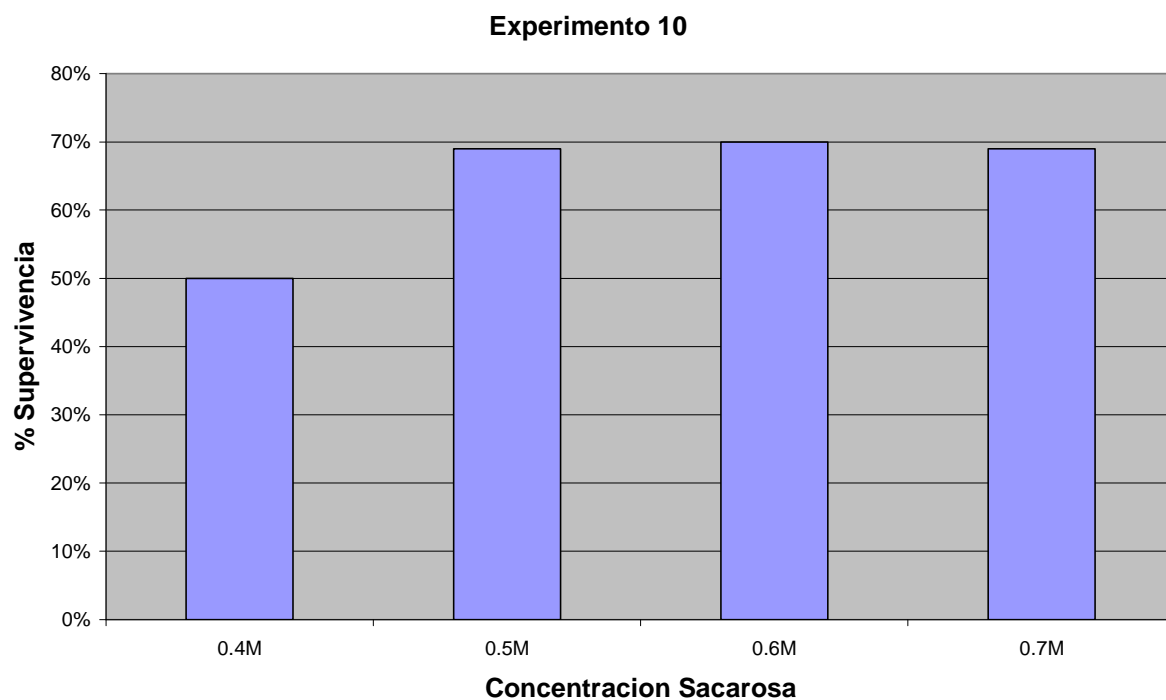


Figura 7. Resultados experimento 10 del proyecto.

En esta figura se muestran los resultados de supervivencia en relación a las concentraciones de sacarosa utilizadas en los medios de pre-tratamiento. Se puede observar que en la concentración 0.4M de sacarosa se obtuvo el porcentaje de supervivencia más bajo (50%), mientras que para las concentraciones 0.5M, 0.6M y 0.7M se obtuvieron porcentajes similares de supervivencia (70% aproximadamente).

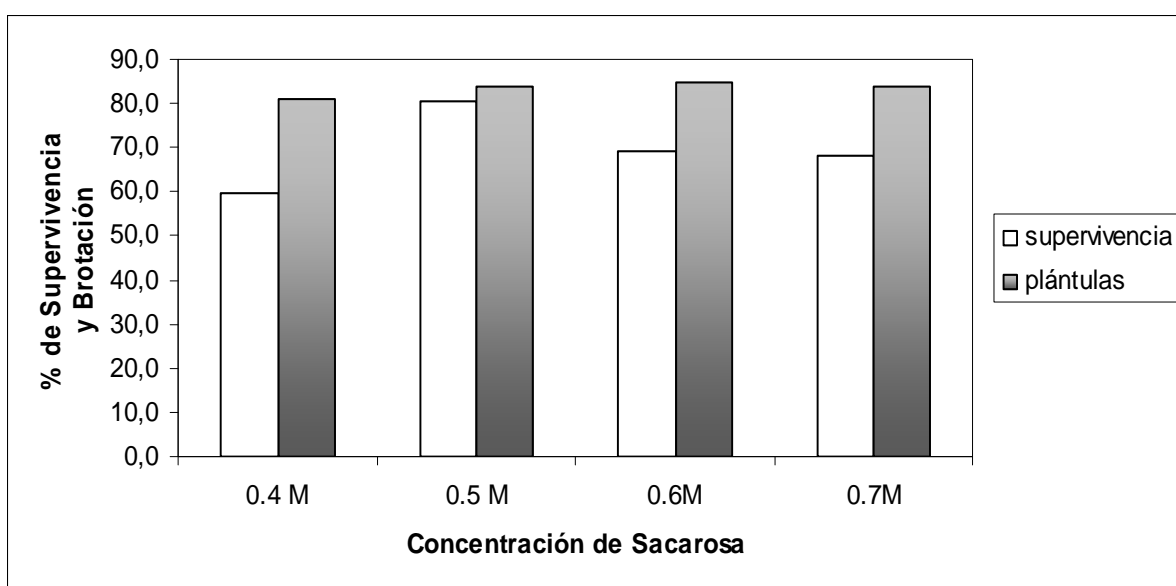


Figura 8. Resumen de resultados promedio para los 4 medios de pre-tratamiento exitosos en el proyecto.

En esta figura se puede ver que en la concentración de 0.5M se obtienen los mayores porcentajes de supervivencia (80%) y brotación (85%). También se observa que los porcentajes de brotación, en relación al porcentaje de sacarosa, son altos para las 4 concentraciones analizadas.



Figura 9. Tamaño de plantas para comenzar aclimatación
Se observa que las plantas cultivadas *in vitro* tiene una fisiología normal, presentan hojas grandes, tallos normales y raíces fuertes.



Figura 10. Tamaño de plantas listas para traspaso a bolsas

En esta figura se observan plantas de tres semanas después de ser sembradas en vasijas. Se observa que las plantas con hojas grandes y que han elongado su tallo, alcanzando una altura de 10 cm.



Figura 11. Plantas pequeñas aclimatadas exitosamente

En esta figura se muestra una planta de 5 cm. de altura que fue aclimatada con éxito. Se puede observar que tiene un tallo fuerte y hojas grandes.



Figura 12. Grupo de plantas en proceso de aclimatación en cuarto de cultivo
En esta figura se observan algunas plantas aclimatadas exitosamente. Se puede ver que se encuentran en bolsas negras con tierra y que presentan tallos fuertes y hojas grandes.



Figura 13. Planta de dos semanas de aclimatación

En esta figura se observa el aspecto de una planta en proceso de aclimatación. Esta planta tiene 11 cm de altura, hojas grandes y tallo fuerte.



Figura 14. Planta de tres semanas de aclimatación

En esta figura se observa una planta de tres semanas. Esta planta presenta un aspecto fuerte y tiene una altura de 12 cm.



Figura 15. Plantas muerta tras el proceso de aclimatación
En esta figura se observa una planta que no sobrevivió al proceso de aclimatación. Se puede ver que las hojas están marchitas y el tallo perdió firmeza debido a su delgadez.

15. Anexos

A continuación se presentan los resultados crudos de cada experimento, en donde se probaron diferentes variantes para la estandarización del protocolo de crioconservación para naranjilla.

Experimento 1			
Concentraciones sacarosa	VARIANTES		
	Incubación 4 °C	Incubación 25 °C	Total
	# explantes / # vivos	# explantes / # vivos	# explantes / # vivos
0,09M	6 / 0	4 / 0	10 / 0
0,3M	X*	4 / 0	4 / 0
0,4M	5 / 4	5 / 1	10 / 5
0,7M	4 / 1	5 / 3	9 / 4
1M	6 / 0	X*	6 / 0
Total	21 / 5	18 / 4	39 / 9

*Contaminación

Tabla 1. Resultados experimento No. 1

Experimento 2			
Concentraciones sacarosa	VARIANTES		
	Incubación 4 °C	Incubación 25 °C	Total
	# explantes / # vivos	# explantes / # vivos	# explantes / # vivos
0,09M	14 / 0	no se trató	14 / 0
0,3M	14 / 0	no se trató	14 / 0
0,4M	14 / 4	no se trató	14 / 4
0,7M	8 / 2	7 / 2	15 / 4
1M	14 / 0	no se trató	14 / 0
Total	64 / 6	7 / 2	71 / 8

Tabla 2. Resultados Experimento No. 2

Experimento 3			
Concentraciones sacarosa	VARIANTES		
	Medio con GA3	Medio sin GA3	Total
	# explantes / # vivos	# explantes / # vivos	# explantes / # vivos
0,4M	10 / 2	8 / 0	18 / 2
0,7M	6 / 4	5 / 2	11 / 6
Total	16 / 6	13 / 2	29 / 8

Tabla 3. Resultados Experimento No. 3

Experimento 4		
Concentraciones sacarosa	VARIANTES	
	Medio con GA3	Total
	# explantes / # vivos	# explantes / # vivos
0,4M	30 / 11	30 / 11
0,7M	55 / 40	55 / 40
Total	85 / 51	85 / 51

Tabla 4. Resultados Experimento No. 4

Experimento 5		
Concentraciones sacarosa	VARIANTES	
	Medio con GA3	Total
	# explantes / # vivos	# explantes / # vivos
0,4M	23 / 9	23 / 9
0,7M	31 / 0 *	31 / 0 *
Total		66 / 9

*Contaminación

Tabla 5. Resultados Experimento No. 5

Experimento 8			
Concentraciones sacarosa	VARIANTES		
	Yemas apicales	Yemas axilares	Total
	# explantes / # vivos	# explantes / # vivos	# explantes / # vivos
0.4M	8 / 5	4 / 0	12 / 5
0.5M	12 / 10	10 / 0	22 / 10
0.6M	13 / 9	7 / 0	20 / 9
0.7M	10 / 6	4 / 0	14 / 6
Total	43 / 30	25 / 0	68 / 30

Tabla 6. Resultados Experimento No. 8

Experimento 9		
Concentraciones sacarosa	VARIANTES	
	Yemas apicales	Total
	# explantes / # vivos	# explantes / # vivos
0.4M	20 / 13	20 / 13
0.5M	20 / 19	20 / 19
0.6M	20 / 14	20 / 14
0.7M	20 / 13	20 / 13
Total	80 / 59	80 / 59

Tabla 7. Resultados Experimento No. 9

Experimento 10		
Concentraciones sacarosa	VARIANTES	
	Yemas apicales	Total
	# explantes / # vivos	# explantes / # vivos
0.4M	20 / 10	20 / 10
0.5M	21 / 13	21 / 13
0.6M	20 / 14	20 / 14
0.7M	23 / 13	23 / 13
Total	84 / 51	84 / 51

Tabla 8. Resultados Experimento No. 10