

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
POSTGRADO DE AGRONOMÍA

USO DEL ACÍDO ACETILSALICÍLICO EN LA CONSERVACIÓN *in vitro* BAJO MÍNIMO
CRECIMIENTO DE DOS CLONES DE YUCA (*Manihot esculenta* CRANTZ) Y
DETERMINACION DE SU VIABILIDAD

Autor: José Ángel Gómez Llaca.

Tutora: Josefina Páez de Casares

MARACAY-VENEZUELA

Trabajo de Grado presentado como requisito final para optar al título de
Magister Scientiarum en Agronomía, orientación producción vegetal.

Prof^a. Josefina Páez de Cásares

Tutor

DEDICATORIA

A Dios todopoderoso, fuente de conocimiento e inspiración

A mis padres Angel y Marijose por haberme dado la vida

A Marta mi esposa por apoyarme en las buenas y en las malas

A Mariangel mi hija el lucerito que ha iluminado mi vida

AGRADECIMIENTOS

A Dios Todopoderoso, quien siempre me guió e iluminó a lo largo de estos años.

A mi madre Marijose, pilar fundamental y ejemplo a seguir sin quien no hubiese logrado esta meta.

A María Martiradonna de Gómez, quien ha estado a mi lado en los momentos buenos y malos y cuyo apoyo ha sido indispensable para lograr esta meta.

A Juan Pablo, mi hermano.

A la profesora Josefina Páez, guía inestimable en la elaboración de este trabajo.

A la profesora Catalina Ramis, por la gran ayuda brindada en el análisis de los datos de marcadores moleculares y en la elaboración del análisis de hipermetilación del ADN.

A Zulay Gutiérrez por su inestimable y desinteresada ayuda con los Marcadores Moleculares.

A Angélica Chávez, cuya ayuda fue imprescindible en todo momento dentro del laboratorio.

A la memoria de la Doctora Asia Yuseli Zambrano (Q.E.P.D.) por su ayuda en mi formación y trabajos iniciales en los marcadores moleculares.

A la profesora Judit García, por su colaboración desinteresada en el análisis estadístico para este trabajo.

A Pedro Zarraga por suministrar el material vegetal inicial.

A mis amigos Gianna Martiradonna y Maximiliano Méndez.

A la UCV... mi segunda casa.

A todos aquellos que de una u otra forma colaboraron conmigo e hicieron posible que hoy se cumpla esta meta.

Gracias

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTOS	IV
TABLA DE CONTENIDO	VI
ÍNDICE DE CUADROS	XI
ÍNDICE DE FIGURAS	XIV
ÍNDICE DE ANEXOS	XVI
RESUMEN	XVII
ABSTRACT	XVIII
CAPITULO I	1
INTRODUCCION	1
OBJETIVOS	5
<i>OBJETIVO GENERAL</i>	5
<i>OBJETIVOS ESPECIFICOS</i>	5
CAPITULO II	6
REVISION DE LITERATURA	6
1.1. GENERALIDADES DE LA YUCA (<i>Manihot esculenta</i> Crantz)	6
1.1.1. Origen	6
1.1.2. Taxonomía y características botánicas	8
1.2. REQUERIMIENTOS AGROECOLÓGICOS DE LA YUCA (<i>Manihot esculenta</i> Crantz)	9
1.2.1. Suelos	9
1.2.2. Requerimientos hídricos	10
1.2.3. Fertilización	10
1.2.4. Plagas	10
1.2.5. Enfermedades	11

1.3. PROPAGACIÓN DE LA YUCA (<i>Manihot esculenta</i>)	11
1.3.1. Propagación sexual.....	11
1.3.2. Propagación asexual <i>in vivo</i>	12
1.3.2.1. Estacas (propagación tradicional-comercial).....	12
1.3.2.2. Sistemas de propagación rápida de la yuca	12
1.3.2.2.1. Sistemas Hoja-yema.....	13
1.3.2.2.2. Brotes enraizados.....	13
1.3.3. Propagación asexual <i>in vitro</i>	14
1.3.3.1. Consideraciones generales	14
1.3.3.2. Cultivo de meristemas apicales	15
1.3.3.3. Cultivo de Ápices y Microestacas	15
1.3.3.4. Brotes múltiples o “roseta”	16
1.3.3.5. Aclimatación de plantas provenientes de cultivo de tejidos	17
1.4. CONSERVACION DE GERMOPLASMA	18
1.4.1. Métodos de conservación de germoplasma	20
1.4.1.1. Criopreservación.....	20
1.4.1.2. Conservación de germoplasma a tasas mínimas de crecimiento.....	21
1.4.1.3. Conservación de germoplasma a tasas mínimas de crecimiento empleando Ácido Acetilsalicílico.....	28
1.5. ESTUDIOS DE IDENTIDAD GENETICA EN MATERIALES CONSERVADOS <i>in vitro</i>	33
1.5.1. RAPDs y otros marcadores moleculares.....	34
1.5.2. Hipermetilación del ADN	37
CAPITULO III	41
MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
1.1. Ubicación	41
1.2. Material vegetal.....	41
1.3. Preparación del material vegetal.....	42
1.4. FASE I. IMPLANTACIÓN DE APICES CAULINARES.....	42

1.5. FASE II. CONSERVACIÓN DE GERMOPLASMA.	44
1.5.1. EXPERIMENTO I: Conservación <i>in vitro</i> bajo mínimo crecimiento de dos clones de yuca empleando Ácido Acetilsalicílico (AAS) en cinco concentraciones	44
1.5.2. EXPERIMENTO II: Conservación <i>in vitro</i> bajo mínimo crecimiento del clon CM 6740-7 de yuca empleando Ácido Acetilsalicílico (AAS) en nueve concentraciones	46
1.6. FASE III. VIABILIDAD.	49
1.6.1. EXPERIMENTO I: determinación de la viabilidad de dos clones de yuca conservados <i>in vitro</i> bajo mínimo crecimiento por siete meses empleando Ácido Acetilsalicílico (AAS)	49
1.6.2. EXPERIMENTO II: determinación de la viabilidad del clon CM 6740-7 de yuca conservado <i>in vitro</i> bajo mínimo crecimiento por siete meses empleando Ácido Acetilsalicílico (AAS)	50
1.7. FASE IV. PRUEBAS DE IDENTIDAD GENETICA.	51
1.7.1. Material vegetal.....	51
1.7.2. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL ADN.....	52
1.7.3. IDENTIDAD GENÉTICA A TRAVÉS DE RAPDs.....	53
1.7.3.1. Amplificación de las muestras.....	53
1.7.4. ANÁLISIS DE HIPERMETILACIÓN DEL ADN.....	55
CAPITULO IV	56
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	56
FASE I. IMPLANTACIÓN DE ÁPICES.....	56
1.1. Desarrollo aéreo	56
1.2. Desarrollo radical.....	57
1.3. Porcentaje de sobrevivencia	59
FASE II. CONSERVACIÓN DE GERMOPLASMA.....	61
1.1. EXPERIMENTO I: Conservación <i>in vitro</i> bajo mínimo crecimiento de dos clones de yuca empleando Ácido Acetilsalicílico en cinco concentraciones	61

1.1.1. Evaluación por muestras del desarrollo de los brotes en crecimiento en tubos de ensayo	61
1.1.2. Evaluación final por muestras del desarrollo de los brotes fuera de los tubos de ensayo	65
1.1.3. Porcentaje de sobrevivencia de las microestacas sometidas a conservación por siete meses.....	68
1.2. EXPERIMENTO II: Conservación <i>in vitro</i> bajo mínimo crecimiento del clon CM 6740-7 de yuca, empleando Ácido Acetilsalicílico en nueve concentraciones	70
1.2.1. Evaluación por muestras del desarrollo aéreo de los brotes en crecimiento en tubos de ensayo.....	70
1.2.2. Evaluación por muestras del desarrollo radical de los brotes en crecimiento en tubos de ensayo.....	75
1.2.3. Observación final destructiva.....	76
1.2.4. Porcentaje de sobrevivencia.....	78
FASE III. VIABILIDAD.	80
1.3. EXPERIMENTO I	80
1.3.1. Viabilidad a nivel de laboratorio.....	80
1.3.2. Viabilidad a nivel de vivero.....	81
1.3.3. Sobrevivencia a nivel de laboratorio y de vivero.....	82
1.4. EXPERIMENTO II	85
1.4.1. Viabilidad a nivel de laboratorio.....	85
1.4.2. Viabilidad a nivel de vivero.....	87
1.4.3. Sobrevivencia a nivel de laboratorio y de vivero	89
FASE IV. PRUEBAS DE IDENTIDAD GENÉTICA.....	91
1.5. Extracción y purificación del ADN.....	91
1.6. Identidad genética a través de marcadores moleculares RAPDs.....	91
1.6.1. EXPERIMENTO I	91
1.6.2. EXPERIMENTO II	98

1.7. Análisis de hipermetilación del ADN.	101
CAPITULO V	104
CONCLUSIONES	104
RECOMENDACIONES.....	108
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	110
ANEXOS	122

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 1: Iniciadores RAPDs empleados para detectar cambios genéticos inducidos por la conservación <i>in vitro</i> durante siete meses en yuca (<i>Manihot esculenta</i> crantz).	53
CUADRO 2: Medio de reacción empleado para la amplificación de los iniciadores RAPDs.	54
CUADRO 3: Programación del termociclador para la amplificación de los iniciadores RAPDs.	54
CUADRO 4: Valores promedios observados en ápices caulinares desarrollados <i>in vitro</i> provenientes de los clones Sardina 11 y clon CM 6740-7 a los 60 días de ser implantados.....	57
CUADRO 5: Valores observados de altura promedio del brote, numero promedio de hojas y mediana del vigor de brotes de yuca (<i>Manihot esculenta</i> Crantz) de los clones Sardina 11 y Clon CM 6740-7 conservados <i>in vitro</i> bajo mínimo crecimiento durante cuatro meses.	62
CUADRO 6: Valores observados de altura promedio del brote, numero promedio de hojas, mediana del vigor de brotes de yuca, peso fresco y seco de la raíz de yuca (<i>Manihot esculenta</i> Crantz) de los clones Sardina 11 y clon CM 6740-7 luego de finalizada la conservación bajo mínimo crecimiento por siete meses.	68
CUADRO 7: Efecto del AAS en la conservación <i>in vitro</i> durante siete meses sobre la sobrevivencia (%) de microestacas de los clones Sardina 11 y CM 6740-7 de yuca (<i>Manihot esculenta</i> Crantz).....	69
CUADRO 8: Diferentes observaciones de la parte aérea y radical de brotes de yuca (<i>Manihot esculenta</i> Crantz) del Clon CM 6740-7 conservados <i>in vitro</i> bajo mínimo crecimiento durante tres meses	72

CUADRO 9: Valores observados de altura promedio del brote, número promedio de hojas y número promedio de nudos en brotes de yuca (<i>Manihot esculenta</i> Crantz) del Clon CM 6740-7 conservados <i>in vitro</i> durante siete meses.....	78
CUADRO 10: Porcentaje de sobrevivencia del cultivo de microestacas de yuca (<i>Manihot esculenta</i> Crantz) clon CM 6740-7 conservadas <i>in vitro</i> por siete meses.	79
CUADRO 11: Valores observados en brotes de yuca (<i>Manihot esculenta</i> Crantz) de los clones Sardina 11 y CM 6740-7 luego de regenerados <i>in vitro</i> tras su conservación por siete meses.	81
CUADRO 12: Valores observados en brotes de yuca (<i>Manihot esculenta</i> Crantz) de los clones Sardina 11 y CM 6740-7 luego de regenerados <i>in vitro</i> y un mes de cultivo en vivero, tras su conservación por siete meses.	82
CUADRO 13: Porcentaje de sobrevivencia a nivel laboratorio y de vivero del cultivo de microestacas de yuca (<i>Manihot esculenta</i> Crantz) de los clones CM 6740-7 y Sardina 11 regeneradas <i>in vitro</i> por 2 meses, luego de conservación.	84
CUADRO 14: Diferentes valores observados en brotes de yuca (<i>Manihot esculenta</i> Crantz) del clon CM 6740-7 luego de regenerados <i>in vitro</i> tras su conservación por siete meses.....	86
CUADRO 15: Diferentes valores observados en brotes de yuca (<i>Manihot esculenta</i> Crantz) del clon CM 6740-7 luego de regenerados <i>in vitro</i> y un mes de cultivo en vivero, tras su conservación por siete meses.	88
CUADRO 16: Porcentaje de sobrevivencia a nivel laboratorio y de vivero del cultivo de microestacas de yuca (<i>Manihot esculenta</i> Crantz) del clon CM 6740-7 regenerado <i>in vitro</i> por dos meses, luego de conservación.....	90
CUADRO 17: Numero de bandas monomórficas, polimórficas y totales observadas en los iniciadores empleados para verificar la identidad genética de yuca conservada <i>in vitro</i> por siete meses.	92

CUADRO 18: Tamaño de las bandas en pares de base (pb) de cada una de las bandas RAPDs obtenidas para los siete iniciadores utilizados en el análisis de estabilidad genética de plantas de yuca (*Manihot esculentum*) regeneradas *in vitro*.93

CUADRO 19: Valores observados de digestión enzimática de dos clones de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) con las enzimas de restricción HpaII y MspI para determinar Hipermetilación del ADN, tras su conservación *in vitro* por siete meses.103

ÍNDICE DE FIGURAS

- FIGURA 1:** Número de raíces en relación a la altura del brote (mm) de plantas de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) de los clones Sardina 11 y Clon CM 6740-7, micropropagadas *in vitro* por dos meses.....58
- FIGURA 2:** Número de raíces en relación al número de hojas de plantas de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) de los clones Sardina 11 y Clon CM 6740-7, micropropagadas *in vitro* por dos meses.....59
- FIGURA 3:** Plantas de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) de los clones Sardina 11 y clon CM 6740-7 luego de siete meses de conservación *in vitro* con diferentes tratamientos de Acido Acetilsalicílico o testigo que empleó sacarosa y manitol en combinación.....63
- FIGURA 4:** Efecto del AAS luego de la conservación *in vitro* durante siete meses sobre la altura (mm), número de hojas y nudos de los clones Sardina 11 y clon CM 6740-7 de yuca (*Manihot esculenta* Crantz)66
- FIGURA 5:** Plantas de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) del clon CM 6740-7 luego de siete meses de conservación *in vitro* con diferentes tratamientos de Acido Acetilsalicílico o un testigo que empleó sacarosa y manitol en combinación.....73
- FIGURA 6:** Gel de agarosa al 3% mostrando patrón de bandas monomórficas y polimórficas producidas por el iniciador Y09 en los clones Sardina 11 y CM 6740-7 de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) luego de conservada por siete meses bajo mínimo crecimiento en presencia de ácido acetilsalicílico.....93
- FIGURA 7:** Dendrograma obtenido con siete iniciadores RAPD (UPMGA) basado en la distancia de Jaccard para la estabilidad genética de cuatro tratamientos de conservación *in vitro* en dos clones de yuca (*Manihot esculenta* Crantz).....96

FIGURA 8: Análisis por coordenadas principales (componentes) para la estabilidad genética de cuatro tratamientos de conservación *in vitro* en dos clones de yuca (*Manihot esculenta* Crantz).....97

FIGURA 9: Dendrograma obtenido con siete iniciadores RAPD (UPMGA) basado en la distancia de Jaccard para la estabilidad genética de seis tratamientos de conservación *in vitro* del clon CM 6740-7 de yuca (*Manihot esculenta* Crantz).99

FIGURA 10: Análisis por coordenadas principales para la estabilidad genética de seis tratamientos de conservación *in vitro* en el clon CM 6740-7 de yuca (*Manihot esculenta* Crantz).....100

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. Preparación del Ácido Acetilsalicílico.	123
ANEXO 2. Descripción del significado de la variable vigor del brote.	124
ANEXO 3. Observaciones de la variable vigor del brote de plantas de yuca (<i>Manihot esculenta</i> Crantz) conservadas <i>in vitro</i> bajo mínimo crecimiento con Ácido Acetilsalicílico (AAS).	125
ANEXO 4. Descripción del significado de la variable vigor de la raíz.	126
ANEXO 5. Vigor de la raíz de plantas de yuca (<i>Manihot esculenta</i> Crantz) conservadas <i>in vitro</i> bajo mínimo crecimiento con Ácido Acetilsalicílico.	127
ANEXO 6. Clorosis intervenal presente en plantas de yuca (<i>Manihot esculenta</i> Crantz) conservadas <i>in vitro</i> bajo mínimo crecimiento con Ácido Acetilsalicílico por siete meses.	128
ANEXO 7. Aclimatación en campo de plantas de yuca (<i>Manihot esculenta</i> Crantz) conservadas <i>in vitro</i> bajo mínimo crecimiento por siete meses.	129

RESUMEN

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz) es un importante cultivo de origen Americano eficiente en la conversión de la energía radiante solar en carbohidratos. La conservación *in vitro* de germoplasma por mínimo crecimiento ha probado ser útil en la preservación de recursos genéticos valiosos. Este trabajo tiene como objetivo evaluar el uso del ácido acetilsalicílico (AAS) en la conservación *in vitro* bajo mínimo crecimiento de dos clones de yuca y determinar posteriormente su viabilidad. Para ello se llevaron a cabo dos experimentos de conservación con una duración de siete meses. En el primer experimento se evaluaron en conjunto los clones Sardina 11 y CM 6740-7 con cinco concentraciones de AAS; además de dos testigos que se conservaron por estrés osmótico mediante una combinación de manitol y sacarosa. En el segundo experimento se evaluó el clon CM 6740-7 con nueve concentraciones de AAS y un testigo. Las variables evaluadas en ambos experimentos fueron: altura, vigor del brote, vigor de la raíz, número de nudos, hojas y brotes; analizándose mediante pruebas estadísticas de acuerdo al tipo de variable. En ambos experimentos se encontraron diferencias entre los tratamientos empleados. La mejor concentración de AAS para conservación de germoplasma de yuca es de $1 \times 10^{-5} \text{M}$ en el caso del primer experimento para ambos clones; mientras que esta misma concentración y una de $5 \times 10^{-6} \text{M}$ resultaron las mejores en el segundo experimento; sin embargo, con el clon CM 6740-7 no hubo tendencia a superar al Sardina 11 en sobrevivencia. La viabilidad se vio afectada en los tratamientos testigos y las concentraciones más altas de AAS. Se confirmó la estabilidad genética de los materiales conservados en ambos experimentos mediante análisis de RAPDs. Además, se realizaron pruebas de metilación del ADN, donde solo uno de los testigos presentó Hipermetilación. En conclusión, el AAS en concentraciones adecuadas para cada clon, puede ser utilizado en la conservación *in vitro* de germoplasma de yuca en sustitución de medios con estrés osmótico.

Palabras claves: ácido acetilsalicílico, bancos de germoplasma, conservación *in vitro*, Hipermetilación del ADN, *Manihot esculenta*, mínimo crecimiento, RAPDs.

ABSTRACT

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is an important crop of American origin, efficient in converting solar radiant energy into carbohydrates. The *in vitro* minimum growth conservation of germplasm has proven useful in the preservation of valuable genetic resources. This study aims to evaluate the use of acetylsalicylic acid (ASA) for the conservation *in vitro* under minimum growth of two clones of cassava and to determine its viability. For this purpose two experiments of conservation were conducted for seven months. In the first experiment there were evaluated jointly clones Sardina 11 and CM 6740-7 with five concentrations of ASA, and two controls who were conserved by osmotic stress through a combination of mannitol and sucrose. In the second experiment is was evaluated the clone CM 6740-7 with nine concentrations of ASA and a control. The variables recorded in both experiments were: height, shoot vigor, root vigor, nodes number, leaves and shoots; they were analyzed by statistical tests in accordance to variable type. In both experiments, differences were found among treatments applied. The best ASA concentration for conservation of cassava germplasm was $1 \times 10^{-5} \text{M}$ in the first experiment for both clones, whereas the same concentration, and $5 \times 10^{-6} \text{M}$ were better in the second experiment, however, with the clone 6740-7 there was a tendency of not to exceed the Sardina 11 regarding survival. The viability was affected in control treatments and the highest concentrations of ASA. It was confirmed the genetic stability of the materials below conservation in both experiments by RAPD analysis. In addition, tests of DNA methylation were carried out, where only one of the controls presented hypermethylation. In conclusion, the ASA in appropriate concentrations for each clone, can be used in the *in vitro* conservation of cassava germplasm in replacement of media with osmotic stress.

Keywords: acetylsalicylic acid, DNA hypermethylation, germplasm, *in vitro* conservation, *Manihot esculenta*, minimum growth, RAPDs.

CAPITULO I

INTRODUCCION

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz) es un cultivo originario de la zona tropical de América, con gran importancia dado su elevado aporte energético y eficiencia en la conversión de energía radiante solar en carbohidratos, por lo que es considerada una panacea en la lucha contra el hambre a escala mundial, ya que provee de alimento a unas 800 millones de personas. Es un cultivo apreciado por su fácil y amplia adaptabilidad a diversos ambientes ecológicos, incluida su facilidad de producir con rendimientos aceptables en suelos poco fértiles, el poco trabajo que requiere, la facilidad con que se cultiva y su gran productividad. Se cree que fue domesticada hace unos 4000 años en lo que hoy día se conoce como la cuenca del lago de Maracaibo en Venezuela por los aborígenes Caribe y Amazónicos de la zona, quienes se encargaron de extenderlo a lo largo del continente. En tiempos de la colonia fue llevada por españoles y portugueses a sus diferentes colonias en África y Asia, con lo que se distribuyó por todas las zonas tropicales del mundo. En el siglo XIX fue considerado por ocupar un sitio de honor entre los cultivos alimenticios, superando incluso al trigo, del cual se decía en aquella época que rendía seis veces menos que la yuca, siendo sin embargo los costos de producción de la yuca menores (Díaz, 1877; Montaldo y Montilla, 1996).

Su cultivo se realiza principalmente para consumir sus raíces tuberosas, las cuales son ricas en carbohidratos (almidón), estas se pueden consumir frescas pero cocinadas, sin embargo en África y Asia se aprovechan también sus hojas, las cuales aportan principalmente proteínas, minerales y vitaminas. De esta manera se observa la gran importancia que tiene la yuca en la lucha contra la desnutrición en países tropicales donde se presentan con frecuencia hambrunas y donde el acceso a ciertas

vitaminas como el caso de la vitamina A en África, se ve seriamente comprometido (Ospina y Ceballos, 2002). También tiene un uso muy importante y difundido en la alimentación animal debido a su alto valor energético, pudiendo ser procesadas sus raíces hasta obtenerse trozos secos o pellets. De esta manera, se le ha podido incorporar en la dieta de aves, porcinos, peces y otros animales domésticos. En la industria se usa como materia prima en la elaboración de diversos productos; un ejemplo de esto es en la elaboración de chips similares a los de papa, sin embargo, es en la extracción de almidones y alcoholes donde se ha usado en mayor escala desde hace tiempo (Buitrago, 1990).

Este cultivo se propaga comúnmente mediante estacas de tallo, sin embargo esta es una forma muy eficaz de diseminar enfermedades y plagas; además, las tasas de multiplicación por esta vía son muy bajas (González, 1999). La multiplicación *in vitro* permite obtener plantas en las mejores condiciones fitosanitarias, además de producir una cantidad de plantas considerablemente superior a la que pudiera obtenerse a través de estacas de madera dura (de un ápice pueden obtenerse cientos de plantas), en un espacio reducido y muy parecido al material parental, permitiendo además el intercambio genético entre naciones, regiones y localidades en forma segura desde el punto de vista de las plagas y enfermedades (Páez, 1984; Albarran *et al.*, 2003).

El mejoramiento genético de la yuca demanda contar con una gran fuente de variabilidad, donde puedan ubicarse genes de interés para una característica que se desee optimizar. Los bancos de germoplasma son creados con esta finalidad. Sin embargo, la manutención de un banco de germoplasma *ex situ* en campo resulta muy costoso, además de estar siempre presente un riesgo de destrucción por plagas, patógenos o desastres naturales; en este sentido, cultivar plantas *in vitro* bajo mínimo crecimiento ha probado ser útil en la conservación de este germoplasma (Roca y Mroginski, 1991).

Para conservar germoplasma *in vitro* por largo tiempo es necesario transferirlos periódicamente a medio de cultivo fresco; sin embargo, esto aumenta las probabilidades de pérdida de material por contaminación, de manera tal, que uno de los objetivos de la investigación en conservación *in vitro* de germoplasma es lograr alargar estos periodos entre transferencias, para evitar esta limitante. (González, 1999).

Una forma frecuentemente empleada para lograr desacelerar el crecimiento de plantas mantenidas *in vitro* con fines de conservación de germoplasma, consiste en someterlas a estrés osmótico. Sin embargo, se ha demostrado que puede ocurrir hipermetilación del ADN, lo que podría traer como consecuencia que se generen mutaciones en el genoma de la planta o por lo menos cambios fenotípicos muy grandes que disminuyan grandemente la viabilidad de las plantas al llevarlas nuevamente al campo. Esto es indeseable al preservar material genético en bancos de germoplasma *in vitro*, pues lo que se busca es que el material así preservado no posea ningún tipo de cambio y sea fácil de aclimatar en su uso por los mejoradores (Harding, 1994).

Lo anteriormente expuesto evidencia la necesidad de investigar en alternativas viables diferentes a la conservación mediante estrés osmótico. Una opción lo constituye la utilización de retardantes del crecimiento; entre los cuales, el Ácido Acetilsalicílico (AAS) se ha venido usando recientemente en una amplia gama de cultivos agámicos como la papa, el chayote y la yuca entre otros. (López *et al.*, 1998b).

Para constatar que los materiales conservados *in vitro* sean estables desde el punto de vista genético se hace necesario llevar a cabo un seguimiento cuidadoso para verificar que no se estén produciendo mutaciones u otros tipos de cambios como consecuencia de la propia técnica de preservación. En este sentido, los marcadores moleculares se plantean como una herramienta altamente poderosa que permite

verificar con gran precisión la estabilidad genética del germoplasma conservado (Pardo, 2007).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL.

Estudiar el efecto del Ácido acetilsalicílico en la conservación *in vitro* de dos clones de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) y la posterior determinación de su viabilidad y estabilidad genética en laboratorio.

OBJETIVOS ESPECIFICOS.

Determinar las mejores condiciones de cultivo *in vitro* para inducir mínimo crecimiento en yuca (*Manihot esculenta* Crantz).

Determinar la dosis de Ácido Acetilsalicílico mas adecuada para inducir mínimo crecimiento en plantas de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) cultivadas *in vitro*.

Verificar la estabilidad genética de las plantas cultivadas *in vitro* bajo mínimo crecimiento.

Evaluar el efecto del uso del Ácido Acetilsalicílico en la regeneración de plantas provenientes de conservación *in vitro* bajo condiciones de mínimo crecimiento.

CAPITULO II

REVISION DE LITERATURA

1.1. GENERALIDADES DE LA YUCA (*Manihot esculenta* Crantz)

La yuca es uno de los cultivos mejor adaptados a las condiciones tropicales, ya que tiene un ciclo relativamente largo que le permite aprovechar la alta energía radiante solar a lo largo del año, además de presentar una considerable resistencia a la sequía, el cual es otro de los factores limitantes de los agroecosistemas tropicales. El valor de la producción de la yuca está incluido en los diez más importantes entre los cultivos tropicales. Provee considerables cantidades de carbohidratos para consumo humano o animal a bajo precio y suele cultivarse en suelos pobres por campesinos de escasos recursos económicos y poca tecnología, por lo que tiene un alto valor social y una gran importancia en el combate del hambre. Se ha convertido también en un cultivo agroindustrial de amplio desarrollo a nivel mundial (Montaldo y Montilla, 1996).

Los principales productores de yuca en el mundo para el año 2007 son: Nigeria (34.410.000 TM) Tailandia (26.915.541 TM) e Indonesia (19.988.058 TM), ocupando Venezuela el puesto Número 34 en el mundo. Mientras que en América los primeros lugares son ocupados por Brasil (26.541.200 TM), Paraguay (5.100.000 TM), Colombia (1.287.864 TM), Perú (1.158.042 TM), Cuba (490.480 TM) y Venezuela (416.914 TM) (FAOSTAT, 2009).

1.1.1. Origen

A pesar de ciertos desacuerdos en cuanto a la taxonomía de la yuca, se tiene claro que su origen se centra en Suramérica, y más específicamente en los bosques

tropicales de Brasil, Perú, Surinam, Bolivia, Guyana y Venezuela. Se reconocen tres subespecies: *Manihot esculenta* subsp. *esculenta*, que incluye todos los clones cultivados. *Manihot esculenta* subsp. *peruviana* que puede encontrarse entre el este de Perú y el oeste de Brasil. Y finalmente *Manihot esculenta* subsp. *flabellifolia*, que muestra una distribución mas amplia que abarca desde el céntrico estado Brasileño de Goias, hasta la Amazonía Venezolana (Allem, 1994).

En un estudio llevado a cabo para determinar el origen y la filogeografía del cultivo, se utilizó La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para estudiar las relaciones entre 212 individuos examinados. Se concluyó que el cultivo parece haberse originado de poblaciones de plantas de la subespecie *flabellifolia* en la cuenca del Amazonas (Olsen, *et al.*; 1999).

Evidencias arqueológicas apuntan a que la yuca fue cultivada en la localidad conocida como rancho peludo, en la cuenca del lago de Maracaibo aproximadamente en el 2700 A.C.; evidenciándose por restos de budares, empleados en la preparación de la yuca, por lo que es en esta localidad donde se sitúa su origen de domesticación (Montaldo *et al.*, 1985).

Sin embargo, cuando se emplearon microsátélites para determinar el origen de la domesticación de la yuca, se llegó entre otras conclusiones a que la misma fue domesticada en el borde de la cuenca sur del Amazonas. Para este estudio se emplearon 220 individuos representando 20 poblaciones del cultivo, 27 poblaciones de parientes cercanos a la yuca (*M. esculenta* subsp. *flabellifolia*) y seis poblaciones de especies potencialmente hibridizables con la yuca (*M. pruinosa*) (Olsen y Schaal, 2001).

1.1.2. Taxonomía y características botánicas

La yuca pertenece al reino Plantae, división Angiospermae, clase Dicotyledoneae, subclase Archyclamydeae, orden Geraniales, suborden Euphorbiineae, familia euphorbiaceae, esta cuenta con aproximadamente 7200 especies, las cuales están caracterizadas por un notable desarrollo de los vasos laticíferos, que son los responsables de secretar una sustancia lechosa característica de esta familia de plantas. Las plantas de esta familia pueden ser árboles, arbustos o hierbas. Dentro de ella existen plantas de interés agrícola como la yuca, el caucho y el ricino; otras son importantes por ser malezas, ornamentales e incluso por su valor medicinal (Badillo *et al.*, 1985).

El genero *Manihot* se extiende desde el sur de los Estados Unidos hasta el norte de Argentina. En forma natural solo se les encuentra en el continente Americano. El genero *Manihot* cuenta con 98 especies, de las que solamente *Manihot esculenta* es cultivada (Ospina y Ceballos, 2002).

La yuca posee tallos cilíndricos de hasta 6 cm de diámetro de colores gris-plateado, morado o amarillo-verdoso. En el nudo se inserta el pecíolo de la hoja, una yema protegida por una escama y dos estipulas. En vista de que la yuca es una especie de propagación asexual el tallo reviste una gran importancia ya que de el depende el próximo ciclo de cultivo. Las hojas de la yuca son caducas, su número, capacidad fotosintética y longevidad son características varietales y a su vez están influidas por las condiciones ambientales. Las hojas son simples y lobuladas, el numero de lóbulos oscila entre 3 y 9 (Ospina y Ceballos, 2002).

El sistema radical de la yuca es el órgano comercial del cultivo. Se caracteriza por su elevada capacidad para almacenar almidón. Si la planta proviene de semillas, se

produce una raíz principal, que es la primera en volverse reservante seguida de raíces secundarias, que pueden o no ser reservantes. Si la planta viene de estacas, entonces todo el sistema radical es secundario y proviene de la cicatriz del corte de la estaca o de las yemas que quedaron bajo suelo. La densidad del sistema radical es baja, pero posee una alta penetración, lo que le confiere resistencia a la sequía (Ospina y Ceballos, 2002).

Es bastante común clasificar a los diferentes clones de este cultivo con base en su precocidad de cosecha; de esta manera se suelen nombrar clones de ciclo corto aquellos cuya época de cosecha se ubica entorno a los ocho meses (clon Sardina 11), de ciclo intermedio entre ocho y doce meses (clon CM 6740-7) y por último los clones de ciclo largo que se cosechan luego de doce meses (Zarraga, 2009; Marin, 2007).

1.2. REQUERIMIENTOS AGROECOLÓGICOS DE LA YUCA (*Manihot esculenta* Crantz)

1.2.1. Suelos

Al igual que todos los cultivos, la yuca requiere de suelos fértiles, con buen drenaje, de pH neutro y con buena retención de humedad. Sin embargo, es bajo condiciones extremas de suelos donde la yuca expresa mejor todo su potencial, ya que se pueden obtener altos rendimientos en suelos muy pobres. Los suelos deberán tener una alta porosidad que garantice una buena aireación de la zona radical. La yuca presenta una alta tolerancia a la acidez pudiendo no disminuir los rendimientos aún en suelos con pH tan bajos como 4,3 (Adams y Contreras, 1996).

1.2.2. Requerimientos hídricos

La yuca puede producir con rendimientos aceptables bajo un régimen de precipitaciones que oscile entre 500 hasta 2000 mm al año. Esto indica que el cultivo se adapta muy bien a una gran cantidad de regiones tropicales y subtropicales. Sin embargo, la alta variabilidad de los rendimientos en raíces reservantes en las diferentes localidades en Venezuela hace necesario que se realicen ensayos para determinar en cada localidad los clones mas adecuados en función de la variable precipitación (Garcia y Montaldo, 1971).

1.2.3. Fertilización

Aún cuando la yuca tiene altos rendimientos en suelos pobres, es necesario manejar adecuadamente los niveles de nutrimentos del suelo para aportarle las mínimas cantidades de los mismos y lograr los mejores rendimientos (Adams y Contreras, 1996).

1.2.4. Plagas

Estudios realizados demuestran que los insectos pueden causar perdidas en el rendimiento de raíces y en la producción de material de siembra; sin embargo, se ha establecido que la yuca puede ser mas tolerante al ataque de plagas que otros cultivos debido a la falta de periodos críticos de producción (Bellotti, 1996). Las principales plagas que afectan al cultivo de la yuca son: los trips, los acaros de la yuca, la mosca de las frutas, el cachudo de la yuca, el taladrador del tallo de la yuca, la chinche de encaje y el barrenador de los brotes de la yuca (Marcano, 1996).

1.2.5. Enfermedades

La yuca es afectada por gran cantidad de patógenos, entre los que destacan las bacterias, hongos, virus y nematodos; pudiendo ocasionar importantes disminuciones en los rendimientos. El añublo bacteriano de la yuca, la bacteriosis del tallo de la yuca, la mancha parda y el añublo pardo fungoso destacan entre algunas de las enfermedades mas importantes en el cultivo de la yuca (Hernandez, 1996).

1.3. PROPAGACIÓN DE LA YUCA (*Manihot esculenta*)

1.3.1. Propagación sexual

La semilla es el medio habitual de propagación sexual en la yuca; sin embargo, posee poca importancia para la multiplicación comercial del cultivo, debido a los altos niveles de heterocigosidad del mismo este se prefiere multiplicar de manera asexual mediante estacas. No obstante, la propagación de tipo sexual tiene importantes implicaciones en fitomejoramiento, ya que es a través del cruce sexual entre diferentes plantas como pueden obtenerse cultivares superiores o mejorados (Ospina y Ceballos, 2002).

En un reciente estudio llevado a cabo por Nassar *et al.* (2000) se lograron insertar genes de *Manihot neusana* a *Manihot esculenta*, mediante hibridización para lograr apomixis en yuca. La apomixis consiste en la formación de semillas sin que ocurra la fertilización, por lo que las plantas provenientes de dichas semillas poseerían la misma carga genética que los padres, constituyéndose en una forma de propagación clonal alternativa a la usada actualmente y que consiste en el corte de estacas.

1.3.2. Propagación asexual *in vivo*

En el cultivo de la yuca la propagación de tipo asexual es la forma habitual de multiplicar las plantas para su producción. Normalmente se emplean estacas, las cuales se cortan y se tratan de manera apropiada, sin embargo también se han empleado otros métodos.

1.3.2.1. Estacas (propagación tradicional-comercial)

Las estacas son secciones de tallo que contienen una o más yemas capaces de brotar y dar lugar a una nueva planta, debido a que la nueva planta proviene de la división mitótica y no interviene la meiosis, se considera este tipo de propagación de tipo asexual (Hartman y Kester, 1994).

Las estacas deben reunir ciertas características que le confieran la calidad necesaria como material de propagación. Deben ser leñosas, y poseer un adecuado estado de madurez, la cual se consigue en plantas con edades de entre 8 y 14 meses. Deben poseer una longitud de unos 20 cm, donde podrán encontrarse de cinco a siete yemas por estaca, el cual es un número adecuado. También deben tomarse en cuenta otras variables, tales como: diámetro de la estaca, velocidad de brotación de la variedad o del clon, almacenamiento, etc. Cabe resaltar que las estacas son fuente de diseminación de plagas y enfermedades, por lo que se deberá tener especial cuidado en este aspecto (Mantilla, 1996).

1.3.2.2. Sistemas de propagación rápida de la yuca

Para la producción de grandes cantidades de semilla de yuca en buenas condiciones fitosanitarias, el centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) en

conjunto con otros centros de investigación han desarrollado variós métodos de propagación rápida de la yuca para usarse en complemento con planes de multiplicación masiva *in vitro* o en programas de producción de semilla certificada (Mantilla, 1996).

1.3.2.2.1. Sistemas Hoja-yema

En este sistema se cortan una yema y una hoja, luego es tratada adecuadamente y colocada a enraizar en bandejas con sustrato adecuado (arena), bajo un nebulizador y en cámara húmeda. Una vez las plantas han enraizado y se han seleccionado, son sometidas a una aclimatación bajo condiciones controladas y finalmente llevadas al campo. De esta manera, en un espacio de unos 30 metros cuadrados, pueden obtenerse unas 10.000 plantas en unos 30 días a partir de 100 plantas. Los requerimientos de mano de obra e infraestructura son elevados, así como la especialización que debe tener el personal involucrado (Mantilla, 1996).

1.3.2.2.2. Brotes enraizados

Partiendo de una planta adulta (8 a 14 meses de edad) se cortan de ella estacas de dos nudos. En promedio pueden obtenerse de cada estaca ocho brotes, lo que implica que una sola planta podrá producir unos 1200 brotes. Luego que estos brotes son cortados, posteriormente se colocan en agua para que ocurra el enraizamiento. Una vez enraizadas las plantas se pueden colocar en recipientes intermedios o ir directamente a campo. De esta forma pueden obtenerse de 12.000 a 24.000 estacas comerciales de 20 cm al año por planta adulta, lo cual es muy superior a las 100 a 400 estacas que pueden obtenerse por medios tradicionales (Mantilla, 1996).

1.3.3. Propagación asexual *in vitro*

1.3.3.1. Consideraciones generales

El cultivo de tejidos puede definirse como un conjunto de técnicas que permiten cultivar en condiciones asépticas órganos, tejidos, células y protoplastos vegetales en un medio nutritivo de composición química definida. Estas técnicas se emplean con una gran cantidad de objetivos que abarcan desde la obtención de plantas libres de patógenos, pasando por la propagación masiva de plantas, el mejoramiento genético por mutagénesis y la ingeniería genética hasta la conservación de germoplasma valioso (Miranda y Smith, 2001).

Las técnicas de cultivo de tejidos han contribuido en los últimos veinte años con el desarrollo de cultivos en muchas especies vegetales de gran importancia agrícola. Entre estas técnicas destaca la micropropagación que puede ser empleada cuando se necesita multiplicar algún material promisorio de una determinada especie, con la ventaja adicional de prevenirse la diseminación de plagas y algunas enfermedades, de una generación a otra y obtenerse un número elevado de plantas en poco espacio, menos tiempo y asegurándose la estabilidad genética (Miranda y Smith, 2001).

La yuca puede ser micropropagada partiendo de diversos órganos, entre los que destacan meristemas, yemas axilares, yemas apicales, y microestacas; siendo estas últimas de fácil obtención con resultados satisfactorios en la multiplicación de la planta (Miranda y Smith, 2001).

1.3.3.2. Cultivo de meristemas apicales

El meristemo apical es el tejido más próximo al primordio foliar más joven del tallo y tiene forma de pequeña cúpula con una longitud de 0.1 mm. Es responsable de la formación continua de los tejidos primarios. Cuando es correctamente utilizado, es un método excelente para producir plantas libres de patógenos a partir de plantas infectadas. Se cree que debido a que los haces vasculares no están bien desarrollados en esta zona, los virus y otras enfermedades sistémicas tienen dificultades para desplazarse hasta esa parte y por lo tanto, al extraerla e implantarla a medio aséptico la nueva planta se regenera libre de estas enfermedades, si esta técnica es combinada con termoterapia y se realiza un seguimiento mediante pruebas frecuentes de detección de virus los resultados son aún más satisfactorios (CIAT, 1980; Albarran *et al.*, 2003).

1.3.3.3. Cultivo de Ápices y Microestacas

Las microestacas son conocidas también con el nombre de segmentos nodales o estacas de un solo nudo, y como su nombre lo indica son secciones de tallo de aproximadamente 1 cm con un solo nudo o yema que se cultivan en un medio de cultivo adecuado. Esta técnica de cultivo puede complementar a la técnica de brotes múltiples o puede usarse sola, seccionándose repetidas veces una planta cultivada *in vitro* y que previamente ha sido obtenida por cultivo de ápices caulinares, los cuales al crecer e ir formando nudos, son seccionados en segmentos de tallos que contienen una sola yema axilar. De esta forma pueden obtenerse entre tres a cinco plantas al mes (Paez, 1984; Roca y Mroginski, 1991; Albarran *et al.*, 2003).

Los ápices meristemáticos pueden ser cultivados con varios fines, entre los que destacan la multiplicación masiva de plantas y el saneamiento de enfermedades. Para

cultivar los ápices, se eliminan las hojas y foliolos mas jóvenes, procediendo a seccionarse el ápice a un tamaño de 1 mm aproximadamente, para luego colocarse en un medio de cultivo apropiado a los fines que se persigan, en el caso de procurarse “roseta” o brotes múltiples, el medio de cultivo tendrá unas propiedades diferentes a si lo que se persigue es el desarrollo de brotes únicos (Míreles y Páez, 1984).

En yuca también se ha venido usando la técnica de microestacas para su multiplicación con gran éxito. Esto ha sido impulsado por el hecho de que es un cultivo de propagación asexual con unas tasas de multiplicación bajas. El cultivo de microestacas permite la multiplicación rápida de las plantas, las cuales son fácilmente aclimatables. Por otro, lado en Venezuela la carencia de semilla de yuca en condiciones apropiadas hace imperante la necesidad de poner a disposición de los agricultores unas cantidades suficientes de plantas en optimas condiciones fitosanitarias (Albarran *et al.*, 2003).

En un estudio llevado a cabo por Páez (1984) se probó el efecto de cuatro marcas comerciales de agar sobre la formación de brotes foliares de dos clones de yuca (*M. esculenta* Crantz), al implantar ápices de 1 mm de largo en medio de cultivo con las sales básicas de Murashige y Skoog (1962). En ambos clones se obtuvo una mejor respuesta en cuanto a altura del brote y numero de raíces al usar agar Purificado[®], sin embargo con el Phytagar[®] se obtuvo buena respuesta de los brotes, aún cuando no superó en altura al Purificado[®] y presentó menor diámetro del callo basal y menor numero de raíces, características buscadas por el investigador.

1.3.3.4. Brotes múltiples o “roseta”

Los brotes múltiples se obtienen al romper la dominancia apical de los primordios foliares del ápice caulinar mediante el uso de altas concentraciones de

Benziladenino Purina (BAP), de esa forma, brotan simultáneamente gran cantidad de yemas dando lugar a una estructura denominada por algunos “roseta”. Esta última contiene gran cantidad de yemas axilares que cuando alcanzan el tamaño apropiado pueden ser multiplicados por la técnica de microestacas para producir una enorme cantidad de plantas, que en un año pueden llegar al millón, cifra esta muy superior a las aproximadamente treinta estacas por planta que pueden obtenerse por las técnicas tradicionales de multiplicación de la yuca a través de estacas de tallo (Roca y Mroginski, 1991).

En este sentido Míreles y Páez (1984) realizaron una serie de experimentos conducentes a la formación de “roseta” en yuca partiendo de ápices caulinares. Estos investigadores usaron las sales básicas de Murashige y Skoog (1962), a las cuales se les modificó el contenido de los componentes orgánicos, llegando a la conclusión de que la inducción a “roseta” ocurrió a la séptima semana, los ápices de mayor tamaño presentaron mayor porcentaje de inducción y mayor vigor.

1.3.3.5. Aclimatación de plantas provenientes de cultivo de tejidos

Para que el cultivo de tejidos sea exitoso no basta con obtener grandes cantidades de plantas, también es imperativo que cuando se deseen sacar estas plantas de nuevo al campo, sean capaces de regenerarse exitosamente. En este sentido se han hecho gran cantidad de trabajos. En un estudio se evaluó el efecto que tenía la edad de la emergencia *in vitro* de las raíces, substratos y especie utilizada en la capacidad de aclimatación de plantas provenientes de cultivo de tejidos al sacarlas al umbráculo. Se evaluaron las especies *kielmeyera coreacea*, *Manihot esculenta*, *Ipomoea batatas* y *Rubus idaeus*; así como tres edades y cuatro sustratos. Se concluyó que en el caso de la sobrevivencia existe una relación directa con la especie, de todas las especies fue *M.*

esculenta la que presentó mayores dificultades para aclimatarse debido a su gran área foliar (Tadeu *et al.*, 1995).

Se logró aumentar de manera considerable la sobrevivencia y desarrollo de plántulas de yuca provenientes de cultivo *in vitro* mediante la modificación del protocolo de cultivo y la inoculación con micorrizas. Un 90% de enraizamiento *in vitro* y un 75% de sobrevivencia luego de la fase de aclimatación fue logrado. Al inocular el sustrato para aclimatación con *Glomus deserticola* se incrementó la sobrevivencia y la tolerancia al estrés del transplante (Azcón *et al.*, 1997).

1.4. CONSERVACION DE GERMOPLASMA

Las prácticas agrícolas modernas ocasionan que la variabilidad genética de los cultivos haya ido disminuyendo en forma gradual, esto trae como consecuencia que los recursos genéticos valiosos se pierdan. La necesidad de contar con fuentes de resistencia a plagas y enfermedades, así como otras características de interés agronómico justifican la disponibilidad y preservación de colecciones de germoplasma *in situ* y *ex situ* (Roca, 1980).

El almacenamiento de germoplasma por periodos de tiempo largos es costoso. Se requiere trabajar mucho aún para lograr que los procedimientos de almacenamiento sean más eficientes y baratos. El germoplasma puede ser almacenado empleando diversas estructuras vegetales: semillas, polen, órganos vegetativos en cultivos perennes de ciclo corto y plantaciones en campo para cultivos perennes de ciclos largos (Roca, 1980).

Por otro lado, es imperativo que cualquier método de almacenaje o conservación de germoplasma garantice pérdidas mínimas y una máxima estabilidad

genética. En muchas plantas, las semillas cumplen con estos requisitos, estas pueden permanecer viables incluso por varias décadas. Aún cuando poseen una vida menor que las semillas, puede usarse el polen en ciertos casos para preservar genes de interés (Roca, 1980).

Los cultivos que se propagan en forma vegetativa requieren que se preserve a toda costa su alta heterozigosidad, la cual puede perderse a través de la reproducción sexual. Sin embargo, en la mayoría de los cultivos clónales, la manutención de germoplasma a través de órganos vegetativos requiere de continuo cultivo en campo, lo que se traduce en grandes labores con un consiguiente elevado costo, además del siempre presente riesgo de pérdidas de materiales valiosos por ataque de plagas y enfermedades o por sucesos climáticos desastrosos (Roca, 1980).

Las potencialmente altas tasas de multiplicación a través de cultivo de tejidos, adicionado al hecho de no poseer problemas de plagas y enfermedades y al poco espacio requerido lo hacen una técnica factible para conservar todo tipo de cultivos de propagación vegetativa (Roca, 1980).

Al cultivar un material *in vitro*, se está incurriendo en una forma de conservación de germoplasma. Sin embargo, lo impráctico de mantener una gran cantidad de cultivos en esta forma es una desventaja. Estos cultivos normalmente requieren transferencias con intervalos de unas pocas semanas, de lo contrario, sufrirán una senescencia y eventualmente morirán. Con cada transferencia existen riesgos por pérdidas debidas a error humano o contaminaciones microbianas. Algunos cultivos traen consigo un pequeño pero no insignificante riesgo de inestabilidad genética que se acrecienta con las sucesivas generaciones. De manera tal, que los protocolos de multiplicación deben ser modificados y ajustados para permitir un

almacenamiento satisfactorio, tomando en cuenta las anteriores condiciones (Withers *et al.*, 1990).

1.4.1. Métodos de conservación de germoplasma

1.4.1.1. Criopreservación

La criopreservación o crioconservación consiste en la completa suspensión de todas las actividades metabólicas de un explanta mediante el uso de temperaturas ultra bajas de alrededor de -196°C que es la temperatura del nitrógeno líquido; sin embargo también puede someterse al explanta a desecación parcial, bajo nivel de oxígeno o baja presión. Los explantas que se usan para la crioconservación son muy variados, siendo posible utilizar ápices caulinares, meristemas, anteras, embriones, protoplastos, así como callos, suspensiones celulares, etc. (Roca y Mroginski, 1991).

Varios estudios han sido llevados a cabo con el fin de mejorar la técnica de Criopreservación de germoplasma. En uno de ellos, con una duración de diez años, lograron conservar meristemas de yuca congelados en nitrógeno líquido. Pasado ese tiempo, las plantas fueron descongeladas y posteriormente establecidas en suelo hasta su madurez, demostrando la utilidad de esta técnica en la conservación e intercambio internacional de germoplasma (Bajaj, 1983).

En otro experimento se criopreservaron ápices caulinares de yuca al usar la técnica de encapsulación-deshidratación, lo que permitió la inmersión directa del explanta en el nitrógeno líquido. Se probaron diferentes concentraciones de alginato de sodio, bicloruro de calcio (CaCl_2), sacarosa y reguladores de crecimiento, antes y después del congelamiento. Allí pudieron demostrar la sensibilidad de la yuca a elevadas concentraciones de sacarosa (Escobar *et al.*, 2006a).

En varias especies silvestres del género *Manihot* se realizó una investigación para crioconservar meristemas y semillas. Se usó un protocolo modificado de deshidratación-encapsulación, usado con anterioridad en *Manihot esculenta*. Los resultados preliminares muestran que las plantas pueden recobrase luego del congelamiento con 0-60% de supervivencia. Un protocolo desarrollado con anterioridad para crioconservación de semillas y embriones zigóticos fue modificado al calentar el material vegetal luego del congelamiento (Escobar *et al.*, 2006b).

1.4.1.2. Conservación de germoplasma a tasas mínimas de crecimiento

La conservación *in vitro* por mínimo crecimiento consiste en una técnica mediante la cual se logra que los materiales vegetales crezcan a ritmos muy lentos, esto se consigue mediante la disminución del contenido mineral o de la temperatura de incubación así como la aplicación a los medios de cultivo de retardantes del crecimiento hormonales u osmóticos. Los retardantes osmóticos suelen ser carbohidratos (los más usados son el manitol y la sacarosa) y son adicionados al medio de cultivo para reducir el potencial hídrico del mismo. De esta forma, los cultivos son sujetos a una desaceleración en su crecimiento debido a un estrés osmótico causado por la reducción de la absorción de agua y nutrientes del medio. Además, cuando alguno de estos carbohidratos son combinados con algún inhibidor del crecimiento como el ácido Acetilsalicílico (AAS), el cloruro de clorocolina o el ácido abscísico (ABA), pueden obtenerse resultados aún superiores. La conservación de germoplasma de plantas tropicales a tasas mínimas de crecimiento es rutinariamente usada en muchos laboratorios. Cada uno de los pasos involucrados en el proceso debe ser definido precisamente para cada especie (Fortes y Pereira, 2001; Engelmann, 1991).

En yuca, estudios de conservación han sido realizados por autores como Rayas *et al.* (2002), ellos estudiaron 11 concentraciones de sacarosa y manitol en el medio de

cultivo de Murashige y Skoog (1962), con el objetivo de disminuir el número de subcultivos en la conservación *in vitro* de los clones Señorita y CEMSA 74-725 de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Las evaluaciones se realizaron a los nueve meses de la implantación. Las explantas que sobrevivieron, después de la conservación fueron incubadas para su recuperación en el medio de cultivo antes descrito para el crecimiento *in vitro* de la yuca. El medio de cultivo suplementado con 40 g.l⁻¹ de sacarosa, 0.02 mg.l⁻¹ de BAP, 0.1 mg.l⁻¹ de GA₃ (Acido Giberelico) y 0.01 mg.l⁻¹ de ANA (Acido Naftalenacetico), resultó ser el mejor para la conservación *in vitro* de ambos clones.

Por otro lado, Barrueto y Carvalho (2008) desarrollaron un nuevo procedimiento usando yemas axilares cultivadas en un medio de Murashige y Skoog modificado y adicionado con diferentes concentraciones de ABA para aumentar el tiempo de subcultivo. Las explantas fueron conservadas por tres meses, luego fueron cultivadas en el mismo medio de cultivo, pero sin el ABA. Estos investigadores pudieron concluir que unas concentraciones de 20 y 30 μ M de ABA inducían latencia en las yemas y retrasaban la brotación, sin que esto afectara el subsecuente crecimiento y desarrollo de las plantas una vez finalizada la conservación.

En Venezuela (UCV, Facultad de Agronomía, Instituto de Agronomía) se estudió la conservación *in vitro* bajo mínimo crecimiento de microestacas de los clones de yuca (*M. esculenta*) Cubana, Tempranita y Caribe Macho; realizando además termoterapia en una cámara climática rustica por 30 días, que proporcionaba unos $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ y 80-90% de humedad relativa, para eliminación de virus. Posteriormente se tomaron ápices caulinares para su cultivo *in vitro*. Luego fueron conservados las explantas bajo mínimo crecimiento, para lo que emplearon microestacas de las plantas que estaban siendo cultivadas *in vitro*. Por ultimo, llevaron a cabo estudios de viabilidad con los clones Cubana y Tempranita. Se obtuvieron plantas en buenas condiciones fitosanitarias que

fueron conservadas *in vitro* bajo mínimo crecimiento y que no manifestaron cambios genéticos respecto del material del que provenían, comprobándose esto por la prueba citológica del aplastado (González, 1999).

En un estudio reciente, otros autores lograron encapsular cortes de nudos o ápices caulinares *in vitro* de yuca (*M. esculenta*), para lo que se usó 3% de alginato de Calcio, con fines de conservación e intercambio de germoplasma. La regeneración no fue significativamente afectada por la concentración de sacarosa en la matriz de alginato, mientras que la formación de raíces sí. Al elevar la concentración de sacarosa se redujo la regeneración en uno de los accesos estudiados. Al suplementar la matriz de alginato con 6-benzilamino purina y Ácido alfa-naftalenacético se vio mejorada la regeneración en menos de dos meses. Además, la regeneración fue significativamente afectada por la duración del almacenaje y la recuperación de los ápices disminuyó considerablemente luego de 28 días de almacenaje. Estos estudios constituyen una importante innovación y una alternativa viable a las semillas sintéticas derivadas de embriones somáticos (Danso y Ford, 2003).

Este método de conservación de germoplasma ha sido usado con éxito también en otros cultivos de importancia entre los que cabe mencionar, además de yuca: caña de azúcar, banano, café, papa y batata (García *et al.*, 2007).

En caña de azúcar se desarrolló un método efectivo para la conservación *in vitro* de 200 clones híbridos por medio de un sólo medio de multiplicación y desarrollo de los brotes. Después de 12 meses de almacenamiento las plantas se transfirieron a medio fresco y regresaron a la conservación. La integridad genética de los clones (basándose en el fenotipo) no se vio afectada por el método de cultivo *in vitro* y un máximo de 14 meses de almacenamiento (Taylor y Dukic, 1993).

En otro estudio llevado a cabo también con caña de azúcar en Brasil se evaluó el efecto de la temperatura; sacarosa, manitol y sorbitol como fuentes de carbono y regulación osmótica y el ácido abscísico como regulador del crecimiento en la conservación *in vitro* de germoplasma. Para esto utilizaron como material vegetal, yemas apicales de plantas de 10 meses de edad, del banco de germoplasma *in vivo*, de la Universidad Federal de Alagoas. El uso de concentraciones de 1 mg/l de ácido abscísico y 20 g/l de sacarosa, vinculada a condiciones de baja temperatura (15 °C), permitió que los brotes se mantuvieran viables durante un año en el mismo medio de cultivo, sin necesidad de ser subcultivados (Pinto *et al.*, 2002).

Para determinar la influencia de la formulación salina en la conservación de plantas de caña de azúcar *in vitro* fue realizado un trabajo en el Instituto de Biotecnología de las Plantas en Cuba. Las plantas pudieron conservarse durante seis meses consecutivos al emplearse la formulación MS reducida al 25 y 50%, asociada a una temperatura de cultivo de 18°C. De esta manera el crecimiento de las plantas fue lento y menores los daños fisiológicos, con valores de supervivencia entre el 58.3 y 69.2%. La formulación de White no favoreció la conservación y las plantas solo pudieron mantenerse durante dos meses (García *et al.*, 2003).

De igual forma, se realizaron estudios de la temperatura de cultivo, la concentración salina y de manitol en el medio de cultivo para conservar plantas de caña de azúcar. Las plantas pudieron conservarse durante 12 meses consecutivos a una temperatura de 15 °C. Los porcentajes de supervivencia estuvieron entre 53.3 y 86.6% cuando la concentración salina se redujo al 25 y 50% de su concentración total. La altura de las plantas disminuyó con el incremento de las concentraciones de manitol, sin embargo, aumentó el número de brotes por planta en los tratamientos que contenían este regulador osmótico (García *et al.*, 2004).

Así mismo, en bananos diploides se desarrollo un protocolo de conservación *in vitro* basado en la reducción de la temperatura del cuarto climático. Veinticuatro genotipos y cuatro clones por genotipo fueron estudiados. No fueron observadas diferencias entre los accesos en cuanto a su comportamiento *in vitro* y todos presentaron potencial para ser conservados por largos periodos de tiempo. El intervalo entre transferencias puede ser de 180, 360 y 450 días; siendo las temperaturas que deben mantenerse para lograr esto de 26, 22 y 17°C respectivamente (Pedroso *et al.*, 2000).

Por otra parte Bertrand *et al.* (1992) examinaron el efecto de concentraciones reducidas de sacarosa y bajas temperaturas en café. Concentraciones de sacarosa de 0.5 g/l y 20 g/l y temperaturas de 20 y 27°C fueron comparadas. Las diferencias entre genotipos no fueron significativas. Finalmente concluyeron que estos materiales pueden ser conservados con bajas temperaturas por 6 meses a 20°C en un medio de cultivo que contenga por lo menos 20 g/l de sacarosa.

En otro estudio se intentaron conservar ápices encapsulados de café. El mas efectivo de los sustratos en suprimir el crecimiento de los ápices encapsulados del café fue el que contenía la mitad de la concentración de las sales de Murashige y Skoog, 1% de sacarosa y 10 mg/l de Acido Abscísico. La mejor temperatura para la conservación en este experimento fue de 20 °C, sin embargo, al adicionar al medio con Acido abscísico se puede disminuir la temperatura hasta 15 °C (Hassan, 2003).

Otros autores, como Espinosa *et al.* (2002) conservaron exitosamente batata (*Ipomoea batatas*) al cultivar *in vitro* microestacas del clon Jewel en medios de cultivo que contenían las sales de Murashige y Skoog a diferentes concentraciones o suplementadas con ácido abscísico o con manitol. Estos investigadores concluyeron que la supervivencia durante la conservación fue alta en todos los tratamientos

empleados. El empleo del ácido abscísico inhibió el crecimiento de las plantas. Se logró la disminución del crecimiento al emplear manitol en el medio de cultivo. La reducción de las sales de Murashige y Skoog al 25% y 50% de su concentración produjo un menor crecimiento de las plantas que el resto de las concentraciones evaluadas. Se obtuvo un alto porcentaje de recuperación del material conservado cuando se cultivaron en medio de cultivo fresco.

De igual forma, en papa (*Solanum tuberosum* L) se logró extender el intervalo entre transferencias a medios de cultivo frescos de unas pocas semanas hasta 12 meses mediante la adición de retardantes del crecimiento al medio. Se demostró que la adición de Acido Abscísico o manitol al medio de cultivo incrementa la supervivencia de estos en un 15 a 60% luego de 12 meses, y al combinarlo con bajas temperaturas, mas del 73% de los cultivos logra sobrevivir. Cuando se emplean estos retardantes, se observa que se desarrollan con completa normalidad cuando son transferidos a medios de cultivo frescos sin retardantes de crecimiento para su regeneración (Westcott, 1981).

Existen infinidad de factores que afectan el crecimiento mínimo de los cultivos, como quedó demostrado en un trabajo donde se estudio el efecto combinado de la sacarosa, el manitol y el fotoperiodo en la conservación *in vitro* de 4 genotipos de papa (*Solanum tuberosum* L.). El efecto combinado de estos factores muestra que la papa puede conservarse por 30 meses sin subcultivarla cuando el medio contiene 40 g/l de sacarosa, 20 g/l de manitol y bajo un fotoperiodo de 16 horas (Sarkar, 1998).

En Venezuela se han iniciado también trabajos en la conservación *in vitro* de papa (*Solanum tuberosum* L) bajo mínimo crecimiento; así se logró desarrollar una metodología que permite mantener y conservar plántulas por cinco meses. Pudo concluirse que en el quinto mes, la variedad Kennebec presentó menor altura y número

de raíces en los tratamientos T3 (2% manitol, 3% sacarosa, 0.8% agar, 0mg/l BAP, 1.5mg/l ABA, 1.5 mg/l CCC) y T5 (2% manitol, 2% sacarosa, 0.8 % agar, 1.5 mg/l BAP, 0 mg/l ABA, 1.5 mg/l CCC) esperándose se garantice una conservación por mayor tiempo, mientras que, la variedad Patrones presentó la misma respuesta en los tratamientos T2 (4% manitol, 3% sacarosa, 0.8% agar, 0 mg/l BAP, 1.5 mg/l ABA, 1.5 mg/l CCC) y T6 (4% manitol, 0.5% sacarosa, 0.8% agar, 0 mg/l BAP, 0 mg/l ABA, 0 mg/l CCC) (Páez y González, 2001).

También en cultivos como la vainilla se han desarrollado procedimientos efectivos en la conservación por mínimo crecimiento de germoplasma valioso. Para lograr esto, en un trabajo llevado a cabo en la India, se lograron mantener por más de un año bajo mínimo crecimiento cultivares de vainilla con el medio de Murashige y Skoog suplementado con sacarosa y manitol. Estos cultivos pudieron mantenerse por 7 años cambiándoles de medio anualmente. El material así conservado pudo ser regenerado y multiplicado en medio MS con 1 mg/l de Benzilaminopurina y 0.5 mg/l de ácido Indolbutírico. Las plantas mostraron buen crecimiento y desarrollo y formaron plantas normales (Divakaran *et al.*, 2006).

Un aspecto importante a tomar en cuenta a la hora de realizar un plan de conservación bajo mínimo crecimiento lo constituye la viabilidad, entendiéndose esta como la capacidad que tienen las plantas conservadas de regenerarse luego del proceso de conservación. Esta puede verse seriamente afectada tras cultivar durante meses o incluso años un explanta en un mismo medio. La viabilidad puede medirse en función de la contaminación, senescencia de las hojas, número de brotes verdes, número de nudos viables en relación al largo del tallo, presencia o ausencia de raíces y ocurrencia de callo (Roca y Mroginski, 1991).

1.4.1.3. Conservación de germoplasma a tasas mínimas de crecimiento empleando Ácido Acetilsalicílico

El Ácido Acetilsalicílico (AAS) o su análogo natural, el Ácido Salicílico (AS), pertenecen a un vasto grupo de compuestos químicos fenólicos que usualmente se definen como sustancias que poseen un anillo aromático unido a un grupo hidroxilo. Los compuestos fenólicos son usualmente catalogados como metabolitos secundarios que aunque siempre se les consideró poco importantes, hoy en día se reconoce que muchos de estos compuestos cumplen importantes funciones en las plantas. El Ácido Salicílico es normalmente un polvo blanco, moderadamente soluble en agua, pero altamente soluble en solventes polares siendo su pH en soluciones acuosas saturadas de 2,4. Puede ser encontrado en infinidad de especies cultivadas, como la cebada, el arroz, pastos, yuca, etc (Raskin, 1992a; Silverman *et al.*, 1995).

El Ácido Acetilsalicílico se hidroliza espontáneamente en Ácido Salicílico, incluso en soluciones acuosas. Este último puede ser activamente transportado, metabolizado o conjugado, como también translocado rápidamente desde el punto de aplicación, hasta los diferentes tejidos vegetales (Popova, 1997).

Las funciones fisiológicas a las que el AS y el AAS están ligadas son muy variadas. Se sugiere que es un regulador endógeno de la floración, ya que estimula la misma, sin embargo no es específico. El AS producido en la rizosfera de algunas plantas juega el papel de sustancia alelopática inhibiendo el crecimiento de las plantas adyacentes. Es un inhibidor efectivo de la síntesis del etileno, lo cual es de suma importancia en cultivo de tejidos ya que en muchos casos el etileno que se puede concentrar en los tubos de ensayo es nocivo para el desarrollo de las explantas. El AS es un importante mediador en la respuesta de las plantas frente a los plagas y patógenos (Popova *et al.*, 1997).

En los últimos años se ha descubierto que el AAS retarda el crecimiento de las plantas cultivadas *in vitro*, por lo que se le utiliza con este fin para la conservación de germoplasma. El mecanismo mediante el cual el AAS retarda el crecimiento de las plantas cultivadas *in vitro* no es conocido aún, sin embargo existen varios efectos del AAS que afectan procesos metabólicos básicos y de esa manera podrían retardar el crecimiento. En especies como la *Spirodella polyrrhiza*, al aplicar AS se afectó su multiplicación y contenido de antocianinas y clorofila, pero al aplicar concentraciones más altas el crecimiento de las frondas fue retardado. También se sabe que el AAS es capaz de hacer colapsar el potencial electroquímico de la membrana de las mitocondrias. En un experimento se encontró que el AAS reducía las tasas de transpiración, y aunque no se logró explicar plenamente el mecanismo, se sugiere que puede estar involucrado en el cierre de los estomas. La fotosíntesis también se ha observado que es afectada por este compuesto fenólico, probablemente porque afecte la síntesis de la RubisCO. También se conoce que el AAS inhibe la absorción de iones potasio, por lo que bajo condiciones adecuadas de pH y concentración, el AAS puede afectar significativamente la absorción mineral. (Popova *et al.*, 1997; Raskin, 1992b; Pierpoint, 1994).

Esto último fue demostrado en un experimento donde colocaron células de raíces de cebada (*Hordeum vulgare*) en una solución de AS. Las células se despolarizaron rápidamente al estar en contacto con el AS. Los valores iniciales de potencial de la membrana se restauraron lentamente luego de 100 minutos. En ese estudio se soportó la hipótesis de que la inhibición de la absorción de iones ocasionada por el AS, es causada por un incremento generalizado en la permeabilidad de la membrana a los iones inorgánicos (Glass, 1974).

En un experimento similar, investigadores de la Universidad de Wisconsin de los Estados Unidos estudiaron el AS y el ácido ferúlico en la inhibición de la absorción de

iones potasio (K^+) en tejidos radicales de avena (*Avena sativa* L. cv. Goodfield). Pudieron observar que el AS fue mas inhibitorio y que el grado en que ocurrió esa inhibición fue dependiente tanto del pH, como de la concentración. Constataron que el efecto en la inhibición aumentaba al disminuir el pH. A un pH de cuatro y una concentración de AS de 5×10^{-4} M, se inhibió la absorción de K^+ en un 60%, en aproximadamente 1 minuto. Estos investigadores también observaron que la absorción del AS, era dependiente del pH y que dicha absorción aumentaba considerablemente al disminuir el pH. Por ultimo concluyen que bajo condiciones adecuadas de pH y concentración, el AS puede afectar considerablemente la absorción mineral de las plantas (Harper y Balke, 1981).

Otro de los efectos del AAS involucrado en el crecimiento lento de las vitroplantas es el hecho de que el AAS parece estar involucrado en la inhibición de la Fosfatasa acida pH6. Esto fue evidenciado en un experimento donde se ensayaron variós medios de cultivo, entre los que había algunos con presencia de AAS. La actividad de fosfatasa fue en promedio 27% menor en un medio con AAS, en contraste, las plántulas que crecieron en el medio sin AAS presentaron mayor actividad de la fosfatasa. Por último se observó que tras cultivar por un breve periodo de tiempo las plantas en medio con AAS y luego transferirlas a un medio libre del mismo, el crecimiento fue el mayor de todos (Lopez y Carrillo, 1996).

Así, para conservación de germoplasma bajo mínimo crecimiento en cultivos como la yuca, se llevo a cabo un experimento empleando AAS. Para esto se micropropagaron quince variedades de yuca bajo condiciones de crecimiento mínimo empleando Acido Acetilsalicílico partiendo de ápices y se colocaron en diferentes medios de cultivo. Se realizaron evaluaciones periódicas por un lapso de quince meses, al final de los cuales se pudo determinar que un medio de cultivo con una

concentración de ácido acetilsalicílico de 10^{-5} M permite un mayor crecimiento de la yuca, conservando la viabilidad de las mismas (Muñoz, 1991).

La termoterapia es una técnica muy usada en conjunto con técnicas de conservación de germoplasma, que ayuda a erradicar ciertos patógenos sistémicos de las plantas. Sin embargo, las plantas tienen poca tolerancia a ser expuestas por largo tiempo a altas temperaturas, ya que esto puede ser fatal para ellas. El AAS tiene efectos inductores en la termotolerancia, así quedó demostrado en un trabajo donde se propagaron plantas de papa (*S. tuberosum*) a través de segmentos nodales, y siendo posteriormente sometidas a tratamientos de calor similares a los de los procedimientos de termoterapia usados para erradicar virus. Estos investigadores encontraron que al cultivar las vitroplantas en medios de cultivo con bajas concentraciones de AAS (10^{-5} o 10^{-6} M), las plantas podían resistir sin problemas durante cinco semanas a una temperatura de 35°C. Mas aún, cuando se les cultivo en medios sin AAS y luego se subcultivaron varias semanas en medio con AAS, las plantas fueron capaces de resistir siete semanas a 35°C o tratamientos de choque de 15 horas a 42°C. Estos estudios son de gran importancia en el desarrollo y mejora de termoterapia para saneamiento de plantas agámicas, donde las pérdidas de material son grandes (Lopez *et al.*, 1998a).

Algunos de los efectos del AAS pueden ser útiles en la propagación *in vitro* de las plantas. Así quedó demostrado en un experimento en el que indujeron tuberización *in vitro* de plantas de papa (*S. tuberosum*) mediante la aplicación de AS, compuestos relacionados al AS y Ácido Jasmonico. La actividad inductora de tuberización del AS fue alrededor de mil veces mayor que la del Ácido Jasmonico. No obstante la capacidad inductora en la tuberización que posee el AS, los resultados excluyen la posibilidad de que el AS este involucrado en la tuberización natural en las plantas de papa (Koda *et al.*, 1992).

Otro experimento similar llevado a cabo también con papa (*S. tuberosum*) describe el efecto del AAS como un inhibidor del crecimiento y a su vez promotor de la tuberización en este cultivo. El crecimiento del tallo de plantas cultivadas *in vitro* fue significativamente inhibido por el AAS a las concentraciones de 10^{-4} y 10^{-3} mol/l. los efectos de inducción de la tuberización del AAS fueron comparados con los medios de cultivo comúnmente usados para este fin y que para lograrlo incorporan el Cloruro de Clorocolina y la Benzilaminopurina. Los resultados arrojan que el AAS es superior a los otros reguladores de crecimiento en lo que respecta a la inducción de la tuberización (López y Scott, 1996).

La papa se ha logrado conservar exitosamente empleando AAS en combinación con carbohidratos como la sacarosa o el manitol. Para esto, se cultivaron brotes de 1.5 a 2 cm, para posteriormente transferirse a un medio de cultivo en el que había una de dos fuentes de carbohidratos (sacarosa o manitol) y una de cinco concentraciones de AAS. Luego de nueve meses se logró concluir que el uso del manitol en combinación con AAS, en concentraciones a partir de 30 mg/l proporciona menor crecimiento y formación de yemas. El medio que contenía sacarosa manifestó mayor sobrevivencia y número de microtuberculos independientemente de la concentración de AAS empleada (Fortes y Pereira, 2001).

Las aplicaciones del Ácido Acetilsalicílico como retardante del crecimiento e la conservación de germoplasma no se limitan a especies agámicas, también aquellas con semillas recalcitrantes pueden ser conservadas de esta forma. Un ejemplo de esto es la chayote (*Sechium edule*), la cual se propaga comúnmente por semillas sexuales que poseen una duración muy corta. Para lograr conservar germoplasma de esta planta se realizó un estudio donde utilizaron una combinación de varias dosis de sacarosa y AAS, así como disminución de la temperatura de incubación. Se encontró una alta viabilidad después de seis meses de conservación. El mejor tratamiento fue el que combinaba 60

g/l de sacarosa con una temperatura de 16°C, esto por presentar un aspecto mejor, sin embargo no hubo diferencias estadísticamente significativas entre ese tratamiento y aquellos que emplearon AAS (Alvarenga *et al.*, 2007).

En un estudio llevado a cabo por López *et al.* (1998b), se demostró que al colocar plántulas de papa (*S. tuberosum* L) en medios de cultivo para su recuperación luego de la conservación con manitol y con Ácido Acetilsalicílico, las tasas de supervivencia eran similares para ambas, sin embargo, las conservadas con este último presentaban un mayor vigor, expresado en un crecimiento más fuerte. Este aumento de vigor fue registrado anteriormente en otro ensayo de López y Carrillo (1996) en *S. cardiophyllum*.

1.5. ESTUDIOS DE IDENTIDAD GENETICA EN MATERIALES CONSERVADOS *in vitro*

Una de las premisas fundamentales de la conservación de germoplasma es la de que los materiales deben ser fieles al tipo, es decir, el proceso o técnica de conservación que se emplee no debe generar por si mismo ningún tipo de mutación a nivel genético. Es por esto que se hace necesario en cualquier plan de conservación de germoplasma, el verificar constantemente la estabilidad genética de los materiales. Son muchas las técnicas empleadas, entre ellas: pruebas citológicas, isoenzimas, marcadores moleculares (AFLPs, RAPDs, etc.), entre otras. El desarrollo de técnicas que utilizan marcadores moleculares ha permitido identificar cambios en los materiales a nivel del ADN con gran precisión y a un relativo bajo costo, por lo que actualmente son las técnicas mas ampliamente usadas para verificar la identidad genética de las plantas conservadas. Últimamente se han detectado cambios en el ADN de tipo reversible, que aún cuando no supongan en un primer momento mutaciones como tal, si implican cambios ocasionados por el proceso de almacenaje y que en periodos de tiempo mas largos podrían traer como resultado que se aumente el riesgo de mutaciones o

disminución de la viabilidad (Gonzalez, 1999; Roca y Mroginski, 1991; Helliot *et al.*, 2002).

1.5.1. RAPDs y otros marcadores moleculares

Las tecnologías de análisis molecular de la variabilidad del ADN permiten determinar puntos de referencia en los cromosomas, técnicamente denominados marcadores moleculares. Estos se definen como cualquier fenotipo molecular oriundo de la expresión de un gen, como es el caso de las Isoenzimas o de segmentos específicos del ADN (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Varias técnicas que emplean marcadores moleculares se usan para corroborar la identidad genética en cultivo de tejidos, y más específicamente en materiales conservados *in vitro*, entre ellos las Isoenzimas, los RFLPs y los RAPDs son los que se emplean mayoritariamente (Angel *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 2003).

Para establecer marcadores enzimáticos adecuados en la caracterización de un banco de germoplasma de yuca, en el Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP) en Venezuela, fueron analizados 20 sistemas enzimáticos y proteínas desnaturalizadas. Estacas de los clones de yuca fueron plantadas para cosecharse muestras de hojas apicales y puntas de raíces a los 45 días. Los mejores resultados se observaron con el tampón de extracción tris HCl, en geles DISCPAGE 5-10% para las enzimas y 6-15% para las proteínas desnaturalizadas en tampón electrodo tris glicina. Los sistemas seleccionados fueron los polimórficos y estables entre corridas, tales como proteínas desnaturalizadas, RUBISCO, peroxidasas para hojas apicales, y estererasas para puntas de raíces. La técnica de electroforesis de proteínas e isoenzimas utilizando los sistemas a y b -EST en raíces y proteínas desnaturalizadas, RUBISCO y peroxidasas en hojas, pueden ser empleadas para la caracterización de clones de yuca,

por presentar polimorfismo y estabilidad entre corridas. El polimorfismo de los sistemas a y b -EST en puntas de raíces permitieron obtener patrones diferentes en cada uno de los 65 clones analizados (Fuenmayor *et al.*, 2001).

En otra investigación similar se caracterizaron 65 clones de yuca del banco de germoplasma del CENIAP-INIA, mediante el uso de la electroforesis de enzimas y proteínas hidrosolubles para complementar el análisis de caracterización morfológica realizado a estos clones. Se observó que la yuca presenta una amplia variación en caracteres morfológicos y fisiológicos, debido a que es altamente heterocigota, de polinización cruzada y con un gran número de especies silvestres relacionadas. De igual forma, pudo observarse gran variabilidad de patrones electroforéticos en los sistemas enzimático-proteicos evaluados (Schmidt *et al.*, 2003).

Así mismo, los RFLPs han constituido una valiosa herramienta en análisis de identidad genética. Sondas para genes ribosómicos (ADNr) se han empleado para evaluar los cambios genéticos de plantas de *Solanum tuberosum* cv Desiree sometido a mínimo crecimiento y *S. tuberosum* cv Golden Wonder recuperado de criopreservación. Polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs) fueron detectados en dos de las 16 muestras de ADN extraído de plantas derivadas de crecimiento lento, las plantas control no mostraron diferencias; mientras que las plantas recuperadas de ápices criopreservados de la variedad Golden Wonder no mostraron cambios en sus perfiles RFLPS de genes ribosómicos comparados con las plantas testigo (Harding, 1991).

Por otra parte, los RAPDs (ADN polimórfico amplificado al azar) utilizan iniciadores ("primers") arbitrarios para obtener marcadores moleculares en cualquier tipo de genoma aplicando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (Xena, 2000).

Los RAPDs tienen gran diversidad de usos: detección de híbridos, cuantificación de la diversidad genética intra e interespecífica, establecimiento de identidades genéticas, análisis de variación somaclonal, elaboración de mapas genéticos, etc (Xena, 2000).

En un trabajo donde emplearon RFLPS y RAPDs para detectar cambios genéticos en siete clones de yuca provenientes del CIAT y que estuvieron bajo mínimo crecimiento por 10 años, se encontró que la información obtenida mediante estos marcadores evidencia la estabilidad genética de los materiales conservados de esta forma (Angel *et al.*, 1996).

Una evaluación de la estabilidad genética de ápices de ciruelo (*Prunus Ferlenain*) criopreservados fue llevada a cabo. El análisis de las plantas recuperadas luego del congelamiento incluyó los niveles fenotípicos, citológicos y moleculares (RAPDs y AFLPs). No se detectó ningún cambio entre las plántulas regeneradas de los ápices congelados en contraste con plántulas no congeladas, incluyendo una comparación realizada con las hojas de la planta madre, la cual se mantuvo en un vivero. Estos resultados sugieren que esta técnica puede emplearse en forma segura como una forma de conservación de germoplasma a largo plazo en esta especie (Helliot, *et al.*, 2002).

En Venezuela se han usado los RAPDs para conocer la diversidad genética del Banco de Germoplasma de Yuca del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Se estudiaron los productos de amplificación de 65 entradas utilizando 10 iniciadores aleatorios. Para identificar el agrupamiento de los clones, las matrices de similitud o disimilitud obtenidas fueron representadas gráficamente utilizando dos métodos de agrupamiento bajo tres métodos de encadenamiento, y el generado por árboles no-jerárquicos. Los resultados obtenidos permiten seleccionar al iniciador OPB-07 como el

iniciador que ofrece mayor nivel de resolución en la caracterización de los clones de la colección (Zambrano *et al.*, 2003).

En un estudio llevado a cabo con la finalidad de identificar variantes genéticas provenientes de ensayos de conservación *in vitro* y mutagénesis inducida en la Facultad de Agronomía de la UCV en Venezuela, se estandarizó la técnica RAPD. Los patrones electroforéticos no revelaron diferencias entre las plantas adultas y los brotes regenerados a partir de ápices caulinares y secciones de hojas. Los brotes conservados en presencia de sacarosa y un cuarto de la concentración de sales de Murashige y Skoog (1962), exhibieron un perfil electroforético similar a las plantas madres de *Billbergia rosea*, lo que indica su estabilidad genética (Pardo, 2007).

1.5.2. Hipermetilación del ADN

Las plantas superiores están comúnmente metiladas en el dinucleótido CpG y el trinucleótido CpXpG, bajo la forma de 5-metilcitosina. La citosina metilada puede llegar a representar más del 30% de las citosinas en algunas plantas. Se ha sugerido que la función biológica de la metilación del ADN es la de regular la expresión de los genes en eucariotas y las evidencias indican que cumple un rol en la activación de elementos de transposición, la transcripción de genes de proteínas de almacenamiento y la expresión de genes foráneos. También existe la posibilidad que la retardación del crecimiento de las plantas bajo mínimo crecimiento involucre mecanismos como la metilación del ADN. Sin embargo, en humanos se ha encontrado que la 5-metilcitosina es convertida espontáneamente a timina por un proceso de desaminación, lo que conduce a mutaciones que se asocian con ciertas enfermedades como el cáncer (Harding, 1994; Nakao, 2001).

Por esto se han llevado a efecto últimamente varias investigaciones con el fin de determinar las condiciones de metilación del ADN y del ADNr en plantas conservadas bajo mínimo crecimiento. En papa (*Solanum tuberosum*) se ha podido comprobar que medios suplementados con manitol causan cambios morfológicos marcados en las vitroplantas. Al realizar una digestión del ADN de estas plantas con las enzimas de restricción HpaII/MspI y Eco RII/Bst NI, se encontró que presentaban hipermetilación tanto del ADN genómico, como del ribosómico. Una conclusión a la que se llegó es que dicha metilación puede ser una respuesta adaptativa a un elevado estrés osmótico (Harding, 1994).

Diferentes morfologías pudieron observarse en plantas de papa al cultivárseles de manera autotrófica o heterotrófica sobre agar o espuma de poliuretano (como sustituto para el agar). Las vitroplantas fueron caracterizadas visualmente y comparadas con plántulas desarrolladas en vivero. Para determinar la metilación de la citosina del ADN se empleó un método basado en AFLP, pero usando enzimas sensibles a la metilación. Fue posible correlacionar en tres de los cuatro tratamientos, a la metilación del ADN con la evaluación visual de la madurez morfológica. Una relación anómala entre las microplantas con formas de la hoja más juvenil y altos niveles de metilación del ADN fue confirmado. La medición de los niveles de metilación del ADN en plantas *in vitro* se plantea como un método para determinar la calidad de las vitroplantas producidas por distintos protocolos (Joyce y Cassells, 2002).

En arroz se llevó a efecto un minucioso estudio con el fin de determinar su patrón de metilación. Para esto se modificó la técnica de los RFLP, y se aplicó a plántulas y hojas bandera de un híbrido de arroz y sus padres. Las conclusiones arrojaron que 195 sitios estaban metilados en uno o los dos padres, y que ambos padres mostraron aproximadamente el mismo porcentaje de metilación, que rondaba el 16,3%. Un incremento en la metilación fue detectado en el híbrido comparado con

los padres en algunos sitios de reconocimiento, mientras que en otros sitios decreció la metilación del híbrido. También se encontraron algunas diferencias en la metilación cuando se compararon los materiales de donde provenía el ADN, bien sea de las plántulas o de las hojas bandera (Xiong *et al.*, 1999).

Mediante el empleo de los isosquizomeros HpaII y MspI, los cuales muestran sensibilidad diferencial a la metilación de la citosina, fue posible desarrollar un método basado en AFLPs para investigar la metilación del ADN en eucariotas. Para este estudio se emplearon hojas de plantas adultas o de plántulas cultivadas *in vitro* de manzana (*Malus domestica* cv. Gala). Los resultados muestran que más del 25% de las bandas de AFLPs derivaban de secuencias metiladas, con lo que se demuestra que ese protocolo es efectivo en la identificación de perfiles metilados de ADN (Xu *et al.*, 2000).

De la misma manera, aplicando la metodología anterior en manzana cultivada tanto en campo como *in vitro* se detectaron 1622 bandas de AFLPs, empleando 32 pares de iniciadores. Al analizar los resultados, los investigadores pudieron concluir que existe evidencia que ocurren cambios en la metilación del ADN en los tejidos de las hojas de manzana cultivadas *in vitro* (Li *et al.*, 2002).

Los callos embriogénicos, utilizados como forma de conservar germoplasma también son propensos a que su ADN se hipermetile como consecuencia de la técnica de conservación. Así quedó demostrado en un experimento donde se almacenaron callos embriogénicos de *Citrus paradisi* por un año. Se les examinaron variaciones cromosómicas a través de exámenes citológicos, encontrándose que la ploidía permaneció estable. De la misma manera tampoco pudieron encontrarse variaciones en la secuencia del ADN cuando se empleó la técnica de RAPDs. Sin embargo, si se pudieron detectar cambios en la metilación del ADN, al emplearse la técnica de amplificación de polimorfismos sensibles a metilación o MSAP (Hao *et al.*, 2004).

No solo en plantas conservadas *in vitro* bajo mínimo crecimiento es posible observar patrones de Hipermetilación del ADN, también en plantas micropropagadas puede encontrarse este fenómeno. Así lo demostraron Peraza *et al.* (2001) en banano. Para ello utilizaron tanto ápices vegetativos, como ápices de la inflorescencia masculina del banano cultivar Gran Naime micropropagado, y le aplicaron la técnica MSAP. Se encontró que un 23% de los sitios poseían las citosinas metiladas del genoma. En contraste, no se encontró evidencia de metilación con esta técnica en las muestras no sometidas a cultivo *in vitro*, por lo que estos investigadores asocian la metilación del ADN con la micropropagación.

CAPITULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

1.1. Ubicación

La presente investigación se realizó en la Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía, Instituto de Agronomía, Unidad de Apoyo Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Área de Propagación Controlada y el Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola (CIBA) ubicado dentro de las instalaciones del Instituto de Genética de la Facultad de Agronomía de la UCV, así como en la Unidad de Biotecnología Vegetal del INIA-CENIAP, situadas todas estas instituciones, en la ciudad de Maracay, Estado Aragua a 436 m.s.n.m, con una temperatura promedio anual de 24,6° C y una humedad relativa de 75-80%.

1.2. Material vegetal

Como fuente de explantas fueron utilizadas estacas de madera dura de yuca de dos clones comerciales de importancia agrícola, los clones fueron el Clon Sardina 11 (ciclo corto con buen rendimiento) y el clon CM 6740-7 (ciclo intermedio de buen rendimiento). Las plantas de las que se tomaron las estacas tenían un año de edad y eran procedentes del banco de germoplasma de yuca del Instituto de Agronomía de la Facultad de Agronomía en Maracay.

Se contemplaron cuatro fases, desarrolladas de manera consecutiva, las mismas fueron: Fase I, implantación de ápices (dos meses). Fase II, Conservación del germoplasma (siete meses). Fase III, viabilidad (cuatro meses: tres en el laboratorio y

uno en campo). Una vez concluida la segunda fase, se tomaron muestras para verificar la estabilidad genética del material conservado, lo que constituye la Fase IV (un mes).

1.3. Preparación del material vegetal

Se partió de estacas de madera dura, sanas y con buen desarrollo, descartándose cualquiera que presentara síntomas de enfermedades o daño por insectos. Una vez realizada la selección previa se procedió a cortarlas en estacas de 10 cm de longitud teniendo especial cuidado que cada una de estas estacas contara con al menos tres yemas. Fue llevado a cabo un tratamiento preventivo sumergiendo las estacas en una solución fungicida de Triziman-D (3 g/l) y Malatión 57% (3 ml/l) por 5 minutos, para luego dejarse secar una hora. Posteriormente las estacas se plantaron, cuidando la polaridad de las mismas, en bolsas plásticas con una mezcla de tierra y arena en proporción 1:1. Una vez plantadas las estacas en sus bolsas fueron colocadas bajo umbráculo por un periodo de cuatro semanas, aplicándoseles 5 g de fertilizante completo 15-15-15 a cada planta las dos primeras semanas. La quinta semana fueron trasladadas a plena exposición solar para fortalecerlas antes de realizar la implantación en el laboratorio.

1.4. **FASE I.** IMPLANTACIÓN DE APICES CAULINARES.

En esta fase se llevó a cabo un ensayo con base en la utilización de los ápices caulinares extraídos de los brotes desarrollados de las estacas de los dos clones bajo estudio.

Material vegetal, desinfección e implantación: se tomaron ápices que fueron seleccionados por presentar un aspecto más saludable y vigoroso, una vez dentro del laboratorio fueron despojados del exceso de material vegetal y cortados en segmentos

de unos 2 cm de largo, luego se lavaron con agua jabonosa y enjuagaron posteriormente con agua destilada. Una vez bajo cámara de transferencia de flujo laminar y en condiciones asépticas se procedió a realizar la desinfección, la cual consistió en sumergir los ápices en etanol al 70 % por 30 segundos; en hipoclorito de sodio al 0,1% durante 5 minutos y por último lavarlos con agua destilada desionizada y estéril (ADDE) tres veces. Un microscopio estereoscópico fue empleado para realizar la extracción de los ápices hasta llevarlos a 1mm de longitud, para luego implantarlos en el medio de cultivo, todo en forma aséptica y cuidando en todo momento de no invertir la polaridad del ápice. Una vez realizada la implantación, las vitroplantas fueron incubadas en un cuarto climático con una temperatura de $26\pm 2^{\circ}\text{C}$, una humedad relativa de 45-75%; la luz suministrada tenía una Densidad de Flujo Fotónico (DFF) de $2\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ y un fotoperiodo de 16 horas.

El medio de cultivo empleado fue el de Murashige y Skoog ó MS (1962) complementado con 0,5 mg/l Tiamina; 100 mg/l inositol; 0,05 mg/l de 6-benzilaminopurina (BA); 0,05 mg/l de Ácido giberélico (AG_3); 0,01 mg/l de Ácido naftalenacético (ANA); 2% de sacarosa y 0,6% de agar purificado. El pH del medio fue ajustado a 5,7 - 5,8. Cada tubo de ensayo (15 x 150 mm), se llenó con cuatro ml de medio, para luego ser esterilizado en autoclave a 121°C y 15 lb/pulg² durante 10 minutos.

Diseño, análisis estadístico y evaluaciones: el estudio se realizó utilizando un diseño en bloques al azar conformándose un total de dos tratamientos correspondientes a cada uno de los clones bajo estudio con cinco bloques correspondientes a las cinco horas de cultivo. Para comparar todos los tratamientos fue empleada la prueba de medias de Tukey. Las variables evaluadas a la semana 46 fueron: porcentaje de contaminación, longitud del brote, numero de hojas, número de raíces, presencia de callo.

1.5. **FASE II.** CONSERVACIÓN DE GERMOPLASMA.

Debido a que los dos clones de yuca bajo estudio respondieron de manera diferente a la multiplicación *in vitro* y se obtuvieron mayores cantidades de microestacas (360 unidades) del clon CM 6740-7, fueron realizados dos experimentos: en el primero se compararon los dos clones bajo estudio y 5 concentraciones de Acido Acetilsalicílico (AAS) preparado para este experimento (anexo 1), mientras que en el segundo experimento solamente fue utilizado el clon CM 6740-7, pero con 9 concentraciones de AAS.

1.5.1. **EXPERIMENTO I:** Conservación *in vitro* bajo mínimo crecimiento de dos clones de yuca empleando Ácido Acetilsalicílico (AAS) en cinco concentraciones

Las microestacas obtenidas de la fase I se usaron como explantas para el ensayo de conservación. No fue necesario ningún tipo de desinfección ya que las microestacas estaban en condiciones asépticas. Estas, una vez seccionadas bajo condiciones asépticas en cámara de transferencia de flujo laminar, fueron implantadas en tubos de ensayo de 25 x 150 mm con 10 ml de medio de cultivo sólido, previamente esterilizado en autoclave a 121 °C y 15 lb/pulg² durante 10 minutos, ese medio estaba constituido por las sales básicas de MS (1962), sacarosa (1% para los testigos, ya que al combinarse con manitol se crea un gran estrés osmótico; y 2% para las plantas que fueron conservadas con AAS y que es la concentración normalmente usada para el crecimiento de esta planta), manitol (1% para los testigos únicamente), cinco concentraciones de Ácido Acetilsalicílico ($1 \times 10^{-3} \text{M}$; $1 \times 10^{-4} \text{M}$; $1 \times 10^{-5} \text{M}$; $1 \times 10^{-6} \text{M}$; $1 \times 10^{-7} \text{M}$); y para solidificarlo se usaron 6 g/l de agar. El pH fue ajustado a 5,7-5,8. Por último, las microestacas fueron incubadas en un cuarto climático, utilizado para mantener el banco de germoplasma *in vitro* en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Instituto de

Agronomía de la Facultad de Agronomía de la UCV, a una temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$; una humedad relativa de 70% y 14 horas de DFF a $20 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Diseño, análisis estadístico y evaluaciones: el estudio se realizó utilizando un diseño en bloques al azar con un arreglo de tratamiento factorial 2x5 conformándose un total de diez tratamientos y dos testigos. Los cinco bloques utilizados correspondieron a los cinco momentos de implantación y la unidad experimental escogida fue de cinco microestacas, una en cada tubo. Se analizó el factorial 2x5 para establecer la mejor concentración de AAS para cada clon y además un análisis particular incluyendo los dos testigos, obviando el factorial y comparando todos los tratamientos mediante la prueba de medias de Tukey. Los tratamientos resultaron de la combinación de los dos clones (CM 6740-7 y Sardina 11) y concentración de Ácido Acetilsalicílico y sacarosa; así como un testigo por cada clon, que consistió en el medio normal de conservación por estrés osmótico, sin AAS pero con sacarosa y manitol en alta concentración. Este tratamiento donde se combinan estos dos azúcares para potenciar el control de crecimiento por estrés osmótico fue previamente investigado en este laboratorio determinándose que resultó ser el mejor para la conservación *in vitro* de esta planta. Así finalmente resultaron un total de 12 tratamientos: **T-1 ó testigo** (Clon CM 6740-7; AAS 0 M; manitol 1g/l; sacarosa 1 g/l); **T-2 ó testigo** (Clon sardina-11; AAS 0 M; manitol 1g/l; sacarosa 1 g/l); **T1** (Clon CM 6740-7; AAS 1×10^{-3} M; manitol 0 g/l; sacarosa 2 g/l); **T2** (Clon CM 6740-7; AAS 1×10^{-4} M; manitol 0 g/l; sacarosa 2 g/l); **T3** (Clon CM 6740-7; AAS 1×10^{-5} M; manitol 0 g/l; sacarosa 2 g/l); **T4** (Clon CM 6740-7; AAS 1×10^{-6} M; manitol 0 g/l; sacarosa 2 g/l); **T5** (Clon CM 6740-7; AAS 1×10^{-7} M; manitol 0 g/l; sacarosa 2 g/l); **T6** (Clon sardina-11; AAS 1×10^{-3} M; manitol 0 g/l; sacarosa 2 g/l); **T7** (Clon sardina-11; AAS 1×10^{-4} M; manitol 0 g/l; sacarosa 2 g/l); **T8** (Clon sardina-11; AAS 1×10^{-5} M; manitol 0 g/l; sacarosa 2 g/l); **T9** (Clon sardina-11; AAS 1×10^{-6} M; manitol 0 g/l; sacarosa 2 g/l); **T10** (Clon sardina-11; AAS 1×10^{-7} M; manitol 0 g/l; sacarosa 2 g/l).

Para la estrategia de análisis, se realizó el análisis de la varianza (ANAVAR) y la prueba de medias de Tukey, al cumplirse los supuestos que requiere el ANAVAR; en los casos de no cumplirse los supuestos tuvo que utilizarse el análisis no paramétrico, con el análisis de Kruskal y Wallis que es el más apropiado. Las variables evaluadas mensualmente por 7 meses fueron: altura del brote (mm), número de nudos, número de hojas normales o desprendidas, número de raíces y longitud de la raíz más larga (mm), porcentaje de contaminación (%) y vigor del brote y de la raíz. Estos últimos, evaluados según una escala arbitraria del 1 al 4 (Anexos 2, 3, 4 y 5), donde el valor más alto correspondió al más vigoroso, y en este caso de acuerdo a la escala de medidas, solo es apropiado el análisis estadístico por la vía no paramétrica.

1.5.2. **EXPERIMENTO II:** Conservación *in vitro* bajo mínimo crecimiento del clon CM 6740-7 de yuca empleando Ácido Acetilsalicílico (AAS) en nueve concentraciones

El clon CM 6740-7 desarrolló mayor cantidad de microestacas por lo que fue utilizado para un estudio más detallado de conservación con el Ácido Acetilsalicílico. Para ello, se tomaron microestacas de la fase I para usarse como explantas en este ensayo. Al igual que en el experimento I de la fase II, no fue necesario ningún tipo de desinfección ya que las microestacas estaban en condiciones asépticas y una vez seccionadas bajo condiciones asépticas en una cámara de transferencia de flujo laminar, se implantaron en tubos de ensayo de 25 x 150 mm con 10 ml de medio de cultivo sólido, previamente esterilizado. Este medio de cultivo estuvo constituido por las sales básicas de MS (1962), sacarosa (1% para el testigo y 2% para las plantas conservadas con AAS), manitol (1% para el testigo únicamente), probándose nueve concentraciones de Ácido Acetilsalicílico ($1 \times 10^{-3} \text{M}$; $5 \times 10^{-4} \text{M}$; $1 \times 10^{-4} \text{M}$; $5 \times 10^{-5} \text{M}$; $1 \times 10^{-5} \text{M}$; $5 \times 10^{-6} \text{M}$; $1 \times 10^{-6} \text{M}$; $5 \times 10^{-7} \text{M}$; $1 \times 10^{-7} \text{M}$) y 6 g de agar. El pH fue ajustado a 5,7-5,8. Las vitroplantas se incubaron en un cuarto climático utilizado para mantener el banco de

germoplasma *in vitro* en las mismas condiciones empleadas para el experimento anterior (fase II, experimento I).

Diseño, análisis estadístico y evaluaciones: el estudio estuvo enmarcado bajo un diseño en bloques al azar, con siete bloques correspondientes a las siete horas de implantación y cinco microestacas por unidad experimental. Nueve concentraciones fueron utilizadas del Ácido Acetilsalicílico; así como un testigo, que consistió en el medio normal de conservación por estrés osmótico con sacarosa y alta concentración de manitol, este tratamiento donde se combinan estos dos azúcares para potenciar el control de crecimiento por estrés osmótico fue previamente investigado en este laboratorio determinándose que resultó ser el mejor para la conservación *in vitro* de esta planta. Así finalmente resultaron un total de 10 tratamientos: **Testigo** (AAS 0 M; manitol 1g/l; sacarosa 1 g/l); **TI** (AAS 1×10^{-3} M; manitol 0 g/l; sacarosa 2 g/l); **TII** (AAS 5×10^{-4} M; manitol 0 g/l; sacarosa 2 g/l); **TIII** (AAS 1×10^{-4} M; manitol 0 g/l; sacarosa 2 g/l); **TIV** (AAS 5×10^{-5} M; manitol 0 g/l; sacarosa 2 g/l); **TV** (AAS 1×10^{-5} M; manitol 0 g/l; sacarosa 2 g/l); **TVI** (AAS 5×10^{-6} M; manitol 0 g/l; sacarosa 2 g/l); **TVII** (AAS 1×10^{-6} M; manitol 0 g/l; sacarosa 2 g/l); **TVIII** (AAS 5×10^{-7} M; manitol 0 g/l; sacarosa 2 g/l); **TIX** (AAS 1×10^{-7} M; manitol 0 g/l; sacarosa 2 g/l).

Para la estrategia de análisis, fué realizado el ANAVAR y la prueba de medias de Tukey, al cumplirse los supuestos que requiere el ANAVAR; en caso contrario fue utilizado el análisis no paramétrico, para el cual el de Kruskal y Wallis fué el más apropiado. Las variables evaluadas mensualmente por siete meses fueron: altura del brote (mm), número de nudos, número de hojas normales o desprendidas, número de raíces, longitud de la raíz más larga (mm), porcentaje de contaminación y vigor del brote y de la raíz. Estos últimos se evaluaron según una escala arbitraria del 1 al 4 (Anexos 2, 3, 4 y 5), donde el valor más alto correspondió al más vigoroso, y en este

caso de acuerdo a la escala de medidas, solo es apropiado el análisis por la vía no paramétrica.

1.6. **FASE III.** VIABILIDAD.

1.6.1. **EXPERIMENTO I:** determinación de la viabilidad de dos clones de yuca conservados *in vitro* bajo mínimo crecimiento por siete meses empleando Ácido Acetilsalicílico (AAS)

Las explantas utilizadas fueron una muestra tomada al azar constituida por microestacas provenientes del material conservado *in vitro* bajo mínimo crecimiento (fase II, experimento I) con las mismas características a las utilizadas en ese ensayo. Una vez extraídas las microestacas del medio de cultivo de conservación, fueron implantadas asépticamente a un nuevo medio de multiplicación en ausencia de retardantes del crecimiento, realizándose esta transferencia bajo la cámara de flujo laminar. Este medio estuvo constituido por 1/3 de las sales nutritivas de MS (1962) suplementado con tiamina (1mg/l); inositol (100 mg/l); 6-benzilaminopurina (0,05mg/l); ácido giberélico (0,05mg/l); ácido naftalenacético (0,02mg/l), sacarosa (20 g/l) y agar (6g/l) con un pH ajustado a 5,7-5,8 y esterilizado bajo las mismas condiciones descritas en la fase I. Los cultivos, además, estuvieron sometidos a un cambio en las condiciones ambientales, donde la temperatura se ajustó en 28 ± 2 °C en el día y 24 ± 2 °C en la noche, la DFF en $20 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ durante aproximadamente dos semanas y posteriormente incrementada a $60 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ durante el crecimiento de raíces y brotes bajo un fotoperiodo de 12 horas luz.

Diseño, análisis estadístico y evaluaciones: el ensayo se ejecutó bajo un diseño experimental de bloques al azar, donde los tratamientos estaban representados por las concentraciones de AAS empleadas en la fase de conservación, experimento I que sobrevivieron y los bloques por las horas de implantación para un total de ocho tratamientos a evaluar. Se analizó estadísticamente mediante un ANAVAR (una vez verificado el cumplimiento de los supuestos del mismo) y la prueba de medias de

Tukey. Las evaluaciones se realizaron semanalmente por aproximadamente tres meses. Las variables evaluadas fueron: número de brotes, altura del brote (mm), número de hojas, raíces y nudos, y porcentaje de sobrevivencia.

1.6.2. **EXPERIMENTO II:** determinación de la viabilidad del clon CM 6740-7 de yuca conservado *in vitro* bajo mínimo crecimiento por siete meses empleando Ácido Acetilsalicílico (AAS)

Los explantas estuvieron constituidos por las microestacas provenientes del material conservado *in vitro* bajo mínimo crecimiento (fase I, experimento II) seleccionadas al azar con las mismas características a las utilizadas en ese ensayo. Una vez extraídas las microestacas del medio de cultivo de conservación, fueron implantadas asépticamente a un nuevo medio de multiplicación, realizándose esta transferencia bajo la cámara de flujo laminar. Este medio constó de 1/3 de las sales nutritivas de MS (1962) suplementado con tiamina (1mg/l); inositol (100 mg/l); 6-benzilaminopurina (0,05mg/l); ácido giberélico (0,05mg/l); ácido naftalenacético (0,02mg/l), sacarosa (20 g/l) y agar (6g/l) el pH ajustado a 5,7-5,8 y esterilizado bajo las mismas condiciones descritas en la fase I. Los cultivos, también fueron sometidos a un cambio en las condiciones ambientales, como en el experimento I de viabilidad.

Diseño, análisis estadístico y evaluaciones: el ensayo se ejecutó bajo un diseño experimental de bloques al azar, donde los tratamientos estuvieron representados por las concentraciones de AAS y testigo que sobrevivieron a la fase de conservación (fase II, experimento II) con un total de seis tratamientos a evaluar. El análisis y las evaluaciones fueron también como en el experimento anterior de viabilidad (experimento I).

1.7. **FASE IV.** PRUEBAS DE IDENTIDAD GENETICA.

1.7.1. Material vegetal.

El material vegetal estuvo constituido por aquellos brotes de ambos clones que sobrevivieron al proceso de conservación *in vitro*, además de muestras tomadas directamente de plantas que venían desarrollándose normalmente en campo, que no habían pasado por ningún proceso de cultivo *in vitro* y que sirvieran de referencia en cuanto a los niveles normales de metilación para esta especie. Estos brotes conservaron la misma nomenclatura que se venía utilizando desde la fase de conservación, (fase II), pero en este caso se pudieron establecer nueve tratamientos para el experimento I, quedando constituidos de la siguiente forma: **Clásico ó testigo** (Clon CM 6740-7; AAS 0 M; manitol 1g/l; sacarosa 1 g/l); **Clásico ó testigo** (Clon sardina-11; AAS 0 M; manitol 1g/l; sacarosa 1 g/l); **T3** (Clon CM 6740-7; AAS 1×10^{-5} M; manitol 0 g/l; sacarosa 2 g/l); **T4** (Clon CM 6740-7; AAS 1×10^{-6} M; manitol 0 g/l; sacarosa 2 g/l); **T5** (Clon CM 6740-7; AAS 1×10^{-7} M; manitol 0 g/l; sacarosa 2 g/l); **T8** (Clon sardina-11; AAS 1×10^{-5} M; manitol 0 g/l; sacarosa 2 g/l); **T9** (Clon sardina-11; AAS 1×10^{-6} M; manitol 0 g/l; sacarosa 2 g/l); **T10** (Clon sardina-11; AAS 1×10^{-7} M; manitol 0 g/l; sacarosa 2 g/l); **Campo** (plantas tomadas directamente del campo para cada clon).

Mientras que del experimento II (fase II), se estableció el experimento con siete tratamientos que fueron los que sobrevivieron, además una muestra tomada directamente del campo como sigue: **Clásico ó Testigo** (AAS 0 M; manitol 1g/l; sacarosa 1 g/l); **TV** (AAS 1×10^{-5} M; manitol 0 g/l; sacarosa 2 g/l); **TVI** (AAS 5×10^{-6} M; manitol 0 g/l; sacarosa 2 g/l); **TVII** (AAS 1×10^{-6} M; manitol 0 g/l; sacarosa 2 g/l); **TVIII** (AAS 5×10^{-7} M; manitol 0 g/l; sacarosa 2 g/l); **TIX** (AAS 1×10^{-7} M; manitol 0 g/l; sacarosa 2 g/l); **Campo** (plantas tomadas directamente del campo).

1.7.2. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL ADN.

Para extraer el ADN se utilizó la técnica empleada por Zambrano *et al.* (2002). Se tomaron muestras en buen estado y desarrollo utilizándose hojas y tallos tiernos, una vez limpio el material vegetal se procedió a macerarlo con nitrógeno líquido y 750 μL de solución buffer (CTAB 2x) para luego colocarlo en un envase eppendorf. Estas muestras fueron sometidas a un baño María a 65°C por 30 minutos, luego se le adicionaron 300 μL de acetato de potasio y reposaron en refrigerador por 15 min. A continuación se centrifugaron las muestras por 10 minutos a 14.000 revoluciones por minuto (r.p.m), retirándose posteriormente el sobrenadante y depositándose este en un eppendorf nuevo junto con 500 μL de una mezcla 24:1 de cloroformo y alcohol isoamílico, para luego centrifugarse nuevamente por el mismo tiempo y velocidad anterior. Nuevamente es extraído el sobrenadante, agregándosele 700 μL de isopropanol dejándose en refrigeración por una hora para que se forme un pellet. Las muestras fueron nuevamente centrifugadas y eliminado el sobrenadante, el pellet resultante fue lavado con 500 μL de etanol (70%), este alcohol fue eliminado y las muestras fueron secadas en un concentrador por 45 minutos y por último se resuspendió el pellet con 28 μL de TE (0,1M de TRIS HCl y 0,1M de EDTA).

La calidad del ADN se determinó, por la concentración de ADN, evaluada en geles de agarosa al 1% mediante comparación con Marcadores estándar de ADN Lambda no digerido, visualizado con Bromuro de Etídio bajo luz UV.

1.7.3. IDENTIDAD GENÉTICA A TRAVÉS DE RAPDs

1.7.3.1. Amplificación de las muestras

Una vez extraído y cuantificado el ADN se procedió a su amplificación con 15 iniciadores aleatorios desarrollados para Yuca (*Manihot esculenta* Crantz), que pueden verse en el cuadro 1.

CUADRO 1: Iniciadores RAPDs empleados para detectar cambios genéticos inducidos por la conservación *in vitro* durante siete meses en yuca (*Manihot esculenta* crantz).

Iniciador	Secuencia
OPA-01	CAG-GCC-CTT-C
OPA-04	AAT-CGG-GCT-G
OPA-17	GAC-CGC-TTG-T
OPB-07	GGT-GAC-GCA-G
OPK-20	GTG-TCG-CGA-G
OPK-03	CCA-GCT-TAG-G
OPK-04	CCG-CCC-AAA-C
OPM-04	GGC-GGT-TGT-C
OPM-10	TCT-GGC-GCA-C
OPM-14	AGG-GCT-GTT-C
OPM-18	CAC-CAT-CCG-T
OPY-04	GGC-TGC-AAT-C
OPY-07	AGA-GCC-GTC-A
OPY-09	AGC-AGC-GCA-C
OPY-19	TGA-GGG-TCC-C

La amplificación fue realizada en un termociclador MJ Research 200 siguiendo la metodología descrita en Zambrano *et al.* (2002) (Cuadros 2 y 3). La separación de los productos de PCR se hizo en geles de agarosa 3% corridos por 2 h a 100 voltios y visualizados con bromuro de etidio bajo luz UV. Para el análisis de los resultados se procedió a la cuantificación de los productos de PCR detectados para cada caso, por

medio de la asociación de la movilidad relativa con su peso molecular en 25 pares de bases (pb).

CUADRO 2: Medio de reacción empleado para la amplificación de los iniciadores RAPDs.

Componente	Concentración	Volumen
ADN	25 ng/ μ L	1 μ L
Buffer	10x	5 μ L
dNTPs	200 mM	1,33 μ L
Primers	25 mM	1,66 μ L
MgCl ₂	25 mM	3 μ L
TAC	5 U/ μ L	0,33 μ L
Agua	-	12,18 μ L

CUADRO 3: Programación del termociclador para la amplificación de los iniciadores RAPDs.

Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo (Min)
Desnaturalización	94	5
45 ciclos de amplificación	94	1
	36	0,5
	72	2
Extensión	72	7

1.7.4. ANÁLISIS DE HIPERMETILACIÓN DEL ADN

Partiendo del ADN anteriormente extraído y cuantificado, se procedió a realizar un análisis de Hipermetilación del ADN a las muestras por digestión con las enzimas de restricción HpaII y MspI de promega. Se tomaron 150 ng de ADN al que se le agregó 0,2µl de Albúmina de suero bovino acetilada (BSA), 2µl de buffer para enzimas de restricción, 0,5µl de la enzima de restricción y por ultimo agua hasta completar un volumen final de 20µl. Posteriormente las muestras fueron colocadas a 37°C por una hora para su digestión. La separación de los productos de la digestión se hizo por medio de geles de agarosa al 3% corridos por 3 h a 100 voltios y visualizados con bromuro de etidio bajo luz UV y a través de geles de acrilamida revelados con nitrato de plata. Para genotipar los productos de la digestión en los geles antes mencionados, se estableció una escala arbitraria del uno al cinco, donde el uno representaba un ADN sin digestión y el cinco el ADN totalmente digerido.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

FASE I. IMPLANTACIÓN DE ÁPICES

1.1. Desarrollo aéreo

Con respecto a las variables altura del brote (AB) y número de hojas (NH) se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos clones bajo estudio.

El comportamiento de mayor AB a los 60 días, se observó en el clon Sardina 11 con un coeficiente de variación de 60,04%, (Cuadro 4). La AB del clon CM 6740-7 varió entre 8,39 hasta 10,89; mientras que el clon Sardina 11 osciló entre 10,30mm hasta 13,43mm. El NH también fue superior en el clon Sardina 11 con un coeficiente de variación de 50,90%. Para esta variable el clon CM 6740-7 presentó valores promedios entre 1,59 y 2,12; mientras que el clon Sardina 11, estos variaron entre 2,79 y 3,38. En general, pudo observarse que en ambos clones evaluados hubo desarrollo de la parte aérea y entre ellos se observó una respuesta diferencial en la altura y número de hojas. Estos resultados confirman lo señalado por Roca (1980) y Páez (1989), quienes encontraron que las respuestas entre distintos materiales de yuca cultivados *in vitro* fueron diferentes. Es posible explicar el mayor desarrollo de clon Sardina 11 a los 60 días en vista de que es un clon de ciclo corto, en contraposición al clon CM 6740-7 que es un clon de ciclo intermedio y que requiere mayor tiempo en su crecimiento en relación con el anterior.

CUADRO 4: Valores promedios observados en ápices caulinares desarrollados *in vitro* provenientes de los clones Sardina 11 y clon CM 6740-7 a los 60 días de ser implantados.

TRATAMIENTO	CLON	Altura \bar{x} del brote (mm)*	Numero \bar{x} de Hojas*
T1	Clon CM 6740-7	9,64 b	1,85 b
T2	Clon Sardina 11	11,86 a	3,09 a
Coeficiente de Variación (%)		60,04	50,90

* Letras minúsculas diferentes en cada columna indican diferencias estadísticas al 5% (Tukey).

1.2. Desarrollo radical

Se observó la tendencia en el clon CM 6740-7 a producir un máximo de tres raíces por planta, mientras que el clon Sardina 11 llegó a producir hasta cinco raíces. Según puede observarse en la figura 1, el clon CM 6740-7 presentó una mayor altura que el clon Sardina 11 cuando poseía tres raíces. La máxima altura del brote observada para el clon Sardina 11 también se observó cuando este tenía tres raíces, sin embargo, cuando tenía cuatro y cinco raíces, la tendencia fue a que igualmente tuviera una altura superior y con valores cercanos a los 10 mm. La menor altura registrada se presentó en el caso de ambos clones, cuando estos no tenían ninguna raíz. Esto indica que existe una tendencia en los clones bajo estudio a que al aumentar el número de raíces, también aumente la altura, por lo que puede sugerirse que ambas variables están interrelacionadas. Es por ello que se determinó la asociación entre ambas variables, encontrándose que el coeficiente de correlación entre altura y número de raíces en el clon CM 6740-7 fue de 0,5541 ($p=0,0000$) y en el clon Sardina 11 fue de 0,5299 ($p=0,0000$). También se evidencia la misma tendencia en las hojas (figura 2) ya que se presentaron al mismo tiempo mayor número de hojas y raíces, eso varió en su respuesta para los dos clones. Esta asociación entre ellos trajo como resultado que el coeficiente de correlación entre ellos para el clon CM 6740-7 fue de 0,4430 ($p=0,0001$) y para el clon Sardina 11 fue de 0,3691 ($p=0,0005$). Una posible explicación a esto es

que al tener mayor número de raíces, la planta tiene mejor capacidad de absorción de nutrientes y agua, y puede en consecuencia crecer más rápidamente, presentando mayor altura y número de hojas. Investigadores como Roca (1980) y Páez (1989), llegaron a conclusiones similares ya que encontraron que los diferentes clones de yuca responden de manera distinta al ser cultivados *in vitro*.

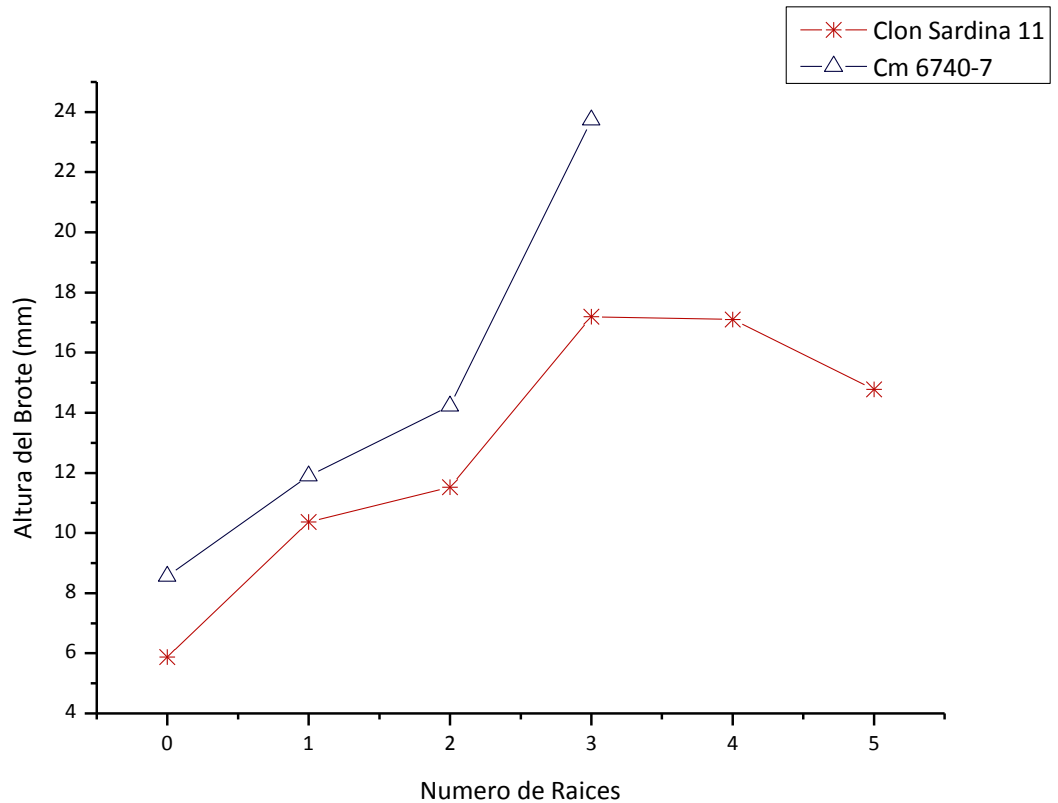


FIGURA 1: Número de raíces en relación a la altura del brote (mm) de plantas de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) de los clones Sardina 11 y Clon CM 6740-7, Micropropagadas *in vitro* por dos meses.

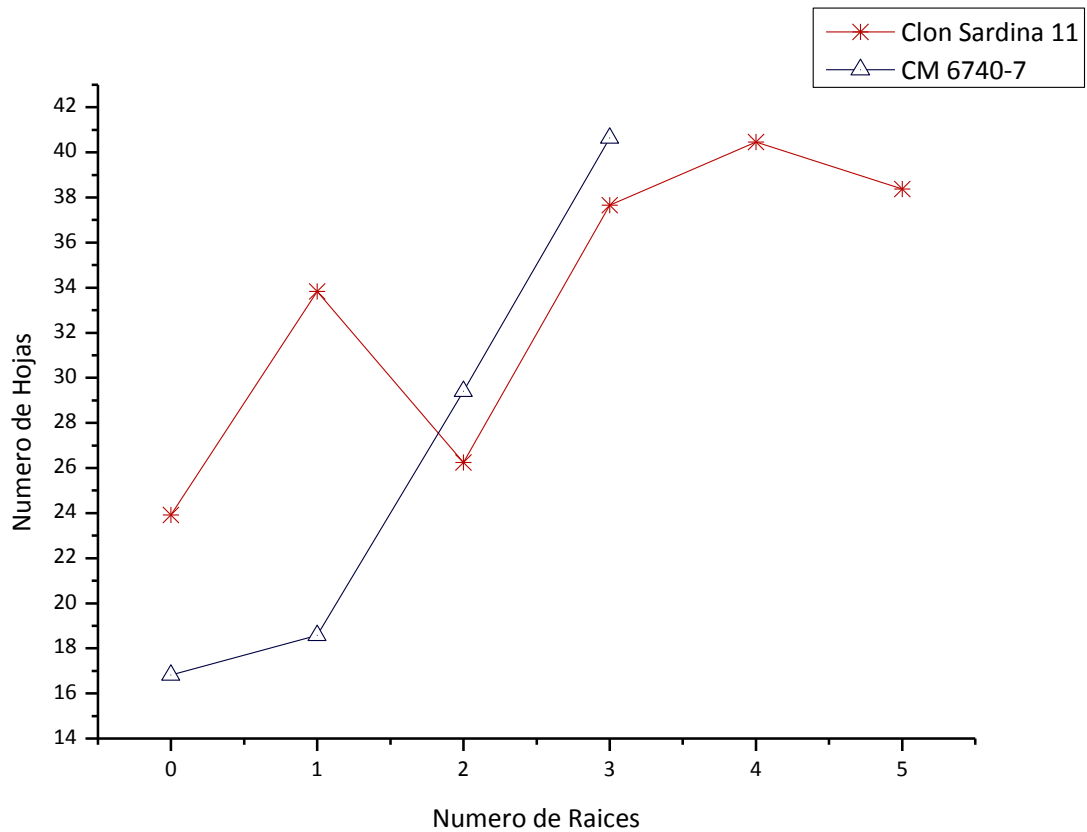


FIGURA 2: Número de raíces en relación al número de hojas de plantas de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) de los clones Sardina 11 y Clon CM 6740-7, micropropagadas *in vitro* por dos meses.

1.3. Porcentaje de sobrevivencia

Luego de dos meses de implantados, se observó una clara tendencia a una mayor sobrevivencia de los ápices para el clon Sardina 11, el cual alcanzó un valor de 92,39%; mientras que de el clon CM 6740-7 sobrevivieron un 81,81% de los ápices implantados. Quizás se debía esperar mas tiempo para su completo crecimiento por ser un clon de ciclo intermedio. Esto evidencia una tendencia a que los diferentes clones de yuca respondan de manera heterogénea al cultivo de tejidos. Resultados similares obtuvo González (1999), quien afirma que los ápices de yuca sin tratamiento con calor

o termoterapia sobrevivían en porcentajes de alrededor del 89%. De igual forma Albarran *et al.* (2003) determinó que clones multiplicados *in Vitro* en diferentes medios de cultivo provenientes del CIAT y el clon local Sardina a los 4 meses presentan porcentajes de sobrevivencia relativamente altos entre 70 y 90%, encontrando para el clon Sardina un 74% de sobrevivencia y los más bajos corresponden a PER 183 (60%), CM5306-8 y CM7073-7 (65%).

FASE II. CONSERVACIÓN DE GERMOPLASMA

1.1. **EXPERIMENTO I:** Conservación *in vitro* bajo mínimo crecimiento de dos clones de yuca empleando Ácido Acetilsalicílico en cinco concentraciones

1.1.1. Evaluación por muestras del desarrollo de los brotes en crecimiento en tubos de ensayo

Luego de desarrollarse los ápices en el medio de cultivo preparado en la fase anterior durante 60 días, fueron transferidos a un medio de conservación constituido por las sales de Murashige y Skoog (1962), suplementado o no con Sacarosa, Manitol y Acido Acetilsalicílico.

Los tratamientos con $1 \times 10^{-6} \text{M}$ y $1 \times 10^{-7} \text{M}$ de AAS de ambos clones bajo estudio se desarrollaron más en cuanto a la altura del brote que el resto de los tratamientos desde el inicio. También se ve que los tratamientos $1 \times 10^{-5} \text{M}$ y testigos les siguen a los anteriores, es de hacer notar que los tratamientos $1 \times 10^{-5} \text{M}$ y $1 \times 10^{-4} \text{M}$ de los dos clones se comportaron en forma similar a los tratamientos testigos que son los medios usuales de conservación de germoplasma empleado en el laboratorio y que se basan en estrés osmótico. De estos tratamientos los mejores resultarían la concentración de AAS de $1 \times 10^{-5} \text{M}$ ya que tienen tendencia a una mayor altura que es ideal para conservación, aunque no son estadísticamente distintos de los testigos. Los tratamientos $1 \times 10^{-3} \text{M}$ y $1 \times 10^{-4} \text{M}$ murieron en su totalidad o tuvieron un muy escaso desarrollo pasados 120 días de conservación (cuadro 5 y figura 3).

En cuanto al número de hojas, en líneas generales puede observarse para ambos clones que los tratamientos que poseían una concentración de AAS de $1 \times 10^{-7} \text{M}$ o $1 \times 10^{-6} \text{M}$; conformaron un grupo donde no hubo diferencias estadísticas y que presentaron una mayor cantidad de hojas. Luego se definió un segundo grupo que

CUADRO 5: Valores observados de altura promedio del brote, número promedio de hojas y mediana del vigor de brotes de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) de los clones Sardina 11 y Clon CM 6740-7 conservados *in vitro* bajo mínimo crecimiento durante cuatro meses.

Tratamiento	Concentración molar AAS	Muestreo 1 30 ddi			Muestreo 2 60 ddi			Muestreo 3 90 ddi			Muestreo 4 120 ddi		
		Altura — \bar{x} del brote (mm)*	Número — \bar{x} de Hojas*	Mediana del Vigor del brote**	Altura — \bar{x} del brote (mm)*	Número — \bar{x} de Hojas*	Mediana del Vigor del brote**	Altura — \bar{x} del brote (mm)*	Número — \bar{x} de Hojas*	Mediana del Vigor del brote**	Altura — \bar{x} del brote (mm)*	Número — \bar{x} de Hojas*	Mediana del Vigor del brote**
Clon CM 6740-7													
T-1 (testigo)	0 M	3,48 b	2,12 b	2 b	1,71 b	2,92 b	2 b	1,66 b	4,08 ab	2 b	35,45 c	4,88 b	2 b
T1	1x10 ⁻³ M	1,86 b	0,46 c	1 b	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T2	1x10 ⁻⁴ M	2,11 b	0,83 c	1 b	7,52 b	1,1 c	1 b	15,88 b	1,36 c	1 b	-	-	-
T3	1x10 ⁻⁵ M	3,96 b	2,00 b	1 b	8,33 b	2,66 b	2 b	24,38 b	3,11 bc	2,5 b	116,34 b	5,63 ab	4 ab
T4	1x10 ⁻⁶ M	7,88 a	3,32 a	3 a	32,68 a	4,28 a	4 a	93,76 a	5,04 a	4 a	221,88 a	8,24 a	4 a
T5	1x10 ⁻⁷ M	9,12 a	3,52 a	4 a	43,84 a	4,52 a	4 a	114,72 a	5,4 a	4 a	253,52 a	7,72 a	4 a
Clon Sardina 11													
T-2 (testigo)	0 M	2,48 c	1,24 b	1 c	4,28 b	1,32 bc	1 c	4,72 b	1,00 b	1 c	4,1 c	1,63 d	1 c
T6	1x10 ⁻³ M	1,76 c	0,46 c	1 c	2,09 b	0,62 c	1 c	2,08 b	0,72 b	1 c	-	-	-
T7	1x10 ⁻⁴ M	2,86 c	0,64 bc	1 c	3,72 b	0,88 bc	1 c	7,44 b	0,96 b	1 c	14,18 c	2,24 cd	2 bc
T8	1x10 ⁻⁵ M	3,48 bc	1,16 bc	1 bc	4,92 b	1,84 b	1 bc	10,48 b	2,00 b	1 bc	69,47 b	4,70 bc	3 abc
T9	1x10 ⁻⁶ M	5,29 ab	2,53 a	2 ab	17,13 a	3,66 a	3 ab	42,17 a	4,03 a	3,5 ab	118,94 a	6,36 ab	4 ab
T10	1x10 ⁻⁷ M	6,65 a	2,76 a	3 a	24,98 a	3,47 a	4 a	51,96 a	4,44 a	4 a	125,71 a	9,01 a	4 ab
Coefficiente de Variación (%)		61,00	54,68		97,66	52,94		74,09	46,51		71,64	66,56	

Las pruebas de medias se llevaron a cabo para cada muestra en forma independiente.

* Letras diferentes dentro de una misma columna y clon indican diferencias al 5% (Tukey).

** Letras diferentes dentro de una misma columna y clon indican diferencias al 5% (Kruskal y Wallis).



Leyenda:

T-1 (Clon CM 6740-7; 0M AAS; 1% Sacarosa; 1% Manitol)	T-2 (Sardina 11; 0M AAS; 1% Sacarosa; 1% Manitol)
T3 (Clon CM 6740-7; 1×10^{-5} M AAS; 2% Sacarosa)	T8 (Sardina 11; 1×10^{-5} M AAS; 2% Sacarosa)
T4 (Clon CM 6740-7; 1×10^{-6} M AAS; 2% Sacarosa)	T9 (Sardina 11; 1×10^{-6} M AAS; 2% Sacarosa)
T5 (Clon CM 6740-7; 1×10^{-7} M AAS; 2% Sacarosa)	T10 (Sardina 11; 1×10^{-7} M AAS; 2% Sacarosa)

FIGURA 3: Plantas de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) de los clones Sardina 11 y clon CM 6740-7 luego de siete meses de conservación *in vitro* con diferentes tratamientos de Acido Acetilsalicílico o testigo que empleó sacarosa y manitol en combinación.

unió a los tratamientos con $1 \times 10^{-5} \text{M}$ y testigos donde el medio no contenía AAS, en general el tratamiento con $1 \times 10^{-5} \text{M}$ de AAS se asemeja en cuanto a número promedio de hojas al tratamiento testigo; este último es el medio común de conservación por estrés osmótico empleado en el laboratorio, por lo que podría decirse es el que se le aproxima más en cuanto a desempeño. Por último, los tratamientos con 1×10^{-3} y 1×10^{-4} M de AAS manifestaron poco crecimiento o la muerte total de las explantas conservadas (cuadro 5). En algunos casos se observó un cierto grado de clorosis intervenal, sin embargo esta se presentó en todos los tratamientos y en una cantidad bastante baja, por lo que no se realizaron estudios estadísticos al respecto (anexo 6).

El vigor de los brotes se evaluó mediante una escala arbitraria, y cuyos valores se analizaron mediante la prueba no paramétrica de Kruskal y Wallis (anexos 2 y 3). En ambos clones, los tratamientos con concentraciones de AAS de $1 \times 10^{-6} \text{M}$ y $1 \times 10^{-7} \text{M}$ presentaron mayor vigor, lo cual no es adecuado para la conservación de germoplasma, ya que el objetivo es precisamente disminuir el crecimiento, y que sea menos vigoroso a fin de que puedan permanecer en el medio de cultivo por más tiempo sin ser subcultivadas. Por otro lado, los tratamientos $1 \times 10^{-3} \text{M}$, $1 \times 10^{-4} \text{M}$ del clon CM 6740-7 y el testigo del clon Sardina 11 presentaron un vigor muy bajo, lo cual tampoco es recomendable, ya que en algunos casos implica la muerte de la explanta, con lo que la sobrevivencia y posterior viabilidad del brote se ven comprometidos. Los tratamientos $1 \times 10^{-5} \text{M}$ y testigo no manifestaron diferencias estadísticamente significativas, por lo que $1 \times 10^{-5} \text{M}$ AAS podría considerarse adecuado para conservación *in vitro* ya que presentaron un crecimiento medianamente vigoroso y es más parecido a los tratamientos testigos, que son el medio común de conservación por estrés osmótico empleado en el laboratorio (cuadro 5). Así finalmente, pudo evidenciarse que tanto la altura como el número de hojas y el vigor, y por ende el crecimiento de los brotes fueron afectados por el contenido de AAS resultando el tratamiento con las mejores respuestas en donde se utilizó la concentración de $1 \times 10^{-5} \text{M}$ de AAS.

Un efecto similar también se ha podido observar en papa (*S. tuberosum*) por López y Scott (1996), quienes demostraron que el crecimiento del tallo de plantas cultivadas *in vitro* fue significativamente inhibido por el AAS a las concentraciones de 10^{-4} y 10^{-3} mol/l. En el caso particular de la yuca estos resultados coinciden plenamente con los hallados por Muñoz (1991), ya que de igual forma este investigador probó el efecto de varias concentraciones de AAS como conservante bajo mínimo crecimiento en ápices de quince clones de yuca, llegando a la conclusión de que el mejor tratamiento era aquel donde el AAS se encontraba a una concentración de 1×10^{-5} M AAS. En contraste, en chayote (*Sechium edule*) Alvarenga *et al.* (2007) evaluaron la concentración de sacarosa, AAS y temperatura cada uno de estos por separado o la combinación de los mismos, encontrando que los brotes mantuvieron la viabilidad en todos los tratamientos al igual que en el presente trabajo, pero concluyendo que la concentración de AAS mas idónea para la conservación *in vitro* bajo mínimo crecimiento era de 1×10^{-3} M; aunque reconocen que el AAS indujo clorosis y aumento en la producción de tricomas. Esto indica que cada cultivo debe ser estudiado en forma independiente y que no se pueden realizar generalizaciones a la hora de aplicar una técnica de cultivo de tejidos vegetales.

1.1.2. Evaluación final por muestras del desarrollo de los brotes fuera de los tubos de ensayo

Una vez culminados los siete meses previstos para el ensayo, se tomó también una muestra final al material vegetal, ya fuera de los tubos de ensayo, para evaluar los valores siguientes: altura, número de hojas, peso fresco y seco de la parte aérea y de la raíz. No hubo interacción entre las dosis de AAS y los clones bajo estudio, de los cuales para las tres variables el clon CM 6740-7 presentó los valores mayores de altura, número de hojas y número de nudos, siendo estas diferencias estadísticamente

significativas (figura 4). Esta diferencia de respuesta en los dos clones utilizados coincide con los hallados por Investigadores como Roca (1980) y Páez (1989), quienes concluyeron que los clones de yuca responden de manera heterogénea al ser cultivados *in vitro*.

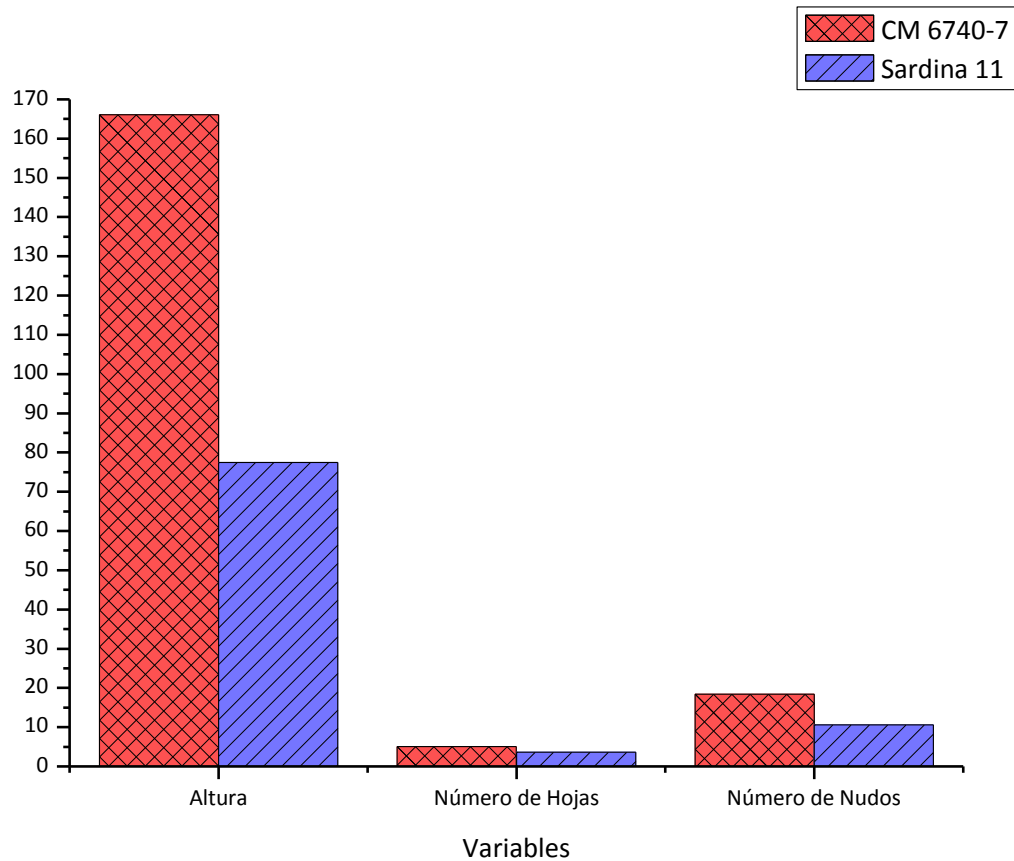


FIGURA 4: Efecto del AAS luego de la conservación *in vitro* durante siete meses sobre la altura (mm), número de hojas y nudos de los clones Sardina 11 y clon CM 6740-7 de yuca (*Manihot esculenta* Crantz)

Con respecto al efecto de los diferentes tratamientos de conservación *in vitro* de los clones Sardina 11 y clon CM 6740-7 empleando AAS, la variable altura promedio del brote registró sus más altos valores en los tratamientos en donde la concentración de AAS era de 1×10^{-6} M ó de 1×10^{-7} M; mientras que los tratamientos testigo o con 1×10^{-5} M de AAS expresaron menor altura; encontrándose que estos dos grupos son

estadísticamente distintos. En cuanto a esta variable, puede verse que el tratamiento que emplea 1×10^{-5} M AAS es el más parecido al testigo (cuadro 6).

La variable número promedio de hojas también conformó dos grupos, en uno el testigo solamente, mientras que en el resto de los tratamientos se ubicaron en un grupo aparte, lo que implica que el tratamiento testigo tiene un efecto negativo sobre la cantidad de hojas producidas por los explantas. El mayor valor de número de hojas se presentó en el tratamiento con 1×10^{-7} M de AAS.

La variable vigor del brote conformo dos grupos nuevamente, donde quedaron separados los tratamientos mas diluidos de AAS del tratamiento testigo y aquel que empleo 1×10^{-5} M AAS. El tratamiento 1×10^{-7} M AAS manifestó el mayor vigor luego de 7 meses de conservación.

Tanto el peso fresco como seco de la raíz expresaron sus mayores valores en los tratamientos de 1×10^{-6} y 1×10^{-7} M AAS; mientras que el peor tratamiento resultó ser el testigo. La concentración de 1×10^{-5} M se ubicó en un renglón intermedio en cuanto a estas variables y luego de pasados siete meses de conservación (cuadro 6).

CUADRO 6: Valores observados de altura promedio del brote, número promedio de hojas, mediana del vigor de brotes de yuca, peso fresco y seco de la raíz de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) de los clones Sardina 11 y clon CM 6740-7 luego de finalizada la conservación bajo mínimo crecimiento por siete meses.

Tratamiento	Altura \bar{x} del brote (mm)*	Número \bar{x} de Hojas*	Mediana del Vigor del brote**	Peso Fresco Raíz (g)	Peso Seco Raíz (g)
Testigo ^y	46,28 b	1,5671 b	2 b	0,19 c	0,01 b
1x10 ⁻⁵ M AAS ^z	79,48 b	4,3234 a	2 ab	0,61 b	0,03 a
1x10 ⁻⁶ M AAS	174,66 a	5,7249 a	3 a	0,65 a	0,04 a
1x10 ⁻⁷ M AAS	186,83 a	5,9138 a	3 a	0,80 ab	0,03 a
C.V. (%)	53,56	59,51	-	51,01	44,30

y: 0 M AAS; 1% Sacarosa; 1% Manitol.

* Letras diferentes dentro de una misma columna indican diferencias al 5% (Tukey).

** Letras diferentes dentro de una misma columna indican diferencias al 5% (Kruskal y Wallis).

C.V.: Coeficiente de variación.

Se pudo constatar que al observar con mayor precisión a estos dos clones, ya fuera de los tubos de ensayo, después de los siete meses de conservación, que presentaron resultados que coinciden a lo ya señalado cuando el material vegetal estuvo en tubos de ensayo en el periodo de conservación y esto evidencia la validez de ambas evaluaciones. En ellos sobresale el comportamiento en la concentración de AAS de 1x10⁻⁵ M de las plantas de los dos clones para efecto de la conservación *in vitro* de las mismas durante el periodo de siete meses, ya que presenta valores intermedios en vigor, altura y número de hojas; así como en formación de raíces parecidas a las plantas testigo.

1.1.3. Porcentaje de sobrevivencia de las microestacas sometidas a conservación por siete meses

En los tratamientos con altas concentraciones de AAS, la tendencia fue a que la sobrevivencia disminuyera de manera notable (cuadro 7). En la sobrevivencia para los dos clones bajo estudio se observó de igual forma que la concentración de AAS mas parecida y con similar desempeño a los tratamientos testigos fue de $1 \times 10^{-5} \text{M}$. La tendencia fue para los tratamientos con $1 \times 10^{-3} \text{M}$ a obtener el menor porcentaje de sobrevivencia, ello corresponde a las mayores concentraciones de AAS, mientras que aquellas concentraciones más diluidas manifestaron unos porcentajes de sobrevivencia que llegaron al 100%, siendo $1 \times 10^{-7} \text{M}$ en el clon CM 6740-7 el que presentó el mayor porcentaje de sobrevivencia. Los anteriores resultados fueron similares a los encontrados por Alvarenga *et al.* (2007), quienes obtuvieron porcentajes de sobrevivencia superiores al 95% al cultivar por 30 días brotes de chayote (*Sechium edule*) en medios de cultivo que contenían AAS.

CUADRO 7: Efecto del AAS en la conservación *in vitro* durante siete meses sobre la sobrevivencia (%) de microestacas de los clones Sardina 11 y CM 6740-7 de yuca (*Manihot esculenta* Crantz)

TRATAMIENTO*	Concentración molar AAS	SOBREVIVENCIA (%)
Clon CM 6740-7		
T-1 (Testigo) ^Y	0 M	84
T1 ^Z	$1 \times 10^{-3} \text{M}$	0
T2	$1 \times 10^{-4} \text{M}$	4
T3	$1 \times 10^{-5} \text{M}$	80
T4	$1 \times 10^{-6} \text{M}$	96
T5	$1 \times 10^{-7} \text{M}$	100
Clon Sardina 11		
T-2 (Testigo)	0 M	60
T6	$1 \times 10^{-3} \text{M}$	0
T7	$1 \times 10^{-4} \text{M}$	32
T8	$1 \times 10^{-5} \text{M}$	68
T9	$1 \times 10^{-6} \text{M}$	84
T10	$1 \times 10^{-7} \text{M}$	76

^Y Tratamientos testigos contenían: 1% Sacarosa y 1% Manitol.

^Z Tratamientos con AAS contenían 2% Sacarosa.

Al analizar la sobrevivencia podemos observar también que en donde se utilizó AAS a $1 \times 10^{-5} \text{M}$, la sobrevivencia tendió a ser buena, y que sus valores son parecidos a los obtenidos en testigos de ambos clones, coincidiendo esto con lo analizado para el desarrollo aéreo y radical encontrado en este ensayo de conservación durante siete meses.

Este buen resultado logrado al utilizar en conservación medios de cultivo con AAS a $1 \times 10^{-5} \text{M}$ coincide con lo observado por Muñoz (1991) en yuca, quien utilizó AAS para conservar 15 clones de yuca y encontró que la concentración de $1 \times 10^{-5} \text{M}$ fue la más adecuada; pero no coincide con Alvarenga *et al.* (2007) en chayote (*Sechium edule*), quienes determinaron que una concentración diferente ($1 \times 10^{-3} \text{M}$) era la más conveniente para conservar esta planta *in vitro*. Lo anterior nos deja ver que lo logrado en este experimento con la yuca es un resultado acertado y que para otros cultivos como el señalado difieren en cuanto a la concentración de AAS que deba utilizarse para conservar las plantas *in vitro* con éxito.

1.2. **EXPERIMENTO II:** Conservación *in vitro* bajo mínimo crecimiento del clon CM 6740-7 de yuca, empleando Ácido Acetilsalicílico en nueve concentraciones

1.2.1. Evaluación por muestras del desarrollo aéreo de los brotes en crecimiento en tubos de ensayo

La variable altura de brote tuvo un comportamiento similar en cada uno de los meses bajo estudio. En el segundo mes no se cumplió con los supuestos del ANAVAR, por lo que se procedió a realizar un estudio no paramétrico mediante la prueba de Kruskal y Wallis. Los tratamientos que arrojaron una mayor altura del brote fueron aquellos con concentraciones de AAS de $1 \times 10^{-6} \text{M}$, $5 \times 10^{-7} \text{M}$ y $1 \times 10^{-7} \text{M}$; mientras que los de menor crecimiento e incluso muerte de los brotes fueron $1 \times 10^{-3} \text{M}$, $5 \times 10^{-4} \text{M}$, $1 \times 10^{-4} \text{M}$ y $5 \times 10^{-5} \text{M}$ AAS. Los tratamientos con $1 \times 10^{-5} \text{M}$, $5 \times 10^{-6} \text{M}$ de AAS y testigo, por

otro lado, desarrollaron una altura intermedia y podrían ser utilizados para la conservación de germoplasma ya que garantizan una mayor permanencia de los brotes sin necesidad de ser subcultivados (cuadro 8, figura 5).

En cuanto a la variable número de hojas, puede observarse que los tratamientos que poseían una concentración de AAS inferior a $1 \times 10^{-6} \text{M}$; conformaron un grupo donde no hubo diferencias estadísticas entre si y que presentaron una mayor cantidad de hojas (cuadro 8, figura 5). Luego se definió un segundo grupo que unió a los tratamientos con $1 \times 10^{-5} \text{M}$ AAS, $5 \times 10^{-6} \text{M}$ AAS y testigo (0M AAS), donde en general el tratamiento con $5 \times 10^{-6} \text{M}$ de AAS superó en cuanto a número promedio de hojas al tratamiento $1 \times 10^{-5} \text{M}$ AAS y al testigo, el cual a su vez se ubico por encima del anterior.

Al observar en conjunto todos los tratamientos, se evidencia que aquellos que poseían una concentración de AAS inferior a $1 \times 10^{-6} \text{M}$ conformaron un grupo donde no hubo diferencias estadísticas entre si y que contabilizaron un mayor número de nudos. Luego se definió un segundo grupo que unió a los tratamientos con $1 \times 10^{-5} \text{M}$ AAS, $5 \times 10^{-6} \text{M}$ AAS y testigo, donde en general el tratamiento con $5 \times 10^{-6} \text{M}$ de AAS tendió a superar en cuanto a número promedio de nudos al tratamiento con $1 \times 10^{-5} \text{M}$ de AAS y al testigo. Por último, los tratamientos con concentraciones iguales o superiores a $5 \times 10^{-4} \text{M}$ de AAS manifestaron poco crecimiento o la muerte total de las explantas conservadas (cuadro 8).

El número de raíces expreso sus mayores valores en los tratamientos al cultivar las explantas con AAS en concentraciones de $1 \times 10^{-6} \text{M}$, $5 \times 10^{-7} \text{M}$ y $1 \times 10^{-7} \text{M}$ en todos los meses bajo estudio; mientras que los valores mas bajos los tuvieron los tratamientos con $1 \times 10^{-3} \text{M}$, $5 \times 10^{-4} \text{M}$, $1 \times 10^{-4} \text{M}$ y $5 \times 10^{-5} \text{M}$ AAS. Nuevamente se puede observar que los tratamientos intermedios estaban constituidos por $1 \times 10^{-5} \text{M}$, $5 \times 10^{-6} \text{M}$ de AAS y testigo,

CUADRO 8: Diferentes observaciones de la parte aérea y radical de brotes de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) del Clon CM 6740-7 conservados *in vitro* bajo mínimo crecimiento durante tres meses

Trat.	Dosis molar de AAS	Muestreo 1 30 ddi						Muestreo 2 60 ddi						Muestreo 3 90 ddi					
		H*	A*	N*	R*	V**	VR**	H*	A**	N*	R*	V**	VR**	H*	A*	N*	R**	V**	VR**
T (Testigo)	0 M	2,37 b	5,54 bc	4,74 b	1,77 bc	2 cd	3 abc	2,92 bc	10,29 b	61,07 b	3,29 d	2 b	2 bc	3,97 ab	23,07 c	7,30 c	3 c	3 c	2 cd
TI	1x10 ⁻³ M	0,32 d	1,18 d	1,43d	0,0 e	1 de	1 e	0,60 ef	0,66 c	18,3 d	1,10 de	1 c	1 cd	-	-	-	-	-	-
TII	5x10 ⁻⁴ M	0,81 cd	1,93 cd	1,95 cd	0,11 de	1 e	1 e	0,08 f	2,83 c	18,82 d	0,09 e	1 c	1 d	0,36 c	-	1,10 d	-	1 c	1 e
TIII	1x10 ⁻⁴ M	0,96 cd	3,28 bcd	2,87 c	0,15 de	1 de	1 e	1,23 e	4,05 c	35,45 cd	0,29 e	1 bc	1 d	1,67 bc	-	4,68 cd	-	1 c	1 de
TIV	5x10 ⁻⁵ M	1,17 c	3,17 bcd	2,97 c	0,48 cde	1 cde	1 de	1,78 de	4,15 c	38,11 c	0,74 e	1 bc	1 cd	2,88 bc	7,78 c	5,25 cd	1 c	1 c	2 e
TV	1x10 ⁻⁵ M	2,26 b	4,54 bcd	4,31 b	1,45 bcd	2 cde	1,5 cde	2,47 cd	9,87 bc	55,92 b	3,74 d	2 b	2 bc	3,90 ab	35,70 bc	7,67 c	4 bc	2 c	2 de
TVI	5x10 ⁻⁶ M	2,49 b	6,29 b	4,65 b	2,44 b	2 bc	3 bcd	3,18 b	24,42 b	66,42 b	5,86 c	2 b	2 b	4,47 ab	78,74 b	10,13 b	9,5 ab	3 b	3 bc
TVII	1x10 ⁻⁶ M	3,48 a	12,28 a	5,91 a	4,20 a	7 ab	3 abc	4,45 a	53,57 a	84,57 a	8,20 b	4 a	4 a	5,40 a	139,89 a	12,25 ab	12,5 a	4 ab	4 ab
TVIII	5x10 ⁻⁷ M	3,68 a	13,60 a	6,25 a	5,11 a	4 a	4 a	4,62 a	68,08 a	97,71 a	10,31 a	4 a	4 a	4,22 ab	173,11 a	13,74 a	14 a	4 a	4 a
TIX	1x10 ⁻⁷ M	3,46 a	13,69 a	5,96 a	4,82 a	3,5 a	4 ab	4,42 a	51,12 a	87,42 a	9,30 ab	3 a	3 a	5,13 a	135,05 a	12,72 a	14 a	4 ab	4 a
Coefficiente de variación (%)		51,26	83,40	34,89	89,66			55,24		36,56	79,16			57,70	74,36	34,45			

Leyenda

H: Numero promedio de hojas.

A: Altura promedio del brote en mm.

N: Numero promedio de nudos.

R: Numero promedio de raíces.

V: Mediana del vigor del brote.

VR: Mediana del vigor de la raíz.

* Letras diferentes dentro de una misma columna indican diferencias al 5% (Tukey).

** Letras diferentes dentro de una misma columna indican diferencias al 5% (Kruskal y Wallis).

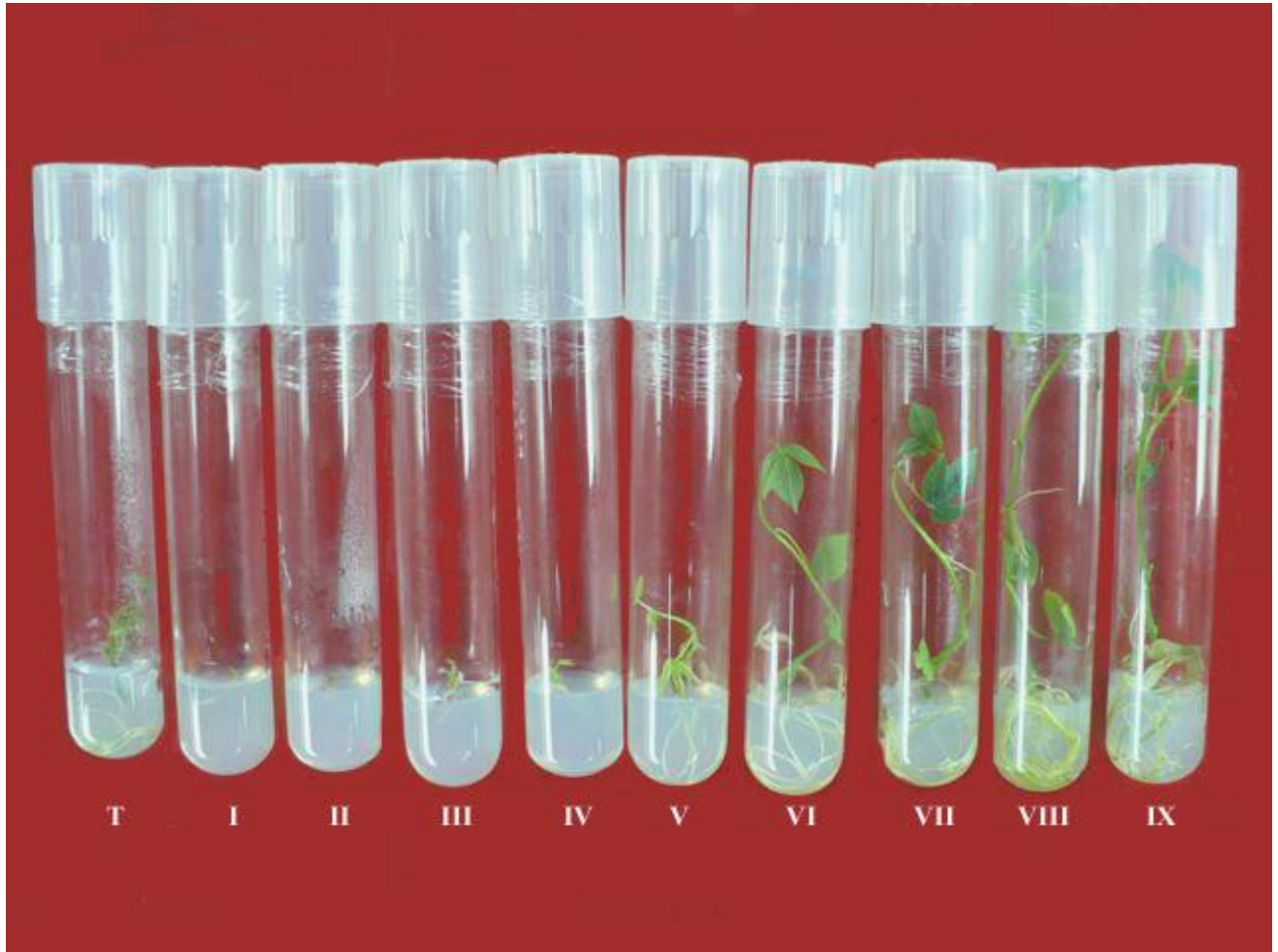


FIGURA 5: Plantas de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) del clon CM 6740-7 luego de siete meses de conservación *in vitro* con diferentes tratamientos de Acido Acetilsalicílico o un testigo que empleó sacarosa y manitol en combinación.

aunque $1 \times 10^{-5} \text{M}$, $5 \times 10^{-6} \text{M}$ tuvieron en general un mayor número de raíces que el testigo (cuadro 8).

En líneas generales se observa que los tratamientos $1 \times 10^{-6} \text{M}$, $5 \times 10^{-7} \text{M}$ y $1 \times 10^{-7} \text{M}$ presentaron mayor vigor, lo cual no es del todo adecuado para la conservación, ya que el objetivo buscado al conservar plantas *in vitro* bajo mínimo crecimiento es precisamente disminuir el crecimiento y que sea menos vigoroso a fin de que puedan permanecer en el medio de cultivo sin ser subcultivadas. Por otro lado, los tratamientos con $1 \times 10^{-3} \text{M}$, $5 \times 10^{-4} \text{M}$, $1 \times 10^{-4} \text{M}$ y $5 \times 10^{-5} \text{M}$ de AAS presentaron un vigor muy bajo, lo cual tampoco es recomendable para conservación, ya que en algunos casos implica la muerte de la explanta, con lo que la sobrevivencia y posterior viabilidad del brote se ven comprometidos. Los tratamientos con $1 \times 10^{-5} \text{M}$, $5 \times 10^{-6} \text{M}$ de AAS y testigo, tuvieron la tendencia a un desarrollo intermedio, muy parecido a la del testigo, con respecto a los tratamientos antes mencionados y en muchos casos no manifestaron diferencias estadísticamente significativas entre si para algunas de las variables bajo estudio. Por lo antes expuesto, las concentraciones de AAS de $1 \times 10^{-5} \text{M}$ ó $5 \times 10^{-6} \text{M}$ podrían considerarse adecuadas para la conservación *in vitro* bajo mínimo crecimiento ya que son las mas parecidas al tratamiento testigo (cuadro 8).

Es de hacer notar que con el tratamiento de $5 \times 10^{-7} \text{M}$ de AAS se logró a su vez el mayor vigor, coincidiendo esto con el desarrollo aéreo y radical desde los 30 días; observándose esto como una tendencia a estimular el crecimiento de las plantas.

Al utilizar medios de cultivo con mayor cantidad de concentración de AAS con este clon CM 6740-7, pudo observarse respuestas similares a las logradas en el anterior experimento (fase II, experimento I). Los resultados aquí expuestos corroboran los hallazgos hechos en yuca por Muñoz (1991), quien probó el efecto de varias

concentraciones de AAS como conservante bajo mínimo crecimiento en ápices de quince clones de yuca, y llegó a la conclusión de que el mejor tratamiento era aquel donde el AAS se encontraba a una concentración de $1 \times 10^{-5} \text{M}$ AAS. También se observan resultados similares con lo encontrado en papa (*Solanum tuberosum*) por López y Scott (1996) quienes señalan que el crecimiento del tallo de plantas cultivadas *in vitro* fue inhibido por el AAS a las concentraciones de 10^{-4} y 10^{-3} mol/l. Por otra parte, en chayote Alvarenga *et al.* (2007) evaluaron la concentración de AAS y otros factores de crecimiento por separado o en combinación, encontrando que la viabilidad se mantuvo en todos los tratamientos al igual que en el presente trabajo, pero concluyendo que la concentración de AAS mas idónea para la conservación *in vitro* bajo mínimo crecimiento era de 1×10^{-3} M; aunque reconocen que el AAS indujo clorosis y aumento en la producción de tricomas. Como se ve, para cada planta deben realizarse ensayos previos que permitan determinar cual o cuales son las concentraciones de AAS mas idóneas para ella en particular.

1.2.2. Evaluación por muestras del desarrollo radical de los brotes en crecimiento en tubos de ensayo

La variable vigor de la raíz se evaluó empleando una escala arbitraria (Anexos 4 y 5) aplicándose posteriormente la prueba de medias de Kruskal y Wallis. Durante los tres meses que duró esta investigación para este clon, los tratamientos testigo y los que contenían $1 \times 10^{-6} \text{M}$, $5 \times 10^{-7} \text{M}$ y $1 \times 10^{-7} \text{M}$ de AAS; poseían el mayor vigor, no presentando diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Por otro lado, el resto de tratamientos quedaron agrupados entre sí sin diferencias entre ellos, siendo el tratamiento con $5 \times 10^{-6} \text{M}$ junto al testigo, los de mayor vigor; y donde se utilizó $1 \times 10^{-3} \text{M}$, $5 \times 10^{-4} \text{M}$ y $1 \times 10^{-4} \text{M}$ de AAS los de menor vigor (cuadro 8).

En líneas generales se observa que los tratamientos con $1 \times 10^{-6} \text{M}$, $5 \times 10^{-7} \text{M}$ y $1 \times 10^{-7} \text{M}$ de AAS presentaron gran vigor en el crecimiento de la raíz, lo cual no es

adecuado para la conservación. Por otro lado, los tratamientos con $1 \times 10^{-3} \text{M}$, $5 \times 10^{-4} \text{M}$ y $1 \times 10^{-4} \text{M}$ y $5 \times 10^{-5} \text{M}$ de AAS presentaron un vigor muy bajo, lo cual tampoco es recomendable para conservación. Los tratamientos que contenían $1 \times 10^{-5} \text{M}$, $5 \times 10^{-6} \text{M}$ y Testigo, conformaron un tercer grupo, en general sin diferencias estadísticas entre sí y ubicado en una posición intermedia entre los grupos de mayor y de menor crecimiento, por lo que $1 \times 10^{-5} \text{M}$ ó $5 \times 10^{-6} \text{M}$ de AAS podrían considerarse adecuados para conservación *in vitro* del clon CM 6740-7 de yuca ya que sus respuestas son más parecidas al tratamiento testigo (cuadro 8).

Nuevamente se observa que los resultados son similares a los encontrados por Muñoz (1991), quien concluyó que la dosis más adecuada de AAS para conservar yuca bajo mínimo crecimiento era de $1 \times 10^{-5} \text{M}$.

1.2.3. Evaluación final por muestras del desarrollo de los brotes fuera de los tubos de ensayo

Al transcurrir los siete meses previstos en el ensayo, se tomó también una muestra final al material vegetal, ya fuera de los tubos de ensayo para evaluar los valores siguientes: altura, número de hojas, peso fresco y seco de la parte aérea y de la raíz. Con respecto a la variable altura del brote, puede verse que se forman tres grupos, en el primer grupo se ubican los tratamientos con $5 \times 10^{-6} \text{M}$, $1 \times 10^{-6} \text{M}$, $5 \times 10^{-7} \text{M}$ y $1 \times 10^{-7} \text{M}$ de AAS donde se registraron los mayores índices de altura. Luego le sigue un segundo grupo donde se agrupan el tratamiento con $1 \times 10^{-5} \text{M}$, $5 \times 10^{-6} \text{M}$ y $1 \times 10^{-6} \text{M}$ de AAS. Por último el tratamiento testigo y el que contenía $1 \times 10^{-5} \text{M}$ conforman un tercer grupo con el menor crecimiento (cuadro 9).

El número promedio de hojas conformó dos grupos, en uno de los cuales quedaron agrupados los tratamientos con $1 \times 10^{-5} \text{M}$, $5 \times 10^{-6} \text{M}$, $1 \times 10^{-6} \text{M}$, $5 \times 10^{-7} \text{M}$ y $1 \times 10^{-7} \text{M}$

⁷M los cuales tuvieron el mayor número de hojas, mientras que el testigo quedó en un grupo aparte con el menor número de hojas.

En cuanto al número promedio de nudos, esta variable tuvo un comportamiento similar al de la variable altura del brote, ya que se conformaron tres grupos y donde nuevamente el que contenía 1×10^{-5} M AAS y el Testigo manifestaron el menor número de nudos.

Estos resultados coinciden con los analizados en 1.2.1 y 1.2.2, donde los tratamientos con 1×10^{-5} M, 5×10^{-6} M AAS destacan por ser más parecidos al testigo y poseer un desarrollo intermedio con respecto a los demás tratamientos en cuanto a altura del brote, número de hojas y número de nudos por lo que siguen considerándose como adecuados para la conservación bajo mínimo crecimiento como lo consideran a su vez Muñoz (1991) y Alvarenga *et al.* (2007) en yuca (*Manihot esculenta* Crantz) y chayote (*Sechium edule*) respectivamente.

En cuanto a las variables peso fresco y peso seco de la raíz, se puede observar que en el caso del peso fresco el menor valor corresponde al tratamiento testigo, seguido del tratamiento con 1×10^{-5} M AAS; sin embargo, este último no tuvo diferencias significativas con el resto de los tratamientos. El peso seco por su lado, no tuvo diferencias entre ninguno de sus tratamientos, aunque en términos de valores, el menor lo obtuvo nuevamente el testigo (cuadro 9).

CUADRO 9: Valores observados de altura promedio del brote, número promedio de hojas y número promedio de nudos en brotes de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) del Clon CM 6740-7 conservados *in vitro* durante siete meses.

Tratamiento	Dosis molar de AAS	Altura del brote (mm)*	Número de Hojas*	Número de Nudos*	Peso Fresco Raíz	Peso Seco Raíz
T (Testigo)	0 M	57.86 c	2.30 b	10.95 c	0,40 b	0,03 a
TI	1x10 ⁻³ M	-	-	-	-	-
TII	5x10 ⁻⁴ M	-	-	-	-	-
TIII	1x10 ⁻⁴ M	-	-	-	-	-
TIV	5x10 ⁻⁵ M	-	-	-	-	-
TV	1x10 ⁻⁵ M	144.31 bc	3.44 ab	14.60 bc	0,62 ab	0,04 a
TVI	5x10 ⁻⁶ M	205.50 ab	3.41 ab	17.22 ab	0,85 a	0,09 a
TVII	1x10 ⁻⁶ M	219.42 ab	3.62 ab	20.06 ab	0,81 a	0,05 a
TVIII	5x10 ⁻⁷ M	248.81 a	4.49 ab	21.67 a	0,90 a	0,04 a
TIX	1x10 ⁻⁷ M	251.70 a	5.56 a	20.26 ab	0,88 a	0,05 a
Coeficiente de Variación (%)		30,78	66,57	25,21	46,63	159,81

* Letras diferentes dentro de una misma columna indican diferencias al 5% (Tukey).

1.2.4. Porcentaje de sobrevivencia de las microestacas sometidas a conservación por siete meses

Se observa una disminución notable de la sobrevivencia en los tratamientos con altas concentraciones de AAS. La concentración de AAS con un desempeño tendiente a ser similar al tratamiento testigo es la de 1x10⁻⁶M, aunque 5x10⁻⁶M también tiende a mostrar valores que no están muy distantes de estos. La tendencia observada fue a que el menor porcentaje de sobrevivencia ocurriera en los tratamientos con 1x10⁻³M, 5x10⁻⁴M, 1x10⁻⁴M y 5x10⁻⁵M AAS correspondientes a las mayores concentraciones de AAS, mientras que aquellas concentraciones más diluidas manifestaron unos porcentajes de sobrevivencia altos y en algunos casos cercanos al 100%, siendo la de 5x10⁻⁷M AAS la que presentó el más alto porcentaje de sobrevivencia (cuadro 10). Así

que finalmente podemos decir que esta tendencia coincide con el buen desempeño logrado al utilizar el medio con 5×10^{-6} M AAS en otras variables al conservar *in vitro* bajo mínimo crecimiento plantas de yuca del clon CM 6740-7.

CUADRO 10: Efecto del AAS en la conservación *in vitro* durante siete meses sobre la sobrevivencia (%) de las microestacas del clon CM 6740-7 de yuca (*Manihot esculenta* Crantz)

TRATAMIENTO*	Dosis molar de AAS	SOBREVIVENCIA (%)
T (Testigo)	0 M	86
T-I	1×10^{-3} M	0
T-II	5×10^{-4} M	0
T-III	1×10^{-4} M	0
T-IV	5×10^{-5} M	6
T-V	1×10^{-5} M	57
T-VI	5×10^{-6} M	71
T-VII	1×10^{-6} M	91
T-VIII	5×10^{-7} M	94
T-IX	1×10^{-7} M	80

Esto deja ver que para este clon CM 6740-7 se debería considerar que el medio con 5×10^{-6} M AAS también debería ser tomado en cuenta para la conservación *in vitro* por su buen desempeño en las diferentes variables observadas y porque además tendió a presentar una buena sobrevivencia de las microestacas. Los resultados de esta investigación coinciden con lo encontrado por Albarran *et al.* (2003) ya que al multiplicar *in vitro* la yuca, logro obtener de un 70-90% de sobrevivencia del material vegetal.

FASE III. VIABILIDAD.

1.3. EXPERIMENTO I

1.3.1. Viabilidad en el laboratorio.

Al concluir la fase de conservación de germoplasma (fase II, experimento I) se extrajeron microestacas de los brotes sobrevivientes a fin de implantarlas en un medio de cultivo y en condiciones climáticas adecuadas para su regeneración y posterior aclimatación a condiciones de vivero. Los brotes de ambos clones que sobrevivieron al proceso de conservación mostraron la capacidad de regenerarse (cuadro 11). La variable altura de las vitroplantas mostró sus mayores valores en las dosis $1 \times 10^{-5}M$, $1 \times 10^{-6}M$ y $1 \times 10^{-7}M$, entre estos tratamientos no hubo diferencias estadísticamente significativas. Las dosis $1 \times 10^{-5}M$ y $1 \times 10^{-6}M$ conformaron un segundo grupo, el cual no tuvo diferencias estadísticas entre sí, pero tampoco con el tratamiento testigo. La variable número de hojas, tuvo un comportamiento un tanto distinto al de altura, conformándose un grupo de mayor crecimiento por las dosis $1 \times 10^{-5}M$, $1 \times 10^{-6}M$ y $1 \times 10^{-7}M$ y un segundo grupo de menor crecimiento conformado únicamente por el testigo. La variable número de nudos tuvo un comportamiento idéntico al presentado por la variable número de hojas. El diámetro del callo basal fue medido, resultando que las dosis $1 \times 10^{-5}M$, $1 \times 10^{-6}M$ y $1 \times 10^{-7}M$ no difirieron estadísticamente entre si, mientras que el testigo se mantuvo en un grupo aparte que no presentó a su vez diferencias respecto de $1 \times 10^{-5}M$.

CUADRO 11: Valores observados en brotes de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) de los clones Sardina 11 y CM 6740-7 luego de regenerados *in vitro* tras su conservación por siete meses.

Dosis molar de AAS en conservación	Variables			
	A*	H*	N*	D*
0 M (Testigo)	25.69 b	2.38 b	3.77 b	7.10 b
1x10 ⁻³ M	-	-	-	-
1x10 ⁻⁴ M	-	-	-	-
1x10 ⁻⁵ M	43.34 ab	5.29 a	6.66 a	8.14 ab
1x10 ⁻⁶ M	46.32 ab	4.69 a	5.96 a	8.35 a
1x10 ⁻⁷ M	48.13 a	4.76 a	6.46 a	8.70 a
C.V.(%)	131.71	90.05	64.97	28.20

Leyenda:

A: Altura promedio del brote en mm.

H: Numero promedio de hojas.

N: Numero promedio de nudos.

D: Diámetro promedio del callo basal.

C.V.: Coeficiente de variación

* Letras diferentes dentro de una misma columna indican diferencias al 5% (Tukey).

Como se puede ver, las plantas sobrevivientes al proceso de conservación tuvieron un buen desarrollo aéreo por lo que pudieron ser transplantadas fuera del laboratorio observando que la concentración de AAS que tuvo buen comportamiento en la conservación (1x10⁻⁵ M AAS) presentó buen desarrollo también, y el callo basal formado estuvo en el mismo grupo del testigo (estrés osmótico), por lo tanto no difiere con el, ello es importante porque no tiene tanto desarrollo ya que una mayor formación del callo puede traer consigo cambios genéticos.

1.3.2. Viabilidad a nivel de vivero.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas, una vez transcurridos 60 días, entre ninguno de los tratamientos que llegaron a la fase de vivero en cuanto a las variables altura, numero de nudos, numero de hojas y numero de brotes (cuadro 12). Todos los tratamientos a que fueron sometidos los clones en la

fase de conservación, permitieron el correcto desarrollo de las plantas una vez aclimatadas y llevadas a condiciones de vivero, por lo que será mediante el estudio de otras variables tales como la sobrevivencia que se debe seleccionar el mejor tratamiento.

CUADRO 12: Valores observados en brotes de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) de los clones Sardina 11 y CM 6740-7 luego de regenerados *in vitro* y un mes de cultivo en vivero, tras su conservación por siete meses.

Dosis molar de AAS en conservación	Variables			
	A*	H*	N*	NB*
0 M (Testigo)	125,43 a	6,38 a	10,35 a	2,69 a
1x10 ⁻³ M	-	-	-	-
1x10 ⁻⁴ M	-	-	-	-
1x10 ⁻⁵ M	102,76 a	5,54 a	10,82 a	2,17 a
1x10 ⁻⁶ M	109,32 a	6,07 a	11,10 a	2,02 a
1x10 ⁻⁷ M	116,92 a	5,69 a	11,12 a	2,31 a
C.V. (%)	37,36	40,16	24,13	63,25

ALFA 0,1%

Leyenda:

A: Altura promedio del brote en mm.

H: Numero promedio de hojas.

N: Numero promedio de nudos.

NB: Numero de Brotes

C.V.: Coeficiente de variación

* Letras diferentes dentro de una misma columna indican diferencias al 5% (Tukey).

1.3.3. Sobrevivencia a nivel de laboratorio y de vivero.

En el cuadro 13 se aprecian los valores obtenidos en cuanto a sobrevivencia de microestacas de los clones CM 6740-7 y Sardina 11 de yuca regenerados por 60 días luego del proceso de conservación *in vitro*. Los tratamientos con 1x10⁻³M Y 1x10⁻⁴M en ambos clones, correspondientes a las más altas concentraciones de AAS, murieron en

su totalidad. El resto de los tratamientos manifiestan tendencia a una alta sobrevivencia en todos los tratamientos, la cual, en ningún caso disminuyó por debajo del 90%. El menor porcentaje de sobrevivencia tendió a ocurrir en los tratamientos con $1 \times 10^{-5} \text{M}$ y $1 \times 10^{-7} \text{M}$ AAS del clon CM 6740-7 por un lado, y en cuanto al clon Sardina 11; el testigo y el que contenía $1 \times 10^{-7} \text{M}$ AAS. Mientras que el mayor porcentaje de sobrevivencia se observó en los tratamientos con AAS a una concentración de $1 \times 10^{-6} \text{M}$ en los dos clones, con valores de 98%.

En cuanto a la regeneración de plantas aptas para aclimatación, se puede observar en el mismo cuadro 13 que el clon CM 6740-7 manifiesta un máximo de regeneración al conservársele con $1 \times 10^{-7} \text{M}$ de AAS; mientras que el estrés osmótico generó una tendencia a impedir la regeneración de los brotes ya que su valor fue el menor (cuadro 13). El clon Sardina 11 presentó una tendencia a que no regeneraran adecuadamente las plantas conservadas con los medios usuales de conservación por estrés osmótico empleados en el laboratorio (testigo), por lo que los porcentajes de regeneración de estos son muy bajos, mientras que los de $1 \times 10^{-5} \text{M}$ AAS manifestaron una tendencia a regenerarse en mayor cantidad.

Una vez aclimatadas las plantas adecuadamente fueron llevadas a vivero, donde estuvieron por un periodo de 60 días, tras los cuales se midió su sobrevivencia (cuadro 13). Se observa que el clon CM 6740-7 tuvo su máxima sobrevivencia en el testigo, manifestando que este tiene tolerancia al estrés osmótico, seguido del que contenía $1 \times 10^{-5} \text{M}$ y $1 \times 10^{-7} \text{M}$ AAS. Sin embargo el clon Sardina 11 manifestó su menor sobrevivencia en el testigo, esto indica que este clon es sensible al estrés osmótico y que cada clon de yuca reacciona de manera heterogénea al cultivo *in vitro*. Los tratamientos con $1 \times 10^{-5} \text{M}$ y $1 \times 10^{-7} \text{M}$ AAS tuvieron porcentajes de sobrevivencia mayores para Sardina 11, y si se les compara con los del clon CM 6740-7 podrá apreciarse que son las mismas concentraciones de AAS con mejores valores en ese

clon. Resultados similares fueron demostrados por López *et al.* (1998b), quienes colocaron plántulas de papa (*S. tuberosum* L) en medios de cultivo para su recuperación luego de la conservación con manitol y con Ácido Acetilsalicílico, y donde las tasas de supervivencia eran similares para ambas, sin embargo, aquellas conservadas con este último presentaban un mayor vigor, expresado en un crecimiento más fuerte.

CUADRO 13: Supervivencia (%) en laboratorio y vivero de plantas cultivadas a partir de microestacas de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) de los clones CM 6740-7 y Sardina 11 regeneradas *in vitro* por 2 meses, luego de ser sometidas a conservación.

Tratamiento	Dosis molar de AAS en conservación	Laboratorio		Campo
		Sobrevivencia (%)	Plantas Aptas (%)	Sobrevivencia (%)
Clon CM 6740-7				
T-1 (Testigo)	0 M	95	32	100
T1	1x10 ⁻³ M	0	-	-
T2	1x10 ⁻⁴ M	0	-	-
T3	1x10 ⁻⁵ M	90	33	69
T4	1x10 ⁻⁶ M	98	50	50
T5	1x10 ⁻⁷ M	90	54	88
Clon Sardina 11				
T-2 (Testigo)	0 M	92	4	0
T6	1x10 ⁻³ M	0	-	-
T7	1x10 ⁻⁴ M	0	-	-
T8	1x10 ⁻⁵ M	97	49	94
T9	1x10 ⁻⁶ M	98	29	92
T10	1x10 ⁻⁷ M	92	33	94

Para el clon CM 6740-7 la tendencia es que al conservar estas plantas pueden soportar un alto estrés osmótico y quizás pudieran por ello ser conservadas en una mayor concentración de AAS, pero con el Sardina 11 por su tendencia a no sobrevivir

plantas del testigo si sería conveniente utilizar la concentración de AAS $1 \times 10^{-5} \text{M}$ ya que presentó la mayor sobrevivencia en el laboratorio y luego en el campo.

1.4. EXPERIMENTO II

1.4.1. Viabilidad a nivel de laboratorio.

Al igual que en el caso del experimento I, una vez finalizada la fase II, experimento II de conservación de germoplasma se extrajeron microestacas para su implantación en un medio de cultivo y condiciones climáticas adecuadas para su regeneración y posterior aclimatación a condiciones de vivero. Así, los clones que sobrevivieron al proceso de conservación mostraron en general la capacidad de regenerarse. La variable altura de las vitroplantas mostró sus mayores valores en los tratamientos con $1 \times 10^{-6} \text{M}$, $5 \times 10^{-7} \text{M}$, $1 \times 10^{-7} \text{M}$ AAS, entre los que no hubo diferencias estadísticamente significativas. Los tratamientos con $1 \times 10^{-5} \text{M}$ y $5 \times 10^{-6} \text{M}$ AAS y testigo conformaron un segundo grupo, el cual no tuvo diferencias estadísticas entre sí, pero tampoco con los tratamientos con $5 \times 10^{-7} \text{M}$ y $1 \times 10^{-7} \text{M}$, mas si con el que contenía $1 \times 10^{-6} \text{M}$ de AAS. Otra variable observada fue el número de hojas, la cual tuvo un comportamiento similar a la altura, conformándose un grupo de mayor crecimiento, conformado por el que contenía $1 \times 10^{-6} \text{M}$ de AAS; un grupo intermedio donde se ubicaron los tratamientos con $1 \times 10^{-5} \text{M}$, $5 \times 10^{-6} \text{M}$, $5 \times 10^{-7} \text{M}$ y $1 \times 10^{-7} \text{M}$ AAS que no poseían diferencias entre si, ni con el que contenía $1 \times 10^{-6} \text{M}$ ó el testigo que conformó el grupo con el menor número de hojas. Por otra parte, la variable número de nudos tuvo un comportamiento idéntico al presentado por la variable número de hojas (cuadro 14).

CUADRO 14: Valores observados en brotes de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) del clon CM 6740-7 luego de regenerados *in vitro* tras su conservación por siete meses.

Tratamiento	Dosis molar de AAS	Variables		
		A*	H*	N*
T (Testigo)	0 M	18.25 b	2.53 b	4.01 b
TI	1x10 ⁻³ M	-	-	-
TII	5x10 ⁻⁴ M	-	-	-
TIII	1x10 ⁻⁴ M	-	-	-
TIV	5x10 ⁻⁵ M	-	-	-
TV	1x10 ⁻⁵ M	18.53 b	3.26 ab	4.79 ab
TVI	5x10 ⁻⁶ M	19.44 b	3.58 ab	5.25 ab
TVII	1x10 ⁻⁶ M	47.10 a	5.58 a	7.12 a
TVIII	5x10 ⁻⁷ M	26.33 ab	3.46 ab	5.07 ab
TIX	1x10 ⁻⁷ M	21.01 ab	3.59 ab	5.72 ab
C.V. (%)		161.68	101.52	74.90

Leyenda:

A: Altura promedio del brote en mm.

H: Numero promedio de hojas.

N: Numero promedio de nudos.

C.V.: Coeficiente de variación

* Letras diferentes dentro de una misma columna indican diferencias al 5% (Tukey).

1.4.2. Viabilidad a nivel de vivero.

Una vez transcurridos 60 días luego de subcultivarse las plantas en medio de cultivo para regenerarlas del proceso de conservación, fueron aclimatadas estas y luego de 30 días se evaluaron diversas variables. La variable altura expresó su mayor tamaño en el tratamiento 5×10^{-7} M AAS, aun cuando este no presentó diferencias estadísticas con 1×10^{-6} M y 1×10^{-7} M AAS. El valor más bajo fue el de 5×10^{-6} M AAS. Sin embargo, esta variable manifestó pocas diferencias entre los tratamientos lo cual indica que los materiales se recuperaron de manera satisfactoria en los tratamientos que lograron sobrevivir a la conservación. En cuanto al número de hojas, el comportamiento fue similar al visto para la altura. En este caso los valores oscilaron entre 4,23 (1×10^{-5} M) y 8,48 (5×10^{-7} M); existiendo diferencias estadísticas entre estos dos tratamientos pero no entre estos y el resto de los tratamientos. El número promedio de nudos no evidenció ningún tipo de diferencia entre los tratamientos. La variable número de brotes puede indicar en cierta forma el vigor desarrollado por las plantas luego de su regeneración. Al observar el cuadro 15 se aprecia que el mayor número de brotes ocurre luego de conservar el clon CM 6740-7 en un medio con 5×10^{-7} M de AAS o 1×10^{-6} M, siendo estos valores diferentes a cuando es conservado con cualquier otra concentración de AAS. La menor cantidad de brotes se obtiene tras conservar con 1×10^{-5} M de AAS (cuadro 15).

Las plantas de yuca se regeneraron de manera satisfactoria una vez concluyó la conservación y regeneración *in vitro*. Existen diferencias estadísticas entre los tratamientos de conservación, pero no tan grandes como para separar en grupos bien definidos, lo que sí se puede observar es que el tratamiento con 1×10^{-5} M de AAS pareciera tener una tendencia a manifestar un crecimiento menor respecto al crecimiento del resto de tratamientos pero no difiere estadísticamente en relación al testigo (estrés osmótico) por lo cual tiende a ser aceptable su crecimiento al ser conservado este clon a una concentración de 1×10^{-5} M de AAS.

CUADRO 15: Valores observados en brotes de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) del clon CM 6740-7 luego de regenerados *in vitro* y un mes de cultivo en vivero, tras su conservación por siete meses.

Tratamiento	Dosis molar de AAS	Variables			
		A*	H*	N*	NB*
T (Testigo)	0 M	98.67 ab	5.82 ab	10,21 a	1.98 bc
TI	1x10 ⁻³ M	-	-	-	-
TII	5x10 ⁻⁴ M	-	-	-	-
TIII	1x10 ⁻⁴ M	-	-	-	-
TIV	5x10 ⁻⁵ M	-	-	-	-
TV	1x10 ⁻⁵ M	83.39 ab	4.23 b	9,44 a	1.21 c
TVI	5x10 ⁻⁶ M	72.80 b	5.76 ab	10,01 a	1.81 bc
TVII	1x10 ⁻⁶ M	124.33 ab	6.32 ab	12,11 a	2.72 ab
TVIII	5x10 ⁻⁷ M	142.21 a	8.48 a	12,38 a	4.28 a
TIX	1x10 ⁻⁷ M	87.20 ab	5.20 ab	10,64 a	2.11 bc
Coefficiente de Variación (%)		49,01	41,44	22,24	57,77

ALFA 0,1%

Leyenda:

A: Altura promedio del brote en mm.

H: Numero promedio de hojas.

N: Numero promedio de nudos.

NB: Numero de Brotes

* Letras diferentes dentro de una misma columna indican diferencias al 5% (Tukey).

1.4.3. Sobrevivencia en laboratorio y vivero

Las plantas que soportaron el proceso de conservación *in vitro* fueron capaces en su totalidad de regenerarse y sobrevivir lo suficiente como para llegar a campo (cuadro 16). La sobrevivencia en el laboratorio oscilo entre 89 y 97%; a excepción de los tratamientos con $1 \times 10^{-3} \text{M}$, $5 \times 10^{-4} \text{M}$, $1 \times 10^{-4} \text{M}$, $5 \times 10^{-5} \text{M}$ AAS que murieron en su totalidad y no llegaron a la fase de regeneración. El Tratamiento con $1 \times 10^{-6} \text{M}$ AAS y el testigo tendieron a ser los mejores tratamientos de todos con un 97% de sobrevivencia. De las plantas que sobrevivieron al proceso de conservación y que sobrevivieron al subcultivo para su regeneración, no todas tendieron a ser aptas para llevarlas a la fase de vivero, ya que a pesar de estar vivas, no tenían un vigor suficiente ni un tamaño que les permitiera sobrevivir a la siguiente fase. En las plantas aptas, los valores discurrieron entre 24 y 50%. El mayor valor tendió a registrarse para el tratamiento $1 \times 10^{-6} \text{M}$ AAS con 50% de sobrevivencia, mientras que el testigo expresó el menor valor con un 24%, aún cuando la sobrevivencia al salir de la fase de conservación fue muy alta, luego las plantas no se recuperaron adecuadamente.

Una vez que las plantas pasaron 60 días de regeneración *in vitro* en el laboratorio, se acondicionaron y aclimataron adecuadamente para llevarse a vivero; una vez allí y transcurridos otros 60 días, mediciones fueron realizadas a la sobrevivencia de los brotes. El mejor tratamiento tendió a ser $1 \times 10^{-5} \text{M}$ (91%) y el peor de todos el $1 \times 10^{-6} \text{M}$ (61%), a pesar de que este tratamiento tuvo un buen número de brotes aptos para ser llevados a vivero.

Estos resultados tienden a ser contrarios a los encontrados por Marin (2005), quien concluyó que al sacar brotes de yuca multiplicados *in vitro* y no sometidos a conservación dentro del laboratorio, los porcentajes de sobrevivencia fueron muy bajos, pero esos resultados si coinciden con los encontrados por González (1999) en

este mismo laboratorio al conservar plantas previamente sometidas a termoterapia. De igual forma, Lopez *et al.* (1998b) llegaron a conclusiones similares ya que tras conservar plantas de papa con AAS o con manitol (estrés osmótico) lograron una buena sobrevivencia con ambos, pero destacan estos investigadores que aquellas plantas conservadas con AAS tuvieron mayor vigor y un crecimiento mas fuerte.

CUADRO 16: Sobrevivencia (%) en laboratorio y vivero de plantas cultivadas a partir de microestacas de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) del clon CM 6740-7 regenerado *in vitro* por dos meses, luego de ser sometidas a conservación.

Tratamiento	Dosis molar de AAS en Conservación	Laboratorio		Campo
		Sobrevivencia (%)	Plantas Aptas (%) ^y	Sobrevivencia (%)
T (Testigo)	0 M	97	24	88
TI	1x10 ⁻³ M	0	-	-
TII	5x10 ⁻⁴ M	0	-	-
TIII	1x10 ⁻⁴ M	0	-	-
TIV	5x10 ⁻⁵ M	0	-	-
TV	1x10 ⁻⁵ M	94	31	91
TVI	5x10 ⁻⁶ M	94	28	80
TVII	1x10 ⁻⁶ M	97	50	61
TVIII	5x10 ⁻⁷ M	89	25	78
TIX	1x10 ⁻⁷ M	92	36	69

^y Plantas aptas: plantas que poseían un vigor y tamaño suficiente que les permitiera sobrevivir al proceso de aclimatación.

Finalmente, se puede observar una tendencia que pese a tener el tratamiento con la concentración 1x10⁻⁵M de AAS un menor desarrollo aéreo, las plantas conservadas de esa manera presentan el mayor porcentaje de sobrevivencia en el campo por lo que pudieran utilizarse para conservar el clon CM 6740-7.

FASE IV. PRUEBAS DE IDENTIDAD GENÉTICA.

1.5. Extracción y purificación del ADN

El método desarrollado por Zambrano (2002) resultó efectivo para la obtención y purificación del ADN genómico de todos los materiales conservados *in vitro*, así como aquellos provenientes directamente de campo. Las muestras provenientes de campo presentaron un aspecto un poco más contaminado con posible presencia de almidones y otras sustancias similares, de igual forma su maceración con el nitrógeno líquido resultó un poco más difícil ya que estas plantas presentaban una mayor grado de lignificación que ofrecía una mayor resistencia mecánica. Se confirmó la concentración, pureza e integridad del ADN extraído de todas las muestras a través de geles de calidad en Agarosa al 0.8%.

Se obtuvo amplificación con la técnica empleada con todos (un total de 15) los iniciadores utilizados. Sin embargo, solamente en siete de los iniciadores se produjo la amplificación de todos los materiales, ya que en los otros había materiales que no amplificaban o lo hacían de manera muy débil, por lo que se descartaron dejándose solo: OPA-01; OPA-04; OPM-10; OPY-04; OPY-07; OPY-09; OPY-19 para el análisis molecular.

1.6. Identidad genética a través de marcadores moleculares RAPDs

1.6.1. EXPERIMENTO I

En el cuadro 17 y la figura 6, se presentan el número de bandas monomórficas, polimórficas y totales para cada iniciador RAPD seleccionado con base en su buena amplificación para cada una de las muestras estudiadas. El número total de bandas

obtenidas corresponderían a distintas regiones del genoma distribuidas al azar de las muestras, por lo que darían información de la estabilidad genética de los materiales conservados *in vitro* para el periodo de siete meses. Se seleccionaron aquellos iniciadores que aportaron una mejor información, de manera tal que se escogieron los siete mejores. En el cuadro 18 se presentan las tallas en pares de base (pb) de cada una de las 69 bandas RAPDs obtenidas para los siete iniciadores utilizados en el análisis de estabilidad genética. Como puede apreciarse en el mismo el tamaño de las bandas osciló entre 40 y 1500pb, tallas esperadas para fragmentos amplificados al azar de tipo RAPDs y separadas en geles de agarosa al 3%. A través de la técnica molecular se lograron evidenciar las diferencias genéticas entre los clones bajo estudio.

CUADRO 17: Numero de bandas monomorficas, polimórficas y totales observadas en los iniciadores empleados para verificar la identidad genética de yuca conservada *in vitro* por siete meses.

Iniciador	N° de bandas monomorficas	N° de bandas polimorficas	Total
OPA-01	7	2	9
OPA-04	5	6	11
OPM-10	4	9	13
OPY-04	3	7	10
OPY-07	5	6	11
OPY-09	6	5	11
OPY-19	3	1	4
Total	33	36	69

CUADRO 18: Tamaño de las bandas en pares de base (pb) de cada una de las bandas RAPDs obtenidas para los siete iniciadores utilizados en el análisis de estabilidad genética de plantas de yuca (*Manihot esculentum*) regeneradas *in vitro*.

Banda	Iniciador RAPD						
	A01	A04	M10	Y04	Y07	Y09	Y19
1	1383*	1512	1402	1088	1816	1112	352
2	872	1239	729	931	1061	797	214
3	509	919	610	682	663	500	129
4	404	559	481	462	414	409	87
5	297	458	402	366	296	335	58
6	161	375	379	212	242	274	
7	80	278	299	156	162	197	
8	43	207	250	123	124	151	
9	16	139	186	66	83	132	
10		42	146	41	59	108	
11			102			77	
12			76				
13			50				
14			40				

*Tamaño de las bandas en pares de bases (pb)

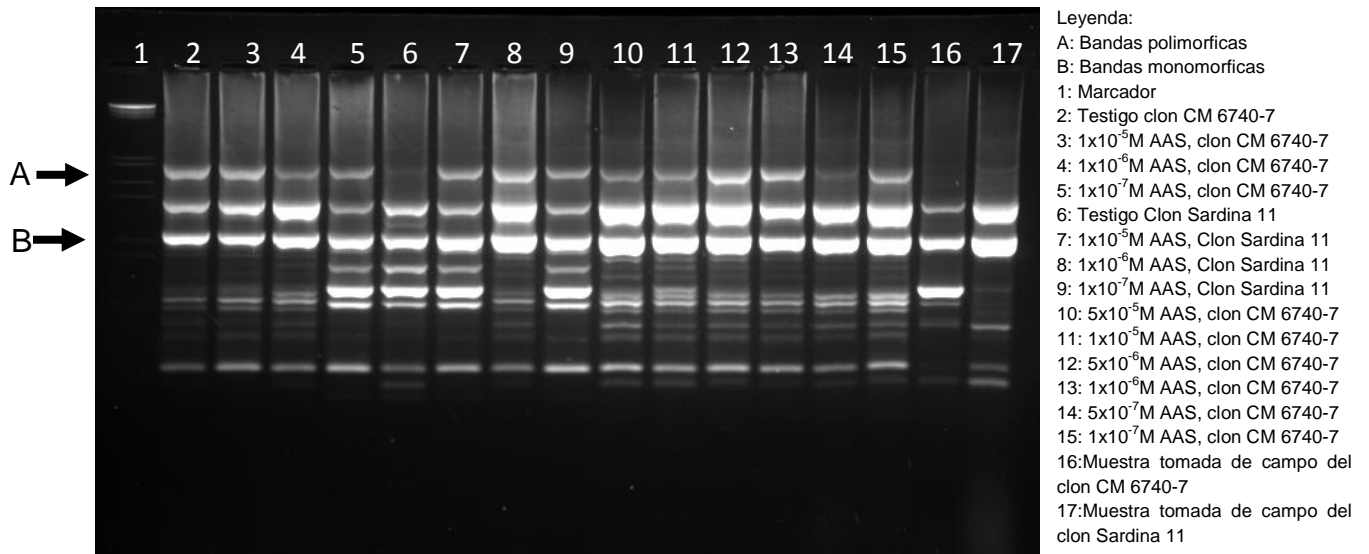


FIGURA 6: Gel de agarosa al 3% mostrando patrón de bandas monomórficas y polimórficas producidas por el iniciador Y09 en los clones Sardina 11 y CM 6740-7 de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) luego de conservada por siete meses bajo mínimo crecimiento en presencia de ácido acetilsalicílico.

Como se observa en el análisis de agrupamiento UPGMA, a través del dendrograma obtenido basado en la distancia de Jaccard (Figuras 7 y 8), las mayores diferencias de 0,64 se encontraron entre los clones; y luego entre la muestras de campo y la obtenida a partir de plantas conservadas *in vitro* (0,75 para el clon Sardina 11 y 0,79 para el clon CM 6740-7).

Durante el estudio de conservación *in vitro*, se utilizaron brotes regenerados a partir de ápices caulinares con el fin de minimizar el riesgo de variación genética, tal como fue propuesto por Roca y Mroginski (1991). Sin embargo, el análisis RAPD detectó polimorfismo entre las plantas adultas y los diferentes tratamientos de conservación. Debido a que todos los brotes fueron almacenados por un periodo de siete meses sin subcultivo, las causas de la variación podrían asociarse mas al medio de cultivo empleado, que al tiempo de permanencia de los brotes en los medios de conservación utilizados. El análisis RAPD separó a las plantas de campo de aquellos brotes conservados *in vitro*, indistintamente del tratamiento empleado. Estos resultados pueden estar asociados a los efectos de una exposición prolongada a medios de cultivo estresantes.

Probablemente, el comportamiento observado en los brotes conservados *in vitro*, fue debido a que bajo condiciones de estrés, se afectó bien sea el control del ciclo celular o bien los sistemas de reparación del ADN como fue sugerido por Phillips *et al.*, (1994). Los Investigadores Kaeppler y Phillips (1993) plantean que las alteraciones a nivel celular pueden manifestarse como daños en la fisiología de los tejidos, alteraciones en el ADN como consecuencia del estrés o ambas situaciones simultáneamente, lo cual posiblemente repercute en el deterioro progresivo de las plantas durante el periodo de conservación, lo que puede ser detectado como polimorfismo RAPD.

El análisis RAPD permitió discriminar por diferencias en sus patrones electroforéticos, todos los brotes almacenados bajo cuatro condiciones de crecimiento mínimo, permitiendo de esta manera detectar cuales de los tratamientos presentaban mayor similitud con el plantel madre.

Los resultados obtenidos por la técnica RAPD en la presente investigación, pueden ser utilizados como punto de partida para la planificación de estrategias de conservación a gran escala de *Manihot esculenta* Crantz, en sustitución de los actuales métodos de conservación basados en estrés osmótico, tal como ha sido señalado en papa (*Solanum tuberosum*) por López y Carrillo (1996); López *et al.* (1996) y López *et al.* (1998b). La información genética suministrada podría ser de utilidad con diversos fines o para uso inmediato por parte de fitomejoradores o biólogos moleculares.

Para ambos clones el patrón molecular de las plantas de campo difirió de los patrones moleculares para las plantas conservadas *in vitro*. Esto comprueba que la conservación *in vitro* causa un estrés que promueve cambios a nivel del ADN. Sin embargo, debe comprobarse su expresión a nivel fenotípico; ya que en otras investigaciones, al conservar plantas de yuca *in vitro* bajo mínimo crecimiento con métodos convencionales, las plantas mantuvieron su estabilidad genética la cual fue comprobada con técnicas RFLPs y RAPDs (Angel *et al.*, 1996).

El análisis molecular no reveló diferencias importantes entre los medios de cultivo utilizados, por lo que puede considerarse que todos causan algún nivel de cambio a nivel molecular. De esta manera, la selección del medio más adecuado depende de otros factores como el vigor y la sobrevivencia.

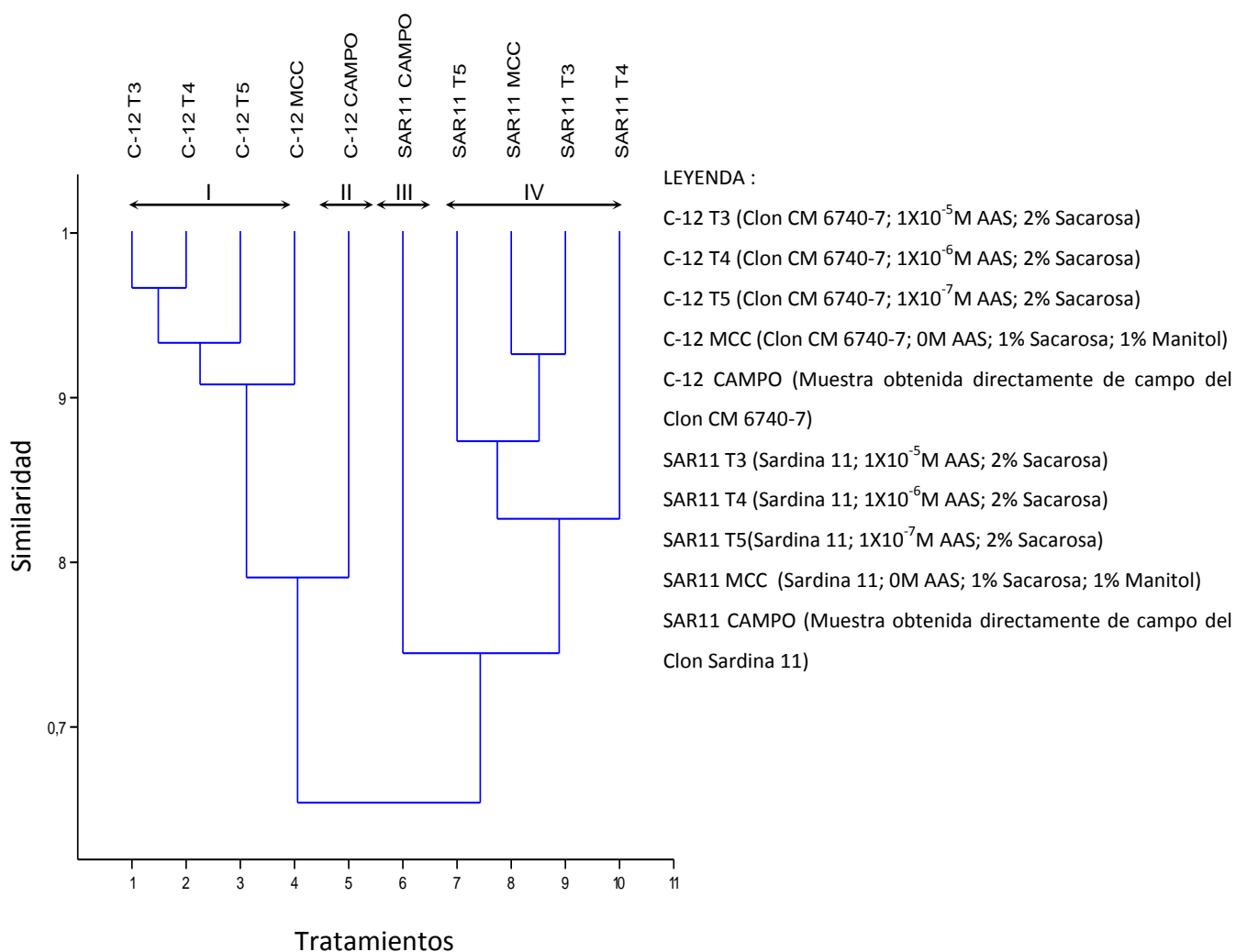
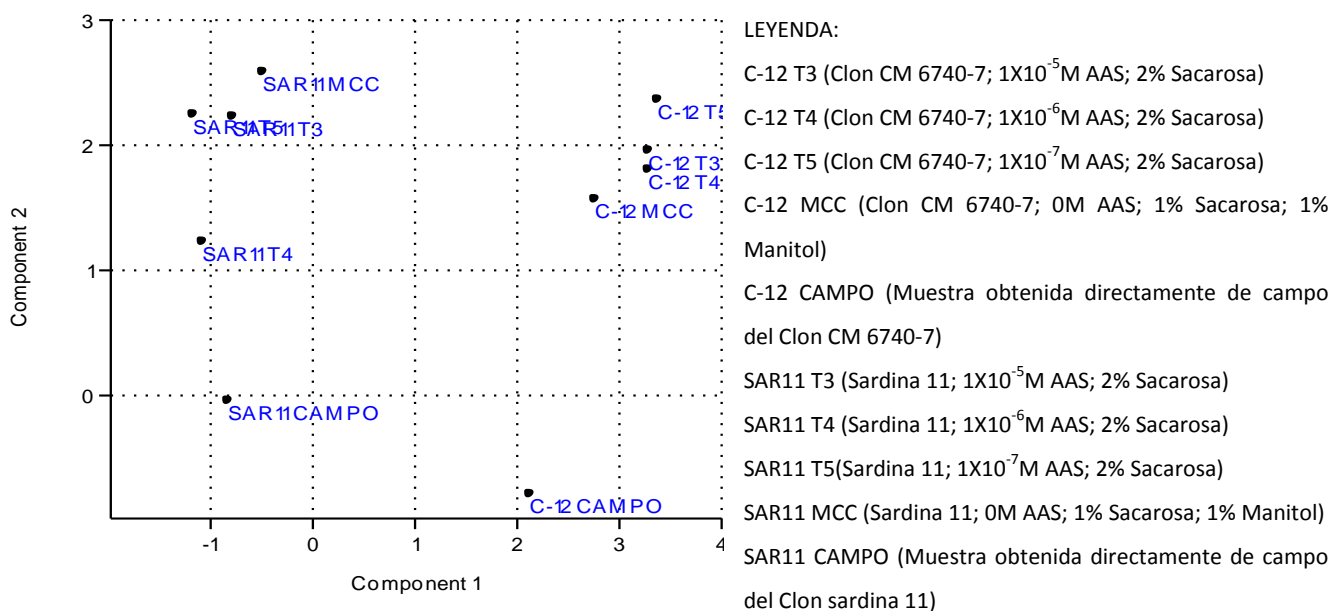


FIGURA 7: Dendrograma obtenido con siete iniciadores RAPD (UPMGA) basado en la distancia de Jaccard para la estabilidad genética de cuatro tratamientos de conservación *in vitro* en dos clones de yuca (*Manihot esculenta* Crantz).



Valor propio	%Varianza	%Varianza acumulada
4,28	52,54	52,54
1,22	15,07	67.61
0,65	8,04	75.65

FIGURA 8: Análisis por coordenadas principales (componentes) para la estabilidad genética de cuatro tratamientos de conservación *in vitro* en dos clones de yuca (*Manihot esculenta* Crantz)

1.6.2. EXPERIMENTO II

Los brotes del clon CM 6740-7 conservados bajo condiciones de crecimiento mínimo, mostraron variaciones en sus patrones electroforéticos cuando fueron comparados con las plantas provenientes directamente del campo. La descripción del comportamiento de las bandas obtenidas de los marcadores RAPDs es igual que como se describió en 1.6.1 basándose en los cuadros 17, 18 y en la figura 6.

Como se observa en el análisis de agrupamiento UPGMA, a través del dendrograma obtenido basado en la distancia de Jaccard (Figuras 9 y 10), las mayores diferencias de 0,79 se encontraron entre los tratamientos TIX (el más diluido de todos) y de campo respecto del resto de los tratamientos.

El análisis RAPD detectó polimorfismo entre todas las plantas. Las causas de la variación podrían asociarse al medio de cultivo empleado. El análisis RAPD separó a las plantas de campo y al tratamiento con menor concentración de AAS de aquellos brotes conservados *in vitro* en tratamientos más estresantes. Estos resultados pueden estar asociados a los efectos de una exposición prolongada a medios de cultivo estresantes, tal como fue explicado en 1.6.1, el comportamiento observado en los brotes conservados *in vitro* pudo estar relacionado al estrés, que pudo afectar bien sea el control del ciclo celular o bien los sistemas de reparación del ADN como fue sugerido por Phillips *et al.*, (1994) y Kaeppeler y Phillips (1993).

Los brotes del clon CM 6740-7 almacenados bajo seis condiciones de crecimiento mínimo pudieron ser separados por las diferencias en sus patrones de bandas electroforéticas, permitiendo de esta manera detectar que el tratamiento IX (1×10^{-7} M AAS; 2% Sacarosa) presentaba mayor similitud con el plantel madre.

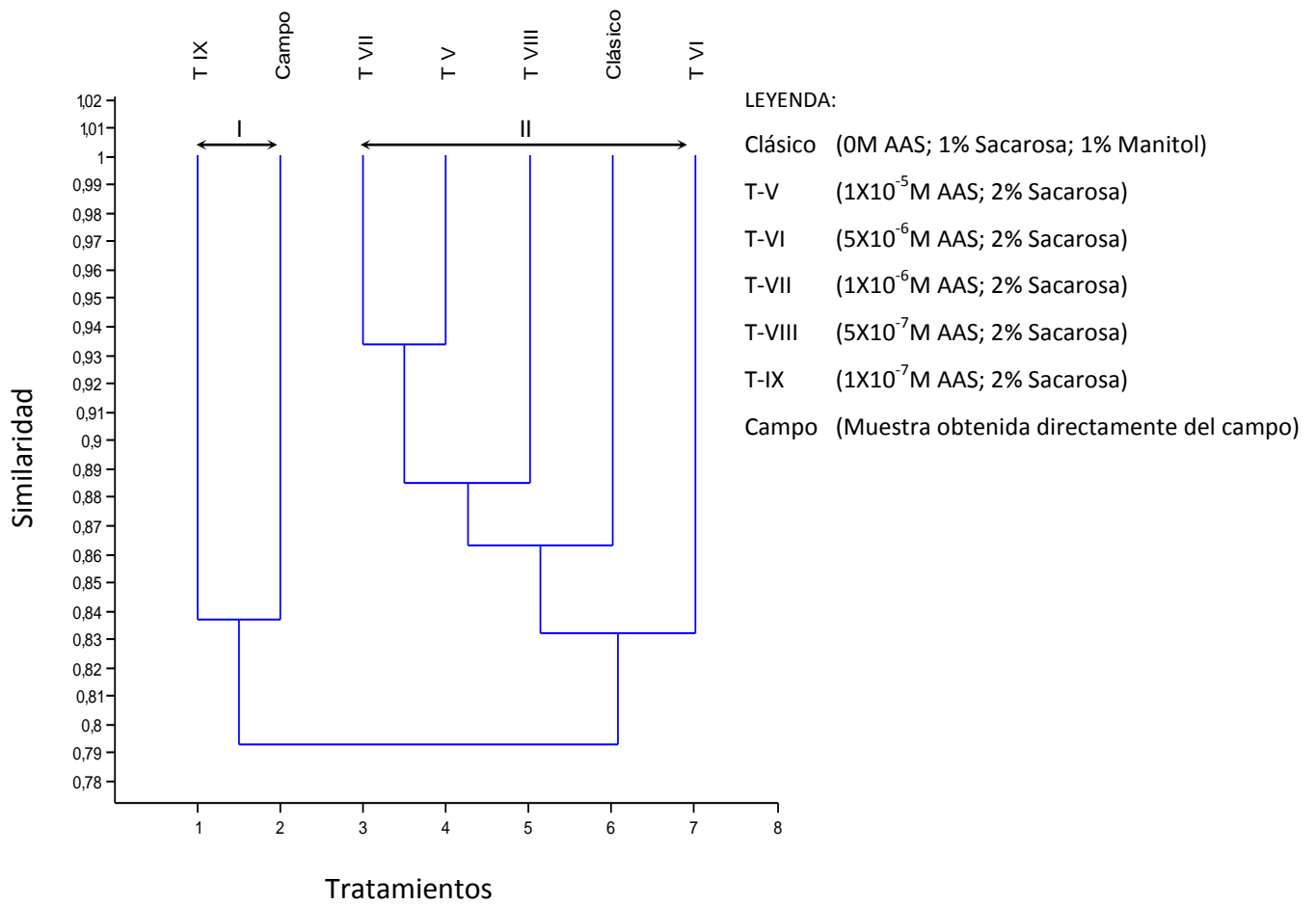
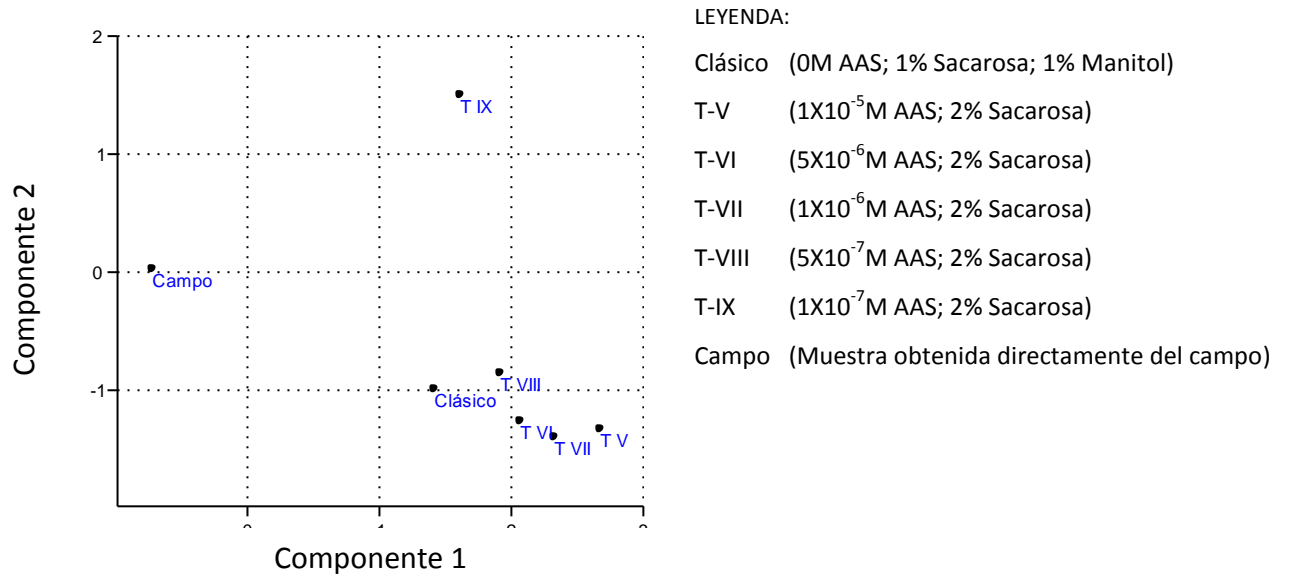


FIGURA 9: Dendrograma obtenido con siete iniciadores RAPD (UPMGA) basado en la distancia de Jaccard para la estabilidad genética de seis tratamientos de conservación *in vitro* del clon CM 6740-7 de yuca (*Manihot esculenta* Crantz).



Valor propio	%Varianza	%Varianza acumulada
1,24002	23,673	23,67
1,10433	21,083	44,75
1,06268	20,288	65,04
0,845349	16,138	81,18
0,473015	9,0303	90,21

FIGURA 10: Análisis por coordenadas principales para la estabilidad genética de seis tratamientos de conservación *in vitro* en el clon CM 6740-7 de yuca (*Manihot esculenta* Crantz).

1.7. Análisis de hipermetilación del ADN.

El ADN disponible fue de buena calidad, ya que no presentaba contaminación con ARN y se encontraba en cantidades suficientes para su digestión con enzimas de restricción.

Las enzimas utilizadas (HpaII y MspI) son enzimas de restricción que reconocen la misma secuencia en el ADN $\begin{pmatrix} C\downarrow CGG \\ GGC\uparrow C \end{pmatrix}$; es decir, esquizoméricas. Exhiben diferentes sensibilidades a la metilación del ADN. Si el ADN se encuentra metilado, la enzima HpaII no es capaz de digerir el ADN aunque este presente el sitio de restricción. Por el contrario, la enzima MspI es capaz de digerir el ADN este metilado o no. De esta manera, los resultados de la digestión con estas enzimas darían diferentes si el ADN estuviera metilado y similares si el ADN no estuviera metilado. En el cuadro 19 se presentan los resultados obtenidos de la digestión con las enzimas de restricción.

En ese cuadro puede apreciarse que el tratamiento testigo del clon 12 presentó hipermetilación del ADN, mientras que los demás tratamientos de ese clon y del Sardina 11 no la presentaron. Esta respuesta diferente puede deberse al carácter heterogéneo que tienen los clones de yuca al cultivárseles *in vitro*, sin embargo, no es aconsejable que los materiales estén hipermetilados ya que la estabilidad genética se ve comprometida. El tratamiento testigo empleaba una combinación de sacarosa y manitol para crear un estrés osmótico fuerte que retardara el crecimiento de las plantas, y ese mismo estrés osmótico es el que estaría involucrado en la metilación del ADN. Puede entonces verse que el AAS no retarda el crecimiento creando un fuerte estrés que provocaría una anormal metilación del ADN.

El experimento 2 tuvo resultados similares a los vistos para el clon CM 6740-7 en el Experimento 1, por lo que no se detectaron niveles importantes de Hipermetilación a excepción nuevamente del tratamiento testigo.

Por lo anterior se puede pensar que si las diferentes concentraciones utilizadas de AAS tendieron a no presentar hipermetilación del ADN en ninguno de los clones utilizados (CM 6740-7 y Sardina 11) sería conveniente tomar en cuenta este tipo de compuesto para la conservación *in vitro* y realizar un seguimiento de estas plantas luego de ser llevadas a condiciones de campo, porque ya se conoce que las plantas *in vitro* van realizando una serie de cambios para finalmente adaptarse a las condiciones de campo. Además, se ha venido observando la tendencia a que un tratamiento (1×10^{-5} M de AAS) ha mostrado buena respuesta en los anteriores experimentos de donde proviene el material vegetal (conservación y viabilidad) así como en este análisis de la Hipermetilación. Por ello, podría considerarse como mejor para ser utilizado inicialmente en sustitución del tratamiento convencional (medio con estrés osmótico) y esto es aun mas recomendable en el caso del clon CM 6740-7 quien presento Hipermetilación del ADN en el tratamiento testigo (estrés osmótico) en esta investigación.

Estos resultados coinciden plenamente con los hallados por Harding (1994), quien llevo a cabo varias investigaciones con el fin de determinar las condiciones de metilación del ADN y del ADNr en plantas de papa (*Solanum tuberosum*) conservadas bajo mínimo crecimiento. En esa investigación se comprobó que los medios suplementados con manitol causaron cambios morfológicos marcados en las vitroplantas. Al realizar una digestión del ADN de estas plantas con las enzimas de restricción HpaII/MspI y Eco RI/Bst NI, se encontró que presentaban hipermetilación tanto del ADN genómico, como del ribosómico. Una conclusión a la que se llegó es que dicha metilación puede ser una respuesta adaptativa a un elevado estrés osmótico.

CUADRO 19: Valores observados de digestión enzimática de dos clones de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) con las enzimas de restricción HpaII y MspI para determinar Hipermetilación del ADN, tras su conservación *in vitro* por siete meses.

Tratamiento	Dosis molar de AAS en conservación	HpaII (Sensible)	MspI (Insensible)	Conclusión
CM 6740-7				
T-1	0 M	1*	3,5	Esta Hipermetilado
T3	1x10 ⁻⁵ M	4	5	No esta Hipermetilado
T4	1x10 ⁻⁶ M	5	5	No esta Hipermetilado
T5	1x10 ⁻⁷ M	3	3	No esta Hipermetilado
Campo		1	2	No esta Hipermetilado
Sardina-11				
T-2	0 M	5	4	No esta Hipermetilado
T8	1x10 ⁻⁵ M	2,5	3	No esta Hipermetilado
T9	1x10 ⁻⁶ M	2,5	2,5	No esta Hipermetilado
T10	1x10 ⁻⁷ M	4	3,5	No esta Hipermetilado
Campo		5	3	No esta Hipermetilado

* Valores arbitrarios: 1- Sin digestión. 5- Totalmente digerido.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

Los clones bajo estudio se comportaron de manera diferente al cultivárseles *in vitro* con fines de multiplicación, son genotipo dependientes.

El clon Sardina 11 tuvo mayor crecimiento y desarrollo de la parte aérea que el clon CM 6740-7 en la fase de implantación de ápices con fines de multiplicación.

Se encontró correlación positiva entre el número de raíces, la altura del brote y el número de hojas; lo que indica que un número de raíces tiene un efecto de incremento de la altura y el número de hojas de los brotes cultivados *in vitro*.

Se observó una tendencia a que el clon Sardina 11 tuviera mayor sobrevivencia tras la fase de implantación de ápices con fines de multiplicación.

En la fase de conservación *in vitro* del experimento I, se observó que las dosis de 1×10^{-6} y 1×10^{-7} M de ácido acetilsalicílico indujeron mayor desarrollo de la parte aérea tras cuatro meses de conservación.

Luego de siete meses de conservación, el clon CM 6740-7 (ciclo de crecimiento intermedio) supero en cuanto a altura, número de hojas y número de nudos al clon Sardina 11 (ciclo corto).

Finalizados los siete meses de conservación de germoplasma, la dosis de AAS con donde las variables estudiadas presentaron mayor similitud al tratamiento testigo fue de 1×10^{-5} M AAS.

En el experimento II, se evidenció que las concentraciones con 1×10^{-5} y 5×10^{-6} M de AAS resultaron más parecidas al testigo; sin embargo, 1×10^{-5} M de AAS tendió a sobrevivir más en condiciones de campo por lo que se considera mejor para la conservación *in vitro* de germoplasma de yuca

Concentraciones de AAS mayores a 5×10^{-5} M no deben usarse con fines de conservación *in vitro* de germoplasma de yuca, ya que pasados siete meses de conservación tendieron a disminuir de manera notable la sobrevivencia de los brotes.

La viabilidad de los brotes conservados con la técnica tradicionalmente empleada en el laboratorio por estrés osmótico (testigos) en ambos experimentos se vio afectada.

El clon Sardina 11 tendió a perder toda su capacidad de regenerarse luego de ser conservada por siete meses en el medio usual de conservación por estrés osmótico utilizado como testigo en estas investigaciones.

Cualquier medio de los suplementados con AAS para conservación resultó mejor que el medio que empleó manitol (1%) en combinación con sacarosa (1%) para crear un estrés osmótico en esta investigación.

Se logró estudiar 69 bandas RAPDs mediante siete iniciadores, con tallas entre 40 y 1500 pb y con ellas evidenciar diferencias genéticas entre los clones bajo estudio.

Para ambos clones el patrón molecular de las plantas de campo difirió de los patrones moleculares para las plantas conservadas *in vitro*. Esto podría indicar que la conservación *in vitro* causa un estrés que puede promover cambios a nivel del ADN. Sin

embargo, debe comprobarse su expresión a nivel fenotípico ya que se conoce que las plantas tienen una serie de cambios a medida que se someten al proceso de aclimatación.

El análisis molecular no reveló diferencias importantes entre los medios de cultivo utilizados, todos causan algún cambio a nivel molecular.

Para el clon CM 6740-7 el patrón molecular de las plantas de campo y del tratamiento IX (concentración de AAS más baja: 1×10^{-7} M AAS y 2% Sacarosa), difirieron de los patrones moleculares para las demás plantas conservadas *in vitro*. Esto comprueba que la conservación *in vitro* causa un estrés que puede promover cambios a nivel del ADN al ser conservadas *in vitro* por siete meses. Sin embargo, debe comprobarse su expresión tanto a nivel molecular como fenotípico para ver si se mantiene esta tendencia al transplantarlas a condiciones de vivero y luego al campo.

Se detectó metilación del ADN en el tratamiento testigo del clon CM 6740-7, lo que parece indicar que esta respuesta de metilación está relacionada al estrés osmótico, aunque no se puede decir lo mismo con el otro clon utilizado (clon Sardina 11) ya que no presentó metilación.

La muestra observada de las plantas conservadas *in vitro* bajo mínimo crecimiento empleando AAS en esta investigación no presentó metilación del ADN, por lo que este tipo de conservación resulta mejor en comparación con el medio fuertemente estresante utilizado antes en conservación en este laboratorio e identificado como testigo. Como consecuencia de ello, el medio con 1×10^{-5} M de AAS que fue uno de los más adecuados por su respuesta de desarrollo intermedio observado en las variables estudiadas durante siete meses pudiera utilizarse para

conservar ambos clones de yuca con mayor seguridad en un periodo de tiempo similar al utilizado en esta investigación.

RECOMENDACIONES

Realizar investigaciones que empleen dosis de AAS de 1×10^{-5} y 5×10^{-6} ; en otros clones a fin de corroborar el efecto del mismo y hacer inferencias sobre su comportamiento en la especie.

No es recomendable en la conservación de germoplasma de yuca utilizar dosis mas concentradas de AAS (1×10^{-3} M y 1×10^{-4} M) ya que tienden a afectar negativamente la sobrevivencia de los brotes.

Seria recomendable iniciar una serie de ensayos con concentraciones diluidas de AAS (5×10^{-7} M) para verificar su efecto en el estimulo del desarrollo con fines de multiplicación *in vitro* en esta planta.

Realizar experimentos donde se combinen niveles de AAS adecuados para la conservación del germoplasma con otras concentraciones de las sales minerales presentes en el medio de cultivo y otras concentraciones de sacarosa.

Realizar ensayos que combinen el efecto en la conservación del AAS con factores ambientales tales como bajas temperaturas.

Probar el efecto del AAS y la termoterapia (efecto estresante) en el crecimiento de brotes de yuca con fines de multiplicación masiva *in vitro*.

Deben realizarse pruebas a nivel molecular si se va a emplear el estrés osmótico como forma de conservación de germoplasma, ya que conlleva el riesgo de inducir metilaciones anómalas del ADN o de reducir la viabilidad de los explantas de algunos clones conservados.

Establecer análisis de metilación del ADN como rutinarios entre las pruebas a los materiales conservados *in vitro* antes y después de llevarlos al campo a fin de realizar un seguimiento de este y así evitar posibles cambios genéticos del material vegetal de interés agrícola.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ADAMS, M.; CONTRERAS, F. 1996. Suelos y fertilizantes para el cultivo de la yuca. En: la yuca frente al hambre del mundo tropical. A. Montaldo. Compilador. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía y Veterinaria, CECOTUD-FEDEAGRO-fondo de crédito AGROPECUARIO. Maracay, Venezuela. 57-75.
- ALBARRAN, J.; FUENMAYOR, F.; FUCHS, M. 2003. Propagación clonal rápida de variedades comerciales de yuca mediante técnicas biotecnológicas. [enlinea] <http://www.ceniap.gov.ve/ceniaphoy/articulos/n3/texto/albaran.htm>.
- ALLEM, A. 1994. The origin of *Manihot esculenta* Crantz (Euphorbiaceae). Genetic Resources and Crop Evolution 41 : 133-150.
- ALVARENGA, S.; ABDELNOUR, A.; VILLALOBOS, V. 2007. Conservación *in vitro* de chayote (*Sechium edule*). Agronomía Mesoamericana 18: 65-73.
- ANGEL, F.; BARNEY, V.; TOHME, J.; ROCA, W. 1996. Stability of cassava plants at the DNA level after retrieval from 10 years of *in vitro* storage. Euphytica 90: 307-313.
- AZCÓN, C.; CANTOS, M.; TRONCOSO A.; BAREA M. 1997. Beneficial effect of arbuscular mycorrhizas on acclimatization of micropropagated cassava plantlets. Scientia Horticulturae 72: 63-7.
- BADILLO, V.; SCHNEE, L.; BENITEZ, C. 1985. Clave de las familias de plantas superiores de Venezuela. 7^{ma} edición. Venezuela, Espasande S.R.L. Editores. pp 270.

- BAJAJ, Y. 1983. Cassava plants from meristem cultures freeze-preserved for three years. *Field Crops Research* 7: 161-167.
- BARRUETO, P.; CARVALHO L. 2008. Importance of abscisic acid (ABA) in the *in vitro* conservation of cassava (*Manihot esculenta* crantz). *Chilean Journal Of Agricultural Research* 68(3):304-308.
- BELLOTTI, A. 1996. Las plagas de la yuca y su manejo. En: la yuca frente al hambre del mundo tropical. A. Montaldo. Compilador. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía y Veterinaria, CECOTUD-FEDEAGRO-fondo de crédito AGROPECUARIO. Maracay, Venezuela. 57-75.
- BERTRAND, A.; NOIROT, M.; CHARRIER A. 1992. Slow growth *in vitro* conservation of coffee (*Coffea spp.*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 31: 105-110.
- BUITRAGO, A. J. 1990. La yuca en la alimentación animal. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. 450 p.
- CHAPARRO, E. I., TRUJILLO, G. 2003. Enfermedades virales en el cultivo de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) en algunos estados de Venezuela. *Revista de la Facultad de Agronomía* 20(4): 461-467.
- CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL (CIAT). 1980. El Cultivo de meristemas de yuca. Serie 04SC-02.02. Cali, Colombia. 40 pp.
- DANSO, K.; FORD, B. 2003. Encapsulation of nodal cuttings and shoot tips for storage and exchange of cassava germplasm. *Plant Cell Reports* 21(8): 718-725.

- DIAZ, J. 1877. El agricultor Venezolano. Libreros-Editores Hermanos Rojas. Caracas, Venezuela. 283 p.
- DIVAKARAN, M.; NIRMAL, K.; PETER, K. 2006. Conservation of Vanilla species, *in vitro*. Scientia Horticulturae 110: 175–180
- ENGELMANN, F. 1991. *In vitro* conservation of tropical plant germplasm - a review. Euphytica 57: 227-243.
- ESCOBAR, R.; MANRIQUE, N.; DEBOUCK, D.; TOHME, J.; ROCA, W. 2006a. Cryopreservation of cassava shoot tips using the encapsulation-dehydration technique,[en línea].<http://www.danforthcenter.org/media/video/cbnv/session7/s7-09.htm>
- ESCOBAR, R.; MANRIQUE, N.; TOHME, J.; DEBOUCK, D. 2006b. Preliminary studies on the cryopreservation of meristems and seeds of wild manihot species,[en línea]. <http://www.danforthcenter.org/media/video/cbnv/session7/s7-08.htm>.
- ESPINOSA A.; SALAS L.; GONZÁLEZ O.; SILVA J. 2002. Empleo de ácido abscísico, manitol y la disminución de la concentración de las sales del medio de cultivo en la conservación *in vitro* de *Ipomoea batatas*. Biotecnología vegetal 2: 39-42.
- FAOSTAT Agricultura. 2009. superficie, producción y rendimiento de yuca. (En línea) dirección URL: <<http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>> (Consulta: Febrero, 2009).
- FERREIRA, M.; GRATTAPAGLIA, D. 1998. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. Brasil, EMBRAPA. pp 221.

- FORTES, G.; PEREIRA, J. 2001. Preservação *in vitro* da batata com Ácido acetilsalicílico e duas fontes de carbohidrato. Pesquisa Agropecuária Brasileira 36(10): 1261-1264.
- FUENMAYOR, F.; SCHMIDT, A.; FUCHS, M. 2001. Electroforesis de proteínas hidrosolubles e isoenzimas para caracterización de clones de yuca. Agronomía Tropical 51(4): 485-499.
- GARCIA, J.; MONTALDO, A. 1971. Exigencias hídricas de la yuca o mandioca (*Manihot esculenta*). Agronomía Tropical 21(1):25-31.
- GARCÍA, L.; PÉREZ, J.; RODRÍGUEZ, M.; PÉREZ, B.; MARTÍNEZ, Y.; SARRÍA, Z. 2003. Influencia de la formulación salina en la conservación de plantas *in vitro* de caña de azúcar a dos temperaturas. Biotecnología Vegetal 3(3): 155 – 160.
- GARCÍA, L.; PÉREZ, J.; RODRÍGUEZ, M.; PÉREZ, B.; MARTÍNEZ, Y.; SARRÍA, Z. 2004. Conservación *in vitro* de plantas de caña de azúcar. Biotecnología Vegetal 4(2): 101 – 105.
- GARCIA, L.; FERIA, M.; ACOSTA K. 2007. aspectos básicos de La conservación *in vitro* de germoplasma vegetal. Biotecnología Vegetal 7(2):67-79.
- GLASS, A. 1974. Influence of Phenolic Acids on Ion Uptake IV. Depolarization of membrane potentials. Plant Physiology 54: 855-858.
- GONZALEZ, R. 1999. Influencia de la termoterapia y de diferentes medios de cultivo en la conservación *in vitro* bajo mínimo crecimiento de clones de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Trabajo de grado, Facultad de Agronomía UCV. Maracay, 117 p.

- HAO, Y.; WEN, X.; DENG, X. 2004. Genetic and epigenetic evaluations of citrus calluses recovered from slow-growth culture. *Journal of Plant Physiology* 161: 479-484.
- HARDING, K. 1991. Molecular stability of the ribosomal RNA genes in *Solanum tuberosum* plants recovered from slow growth and cryopreservation. *Euphytica* 55 : 141-146.
- HARDING, K. 1994. The methylation status of DNA derived from potato plants recovered from slow growth. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 37: 31-38.
- HARPER, J.; BALKE, N. 1981. Characterization of the Inhibition of K⁺ Absorption in Oat Roots by Salicylic Acid. *Plant Physiology* 68: 1349-1353.
- HARTMAN, H.; KESTER, D. 1994. Propagación de plantas, principios y prácticas. 3ra reimpresión de la segunda edición. México, Compañía Editorial Continental, S.A. de C.V. p. 94.
- HASSAN, A. 2003. Slow Growth Storage of Encapsulated Germplasm of *Coffea arabica* L. *International Journal Of Agriculture & Biology* 5(4): 517-520.
- HELLIOT, B.; MADUR, D.; DIRLEWANGER, E.; BOUCAUD, M. 2002. Evaluation of genetic stability in cryopreserved prunus. *in vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 38:493–500.
- HERNANDEZ, Y. 1996. Revisión sobre investigaciones de las enfermedades de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz) en Venezuela. En: la yuca frente al hambre del mundo tropical. A. Montaldo. Compilador. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía y Veterinaria, CECOTUD-FEDEAGRO-fondo de crédito AGROPECUARIO. Maracay, Venezuela. 57-75.

- JOYCE, S.; CASSELLS, A. 2002. Variation in potato microplant morphology *in vitro* and DNA methylation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 70: 125–137.
- KAEPLER, S.; PHILLIPS, R. 1993. DNA methylation and tissue culture induced variation in plants. *in vitro Cellular & Developmental Biology* 29:125-130.
- KODA, Y.; TAKAHASHI, K.; KIKUTA, Y. 1992. Potato tuber-inducing activities of salicylic acid and related compounds. *Journal of Plant Growth Regulation* 11: 215-219.
- LI, X.; XU, M.; KORBAN, S. 2002. DNA methylation profiles differ between field- and *in vitro*-grown leaves of apple. *Journal of Plant Physiology* 159: 1229-1234.
- LOPEZ, H.; CARRILLO, G. 1996. Acetylsalicylic acid: its effects on a highly expressed phosphatase from *Solanum cardiophyllum*. *Biotechnologia Aplicada* 13: 186-189.
- LOPEZ, H.; DAT, J.; FOYER, C.; SCOTT, I. 1998a. Induction of thermotolerance in potato microplants by acetylsalicylic acid and H₂O₂. *Journal of Experimental Botany* 49(321):713-720.
- LOPEZ, H.; JIMENEZ, M.; SCOTT, I. 1998b. Storage of potato microplants *in vitro* in the presence of acetylsalicylic acid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 54:145-152.
- LOPEZ, H.; SCOTT, I. 1996. Induction of *In vitro* Tuberization of Potato Microplants by Acetylsalicylic Acid. *Journal of Plant Physiology* 151:74-78.
- MANTILLA, J. 1996. Producción de material de propagación de yuca. En: la yuca frente al hambre del mundo tropical. A. Montaldo. Compilador. Universidad Central de

- Venezuela. Facultad de Agronomía y Veterinaria, CECOTUD-FEDEAGRO-fondo de crédito AGROPECUARIO. Maracay, Venezuela. 57-75.
- MARCANO, R. 1996. Principales plagas de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz) en Venezuela. En: la yuca frente al hambre del mundo tropical. A. Montaldo. Compilador. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía y Veterinaria, CECOTUD-FEDEAGRO-fondo de crédito AGROPECUARIO. Maracay, Venezuela. 141-152.
- MARÍN, A. 2005. Evaluación del comportamiento *in vitro* e *in vivo* de veinte materiales elites de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Trabajo de grado, Facultad de Agronomía UCV. Maracay, 98 p.
- MIRANDA, I.; SMITH, R. 2001. Protocolo de micropropagação da mandioca. En: Culturas de Tuberosas Amiláceas Latinoamericanas. Volume 2: Cultura de tuberosas amiláceas Latino Americanas. Fundação Cargill. São Paulo, Brasil. pp. 13-37.
- MIRELES, M.; PAEZ, J. 1984. Inducción de "roseta" en yuca (*Manihot esculenta* Crantz) para la propagación múltiple de la planta *in vitro*. Revista de la Facultad de Agronomía-Alcance 33: 73- 81.
- MONTALDO, A.; GUNZ, T.; MONTILLA, J.; ALEMAN,S. 1985. La Yuca o mandioca: cultivo, industrialización, aspectos económicos, empleo en la alimentación animal, mejoramiento. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. San Jose, Costa Rica, 386 p.
- MONTALDO, A.; MONTILLA, J. 1996. La yuca frente al hambre del mundo tropical. En: la yuca frente al hambre del mundo tropical. A. Montaldo. Compilador. Universidad Central de

- Venezuela. Facultad de Agronomía y Veterinaria, CECOTUD-FEDEAGRO-fondo de crédito AGROPECUARIO. Maracay, Venezuela. 19-34.
- MUÑOZ, M. 1991. Efecto del ácido acetil salicílico en conservación *in vitro* de quince variedades de yuca (*Manihot esculenta* Crantz), [en línea]. <http://orton.catie.ac.cr/cgi-bin/wxis.exe/>. Consulta 2008.
- MURASHIGE, T. and SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- NAKAO, M. 2001. Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin. *Gene* 278: 25-31.
- NASSAR, N.; DOS SANTOS, E.; DAVID, S. 2000. The transference of apomixis genes from *Manihot neusana* Nassar to cassava, *M. esculenta* Crantz. *Hereditas* 132: 167- 170.
- OLSEN, K.; SCHAAL, B. 1999. Evidence on the origin of cassava: Phylogeography of *Manihot esculenta*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96: 5586-5591.
- OLSEN, K.; SCHAAL, B. 2001. Microsatellite variation in cassava (*Manihot esculenta*, euphorbiaceae) and its wild relatives: further evidence for a southern amazonian origin of domestication. *American Journal of Botany* 88(1): 131-142.
- OSPINA, B., CEBALLOS, H. 2002. La yuca en el tercer milenio, sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización. Cali, Colombia, publicación CIAT N° 327, Centro Internacional de Agricultura Tropical. 586 p.

- PAEZ, J. 1984. Brotes foliares *in vitro* y su producción a partir de ápices caulinares para la micropropagación de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz). I. efecto del agar. Revista de la Facultad de Agronomía-Alcance 33: 83- 99.
- PAEZ, J. 1989. Propagación *in vitro* de dos cultivares de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Revista de la Facultad de Agronomía 38: 139-146.
- PAEZ, J.; GONZALEZ, R. 2001. Conservación *in vitro* de dos variedades de papa (*Solanum tuberosum* L) bajo condiciones de crecimiento mínimo. Revista Latinoamericana de la Papa 12:121-129.
- PARDO, A. 2007. Cultivo de tejidos e inducción de mutaciones en *Billbergia rosea* Hortus ex Beer (Bromeliaceae). Trabajo de Doctorado, Facultad de Agronomía UCV. Maracay, 229 p.
- PEDROSO, R.; DE OLIVEIRA, S.; MAGALHÃES, K.; GARCIA, D. 2000. *in vitro* conservation of diploid banana accessions. Scientia Agricola 57(2): 245-249.
- PERAZA, S.; HERRERA, V.; KAY, A. 2001. Detection of DNA methylation changes in micropropagated banana plants using methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP). Plant Science 161: 359-367.
- PHILLIPS, R.; KAEPLER, S.; OLHOFT, P. 1994. Genetic instability of plant tissue cultures: breakdown of normal controls. Proceedings of the National Academy of Sciences 91:5222-5226
- PIERPOINT, W. 1994. Salicylic Acid and its Derivatives in Plants: Medicines, Metabolites and Messenger Molecules. Advances in Botanical Research 20: 163-235.

- PINTO, E.; FERREIRA, M.; CALHEIROS, L.; RAMALHO, C.; ALBUQUERQUE, M. 2002. Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. Pesquisa Agropecuária Brasileira 37(10): 1359-1364.
- POPOVA, L.; PANCHEVA, T.; UZUNOVA, A. 1997. Salicylic acid: properties, biosynthesis and physiological role. Bulgarian Journal of Plant Physiology 23 (1-2): 85-93.
- RASKIN, I. 1992a. Role of salicylic acid in plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 43: 439-463.
- RASKIN, I. 1992b. Salicylate, a new plant hormone. Plant Physiology 99: 799-803.
- RAYAS, A.; MEDEROS, V.; GARCÍA, M.; LÓPEZ, J.; CABRERA, M.; VENTURA, J.; MARTÍNEZ, M.; GUTIÉRREZ, V.; ÁLVAREZ, M.; BAUTA, M. 2002. Estudio de medios de cultivo para la conservación *in vitro* de la yuca. Biotecnología vegetal 2(4): 249-251.
- ROCA, M. 1980. Meristem Culture in Cassava - Principles and Methodology. CIAT, Cali, Colombia.
- ROCA, M. y MROGINSKI, L. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Colombia. 969 p.
- SARKAR, D.; NAIK P. 1998. Factors affecting minimal growth conservation of potato microplants *in vitro*. Euphytica 102:275-280.
- SCHMIDT A.; FUENMAYOR F.; FUCHS M. 2003. Caracterización de clones de yuca (*Manihot esculenta*) mediante marcadores protéicos e isoenzimáticos. Interciencia 28(12): 690-698.

- SILVERMAN, P.; SESKAR, M.; KANTER, D.; SCHWEIZER, P.; MÉTRAUX, J.; RASKIN, I. 1995. Salicylic acid in rice. *Plant physiology* 108: 633-639.
- TADEU, A.; PASQUAL, M.; SUSUMO, J.; CORREA, L. 1995. Aclimataçao de plantas provenientes da cultura *in vitro*. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 30 (1): 49-53.
- TAYLOR, P.; DUKIC S. 1993. Development of an *in vitro* culture technique for conservation of *Saccharum spp.* hybrid germplasm. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 34: 217-222.
- WESTCOTT, R. 1981. Tissue culture storage of potato germplasm. 2. Use of growth retardants. *Potato Research* 24(3): 343 352.
- WITHERS, L.; WHEELANS, S.; WILLIAMS, J. 1990. *in vitro* conservation of crop germplasm and the IBPGR databases. *Euphytica* 45: 9-22,1990.
- XENA N. 2000. Una década de aplicación del método rapd: alcances y limites en el estudio de relaciones genéticas en plantas. *Acta Científica Venezolana* 51: 197–206.
- XIONG, L.; XU, C.; SAGHAI, M. 1999. Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental lines, detected by a methylation-sensitive amplification polymorphism technique. *Molecular Genetics and Genomics* 261: 439-446.
- XU, M.; LI, X.; KORBAN, S. 2000. AFLP-based detection of DNA methylation. *Plant Molecular Biology Reporter* 18: 361-368.
- ZAMBRANO, A.; DEMEY, J.; FUENMAYOR, F.; SEGOVIA, V.; GUTIERREZ, Z. 2003. Diversidad genética de una colección de yuca a través de marcadores moleculares RAPDs. *Agronomía Tropical* 53(2): 157-173.

ZAMBRANO, A.; DEMEY, J.; MARTINEZ, G.; FUENMAYOR, F.; GUTIERREZ, Z.; SALDAÑA Y TORREALBA, M. 2002. Método rápido, económico y confiable de minipreparación de ADN para amplificaciones por PCR en bancos de germoplasma. *Agronomía Tropical* 52: 235-243.

ZARRAGA, P. 2009. Comunicación personal. Instituto de Agronomía. Facultad de Agronomía UCV.

ANEXOS

ANEXO 1. Preparación del Ácido Acetilsalicílico.

Partiendo de que el Ácido Acetilsalicílico (ASA) tiene un peso molecular de 180,2 g/mol se preparó una solución 1 disolviendo 1,802 g de ASA en agua y enrasándolo luego a 1L. A esta concentración el ASA se disuelve sin problemas, ya que su solubilidad en agua es del orden de 1mg/mL, se aplicó algo de calor para disolver algunos granulos. Luego se tomaron 10 mL de la solución 1 y se colocaron en un balón aforado de 100 mL y se enrasó con agua destilada y desionizada, de esta forma se obtuvo la solución 2. De la solución 2 se tomaron de igual forma 10 mL que se enrasaron con agua hasta 100 mL para formar la solución 3 y se repitió este procedimiento nuevamente para obtener una solución 4.

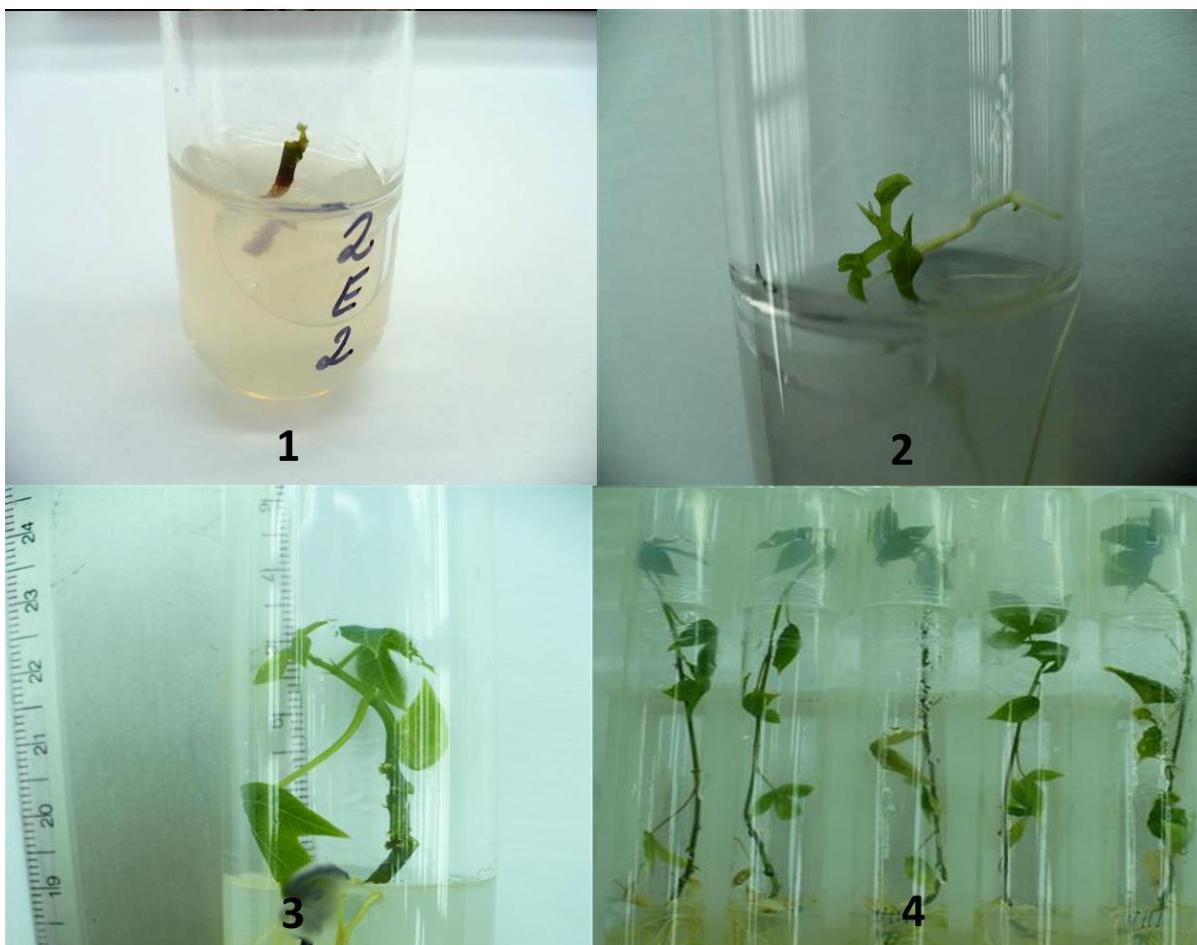
Una vez preparadas las 4 soluciones madres se procedió de la siguiente forma:

- Para preparar 1 L de medio de cultivo a 1×10^{-3} M se tomaron 100 mL de la solución 1.
- Para 1/2L de medio a 5×10^{-4} M se tomaron 25 mL de la solución 1.
- Para 1L de medio a 1×10^{-4} M se tomaron 10 mL de la solución 1.
- Para 1/2L de medio a 5×10^{-5} M se tomaron 25 mL de la solución 2.
- Para 1L de medio a 1×10^{-5} M se tomaron 10 mL de la solución 2.
- Para 1/2L de medio a 5×10^{-6} M se tomaron 25 mL de la solución 3.
- Para 1L de medio a 1×10^{-6} M se tomaron 10 mL de la solución 3.
- Para 1/2L de medio a 5×10^{-7} M se tomaron 25 mL de la solución 4.
- Para 1L de medio a 1×10^{-7} M se tomaron 10 mL de la solución 4.

ANEXO 2. Descripción del significado de la variable vigor del brote.

1. Poco vigoroso: brote muerto o muy poco desarrollado, con pocas hojas y longitud del brote si lo hubiere no mayor a medio centímetro, coloraciones verdes claras a amarillentas, aspecto moribundo.
2. Medianamente vigoroso: brotes en crecimiento activo, longitud mayor a medio centímetro, coloración verde claro con o sin clorosis, pocas hojas verdes o caídas.
3. Muy vigoroso: brote en activo crecimiento, con coloraciones verdes muy fuertes aún cuando pueda presentar algo de clorosis, el brote no llega hasta la tapa del tubo de ensayo, abundantes hojas verdes y caídas.
4. Altamente vigoroso: brote en pleno crecimiento, coloraciones muy verdes, aspecto fuerte, poca clorosis, el brote puede llegar a la tapa y enroscarse, abundantes hojas verdes y desprendidas, tallo grueso y fuerte.

ANEXO 3. Observaciones de la variable vigor del brote de plantas de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) conservadas *in vitro* bajo mínimo crecimiento con Ácido Acetilsalicílico (AAS).



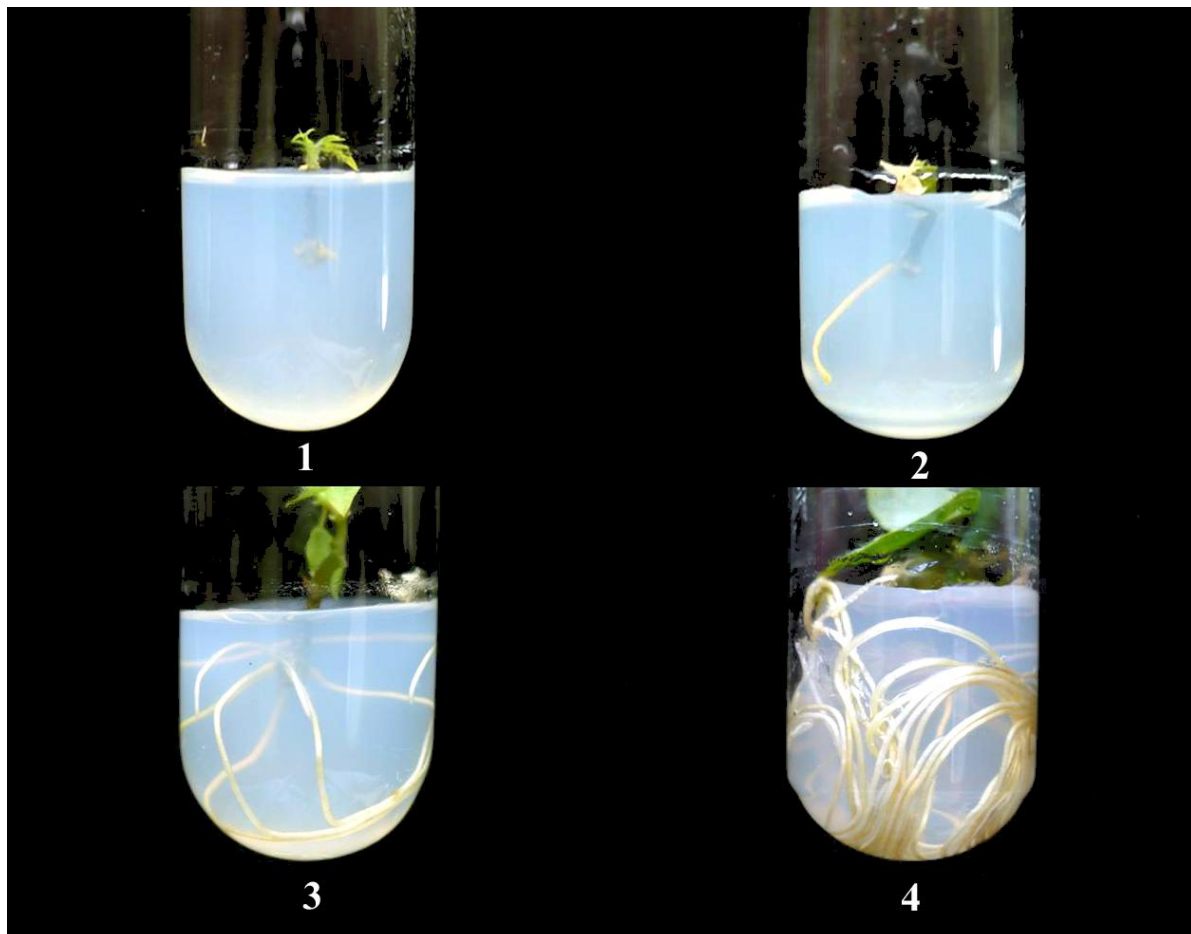
Escala arbitraria de valores de vigor del brote:

1. Poco vigorosas.
2. Medianamente vigorosas.
3. Muy vigorosas.
4. Altamente vigorosas.

ANEXO 4. Descripción del significado de la variable vigor de la raíz.

1. Poco vigoroso: ninguna raíz o raíces muy pequeñas o escasas, la raíz mas larga no supera los 5 milímetros.
2. Medianamente vigoroso: raíces abundantes que pueden superar los 5 milímetros de longitud, pero que no llegan a tocar nunca el tubo de ensayo.
3. Muy vigoroso: abundantes raíces, al menos una de ellas toca el tubo de ensayo pero en ningún caso se enrolla, aún puede medirse la longitud de la raíz mas larga.
4. Altamente vigoroso: abundantes raíces que se enrollan sobre si mismas, haciendo muy difícil o imposible la medición de la longitud de la raíz mas larga.

ANEXO 5. Vigor de la raíz de plantas de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) conservadas *in vitro* bajo mínimo crecimiento con Ácido Acetilsalicílico.



Escala arbitraria de valores de vigor de la raíz:

1. Poco vigorosas.
2. Medianamente vigorosas.
3. Muy vigorosas.
4. Altamente vigorosas.

ANEXO 6. Clorosis intervenal presente en plantas de yuca (*Manihot esculenta Crantz*) conservadas *in vitro* bajo mínimo crecimiento con Ácido Acetilsalicílico por siete meses.



ANEXO 7. Aclimatación en campo de plantas de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) conservadas *in vitro* bajo mínimo crecimiento por siete meses.

