

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

**ESTUDIO CONDUCENTE AL ESTABLECIMIENTO DE UN
PROTOCOLO PARA EL PRETRATAMIENTO Y LA
CRIOCONSERVACIÓN DE ÁPICES DE CEDRO (*CEDRELA
ODORATA L.*).**

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

ALEJANDRA MEDRANO BRICEÑO

CARTAGO NOVIEMBRE, 2009.

ESTUDIO CONDUCENTE AL ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO PARA EL PRETRATAMIENTO Y LA CRIOCONSERVACIÓN DE ÁPICES DE CEDRO (CEDRELA ODORATA L.).

Alejandra Medrano Briceño*

1. RESUMEN

Debido a los problemas de deforestación y el ataque en plantaciones del barrenador *Hypsipyla grandella* Zeller, el cual ataca las plantas jóvenes de cedro (*Cedrela odorata* L.) en la yema apical causándoles bifurcaciones en los fustes, se procedió a establecer y evaluar protocolos para el pretratamiento y crioconservación de ápices de cedro. Se realizó la crioconservación por medio de las técnicas de microgota y de encapsulamiento-deshidratación, para los cual se siguieron los protocolos descritos por Sakai y Engelmann (2007) y Engelmann (2004), respectivamente. Se obtuvo con la técnica de microgota un porcentaje de sobrevivencia y regeneración del 34% y del 8%, respectivamente; mientras que los ápices que fueron congelados los porcentajes de sobrevivencia y de regeneración fueron del 10% y del 0%. En la técnica de encapsulamiento-deshidratación la sobrevivencia y regeneración de los ápices NL- fue del 8% y del 0%, respectivamente, y en los ápices NL+ los porcentajes de sobrevivencia y regeneración fueron del 0%. Se recomienda profundizar en los pre-cultivos utilizados, en las concentraciones y tiempo de exposición de las soluciones empleadas para la técnica de microgota, especialmente la solución PVS2. Además de afinar la curva de deshidratación, para obtener datos que puedan correlacionar el porcentaje de humedad con la sobrevivencia de los ápices encapsulados.

1.1. PALABRAS CLAVES: *Cedrela odorata* L., microgota, encapsulamiento-deshidratación, crioconservación.

* INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN, Escuela de Ingeniería en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2009.

ESTUDIO CONDUCENTE AL ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO PARA EL PRETRATAMIENTO Y LA CRIOCONSERVACIÓN DE ÁPICES DE CEDRO (CEDRELA ODORATA L.).

Alejandra Medrano Briceño*

2. ABSTRACT

Due to the problems of deforestation and the attack of the plantation borer *Hypsipyla grandella* Zeller, which attacks the seedlings of cedar (*Cedrela odorata* L.) in the apical bud causing bifurcations in the shafts, it proceeded to establish and evaluate protocols for pretreatment and cryopreservation of shoot tips of cedar. Cryopreservation was performed using droplet vitrification and encapsulation-dehydration techniques, for which followed the protocols described by Sakai and Engelmann (2007) and Engelmann (2004), respectively. It was obtained with the droplet vitrification technique a percentage of survival and regeneration of 34% and 8%, respectively, while the apices that were frozen the rates of survival and regeneration were 10% and 0%. In the encapsulation-dehydration technique survival and regeneration of the NL- tips was 8% and 0%, respectively, and with the tips NL+ the survival and regeneration percentages were 0%. We recommend intensify the pre-culture used, the concentrations and exposure time of the solutions to the droplet vitrification technique, especially PVS2 solution. In addition we recommend refining the dehydration curve, to obtain data that can correlate the moisture to the survival of encapsulated apices.

2.2. KEYWORDS: *Cedrela odorata* L., droplet vitrification, encapsulation-dehydration, cryopreservation.

* INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN, Escuela de Ingeniería en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2009.

**ESTUDIO CONDUCENTE AL ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO PARA EL
PRETRATAMIENTO Y LA CRIOCONSERVACIÓN DE ÁPICES DE CEDRO
(CEDRELA ODORATA L.).**

Informe presentado a la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica
como requisito parcial para optar al título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología.

Miembros del Tribunal



Dr. Ana Abdelnour Esquivel,
Profesora Asesora-ITCR



MSc. Dora María Flores Mora
Profesora Asesora-CIB



MSc. Silvana Alvarenga Venutolo,
Lectora

3. DEDICATORIA

A mi madre y hermano por su apoyo
durante todo este tiempo.

Alejandra

4. AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a la profesora Ana Abdelhour, por su apoyo y paciencia durante todo este tiempo, además a todos mis compañeros del CIB, especialmente a Montserrat y Pilar, por ser tan buenas conmigo, mil gracias.

5. INDICE GENERAL

1.	RESUMEN.....	2
2.	ABSTRACT	3
4.	AGRADECIMIENTOS.....	6
5.	INDICE GENERAL	7
6.	INDICE DE TABLAS.....	9
7.	INDICE DE FIGURAS.....	11
8.	INTRODUCCIÓN	12
9.	REVISIÓN DE LITERATURA.....	14
9.1.	CONSERVACIÓN DEL GERMOPLASMA VEGETAL.....	15
9.3.	CRIOCONSERVACIÓN	18
9.3.1.	<i>Técnicas clásicas de criopreservación</i>	19
9.3.2.	<i>Técnicas modernas de criopreservación</i>	19
9.4.	CEDRO (<i>CEDRELA ODORATA L.</i>).....	21
10.	OBJETIVO GENERAL	23
11.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
12.	MATERIALES Y MÉTODOS	24
12.1.	CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE CEDRO	24
12.1.1.	<i>Introducción in vitro del material</i>	24
12.1.2.	<i>Multiplicación in vitro del material</i>	25
12.1.3.	<i>Regeneración de los ápices aislados</i>	25
12.2.	PROCEDIMIENTO DE MICROGOTA	26
12.2.1.	<i>Aislamiento y Pre-cultivo de los ápices</i>	26
12.2.2.	<i>Criopreservación de los ápices utilizando la técnica de microgota</i>	27
12.3.	PROCEDIMIENTO DE ENCAPSULAMIENTO-DESHIDRATACIÓN	29
12.3.1.	<i>Aislamiento y encapsulado de los ápices</i>	29
12.3.2.	<i>Pre-cultivo de los ápices encapsulados</i>	29
12.3.3.	<i>Curva de deshidratación</i>	30
12.3.4.	<i>Efecto de la deshidratación en la supervivencia y regeneración de los ápices encapsulados</i> 31	
12.3.5.	<i>Criopreservación de los ápices encapsulados</i>	31
13.	RESULTADOS.....	32

13.1.	CULTIVO <i>IN VITRO</i> DEL MATERIAL VEGETAL	32
13.1.1.	<i>Germinación in vitro de las semillas</i>	32
13.1.2.	<i>Multiplicación in vitro del material</i>	32
13.1.3.	<i>Regeneración de los ápices aislados</i>	33
13.2.	PROCEDIMIENTO DE MICROGOTA	34
13.2.1.	<i>Aislamiento y pre-cultivo de los ápices</i>	34
13.2.2.	<i>Crioconservación de los ápices utilizando la técnica de microgota</i>	35
13.3.	PROCEDIMIENTO DE ENCAPSULAMIENTO-DESHIDRATACIÓN	37
13.3.1.	<i>Aislamiento y encapsulado de los ápices</i>	37
13.3.2.	<i>Pre-cultivo de los ápices encapsulados</i>	37
13.3.3.	<i>Curva de deshidratación</i>	38
13.3.4.	<i>Efecto de la deshidratación en la sobrevivencia y regeneración de los ápices encapsulados</i> 39	
13.3.5.	<i>Crioconservación de los ápices encapsulados</i>	40
14.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	42
14.1.	CULTIVO <i>IN VITRO</i> DEL MATERIAL	42
14.1.1.	<i>Regeneración de los ápices aislados</i>	43
14.2.	PROCEDIMIENTO DE MICROGOTA	43
14.2.1.	<i>Aislamiento, pre-cultivo y crioconservación de los ápices aislados utilizando la técnica de microgota</i>	43
14.3.	PROCEDIMIENTO DE ENCAPSULAMIENTO-DESHIDRATACIÓN	45
14.3.1.	<i>Aislamiento y encapsulado de los ápices</i>	45
14.3.2.	<i>Pre-cultivo de los ápices encapsulados</i>	45
14.3.3.	<i>Curva de deshidratación y efecto de la deshidratación en la sobrevivencia y regeneración de los ápices encapsulados</i>	46
14.3.4.	<i>Crioconservación de los ápices encapsulados</i>	48
16.	LITERATURA CITADA	50
17.1.	APÉNDICE 1	54
17.2.	APÉNDICE 2	55
17.3.	APÉNDICE 3	56
17.4.	APÉNDICE 4	57
17.5.	APÉNDICE 5	58
17.6.	APÉNDICE 6	59
17.7.	APÉNDICE 7	60
17.8.	APÉNDICE 8	61

6. INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Medios de cultivo evaluados para la multiplicación de las plántulas de cedro (<i>Cedrela odorata</i> L.).....	25
Tabla 2. Medios de cultivo evaluados para la regeneración de los ápices de cedro (<i>Cedrela odorata</i> L.).....	26
Tabla 3. Germinación <i>in vitro</i> de las semillas de cedro (<i>Cedrela odorata</i> L.).....	32
Tabla 4. Efecto del medio de cultivo en la regeneración de ápices de cedro (<i>Cedrela odorata</i> L.)*	33
Tabla 5. Porcentaje de regeneración de ápices de cedro (<i>C. odorata</i> L.) después del pre-cultivo en sacarosa o sacarosa más DMSO por 24 horas; seguidos por la incubación en la solución de carga (LD) y en la solución PVS2.	35
Tabla 6. Porcentaje de sobrevivencia y regeneración de los ápices de (<i>Cedrela odorata</i> L.), luego del congelamiento (NL+) y el no congelamiento (NL-) en nitrógeno líquido con la técnica de microgota *	36
Tabla 7. Efecto del aislamiento y encapsulado sobre la sobrevivencia de ápices de cedro (<i>Cedrela odorata</i> L.) cultivados en condiciones <i>in vitro</i>	37
Tabla 8. Determinación de la sobrevivencia de los ápices de cedro (<i>Cedrela odorata</i> L.) encapsulados y precultivados en concentraciones crecientes de sacarosa por 48 y 96 horas*	38
Tabla 9. Sobrevivencia y regeneración de los ápices de cedro (<i>Cedrela odorata</i> L.) encapsulados, precultivados y deshidratados por 16 horas (NL-) y de los ápices que se sometieron al proceso de encapsulamiento, pre-cultivo, deshidratación y el congelamiento en nitrógeno líquido (NL+).	41
Tabla 10. Composición química del medio de cultivo básico Murashige y Skoog (1962). Base para la preparación de los medios utilizados en la práctica.....	54
Tabla 11. Composición del medio de cultivo semisólido utilizado para la introducción de <i>in vitro</i> de las semillas de cedro (<i>Cedrela odorata</i> L.). Medio de cultivo utilizado en el Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) del Instituto Tecnológico de Costa Rica.	55
Tabla 12. Medio de cultivo líquido adicionado con 3% de alginato de sodio. Utilizado para la preparación de las cápsulas.	56

Tabla 13. Medio de cultivo líquido adicionado con 100 mM de cloruro de calcio. Utilizado para la preparación de las cápsulas.	57
Tabla 14. Medio de cultivo líquido adicionado con 0.4 M sacarosa y 2 M glicerol. Solución de carga (LD), para las pruebas de crioconservación por microgota.	58
Tabla 15. Solución vitrificadora PVS2. Constituida en base a medio de cultivo líquido 0.4 M sacarosa.....	59
Tabla 16. Medio de cultivo líquido adicionado con 1.2 M sacarosa, utilizado para el lavado de los ápices luego de la exposición al nitrógeno líquido.....	60
Tabla 17. Medio de cultivo semisólido adicionado con 0.5 M sacarosa, utilizado en el aislamiento de ápices para la prueba de microgota.	61

7. INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vitroplantas producidas a partir de la germinación <i>in vitro</i> de las semillas de cedro (<i>Cedrela odorata</i> L.), después de seis semanas en el medio M&S (1962) sin reguladores de crecimiento.	34
Figura 2. Ápices regenerados de <i>Cedrela odorata</i> L. sometidos a la prueba de microgota. A y B. Ápices de cedro (<i>Cedrela odorata</i> L.), no congelados (NL-), sometidos al procedimiento de microgota. C. Ápices <i>Cedrela odorata</i> L. congelados en nitrógeno líquido (NL+) mediante el procedimiento de microgota.	36
Figura 3. Curva de deshidratación de las capsulas de alginato de calcio.	39
Figura 4. Porcentajes de sobrevivencia y regeneración de los ápices de cedro (<i>Cedrela odorata</i> L.) encapsulados durante 0, 2, 4, 8 y 16 horas de deshidratación.	40

8. INTRODUCCIÓN

La crioconservación es el almacenamiento de material vivo a ultra bajas temperaturas, generalmente la del nitrógeno líquido (NL, -196°C). Actualmente la crioconservación es una de las técnicas más valiosas para la conservación de germoplasma vegetal a largo plazo, ya que permite el almacenamiento de células, tejido u órganos; los cuales han sido difíciles de conservar hasta años recientes.

Entre las ventajas que presenta la crioconservación se mencionan: el reducido espacio requerido para mantener la colección, el bajo riesgo de pérdida por contaminación y el bajo costo por mantenimiento. Además, los tejidos vegetales crioconservados presentan una alta estabilidad genética y los porcentajes de sobrevivencia son altos.

Otra de las grandes ventajas de esta modalidad de conservación es su alto valor, por permitir el almacenamiento a largo plazo de especies problemáticas, por ejemplo, aquellas que presentan semillas recalcitrantes, se propagan vegetativamente o se encuentran en peligro crítico de extinción.

Tal es el caso del cedro (*Cedrela odorata* L.) perteneciente a la familia Meliaceae, también conocido como cedro amargo, cedro colorado, cedro hembra. Esta especie es muy utilizada a nivel comercial por la alta calidad de su madera. Además de ser altamente aprovechado, el cedro también presenta graves problemas debido a la deforestación de los bosques para la ganadería y la agricultura. Sumado a lo anterior, muestra problemas en plantaciones, ya que es atacado por el barrenador *Hypsipyla grandella*, que daña la yema apical de las plantas jóvenes y deforma los fustes causándoles bifurcaciones. La crioconservación se presenta como una opción interesante de evaluar en esta especie, ya que permitiría la conservación a largo plazo como apoyo a los programas de mejora genética.

9. REVISIÓN DE LITERATURA

El germoplasma se define como el total del material heredable o todo el material genético de una especie. En otras palabras, el germoplasma es toda la diversidad existente en una especie dada (Poehlman, 2005; Ferreyra, 2005; Borém *et al.*, 2003) El germoplasma incluye semillas u otras partes vegetales que pueden crecer para formar plantas completas (Poehlman, 2005). Este germoplasma vegetal es uno de los recursos naturales más importantes, y posee un valor incalculable para el mejoramiento genético y asegurar la existencia del recurso en el futuro (Poehlman, 2005; Martín, 2001).

Los bosques tropicales son los ecosistemas más ricos del planeta, y en América Latina representan más de la mitad (57%) de los bosques remanentes del mundo. En las últimas décadas, se ha incrementado en forma alarmante su destrucción debido a varios factores entre los que se encuentran: la sobreexplotación, la ganadería extensiva, la agricultura y la urbanización. Con ello se eliminan las funciones fundamentales que brindan a los humanos, entre las cuales se encuentran el captar y fijar el CO₂ y otros gases atmosféricos, con lo que contribuyen a reducir el efecto invernadero, mantener el balance climático y permitir la vida en la Tierra (Abdelnour, 2004). Como resultado de los anterior hay un número importante de especies de árboles en peligro crítico de extinción, tanto local como globalmente y su pérdida supone una amenaza para la estabilidad de los ecosistemas (Martín, 2001). Aunado a esto, las legislaciones son deficiente en esta materia, ya que en muchos países se permite la tala indiscriminada de las especies que son endémicas, raras o amenazadas, lo que ha dejado poblaciones reducidas o fragmentadas (Abdelnour, 2004).

A pesar de que en los últimos años se ha dado una creciente reforestación con diferentes propósitos, lo que representa una medida para disminuir la escasez de la madera y la degradación ambiental; la siembra, por lo general se ha hecho tomando en cuenta el valor comercial de la madera ante todo, dejando de lado especies con elevado valor ecológico. Por lo que se requieren más acciones para conservar la variabilidad genética existente en el recurso forestal (Abdelnour, 2004).

9.1. Conservación del germoplasma vegetal

Existen dos modalidades para la conservación del germoplasma vegetal: *in situ* y *ex situ*. La conservación *in situ* es la conservación de los ecosistemas en sus hábitats naturales. Es decir conservar la diversidad en sus lugares de origen (Ferreyra, 2005; Borém *et al.*, 2003). Por ejemplo, parques naturales, parques nacionales, reservas de vida silvestre. El costo de este tipo de conservación disminuye si hay varias especies en una sola área, pero es elevado cuando las áreas son extensas, ya que las medidas de protección se dificultan y pueden interferir con otras actividades humanas (Martín, 2001). La conservación *ex situ*, quiere decir la conservación de la biodiversidad fuera de su hábitat natural. Presenta varias alternativas, según lo que se quiera conservar: colecciones de campo y jardines botánicos, los bancos de semillas, bancos *in vitro*, colecciones de ADN y bancos de polen (Engelmann, 2000; Ferreyra, 2005). En las colecciones de campo, las plantas se preservan de manera completa (Engelmann, 2004). La conservación solo en colecciones a campo es riesgosa, ya que germoplasma de gran valor puede perderse debido a pestes, enfermedades y condiciones climáticas adversas, además, los costos por mano de obra y mantenimiento son muy elevados. Por otro lado, la distribución e intercambio se dificulta e implica un gran riesgo de transferencia de enfermedades de un lugar a otro (Wang *et al.*, 2000; Engelmann, 2004; Ferreyra, 2005).

En cuanto a la conservación en bancos de semillas, las muestras se preservan en ambientes artificiales, en general las semillas son almacenadas a bajas temperaturas y humedad. En estas condiciones, la viabilidad se puede preservar por varias décadas (Ferreira, 2005; Borém *et al.*, 2003). Esta forma de conservación es recomendada para plantas que tienen semillas ortodoxas, es decir, que resisten las condiciones de bajas temperaturas y humedad (Engelmann, 2004).

En los bancos de conservación de tejidos *in vitro*, se realizan modificaciones en los medio de cultivo y en las condiciones físicas en que se cultivan los materiales, con el fin de disminuir el crecimiento. Comparado con las colecciones de campo, en esta modalidad se reduce el espacio, la mano de obra y el costo para el mantenimiento. Este tipo de conservación permite la multiplicación rápida del material, y también se mantiene aséptico y bastante estable genéticamente. Pero realmente es un tipo de conservación a mediano plazo, ya que se requiere que se realicen subcultivos del material, lo que resulta laborioso y existe siempre el riesgo de pérdida de accesiones debido a la contaminación, error humano o variación somaclonal (Abdelnour, 1999; Vidal *et al.*, 2005; Ferreira, 2005).

9.2. Clasificación del germoplasma

De acuerdo a la habilidad de las semillas para resistir el almacenamiento, las especies vegetales se clasifican en ortodoxas, recalcitrantes e intermedias. Muchos de las especies vegetales tienen semillas ortodoxas, es decir, que pueden ser deshidratadas hasta un bajo contenido de humedad y almacenadas a temperatura bajas durante largos períodos de tiempo, sin perder la viabilidad. Para este tipo de especies, los bancos de semillas son el método más conveniente para preservarlas. Sin embargo, la conservación en forma de semilla es problemático para las otras categorías de plantas (Abdelnour, 2000; Engelmann 2000; (Engelmann, 2004; Ferreira, 2005).

La categoría de recalcitrantes se refiere a aquellas especies cuyas semillas no pueden tolerar la deshidratación a bajos contenidos de humedad, ni resisten el almacenamiento a bajas temperaturas. Estas especies han sido tradicionalmente mantenidas en colecciones de campo y actualmente existen bancos *in vitro* para algunas de ellas. En esta categoría se encuentran frutas y especies forestales, especialmente de origen tropical (Engelmann, 2000; Ferreyra, 2005).

En esta misma categoría se incluyen las especies que no producen semillas y por lo tanto son propagadas vegetativamente; por ejemplo el banano y el plátano (*Musa* spp.). También se encuentran las especies que tienen genotipos estériles o que la semilla no presenta valor para la propagación comercial de la especie, en esta categoría se hayan la papa (*Solanum tuberosum*), otras raíces y tubérculos como el ñame (*Dioscorea* spp.), yuca (*Manihot esculeta*) y camote (*Ipomoea batatas*), y la caña de azúcar (*Saccharum* spp.) (Engelmann, 2000).

El desarrollo de la biotecnología ha dado lugar a un nuevo grupo de germoplasma dentro de las especies recalcitrantes, donde se incluyen clones élites obtenidas de genotipos elites, las líneas celulares con atributos especiales y material genéticamente transformado. Este nuevo germoplasma es a menudo de alto valor agregado y muy difícil de producir (Engelmann, 2004).

En la categoría de las semillas intermedias, se agrupan aquellas especies cuyas semillas toleran la deshidratación a un contenido de humedad relativamente bajo, pero son dañadas por las bajas temperaturas. Entre las especies que presentan este tipo de semillas se encuentran el café y la papaya. Por lo tanto, la conservación se ha realizado como colecciones de campo (Engelmann, 2000). Para todos estos materiales, conocidos también como problemáticos para el almacenamiento se necesitan técnicas efectivas para garantizar su conservación; es así que la

crioconservación se presenta como la única opción para la conservación a largo plazo de este tipo de germoplasma (Engelmann, 2004).

9.3. Crioconservación

Para la conservación del material vegetal, la crioconservación es una herramienta muy valiosa, ya que se presenta como el único método disponible para el almacenamiento a largo plazo, principalmente de las especies problemática y de materiales generados en el laboratorio. Consiste en el almacenamiento de plantas vivas, células, tejidos u órganos a ultra bajas temperaturas (-196°C, temperatura del nitrógeno líquido), con un bajo riesgo de cambios genéticos y fisiológicos durante periodos muy largos de tiempo (Abdelnour, 1999; Al-Ababneh *et al.*, 2002; Engelmann, 2004; Ferreyra, 2005; Sakai y Engelmann, 2007; González-Arno *et al.*, 2008).

Además, la crioconservación presenta muchas otras ventajas: requiere muy poco espacio, los materiales están protegidos de la contaminación y requieren poco mantenimiento, solo se necesita llenar el tanque con el nitrógeno líquido cada cierto tiempo (Scocchi *et al.*, 2004; Hirata *et al.*, 2002). Otra de las grandes ventajas es que el almacenamiento es independiente de la fuente de poder (Abdelnour, 1999).

Esta modalidad de almacenamiento es especialmente útil para todo aquel germoplasma creado utilizando las técnicas biotecnológicas, como clones élites de genotipos élites, líneas celulares con atributos especiales y el material genéticamente transformado, ya que este tipo de germoplasma no puede ser conservado por las técnicas tradicionales. Por el alto valor agregado que poseen, la dificultad y tiempo requerido para su producción; la crioconservación es la única opción para su almacenamiento (Sakai y Engelmann, 2007; Engelmann 2004).

Recientemente, la crioconservación se ha utilizado como medio de eliminación de virus (crioterapia), como sustituto o complemento de las técnicas clásicas. Se basa en que el congelamiento destruye selectivamente las células; ya que las células diferenciadas de los ápices, que tienen los virus también tienen un alto contenido de agua y por la crioconservación son destruidas, esto por la formación de cristales durante la congelación. Mientras que las células meristemáticas tienen más concentrado el citoplasma y gracias a esto sobreviven la congelación (Sakai y Engelmann, 2007).

9.3.1. Técnicas clásicas de crioconservación

Las técnicas clásicas de crioconservación involucran el enfriamiento lento a una determinada temperatura, seguida de un congelamiento rápido en nitrógeno líquido. Pero aunque las células se enfriaban seguían manteniendo las mismas cantidades de agua, lo que provoca la formación de cristales dentro de las células y por ende su destrucción. Estas técnicas son generalmente complejas operativamente, ya que requieren largos pretratamientos y el uso de sofisticados y caros congeladores programables (Engelmann, 2004; Abdelnour, 1999; Al-Ababneh *et al.*, 2002; Sakai y Engelmann, 2007).

9.3.2. Técnicas modernas de crioconservación

Las nuevas técnicas de crioconservación se basan en la vitrificación, encapsulamiento-deshidratación, y encapsulamiento-vitrificación (Engelmann, 2004; Al-Ababneh *et al.*, 2002). En los procedimientos de vitrificación, las células y meristemas deben estar suficientemente deshidratados para evitar heridas letales por la inmersión en nitrógeno líquido, por lo que se utilizan las soluciones vitrificadoras (Sakai y Engelmann, 2007).

Usualmente se utilizan soluciones vitrificadoras a base de glicerol llamadas PVS2 y PVS3. La solución vitrificadora PVS2 contiene 30% de glicerol (v/v), 15% de etilenglicol (v/v) y 15% de dimetilsulfóxido (DMSO) (v/v), preparada en un medio Murashige y Skoog (MS) con 0.4 M de sacarosa. La solución PVS3 se diferencia de la anterior que contiene solamente 50% de glicerol (v/v) y 50% de sacarosa (v/v) preparada en un medio Murashige y Skoog (1962) (MS). La solución se superenfía fácilmente por debajo de temperaturas menores a los -100°C y finalmente se solidifica en un vidrio metaestable a una temperatura de transición del vidrio (T_g : cerca de -110°C). Estas técnicas ofrecen ventajas comparadas con los procedimientos clásicos de pre-enfriamiento. Son más recomendadas para congelar órganos complejos que contiene una variedad de tipos de células (Sakai, 2000; Sakai *et al.*, 2008; Engelmann, 2004; Al-Ababneh *et al.*, 2002; Sakai y Engelmann, 2007).

También existen variantes de la técnica de vitrificación, como la de microgota (*droplet vitrification*), la cual sigue el mismo fundamento, la diferencia está en que los explantes son colocados en tiras de papel aluminio en microgotas de la solución y luego son congeladas rápidamente en nitrógeno líquido (Engelmann, 2004).

La técnica de encapsulamiento-deshidratación se basa en la tecnología desarrollada para la producción de semillas artificiales. Los explantes son encapsulados en esferas de alginato de calcio, pre-cultivados en medio líquido enriquecido con sacarosa por aproximadamente de 1 a 7 días, luego son parcialmente desecadas, en la corriente de aire de la cámara de flujo laminar o con sílica gel a un contenido de agua cerca del 20%, luego son congeladas rápidamente en nitrógeno líquido.

Las tasas de sobrevivencia son altas y la regeneración de los explantes crioconservados es rápida y directa, sin la formación de callo. Este método es simple, barato y la alta estabilidad genética del material se mantiene (Engelmann, 2000; Al-Ababneh *et al.*, 2002; Engelmann, 2004; Abdelnour *et al.*, 2007; Sakai *et al.*, 2008).

9.4. Cedro (*Cedrela odorata* L.)

El cedro (*Cedrela odorata* L.) conocido como cedro amargo o *spanish cedar*, perteneciente a la familia Meliaceae. Es uno de las especies de caoba más importantes en los neotrópicos. El cedro es un árbol semi-deciduo de hasta cuatro metros de altura y dos metros de diámetro. Su distribución natural comprende desde el norte de México hasta Argentina, incluyendo las islas del Caribe (Navarro, 2002). La calidad de la madera del cedro es la característica que hace de esta especie muy atractiva para el hombre. Un estudio de Quesada (2003), mostró que los individuos de esta especie presentan en su mayoría tamaños pequeños, lo que muestra la presión por la extracción a la que la especie está sometida. Como resultado las poblaciones remanentes presentan, en su mayoría, árboles con diámetros de escaso valor comercial (Pérez *et al.*, 2002). Otro problema que tiene esta especie a nivel continental, es el barrenador de las meliáceas, *Hypsipyla grandella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae); que impide el establecimiento de plantaciones extensas, debido a que ataca los brotes jóvenes de las plantas de aproximadamente medio metro de altura, reduciendo del valor comercial de los cedros jóvenes; ya que provoca una reducción en el número y la longitud de troncos rectos y claros. Comparado con los bosques, el ataque se intensifica en los árboles que crecen en plantaciones comerciales. Estas razones evidencian la necesidad urgente de evaluar y establecer métodos para preservar el material valioso remanente de cedro (Howard y Merida, 2004; Pérez *et al.*, 2002).

El establecimiento de plantaciones de estas especies requerirá del germoplasma disponible actualmente y de técnicas de mejoramiento genético que aceleren la obtención de materiales élite. La siembra de estos nuevos materiales en plantaciones será de gran impacto para la industria forestal y para eliminar el impacto de la extracción en los bosques tropicales. Por otra parte, todo material de estas especies generado en laboratorio, deberá conservarse de manera segura y por periodos extensos y la crioconservación representa un respaldo a futuro de este valioso germoplasma (Abdernour, 1999; Howard y Medina, 2004).

10. OBJETIVO GENERAL

- 10.1.** Establecer y evaluar protocolos para el pretratamiento y la crioconservación de ápices de cedro (*Cedrela odorata* L.).

11. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 11.1.** Evaluar la efectividad de la técnica de microgota, basada en la vitrificación, para la conservación a largo plazo de ápices, mediante la evaluación del porcentaje de regeneración de los mismos.
- 11.2.** Evaluar la eficacia de la técnica de encapsulamiento-deshidratación como método para la conservación a largo plazo de ápices, mediante la evaluación del porcentaje de regeneración de los mismos.
- 11.3.** Comparar la eficiencia de las técnicas de microgota y encapsulamiento-deshidratación.

12. MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se llevó a cabo en el Centro de Investigación en Biotecnología (CIB), en el Instituto Tecnológico de Costa Rica, entre los meses de julio a noviembre del 2009.

12.1. Cultivo *in vitro* de cedro

12.1.1. *Introducción in vitro del material*

Como material vegetal experimental se utilizaron semillas proporcionadas por el banco de semillas del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Para el establecimiento *in vitro*, las semillas fueron desinfectadas siguiendo la metodología utilizada en el CIB. Se lavaron con agua destilada y jabón, durante 30 minutos, seguidamente se incubaron en una solución de Agri-mycin®, Benlate®, Ferbam® en una concentración de 5 g/L de cada uno por 30 minutos, para luego ser llevadas a la cámara de flujo laminar donde se realizaron tres lavados con agua destilada estéril. Seguidamente se procedió a agregarles una solución de NaClO al 3.5% i.a. durante 15 minutos, para luego ser enjuagadas de nuevo con tres lavados de agua destilada estéril y finalmente ser cultivadas en el medio de cultivo para inducir su germinación. Las condiciones de crecimiento en el laboratorio fueron de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ y un fotoperiodo de 16 horas luz, con una intensidad lumínica de 3000 lux. El medio de cultivo utilizado fue el descrito por Murashige y Skoog, (MS, 1962) (Apéndice 1) complementado con 0.5 mgL^{-1} de BAP, 30 gL^{-1} de sacarosa, 3 gL^{-1} de Phyta-Gel y se ajustó a un pH 5.7 (Apéndice 2). Se realizaron 7 introducciones de 300 semillas por cada introducción realizada.

12.1.2. Multiplicación *in vitro* del material

Una vez germinadas las semillas y cuando las plántulas presentaron una longitud de cinco centímetros, aproximadamente 6 semanas después de la introducción, se procedió a realizar la multiplicación del material. Para esto, las plántulas se seccionaron en los entrenudos, de manera que se sembró en cada frasco de cultivo un explante que comprendía de uno a dos nudos. Los medios evaluados se observan en la Tabla 1. Se realizaron dos repeticiones con una muestra cada una de 24 explantes por medio evaluado.

Tabla 1. Medios de cultivo evaluados para la multiplicación de las plántulas de cedro (*Cedrela odorata* L).

Medios de cultivo	
<ul style="list-style-type: none">• MS sin reguladores de crecimiento• MS + 0.5 mgL-1 de BAP• MS con las sales al 50% (MS/2) + 0.5 mgL-1 de BAP• MS con las sales al 25% (MS/4) + 0.5 mgL-1 de BAP• MS (con NO₃NH₄ al 50%) + 0.5 mgL-1 de BAP	<ul style="list-style-type: none">• MS + 1mgL-1 BAP• MS/2 + 1 mgL-1 de BAP• MS/4 + 1 mgL-1 de BAP• MS (con NO₃NH₄ al 50%) + 1 mgL-1 de BAP
Todos con 3% de sacarosa, 3.1 gL-1 gelificante y un pH de 5.7.	

Fuente: Datos de laboratorio.

12.1.3. Regeneración de los ápices aislados

Para las pruebas de crioconservación de ápices de cedro (*Cedrela odorata* L.) por las técnicas de microgota y de encapsulamiento-deshidratación, se procedió, inicialmente a determinar el medio de regeneración de los ápices. Se buscaron las condiciones en que los ápices regeneran lo más rápido posible. Se evaluaron los medios de cultivo presentados en el Tabla 2. La muestra consistió de 12 explantes por tratamiento con dos repeticiones.

Tabla 2. Medios de cultivo evaluados para la regeneración de los ápices de cedro (*Cedrela odorata* L.)

Medios de cultivo	
<ul style="list-style-type: none"> • MS • MS con las sales al 50% (MS/2) • MS con las sales al 25% (MS/4) • MS + 0.5 mgL⁻¹ de BAP • MS/2 + 0.5 mgL⁻¹ de BAP • MS/4 + 0.5 mgL⁻¹ de BAP 	<ul style="list-style-type: none"> • MS + 0.5 mgL⁻¹ KIN • MS/2 + 0.5 mgL⁻¹ KIN • MS/4 + 0.5 mgL⁻¹ KIN • MS + 1 mgL⁻¹ KIN • MS/2 + 1 mgL⁻¹ KIN • MS/4 + 1 mgL⁻¹ KIN
<p>Todos con 3% de sacarosa, 3.1 gL⁻¹ gelificante y un pH de 5.7.</p>	

Fuente: Datos de laboratorio.

12.2. Procedimiento de Microgota

Para realizar los ensayos se utilizó el procedimiento de microgota (*droplet vitrification*) descrito por Sakai y Engelmann (2007).

12.2.1. Aislamiento y Pre-cultivo de los ápices

Con la ayuda de un estereoscopio se aislaron ápices (2 mm) de vitroplantas de aproximadamente 3 semanas, los cuales posteriormente se colocaron por 24 horas en los medios de cultivos, que se describen a continuación: MS + 0.1M sacarosa, MS + 0.1M sacarosa + 5%DMSO, MS + 0.3M sacarosa, MS + 0.3M sacarosa + 5%DMSO, MS + 0.5M sacarosa, MS + 0.5M sacarosa + 5%DMSO; los ápices se cultivaron por 24 horas. A continuación se evaluó la regeneración de brotes en cada uno de los medios ensayados. Se realizaron dos repeticiones con una muestra de 15 ápices por medio evaluado.

Los mismos tratamientos de pre-cultivo descritos arriba fueron utilizados para evaluar el efecto de la solución de carga (LD), elaborada a partir de medio líquido M&S (1962) enriquecido con 0.4 M sacarosa y 2 M glicerol (apéndice 5) en el crecimiento de los ápices aislados. Los ápices fueron incubados por 20 minutos. Luego, la solución de carga fue reemplazada por la solución vitrificadora PVS2, la cual consistió en 30% glicerol, 30% etilenglicol y 15% DMSO (apéndice 6). Los ápices fueron incubados por 15 minutos. Pasado este tiempo se reemplazó la solución vitrificadora por una alícuota fresca por otros 15 minutos, para finalmente drenar la solución vitrificadora.

Los ápices fueron cultivados para su regeneración, en un medio M&S (1962), adicionado con 0.5 mgL⁻¹ de BAP, 30 gL⁻¹ sacarosa y 3.1 gL⁻¹ de gelificante y el pH se ajustó a 5.7. Esta prueba se realizó con una muestra de 30 explantes para cada tratamiento.

12.2.2. Crioconservación de los ápices utilizando la técnica de microgota

Una vez obtenidas las mejores condiciones pre-congelantes que permitieron los mejores resultados de regeneración después de las 24 horas de tratamiento se procedió a realizar el protocolo incluyendo el congelamiento en nitrógeno líquido y el descongelamiento. Para lo cual se realizó una muestra de 25 explantes para los tratamientos de congelamiento (NL+) y no congelamiento (NL-), y se realizaron dos repeticiones. Para lo anterior se procedió a realizar el procedimiento que se describe a continuación.

Luego de la incubación de los ápices en el medio de pre-cultivo por 24 horas, los ápices fueron colocados en la solución de carga (LD) durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo, la solución de carga fue eliminada con ayuda de una jeringa con aguja y se reemplazó con la solución vitrificadora PVS2 por 15 minutos, pasado ese tiempo se reemplazó con solución vitrificadora fresca y se incubaron por otros 15 minutos.

Unos dos minutos antes de finalizado el segundo periodo de incubación con la solución vitrificadora se colocó cada ápice en tiras de papel aluminio previamente esterilizadas junto con 2 μL de la solución vitrificadora PVS2. Cada tira de papel aluminio conteniendo el ápice, se introdujo directamente en el nitrógeno líquido y luego en los crioviales, para finalmente ser sumergidos en el nitrógeno líquido por un periodo de una hora (NL+). Pasada la hora, los crioviales se introdujeron en un baño de agua a 40° Celsius, por 2 minutos, posteriormente la tiras de papel aluminio con los ápices se colocaron en platos *Petri* estériles con medio M&S (1962) enriquecido con 1.2 M de sacarosa (Apéndice 7).

Para evaluar la recuperación de los ápices congelados, éstos fueron cultivados en el medio M&S (1962) enriquecido con 0.5 M de sacarosa (Apéndice 8) por dos días, luego se pasaron los ápices al medio de regeneración, que consistió del medio M&S (1962) enriquecido con 0.5 mgL^{-1} de BAP, 30 gL^{-1} sacarosa y 3.1 gL^{-1} de gelificante a un pH de 5.7.

Los restantes ápices (50 ápices), siguieron el mismo procedimiento pero no fueron introducidos en nitrógeno líquido (NL-), sino que se les hizo un lavado con medio M&S (1962) enriquecido con 1.2 M sacarosa (apéndice 7). Luego pasando a la etapa de recuperación y regeneración descrita anteriormente.

12.3. Procedimiento de Encapsulamiento-Deshidratación

Esta técnica se realizó según el protocolo expuesto por Engelmann (2004).

12.3.1. Aislamiento y encapsulado de los ápices

Con la ayuda de un estereoscopio se aislaron ápices apicales a partir de vitroplantas de aproximadamente 3 semanas; y se colocaron en un medio de cultivo M&S (1962) sin reguladores de crecimiento por 24 horas para su recuperación. Transcurrido este periodo, los ápices fueron sumergidos en el medio de cultivo M&S (1962) líquido con 3% de alginato de sodio (Apéndice 3). Seguidamente con la ayuda de una pipeta Pasteur se tomó una gota del medio anterior que contuviera un meristemo y se agregó al medio de cultivo M&S (1962) con 100 mM de cloruro de calcio (Apéndice 4). Se incubaron las cápsulas por 20 minutos aproximadamente, para que tomaran la consistencia adecuada. Pasado este periodo, se eliminó todo el medio con cloruro de calcio y se drenó el exceso de humedad de las cápsulas colocándolas en un plato Petri con papel filtro estéril. Para este experimento se tomó una muestra de 15 explantes con dos repeticiones por cada tratamiento, tanto para los ápices encapsulados y como para los no encapsulados.

12.3.2. Pre-cultivo de los ápices encapsulados

Los ápices encapsulados fueron colocados en un erlenmeyers conteniendo 50 ml del medio M&S (1962) enriquecido con diferentes concentraciones de sacarosa (0.1 M, 0.3M, 0.5M y 0.7M) para determinar el periodo de pre-cultivo. Esta evaluación se realizó con base en la disminución en la sobrevivencia de los ápices encapsulados. Los erlenmeyers que contenían los ápices se colocaron en agitación orbital a una velocidad de 100 rpm.

Para este experimento de pre-cultivo, se tomó una muestra de 30 ápices en cada medio evaluado. De los cuales 15 ápices de cada tratamiento, fueron regenerados luego de dos días de pre-cultivo; y los otros 15 ápices de cada tratamiento lo fueron luego de cuatro días de cultivo.

12.3.3. *Curva de deshidratación*

Para determinar el contenido de humedad de las capsulas después de varios periodos de deshidratación (curva de deshidratación), se colocaron las capsulas en cámaras de deshidratación de vidrio herméticamente selladas, (de aproximadamente 150 ml) conteniendo 100 g de sílica gel. Los periodos de deshidratación evaluados fueron: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 15, 16, 18, 20 y 24 horas. Pasado cada periodo de deshidratación, las cápsulas fueron pesadas en la balanza analítica y se determinó el peso fresco.

Finalmente las cápsulas se colocaron en erlenmeyers de 25 ml y se taparon con papel aluminio y se procedió a secarlas en la estufa durante 24 horas a 90°C. Se volvieron a pesar para determinar el peso seco y calcular el porcentaje de humedad. Utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de humedad} = [(\text{Peso Fresco} - \text{Peso Seco}) / \text{Peso fresco}] \times 100$$

Para este experimento se tomó una muestra de 10 cápsulas con tres repeticiones por cada periodo de deshidratación.

12.3.4. *Efecto de la deshidratación en la sobrevivencia y regeneración de los ápices encapsulados*

Luego de determinar el periodo de deshidratación se procedió a determinar la sobrevivencia de los ápices encapsulados, sometiéndolos a diferentes periodos de deshidratación. Estos periodos comprendieron los siguientes: 0, 2, 4, 8 y 16 horas. Este experimento se realizó con una muestra de 10 ápices encapsulados por cada hora de deshidratación, sin repeticiones. Se evaluaron como sobrevivientes, los ápices que permanecieron verdes y los que regeneraron exitosamente por la aparición de nuevas hojas.

12.3.5. *Crioconservación de los ápices encapsulados*

Una vez determinado el periodo en días de pre-cultivo, se procedió a deshidratar las cápsulas por medio del procedimiento antes descrito: los ápices encapsulados fueron colocados en las cámaras de deshidratación herméticamente selladas, que fueron previamente esterilizadas, durante el periodo a evaluar.

Después del periodo de desecación, las capsulas fueron colocadas en los crioviales (ocho por cada criovial) y fueron introducidos directamente en el nitrógeno líquido, donde permanecieron por una hora (NL+). La descongelación se llevó a cabo introduciendo los crioviales en un baño de agua a 40°C. Los ápices encapsulados fueron sacados de los crioviales y cultivados en el medio de regeneración, que consistió de un M&S (1962) enriquecido con 0.5 mgL⁻¹ de BAP, 30 gL⁻¹ sacarosa y 3.1 gL⁻¹ de gelificante a un pH de 5.7. Los ápices que no fueron sometidos al congelamiento en nitrógeno líquido (NL-), fueron directamente a la fase de regeneración.

13. RESULTADOS

13.1. Cultivo *in vitro* del material vegetal

13.1.1. Germinación *in vitro* de las semillas

Luego de realizada la desinfección de las semillas y su establecimiento en el medio de cultivo se procedió a determinar el porcentaje de germinación (Tabla 3). El porcentaje de germinación de las semillas alcanzó un 73,24% después de una semana de cultivo, pero a la segunda semana, el 100% de las semillas había germinado.

13.1.2. Multiplicación *in vitro* del material

Para la multiplicación del material se evaluaron ocho medios de cultivo, y en todos se observó la brotación de las yemas axilares. Sin embargo, el mejor resultado se obtuvo con el medio MS (sin reguladores de crecimiento), las plántulas presentaron un mejor desarrollo radicular y un aspecto general más saludable, hojas grandes, verdes y no presentaron hiperhidratación (Figura 1). Aún cuando las plántulas crecieron bien en el medio con reguladores, éstas mostraron una coloración más amarillenta en las hojas.

Tabla 3. Germinación *in vitro* de las semillas de cedro (*Cedrela odorata* L.).

Medio de cultivo	Semana de evaluación	Total introducido	Porcentaje de respuesta
M&S (1962) + 0.5 mgL-1 de BAP	1	71	73,24%
	2	71	100%

Fuente: Datos de laboratorio.

13.1.3. Regeneración de los ápices aislados

En cuanto a la regeneración de los ápices, de los 16 medios evaluados el medio MS con 0.5 mgL⁻¹ BAP fue el que indujo la regeneración más precoz (la respuesta ya era evidente dos semanas después del cultivo). Del total de los medios, 13 mostraron regeneración después de un mes de cultivo, mientras que tres no mostraron crecimiento durante el periodo de evaluación. Los datos de regeneración se muestran en el Tabla 4.

Tabla 4. Efecto del medio de cultivo en la regeneración de ápices de cedro (*Cedrela odorata* L.)*

Medio	Regeneración/número de explantes introducidos	Porcentaje de respuesta
MS	2/24	8,33%
MS/2	0/24	0,00%
MS/4	0/24	0,00%
MS + 0.5 mgL ⁻¹ BAP	17/24	70,83%
MS/2 + 0.5 mgL ⁻¹ BAP	6/24	25,00%
MS/4 + 0.5 mgL ⁻¹ BAP	2/24	8,33%
MS + 0.5 mgL ⁻¹ KIN	9/24	37,50%
MS/2 + 0.5 mgL ⁻¹ KIN	2/24	8,33%
MS/4 + 0.5 mgL ⁻¹ KIN	0/24	0,00%
MS + 1 mgL ⁻¹ KIN	11/24	45,83%
MS/2 + 1 mgL ⁻¹ KIN	7/24	29,17%
MS/4 + 1 mgL ⁻¹ KIN	3/24	12,50%

Fuente: Datos de laboratorio.

*Cada tratamiento consistió de 12 explantes y cada experimento se repitió dos veces.



Figura 1. Vitroplantas producidas a partir de la germinación *in vitro* de las semillas de cedro (*Cedrela odorata* L.), después de seis semanas en el medio M&S (1962) sin reguladores de crecimiento.

13.2. Procedimiento de Microgota

13.2.1. Aislamiento y pre-cultivo de los ápices

Las pruebas de regeneración de ápices de cedro (*Cedrela odorata* L.) después de los pretratamientos, que consistieron en el pre-cultivo durante 24 horas, en varios medios conteniendo sacarosa en diferentes concentraciones, más DMSO, seguidos por el tratamiento con la solución de carga y la incubación en PVS2 (Tabla 5), mostraron que los pre-cultivos en 0.3 M y 0.5 M de sacarosa no afectaron considerablemente la regeneración de los ápices (83% y 90%, respectivamente). Cuando estos mismos tratamientos incluyeron la adición de 5% de DMSO, los porcentajes de regeneración disminuyeron al 67% y 43%, respectivamente. En los tratamientos de pre-cultivo que incluyeron la incubación en la solución de carga y en la solución PVS2, los porcentajes de regeneración de ápices varió del 0% al 3%.

Tabla 5. Porcentaje de regeneración de ápices de cedro (*C. odorata* L.) después del pre-cultivo en sacarosa o sacarosa más DMSO por 24 horas; seguidos por la incubación en la solución de carga (LD) y en la solución PVS2.

Medio de Pre-cultivo	Pre-cultivo (24 horas)	LD	Solución PVS2	Regeneración (%)
MS +0.3M sacarosa	X			83,33
MS +0.3M sacarosa +5% DMSO	X			66,67%
MS +0.5M sacarosa	X			90,00%
MS +0.5M sacarosa +5% DMSO	X			43,33%
MS +0.3 M sacarosa	X	X	X	0,00%
MS +0.3M sacarosa +5% DMSO	X	X	X	3,33%
MS +0.5M sacarosa	X	X	X	0,00%
MS +0.5M sacarosa +5% DMSO	X	X	X	0,00%

Fuente: Datos de laboratorio.

13.2.2. Crioconservación de los ápices utilizando la técnica de microgota

La Tabla 6 presenta los datos de sobrevivencia de los ápices de (*Cedrela odorata* L.) cuando se utilizó la técnica de microgota, luego del congelamiento (NL+) y no congelamiento (NL-) en nitrógeno líquido. Al evaluar la técnica de microgota, se observó que los ápices que no fueron congelados (NL-), presentaron una coloración más verde que aquellos que fueron congelados (NL+). Los ápices NL+, presentaron una coloración blancuzco transparente y la zona meristemática más oscura. Mientras que los ápices NL- presentaron en su totalidad con un tono verde muy oscuro (Figura 2).

Tabla 6. Porcentaje de sobrevivencia y regeneración de los ápices de (*Cedrela odorata* L.), luego del congelamiento (NL+) y el no congelamiento (NL-) en nitrógeno líquido con la técnica de microgota *.

Aspecto a evaluar	NL-	NL+
Porcentaje de sobrevivencia	34%	10%
Porcentaje de regeneración	8%	0%

*Datos obtenidos al mes de evaluación.

Fuente: datos de laboratorio.



Figura 2. Ápices regenerados de *Cedrela odorata* L. sometidos a la prueba de microgota. A y B. Ápices de cedro (*Cedrela odorata* L.), no congelados (NL-), sometidos al procedimiento de microgota. C. Ápices *Cedrela odorata* L. congelados en nitrógeno líquido (NL+) mediante el procedimiento de microgota.

13.3. Procedimiento de Encapsulamiento-Deshidratación

13.3.1. Aislamiento y encapsulado de los ápices

Al estudiarse el efecto del aislamiento y el encapsulado en la regeneración de los ápices aislados, se encontró que los porcentajes de regeneración fueron del 100% y del 80% respectivamente, después de tres semanas de cultivo (Tabla 7).

Tabla 7. Efecto del aislamiento y encapsulado sobre la sobrevivencia de ápices de cedro (*Cedrela odorata* L.) cultivados en condiciones *in vitro*.

Tratamiento	Explantos regenerados / explantos introducidos	Porcentaje de brotación
Aislamiento	30/30	100%
Encapsulado	24/30	80%

Fuente: Datos de laboratorio

13.3.2. Pre-cultivo de los ápices encapsulados

Se encontró que el pre-cultivo en los medios con concentraciones de 0.1 M, 0.3 M y 0.5 M de sacarosa, no produjo un efecto adverso en la regeneración de los ápices encapsulados, debido a que la totalidad de los ápices sobrevivieron luego de dos días de pre-cultivo. En cuanto a la concentración de 0.7 M de sacarosa, luego de dos días de pre-cultivo se produjo una disminución en la sobrevivencia. Cuando los ápices se pre-cultivaron cuatro días en el medio con la concentración de 0.1M de sacarosa, no se observaron cambios, todos los explantes sobrevivieron. Los ápices encapsulados que fueron pre-cultivados en las concentraciones de 0.3M, 0.5M y 0.7M sí mostraron una disminución en la sobrevivencia (Tabla 8).

Tabla 8. Determinación de la sobrevivencia de los ápices de cedro (*Cedrela odorata* L.) encapsulados y precultivados en concentraciones crecientes de sacarosa por 48 y 96 horas*.

Medio de pre-cultivo	Sobrevivencia / explantes tratados (48 horas)	Porcentaje de sobrevivencia	Sobrevivencia / explantes tratados (96 horas)	Porcentaje de sobrevivencia
MS + 0.1M sacarosa	15/15	100%	15/15	100%
MS + 0.3M sacarosa	15/15	100%	13/15	87%
MS + 0.5M sacarosa	15/15	100%	13/15	87%
MS + 0.7M sacarosa	14/15	93%	11/15	73%

Fuente: datos de laboratorio.

*Cada tratamiento consistió de una muestra de 30 ápices, de los cuales 15 se de cada tratamiento se pasó al periodo de regeneración luego de dos días y los restantes se pasaron al periodo de regeneración luego de cuatro días.

13.3.3. Curva de deshidratación

La curva de deshidratación mostró que para el tiempo cero horas de deshidratación, las cápsulas contenían alrededor del 93% de humedad (Figura 3). Conforme se incrementó el periodo de deshidratación, el contenido de humedad fue disminuyendo lentamente hasta las ocho horas. A las 15, 16 y 18 horas de deshidratación, los contenidos de humedad disminuyeron al 27%, 20% y 16%, respectivamente. A las 24 horas de deshidratación, las cápsulas presentaron un 12% de humedad.

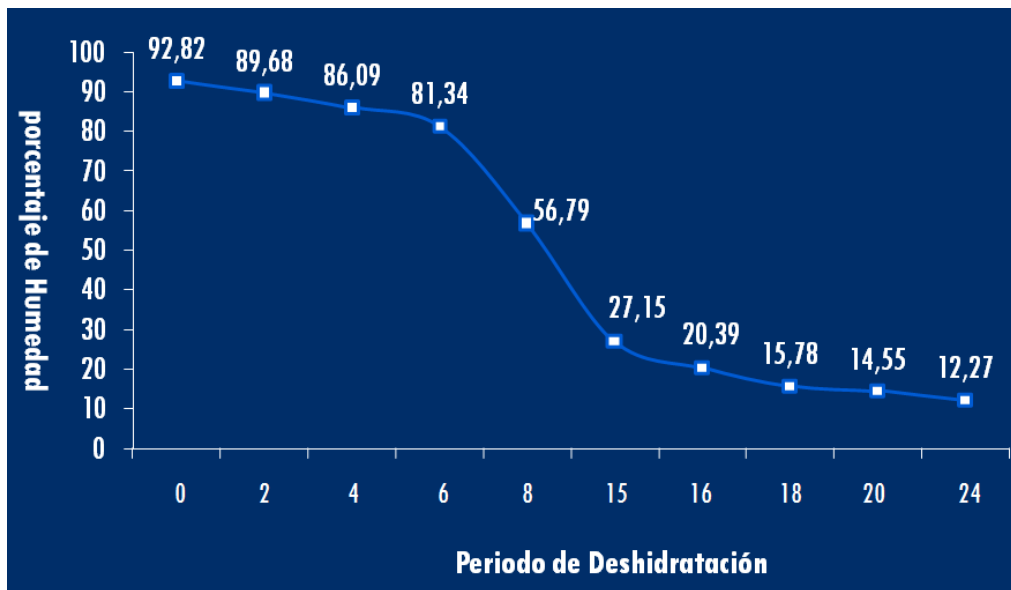


Figura 3. Curva de deshidratación de las capsulas de alginato de calcio.

Fuente: Datos de laboratorio.

13.3.4. Efecto de la deshidratación en la sobrevivencia y regeneración de los ápices encapsulados

Al evaluar el efecto de la deshidratación sobre la sobrevivencia y la regeneración de los ápices de cedro (*Cedrela odorata* L.) encapsulados, se encontró que, a las cero horas de deshidratación se obtuvo una sobrevivencia y regeneración del 100% de los ápices encapsulados (Figura 4). A las dos horas de deshidratación, se obtuvo una sobrevivencia del 89% y un porcentaje de regeneración a los cinco días de cultivo del 50%. A las cuatro horas de deshidratación, la sobrevivencia y la regeneración disminuyeron, ya que se observó un 60% de sobrevivencia y cero por ciento de regeneración a los cinco días de cultivo. A las ocho horas de deshidratación disminuyeron aún más los porcentajes de sobrevivencia y regeneración, siendo los anteriores de un 50 y un cero por ciento respectivamente. A las 16 horas de deshidratación tampoco se obtuvo regeneración y la sobrevivencia fue de un 30%.

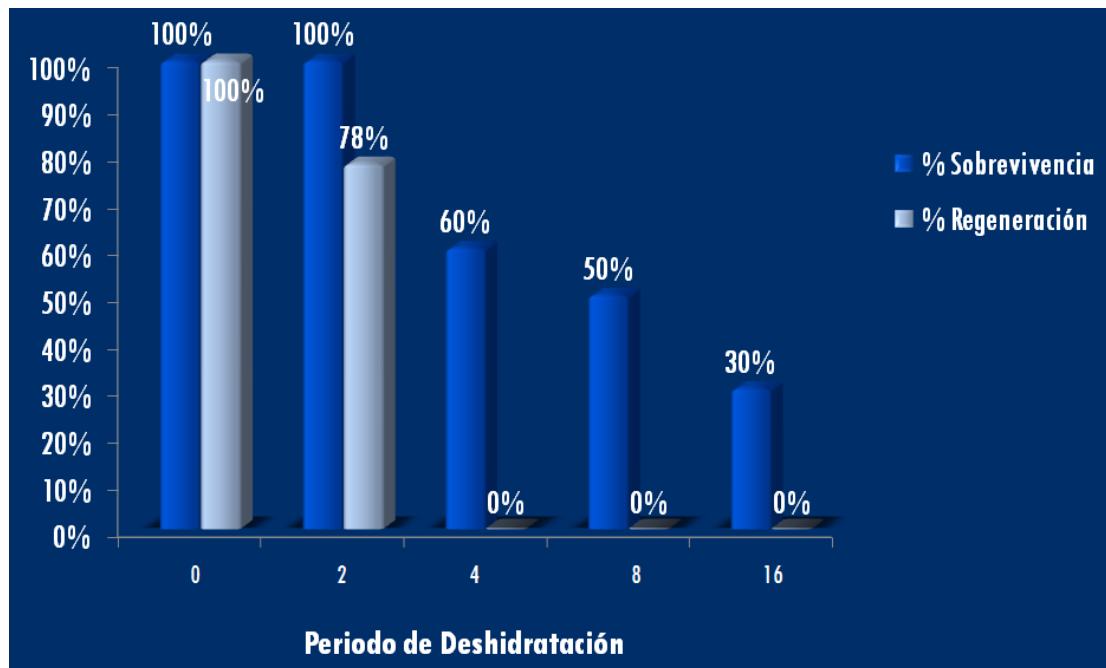


Figura 4. Porcentajes de sobrevivencia y regeneración de los ápices de cedro (*Cedrela odorata* L.) encapsulados durante 0, 2, 4, 8 y 16 horas de deshidratación.

Fuente: Datos de laboratorio.

13.3.5. Crioconservación de los ápices encapsulados

En cuanto a la congelación en nitrógeno líquido, se encontró que los ápices que se sometieron al proceso de encapsulamiento, deshidratación y regeneración, no mostraron sobrevivencia, ya que después de un mes de evaluación, no se observó crecimiento de los ápices. Solo el 8% de los mismos sobrevivieron (mostraron partes verdes). Mientras que los ápices que fueron sometidos al proceso completo incluyendo el congelamiento en nitrógeno líquido, no manifestaron sobrevivencia ni regeneración, teniendo ambos un porcentaje del 0% (Tabla 9).

Tabla 9. Supervivencia y regeneración de los ápices de cedro (*Cedrela odorata* L.) encapsulados, precultivados y deshidratados por 16 horas (NL-) y de los ápices que se sometieron al proceso de encapsulamiento, pre-cultivo, deshidratación y el congelamiento en nitrógeno líquido (NL+).

Aspecto a evaluar	NL-	NL+
Porcentaje de supervivencia	8%	0%
Porcentaje de regeneración	0%	0%

Fuente: datos de laboratorio.

14. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

14.1. Cultivo *in vitro* del material

Los altos porcentajes de germinación observados en las semillas de cedro (*Cedrela odorata* L.) cultivadas *in vitro* mostraron la buena calidad y alta viabilidad del material experimental. Se determinó que una concentración de 0.5 mgL⁻¹ de BAP fue la más eficiente para la introducción *in vitro* de las semillas de cedro, debido a que las plántulas presentaron un aspecto saludable con raíces largas y hojas grandes y verdes.

Este medio es uno de los que más frecuentemente se utilizan y se recomienda para la germinación de semillas; además del empleo de auxinas en bajas concentraciones. Casi siempre el BAP, es el más utilizado en especies forestales para la germinación (Universidad Católica de Occidente, 2006). En cuanto a las pruebas de multiplicación del material experimental, el medio de cultivo que indujo el mejor desarrollo fue el M&S (1962) sin reguladores de crecimiento, ya que al parecer una reducción en la concentración o la ausencia de los reguladores del crecimiento empleados inicialmente, hacen que las plántulas tengan un desarrollo mayor, no se tornen amarillentas y no pierdan las hojas. Este efecto se ha observado también, cuando se utilizaron bajas concentraciones de BAP (0.25 mgL⁻¹ ó 0.2 mgL⁻¹), para la elongación de las plántulas de caoba (*Swietenia macrophylla* King) que provenían de semillas germinadas (Collado *et al.*, 2004).

14.1.1. *Regeneración de los ápices aislados*

A pesar de que Maruyama y colaboradores (1989), señalaron que la mayor regeneración de ápices de cedro fue con una concentración de 0.2 mgL⁻¹ de BAP en un medio Woody Plant Medium (WPM) luego de un mes de cultivo, obtuvieron entre el 80 y el 100% de regeneración. Para los propósitos del presente trabajo, se busca que los ápices regeneraran en el menor tiempo posible, así que la concentración de 0.5 mgL⁻¹ de BAP fue empleado porque en dos semanas de cultivo se observaron los primeros resultados. Es importante destacar que a pesar de que en la fase de multiplicación no se utilizaron medios de cultivo sin o con bajas concentraciones de reguladores de crecimiento, en este paso el balance entre los reguladores es importante, ya que en los tejidos aislados, su adición de manera exógena, por lo general es necesaria para la buena regeneración de los explantes (Collado *et al.*, 2004).

14.2. Procedimiento de Microgota

14.2.1. *Aislamiento, pre-cultivo y crioconservación de los ápices aislados utilizando la técnica de microgota.*

El pre-cultivo de 24 horas en el medio con 0.5 M de sacarosa, no mostró tener efectos adversos. Tan solo cuatro días después de la incubación, se presentó la regeneración del primer ápice. Al final del periodo de evaluación de un mes la regeneración fue de un 90%; se consideró el que dio mejor respuesta para el pre-cultivo de los ápices aislados. Mientras que en medios que presentaban DMSO al 5%, la sobrevivencia fue muy baja. Esto puede deberse en alguna medida al efecto tóxico (no se presenta sobrevivencia de los explantes) que contiene el DMSO.

Se ha observado este efecto tóxico, con solo agregarlo y removerlo de los explantes. También presenta un efecto adverso cuando se utiliza en concentraciones del 10%, tanto al momento de congelar el material como cuando no se congela. Igualmente se ha observado un efecto tóxico en algunas especies cuando se adicionó a los medios de cultivos preparados con DMSO en concentraciones tan bajas como 1% o mayores (Finkle *et al.*, 1985). La incubación en las soluciones de carga y la vitrificadora, mostraron un efecto desfavorable en los ápices, los cuales presentaron una coloración café luego de ser llevados al proceso de recuperación, siendo la sobrevivencia de un cero a un 3,33%. Lo que puede deberse a lo mencionado arriba. Verleysen y colaboradores (2005), encontraron que el pre-cultivo en una concentración alta de sacarosa y un periodo corto de incubación en la solución PVS2, no fue suficiente para proporcionar porcentajes de sobrevivencia aceptables. Asimismo, periodos largos de incubación en altas concentraciones de sacarosa tiene un efecto tóxico para los explantes (Gonzalez-Arno *et al.*, 2000).

Muchos autores han reportado lo beneficioso que resulta la técnica de vitrificación para la crioconservación de muchas especies (Sakai y Engelmann, 2007; Halmagyi *et al.*, 2004; Sant *et al.*, 2008, Vandebussche *et al.*, 2008; Matsumoto y Sakai, 2003). A pesar de esto, los datos obtenidos en este trabajo demostraron que la sobrevivencia de los ápices de cedro (*Cedrela odorata* L.) sometidos a la técnica de microgota y al congelamiento en nitrógeno líquido (NL+), fue baja (4%), y la sobrevivencia de los ápices sometidos a ésta técnica pero no congelados (NL-), también fue baja (34%) (Tabla 4).

14.3. Procedimiento de Encapsulamiento-Deshidratación

14.3.1. Aislamiento y encapsulado de los ápices

Según los resultados obtenidos, ni el aislamiento ni el encapsulamiento de los ápices representaron un obstáculo para que se regeneraran exitosamente (100 y 80%, respectivamente). Esto puede explicarse con base en el tipo de cobertura, ya que la cobertura de alginato de calcio, es un mecanismo efectivo para evitar que el explante sufra de daños mecánicos y por el estrés se presente oxidación, por lo tanto, no le impide a los ápices desarrollarse exitosamente (Suzuki *et al.*, 2005).

14.3.2. Pre-cultivo de los ápices encapsulados

El pre-cultivo de los ápices encapsulados, mostró que en las concentraciones de 0.1 M y 0.3 M de sacarosa, a los dos días de incubación la sobrevivencia se mantuvo alta (100%). Mientras que, luego de cuatro días en todos los tratamientos evaluados la sobrevivencia disminuyó. El pre-cultivo de los ápices representa un periodo de acondicionamiento para la exposición tanto a la deshidratación como para la exposición al nitrógeno líquido, usualmente se utiliza sacarosa en concentraciones altas, con lo cual se otorga resistencia a los explantes. La sacarosa actúa aumentando la tolerancia y manteniendo la integridad de la membrana plasmática interior (Leunufna y Keller, 2003). El pre-cultivo se puede realizar tanto en el aumento progresivo de la concentración de sacarosa o en la concentración más adecuada (Martínez *et al.*, 1999). Por lo que en este trabajo se utilizó la concentración más adecuada, en vez de un aumento progresivo.

La disminución de la sobrevivencia se evidenció cuando se pre-cultivaron los ápices en la concentración de 0.7 M de sacarosa por dos días. En estudios de crioconservación en *Ribes*, begonia, crisantemo y lúpulo, la concentración 0.75 M de sacarosa resultó en la obtención de mayores porcentajes de sobrevivencia (Reed *et al.*, 2005; Burritt, 2008; Halmagyi *et al.*, 2004). En lúpulo se obtuvo un porcentaje de sobrevivencia del 70% después de dos días de pre-cultivo esa concentración de sacarosa (Martínez *et al.*, 1999).

14.3.3. *Curva de deshidratación y efecto de la deshidratación en la sobrevivencia y regeneración de los ápices encapsulados*

El contenido óptimo de humedad de las cápsulas para que los ápices resistan el congelamiento en nitrógeno líquido, se ha reportado entre el 30% y el 20% de humedad. En este estudio, los ápices encapsulados y deshidratados hasta el 20%, mostraron un bajo porcentaje de sobrevivencia (Figura 4). Otro estudio con ápices de *Melia azedarach* L., los cuales se sometieron a esta misma técnica, mostraron que con un porcentaje de humedad del 25% la sobrevivencia fue del 95%, cuando el pretratamiento consistió en el cultivo en concentraciones crecientes de sacarosa por tres días antes de la deshidratación y el congelamiento (Scocchi *et al.*, 2004). Esto difiere con lo obtenido en este estudio, en el cual el pre-cultivo en sacarosa fue con una sola concentración por varios días.

El bajo porcentaje de sobrevivencia, al disminuir el contenido de humedad, parece ser un indicativo de que los ápices fueron dañados durante el proceso de deshidratación y que el pre-cultivo en sacarosa no tuvo el efecto deseado. De acuerdo con Verleysen y colaboradores (2005), es de esperarse que la deshidratación cause una disminución en la viabilidad de los ápices y su posterior regeneración.

Estas observaciones fueron corroboradas por medio de análisis microscópicos de ápices de wasabi, que fueron sometidos a esta técnica, los daños fueron masivos, permaneciendo intacto solo el domo apical (Matsumoto, 2000).

En esta investigación, se eligió la deshidratación hasta un contenido de humedad de aproximadamente 20%, ya que muchos autores han mostrado como la sobrevivencia comienza a decaer cuando se alcanza este porcentaje, y con valores menores de deshidratación sigue en decrecimiento. Como se quedó demostrado en el estudio de Wang y colaboradores (2002), en el cual encontraron que cuando los ápices de cítricos ("Troyer" citrance), con un 21.8% de humedad, la sobrevivencia comenzaba a decaer. Esto también se observó en la crioconservación de ápices de (*Melia azedarach* L.), realizada por Scocchi y colaboradores (2004); donde tanto los ápices congelados como los no congelados, la sobrevivencia decaía cuando se alcanzaba un porcentaje de humedad del 25%.

Asimismo, Wang y colaboradores (2000), encontraron que los ápices de uva, tanto deshidratados por medio de sílica o el flujo de la cámara, el máximo porcentaje de sobrevivencia (60%) de los ápices congelados, se logró cuando el contenido de humedad de las cápsulas fue entre el 15.6% y el 17.6%. A pesar de este comportamiento, también se ha observado que en raíces vellosas (*hairy roots*) de *Vincetoxicum minor*, cuando la deshidratación se llevó a un 23% de humedad, el porcentaje de sobrevivencia luego del congelamiento aumentó en un 10% comparado con las raíces vellosas encapsuladas que fueron deshidratadas a un 25% (Hirata *et al.*, 2002).

14.3.4. Crioconservación de los ápices encapsulados

En cuanto al congelamiento en nitrógeno líquido, los ápices encapsulados que se sometieron al congelamiento, no presentaron regeneración, luego de un mes de evaluación. Los ápices encapsulados que no fueron sometidos al proceso de congelamiento, mostraron un porcentaje de sobrevivencia bajo (34%), y esta se evaluó con base en la aparición de coloración verde. En un estudio de Scocchi y colaboradores (2004) para la crioconservación de ápices de árbol del paraíso (*Melia azedarach* L.), que pertenece a la familia Meliaceae, encontraron que la mejor técnica para la crioconservación era un pretratamiento con concentraciones crecientes de sacarosa, una deshidratación hasta 25% de humedad y un congelamiento lento, con lo cual obtuvieron cerca de un 80% de sobrevivencia.

El proceso de crioconservación requiere muchas combinaciones de tratamientos para obtener porcentajes exitosos de regeneración; asimismo se deben realizar múltiples ensayos con diversos procesos de pre-cultivo y deshidratación, se deben hacer combinaciones de los pre-cultivos para lograr que los explantes sobrevivan al congelamiento en nitrógeno líquido. También se deben buscar el periodo de deshidratación que permita que los explantes soporten el congelamiento. Todas las condiciones que involucran el proceso previo del congelamiento, dependen de los requerimientos especiales de cada especie, es así que deben estudiarse a fondo para que la crioconservación sea exitosa.

15. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Este trabajo demostró la posibilidad de utilizar las técnicas biotecnológicas para la conservación de material valioso y que actualmente se encuentra amenazado, como es el caso del cedro (*Cedrela odorata* L.).

La técnica de crioconservación que se mostró más prometedora fue la de microgota, en la cual se obtuvieron porcentajes de sobrevivencia del 34%. Mientras que para la técnica de encapsulamiento-deshidratación no mostró sobrevivencia de los ápices.

Se recomienda profundizar en el pre-cultivo de los ápices encapsulados, mediante la implementación de glicerol en los medios de cultivo con concentraciones crecientes de sacarosa.

Sería recomendable afinar la curva de deshidratación, para poder correlacionar con mayor exactitud el contenido de humedad después de cada periodo de deshidratación, con la sobrevivencia de los ápices.

Se debe determinar el periodo de incubación en la solución PVS2, para conocer el tiempo en que se torna tóxica para los explantes. Sería aconsejable evaluar otras soluciones vitrificadoras, como la PVS3, que contiene menor concentración de DMSO o la PVS4, que no contiene DMSO.

16. LITERATURA CITADA

- Abdelnour, A. 1999. Crioconservación de plantas, estado actual de la investigación en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*. 23(2):205-214.
- Abdelnour, A. 2004. Micropropagación de tres especies maderables de importancia económica y ecológica para Costa Rica; Teca, Pilon y Caoba. Informe Final Proyecto de Investigación Interinstitucional. Editorial Tecnológica. Cartago, Costa Rica.
- Abdelnour, A; Rojas, G; Alfaro, U. 2007. Estudios preliminares para la crioconservación de especies forestales arbóreas. *Tecnología en Marcha*. 20(1):98-103.
- Al-Ababneh, S; Karam, N; Shibli, R. 2002. Cryopreservation of sour orange (*Citrus aurantium* L.) shoot tips. *In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*. 38:602-607.
- Borém, A; Santos, F; Bowen, D. 2003. Understanding Biotechnology. Prentice Hall PTR. 240 p.
- Collado, R; Barbón, R; Agramonte, D; Jiménez, F; Pérez, M; Gutiérrez, O; Ramírez, D. 2004. Establecimiento *in vitro* de ápices y segmento nodales de *Swietenia macrophylla* King. *Bioteología Vegetal*. 4(3): 143-146.
- Engelmann, F. 2000. Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources. **IN:** Engelmann, F; Takagi, H. (eds.) Cryopreservation of Tropical Germplasm Current Research Progress and Application. Japan International Research Center for Agricultural Sciences and International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, p. 8–20.
- Engelmann, F. 2004. Plant cryopreservation: progress and prospects. *In Vitro Cellular and Development Biology-Plant*. 40(5):427-433.
- Engelmann, F; Gonzalez-Arnao, T; Wu, Y; Escobar, R. 2008. The Development of Encapsulation Dehydration. **IN:** Reed, B. (ed.). Plant Cryopreservation: A Practical Guide. Springer. p. 59-67.
- Ferreira, M. 2005. El estado de las técnicas de crioconservación en plantas: cultivos y árboles forestales [en línea]. Disponible en <http://www.inta.gov.ar/balcarce/ResumenesPG/PGPV2005/diciembre/Ferreira_Mariana.doc> Consultado el 8 julio, 2009.

- González-Arno, M; Panta, A; Roca, W; Escobar, R; Engelmann, F. 2008. Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. *Plant. Cell. Tiss. Cult.* 92:1-13.
- Halmagyi, A; Fisher-Kluver, G; Mix-Wagner, G; Schumacher, H. 2004. Cryopreservation of *Crysanthemum morifolium* (*Dendranthema grandiflora* Ramat.) using different approaches. *Plant Cell Rep.* 22:371-375.
- Howard, F; Merida, M. 2004. *Hypsipyla grandella* (Zeller) [en línea]. Disponible en <http://entnem.ifas.ufl.edu/creatures/trees/moths/Mahogany_borer-Spanish.htm> Consultado el 7 noviembre, 2009.
- Hirata, K; Mukai, M; Goda, S; Ishio-Kinugasa, M; Yoshida, K; Sakai, A; Miyamoto; K. 2002. Cryopreservation of hairy root cultures of *Vinca minor* (L.) by encapsulation-dehydration. *Biotechnology Letters.* 24:371-376.
- Finkle, B; Zavala, M; Ulrich, J. 1985. Cryoprotective compounds in the viable freezing of plant tissues. **IN:** Kartha K (ed.). 1985. Cryopreservation of plant cells and organs. CRC Press. p. 91.
- Leunufna, S; Keller E. 2003. Investigating a new cryopreservation protocol for yams (*Dioscorea* spp.). *Plant Cell Rep* (2003) 21:1159-1166.
- Martín, I. 2001. Conservación de recursos fitogenéticos [en línea]. Disponible en <http://www.esporus.org/recursos/articles/agrobiodiversitat/conservacion_rec_fitog_isaura_martin.pdf> Consultado el 21 julio, 2009.
- Martínez, D; Tamés, R; Revilla, M. 1999. Cryopreservation of in vitro-grown shoot-tips of hop (*Humulus lupulus* L.) using encapsulation/dehydration. *Plant Cell Reports.*19: 59-63.
- Maruyama, E; Ishii, K; Saito, A; Migita K. 1989. Micropropagation of cedro (*Cedrela odorata* L.) by shoot-tip culture. *Journal of the Japanese Forestry Society.* 71: 329–331.
- Matsumoto, T. 2000. Cryopreservation of *in vitro*-cultured meristems of wasabi. **IN:** En: Engelmann, F; Takagi, H. (eds.) Cryopreservation of Tropical Germplasm Current Research Progress and Application. Japan International Research Center for Agricultural Sciences and International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, p. 8–20.

- Matsumoto, T; Sakai, A. 2003. Cryopreservation of axillary shoot tips of in vitro-grown grape (*Vitis*) by a two-step vitrification protocol. *Euphytica*. 131: 299-304.
- Murashige, T; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues culture. *Physiol Plant*. 15: 473-497.
- Navarro, C. 2002. Genetic resources of *Cedrela odorata* L. and their efficient use in Mesoamerica. Universidad de Helsinki. Helsinki, Finlandia. p.7.
- Poehlman, J. 2005. Mejoramiento genético de las cosechas. Limusa Wiley. Mexico. p. 257.
- Quesada, R. 2003. Estudio de especies forestales con poblaciones reducidas o en peligro de extinción. Editorial Tecnológica. Cartago, Costa Rica. p.119-121
- Reed, B; Dumet, D; Denoma, J; Benson, E. 2001. Validation of cryopreservation protocols for plant germplasm conservation: a pilot study using *Ribes* L. *Biodiversity and Conservation*. 10: 939-949.
- Reed, B; Schumacher, L; Dumet, D; Benson, E. 2005. Evaluation of a modified encapsulation–dehydration procedure incorporating sucrose pretreatments for the cryopreservation of ribes germplasm. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*. 41:431-436.
- Sakai, A; Engelmann, F. 2007. Vitrification, Encapsulation-Vitrification and Droplet-Vitrification: A Review. *Cryoletters*. 28(3):151-172.
- Sakai A, Hirai D y Niino T. 2008. Development of PVS-Based Vitrification and Encapsulation-Vitrification Protocols. **IN:** Reed, B. (ed.). *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*. Springer. p. 33-50.
- Sant, R; Panis, B; Taylor, M; Tyagi, A. 2008. Cryopreservation of shoot-tips by droplet vitrification applicable to all taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta*) accessions. *Plant Cell Tiss Organ Cult* .92:107-111.
- Scocchi, A; Faloci, M; Medina, R; Olmos, S; Mroginski, L. 2004. Plant recovery of cryopreserved apical meristem-tips of *Melia azedarach* L. using encapsulation/dehydration and assessment of genetic stability. *Euphytica*. 135:29-38.
- Suzuki, M; Akihama, T; Ishikawa, M. 2005. Cryopreservation of encapsulated gentian axillary buds following 2 step-preculture with sucrose and desiccation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 83: 115–121.

- Vandenbussche, B; Weyens, G; De Proft, M. 2008. Cryopreservation of in vitro sugar beet (*Beta vulgaris* L.) shoot tips by a vitrification technique. *Plant Cell Reports*. 19:1064-1068.
- Verleysen, H; Fernandes, P; Sánchez, I; Bockstaele, E van; Debergh, P. 2005. Cryopreservation of *Robinia pseudoacacia*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 81:193-202.
- Vidal, N; Sánchez, C; Jorquera, L; Ballester, A; Vieitez, A. 2005. Cryopreservation of chestnut by vitrification of in vitro-grown shoot tips. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*. 41:63-68.
- Wang, Q; Batuman, O; Li, P; Bar-Joseph, M; Gafny, R. 2002. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of 'Troyer' citrange [*poncirus trifoliata* (L.) Raf. × *Citrus sinensis* (L.) Osbeck.] by encapsulation-dehydration. *Plant Cell Rep*. 20:901–906.
- Wang, Q; Tanne, E; Arav, A; Gafny R. 2000. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of grapevine by encapsulation-dehydration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 63:41-46.

17. APÉNDICES

17.1. Apéndice 1

Tabla 10. Composición química del medio de cultivo básico Murashige y Skoog (1962). Base para la preparación de los medios utilizados en la práctica.

Componentes	Concentración
Macroelementos	
NH ₄ NO ₃	1650.00
KNO ₃	1900.00
CaCl ₂ ·H ₂ O	440.00
MgSO ₄	370.00
KH ₂ PO ₄	170.00
Microelementos	
Fe-EDTA	43.00
FeSO ₄	27.00
H ₃ BO ₃	6.20
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.30
ZnSO ₄ ·4H ₂ O	8.60
KI	0.83
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025
Compuestos orgánicos	
myo-Inositol	100.00
Ácido nicotínico	0.50
Piridoxina	0.50
Tiamina – Cl	0.10
Glicina	2.00

Fuente: Murashige y Skoog, 1962.

17.2. Apéndice 2

Tabla 11. Composición del medio de cultivo semisólido utilizado para la introducción de *in vitro* de las semillas de cedro (*Cedrela odorata* L.). Medio de cultivo utilizado en el Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) del Instituto Tecnológico de Costa Rica.

Componente	Concentración
Macroelementos	M&S
Microelementos	M&S
Vitaminas e inositol	M&S
Fe EDTA	M&S
Sacarosa	30 g/l
Phyta-Gel	3.1 g/l

Fuente: Datos de laboratorio

17.3. Apéndice 3

Tabla 12. Medio de cultivo líquido adicionado con 3% de alginato de sodio. Utilizado para la preparación de las cápsulas.

Componente	Concentración
Macroelementos*	M&S
Microelementos	M&S
Vitaminas e inositol	M&S
Fe EDTA	M&S
Sacarosa	30 g/l
Gelificante	----
Alginato de sodio	15 g/l

Fuente: Datos de laboratorio

* Las fórmulas con calcio han sido retiradas.

17.4. Apéndice 4

Tabla 13. Medio de cultivo líquido adicionado con 100 mM de cloruro de calcio. Utilizado para la preparación de las cápsulas.

Componente	Concentración
Macroelementos*	M&S
Microelementos	M&S
Vitaminas e inositol	M&S
Fe EDTA	M&S
Sacarosa	30 g/l
Gelificante	----
Cloruro de calcio	100 mM

Fuente: Datos de laboratorio

* Las fórmulas con calcio han sido retiradas.

17.5. Apéndice 5

Tabla 14. Medio de cultivo líquido adicionado con 0.4 M sacarosa y 2 M glicerol. Solución de carga (LD), para las pruebas de crioconservación por microgota.

Componente	Concentración
Macroelementos	M&S
Microelementos	M&S
Vitaminas e inositol	M&S
Fe EDTA	M&S
Sacarosa	136.92 g/l
Gelificante	----
Glicerol	145.756 ml/l

Fuente: Datos de laboratorio.

17.6. Apéndice 6

Tabla 15. Solución vitrificadora PVS2. Constituida en base a medio de cultivo líquido 0.4 M sacarosa.

Componente	Concentración
Macroelementos	M&S
Microelementos	M&S
Vitaminas e inositol	M&S
Fe EDTA	M&S
Sacarosa	136.92 g/l
Gelificante	----
Glicerol	30 ml/l
Etilenglicol	30 ml/l
Dimetil Sulfoxido (DMSO)	15 ml/l

Fuente: Datos de laboratorio.

17.7. Apéndice 7.

Tabla 16. Medio de cultivo líquido adicionado con 1.2 M sacarosa, utilizado para el lavado de los ápices luego de la exposición al nitrógeno líquido.

Componente	Concentración
Macroelementos	M&S
Microelementos	M&S
Vitaminas e inositol	M&S
Fe EDTA	M&S
Sacarosa	410.76 g/l
Gelificante	----

Fuente: Datos de laboratorio

17.8. Apéndice 8

Tabla 17. Medio de cultivo semisólido adicionado con 0.5 M sacarosa, utilizado en el aislamiento de ápices para la prueba de microgota.

Componente	Concentración
Macroelementos	M&S
Microelementos	M&S
Vitaminas e inositol	M&S
Fe EDTA	M&S
Sacarosa	171.15 g/l
Phyta-gel	3.1 g/l

Fuente: Datos de laboratorio.