

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA

**VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y EXTENSIÓN Y EXTENSIÓN
DIRECCIÓN DE PROYECTOS**

INFORME FINAL DE PROYECTO

**CRIOCONSERVACIÓN SEMILLAS
DE ESPECIES FORESTALES**

DRA. ANA ABDELNOUR ESQUIVEL

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA
MARZO 2008**

OBJETIVOS

General

Colaborar con los programas de conservación de germoplasma forestal poniendo a disposición de los usuarios una opción eficiente de almacenamiento a largo plazo.

Específicos

1. Evaluar la crionservación como medio para la conservación de semillas y/o embriones de especies forestales de importancia para Costa Rica.
2. Transferir las técnicas desarrolladas a personal involucrado en la conservación de semillas y a profesionales responsables de bancos de germoplasma.

Objetivo 1

Crioconservación de semillas de especies forestales arbóreas

SUMMARY

Cryopreservation presents numerous advantages compared to other techniques used routinely for germplasm conservation and storage. Some of these advantages are the lower cost of maintenance and the conservation of the genetic stability for indefinite period of time. The present study shows the results obtained during cryopreservation of fruits and seeds of teak (*Tectona grandis*), seeds of cedar (*Cedrela odorata*) pilon (*Hyeronima alchorneoides*), cenizaro (*Pithecellobium saman*) and madero negro (*Gliricidia sepium*) using dehydration-rapid freezing in liquid nitrogen techniques. Before freezing, experimental material was treated with 10 mgL⁻¹ Giberelic acid (GA₃) or water or the hard endocarps were sandpapered. Once thawed, materials were planted under greenhouse conditions to evaluate survival. Fruits and seeds from the species studied were able to survive freezing in liquid nitrogen. This study also pointed out the importance of the collect and the handling of fruits and seeds after harvesting prior to initiation of research on germination and cryopreservation. The results obtained showed the potential of cryopreservation for long-term conservation of forest trees germplasm.

RESUMEN

La crioconservación presenta numerosas ventajas con respecto a otras técnicas que se utilizan rutinariamente para la conservación y almacenamiento de germoplasma. Algunas de estas ventajas son los bajos costos de labor durante el mantenimiento de las colecciones y la conservación de la estabilidad genética por tiempo indefinido. El presente estudio muestra los resultados obtenidos en la crioconservación de frutos y semillas de teca (*Tectona grandis*), semillas de cedro (*Cedrela odorata*), pilón (*Hyeronima alchorneoides*), leucaena (*Leucaena leucocephala*), cenízaro (*Samanea saman*) y madero negro (*Gliricidia sepium*) utilizando la técnica de desecación y congelamiento rápido en nitrógeno líquido. Los frutos

recibieron un tratamiento previo a la congelación con 10 mgL⁻¹ de ácido giberélico (GA₃) o agua, o el lijado del endocarpo duro. Una vez descongelados, los materiales fueron sembrados en el invernadero para evaluar la sobrevivencia. Se encontró que tanto los frutos como las semillas de las especies evaluadas sobrevivieron al congelamiento. El estudio también mostró la importancia de la colecta y el manejo que se dé a las semillas antes de realizar experimentación en crioconservación. Los resultados obtenidos mostraron la factibilidad de utilizar esta técnica para la conservación de forestales y el potencial que presenta para que pueda ser evaluada en otras especies forestales de interés.

Palabras clave

Especies forestales, crioconservación, conservación a largo plazo, *in vitro*, almacenamiento de semillas, deshidratación, nitrógeno líquido.

Introducción

Por lo general los programas de conservación son motivados por amenazas a los recursos naturales, ya sea por una crisis inmediata o por un factor de riesgo potencial para el futuro. Debido a los múltiples beneficios que aportan, tanto al hombre como a las zonas silvestres, los árboles se enfrentan a más amenazas que la mayoría de los organismos. El uso de clones representa una amenaza especial a la diversidad genética, cuando se trata de reforestar y realizar mejoramiento genético de árboles ya que, con la habilidad de reproducir genotipos exactos, sobreviene el potencial de reducir la diversidad en bosques restaurados y en plantaciones debido a la siembra de muchas copias de uno o unos pocos genotipos (Millar, 1993).

Para conservar la diversidad genética de los recursos forestales se dispone de varios métodos. La conservación *in situ*, que comprende la preservación de los bosques naturales, y la conservación *ex situ* en la cual el germoplasma se preserva como semillas, huertos clonales y utilizando las técnicas biotecnológicas (Ahuja, 1989; Engelmann, 2000). Entre estos, la conservación de semillas es el método más utilizado, ya que es el que tradicionalmente se ha utilizado no solo para almacenar el germoplasma, sino también para distribuirlo entre agricultores, mejoradores, científicos y otros usuarios (Engelmann, 2007). El almacenamiento de semillas permite la conservación de la diversidad genética, la que es importante para proveer de materia prima en programas de mejoramiento, para evitar los efectos nocivos de la autogamia y en la protección contra riesgos de destrucción por

plagas y patógenos (Millar, 1993). Por lo general, las semillas son almacenadas en rangos de temperatura que varían de 4°C a -20°C (especies con semillas ortodoxas) (Roberts,); pero en un número considerable de especies, entre ellas forestales tropicales y subtropicales, las semillas almacenadas a estas temperaturas empiezan a perder viabilidad en poco tiempo, ya sea porque no toleran altos grados de desecación o porque son dañadas por esas temperaturas de almacenamiento (semillas intermedias o recalcitrantes) (Engelmann, 2000). Entre las técnicas más promisorias que ofrece la biotecnología para este propósito se señala a la criopreservación, que consiste en el almacenamiento de materiales de interés en nitrógeno líquido (NL, -196°C). Las grandes ventajas que presenta la criopreservación sobre otras modalidades de conservación es que, permite la conservación a largo plazo sin pérdida de viabilidad y conservando la estabilidad genética, ya que una vez que el material es congelado a ultra bajas temperaturas, todas las funciones metabólicas cesan y, por lo tanto, no ocurre división, mutaciones ni deterioro celular, por lo que se mantiene la estabilidad genética. (Abdelnour, 1999; Villalobos y Engelmann, 2000). Esta modalidad de conservación ha sido utilizada en especies hortícolas, frutales, medicinales y en algunas forestales arbóreas con éxito (Ashmore, 1997). Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue evaluar la técnica de criopreservación conocida como desecación y congelamiento rápido en nitrógeno líquido, en semillas de varias especies forestales que presentan problemas de almacenamiento a largo plazo en bancos de semillas convencionales, y lograr así su recuperación como plantas en condiciones *ex vitro* e *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización de la investigación

La investigación de laboratorio e invernado se llevó a cabo en el Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) del Instituto Tecnológico de Costa Rica, durante los años 2006 y 2007.

Material experimental

Como material experimental se utilizaron frutos y semillas de teca (*Tectona grandis*), frutos de pilón (*Hyeronima alchorneoides*), semillas de cedro (*Cedrela odorata*), leucaena (*Leucaena leucocephala*), cenízaro (*Samanea saman*) y madero negro (*Gliricidia sepium*) donados por la empresa MACORI, Precious Woods of Costa Rica, Liberia, Guanacaste, Costa Rica) y el

Laboratorio de Semillas Forestales de CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Turrialba, Costa Rica).

Determinación del contenido de humedad de frutos y semillas al momento del congelamiento

El contenido de humedad de los frutos se determinó con base en el peso fresco ($P_f - P_s / P_f \times 100$) antes del congelamiento. Se tomaron 7 muestras de 10 frutos de teca cada una y se determinó el peso fresco (P_f). Posteriormente, los frutos de cada muestra fueron colocados en un erlenmeyer de 25 ml de capacidad sellados con papel aluminio. Para determinar el peso seco (P_s), los erlenmeyers se colocaron en el horno a 95°C durante 24 horas y transcurrido ese periodo, los frutos fueron pesados y se procedió a determinar el contenido de humedad (en porcentaje) para cada una de las muestras. Posteriormente se calculó el porcentaje de humedad como promedio de las siete muestras. Para la determinación del contenido de humedad de los frutos y las semillas de todas las otras especies se siguió el mismo procedimiento descrito.

Pretratamientos y congelamiento en nitrógeno líquido

Para los ensayos de crioconservación de frutos de teca y pilón, se evaluaron tres tratamientos con 80 frutos cada uno: congelamiento de frutos completos (endocarpo más semillas), frutos con el endocarpo lijado (papel lija #100) y frutos con el endocarpo lijado e incubados durante 24 horas, inmediatamente después del descongelamiento, en una solución de 10 mgL⁻¹ de ácido giberélico (GA_3).

Para el congelamiento, los frutos de teca, en subgrupos de cinco frutos, fueron envueltos en papel aluminio y congelados por inmersión directa en nitrógeno líquido (NL). Después de 1 hora, los materiales fueron descongelados en un baño de agua a 40°C durante 2 min. Para su recuperación, 40 frutos fueron cultivados *in vitro* en condiciones de oscuridad por tres días (25°C) y luego fueron transferidos a condiciones de luminosidad en el cuarto de crecimiento (25°C, 16 horas luz y una intensidad lumínica de 3000 lux). El otro grupo de 40 frutos fue sembrado en camas de germinación en condiciones de invernadero en un sustrato compuesto de una mezcla de suelo y arena (2:1). La sobrevivencia fue evaluada con base en el porcentaje de germinación después de 12 semanas. Cada prueba fue repetida dos veces.

Para los ensayos de crioconservación de semillas de teca, éstas fueron extraídas mecánicamente rompiendo el endocarpo. Para el congelamiento (inmersión directa en NL, 1 hora), se prepararon grupos de 40 semillas, colocándose grupos de 10 semillas en un criotubo de polipropileno de 2 ml. El descongelamiento se efectuó sumergiendo los criotubos en un baño de agua a 40°C. Luego, las semillas fueron desinfectadas (agua y detergente al 1% por 5 min en agitación, seguido por una mezcla de 4 gL⁻¹ de agrymicin, 4 gL⁻¹ de benlate y 6 gL⁻¹ de ferban por 20 min en agitación, posteriormente incubadas en hipoclorito de sodio al 3,5% durante 15 min. Finalmente, fueron enjuagadas tres veces con agua destilada estéril en condiciones de cámara de transferencia) y cultivadas *in vitro* en un medio de cultivo M&S en las condiciones mencionadas para la recuperación de frutos *in vitro*.

En los ensayos de crioconservación realizados con frutos de pilón y semillas de cedro, leucaena, cenízaro y madero negro se siguió el mismo procedimiento descrito arriba, evaluándose la sobrevivencia tanto en condiciones *in vitro*, como en condiciones de invernadero. Con los frutos de pilón y las semillas cenízaro, la recuperación de los materiales se evaluó únicamente en condiciones de invernadero y con las de leucaena solamente *in vitro*.



Figura 1. Procedimiento utilizado para la crioconservación de fruto y semillas de teca (*Tectona grandis*). A. Frutos (endocarpo y semilla), B. Lijado de frutos, C. Aislamiento mecánico de semillas, D. Semillas, D. Tanque con nitrógeno líquido (NL).

Resultados y discusión

Contenido de humedad

La determinación del contenido de humedad de los frutos y las semillas de teca mostró valores de 8% y 6% respectivamente. Por otra parte, los frutos de pilón y las semillas de cedro, leucaena, cenízaro y madero negro presentaron contenidos de humedad del 8%, 9%, 5%, 8% y 13% respectivamente, al momento del congelamiento en NL (Cuadro 1). Estas semillas fueron donadas por bancos de semillas y los porcentajes de humedad determinados son los que comúnmente se encuentran en las semillas almacenadas en bancos de germoplasma convencionales y no necesariamente reflejan las condiciones de humedad óptimas para todos los tipos de semillas. La importancia de la deshidratación de los tejidos reside en que evita la formación de cristales de hielo que pueden romper o desestabilizar las membranas durante el congelamiento y descongelamiento de los materiales, lo que permite una mayor sobrevivencia (Engelmann, 2000).

Cuadro 1. Contenido de humedad (%) al momento del congelamiento en nitrógeno líquido (NL) de frutos y semillas de varias especies forestales tropicales.

Especie	Contenido de humedad* (%)
Frutos de teca (<i>Tectona grandis</i>)	8
Semillas de teca (<i>Tectona grandis</i>)	6
Frutos de pilón (<i>Hyeronima alchorneoides</i>)	9
Semillas de cedro (<i>Cedrela odorata</i>)	8
Semillas de cenízaro (<i>Samanea saman</i>)	8
Semillas de madero negro (<i>Gliricidia sepium</i>)	13
Semillas de leucaena (<i>Leucaena leucocephala</i>),	5

*Calculado con base en el peso fresco de los frutos y semillas.

Sobrevivencia al congelamiento en nitrógeno líquido

Después del congelamiento en NL, cuando los frutos de teca fueron cultivados para su germinación, en condiciones de invernadero (Cuadro 2), se observaron porcentajes de germinación del 51% y 60%, para los frutos congelados completos y lijados respectivamente. Estos valores de recuperación fueron muy similares o superaron los observados en los controles (-NL), excepto para aquellos frutos que fueron incubados en GA_3 durante las primeras 24h de la fase de recuperación, en los que el porcentaje de germinación disminuyó. El congelamiento en NL parece tener un efecto estimulador sobre la germinación de algunas especies, que podría explicarse con base en la inhibición o estimulación de algunas sustancias o procesos involucrados (Taiz and Zeiger, 2002). Por otra parte, el adelgazamiento del endocarpo mostró un efecto positivo en la germinación de las semillas de teca. El endocarpo duro en la semilla dificulta su imbibición, por lo que al lijarlos, se permitiría un mayor movimiento de agua hacia el interior de la semilla y por ende se estimularía la germinación (Flores-Vindas, 1999).

Cuadro 2: Sobrevivencia al congelamiento en nitrógeno líquido (+NL) de frutos de teca (*Tectona grandis*), con un contenido de humedad del 8%, en condiciones de invernadero.

Tratamiento	Germinación (% \pm E.E.*)	
	-NL	+NL
Frutos completos	45,0 \pm 0,00	51,3 \pm 7,50
Frutos endocarpo lijado	42,5 \pm 1,0	60,0 \pm 2,0
Frutos lijados e incubados en GA_3 por 24h, después de descongelarlos	50,00 \pm 4,0	37,5 \pm 2,0

*Error estándar, promedio de 2 repeticiones.

Por otra parte, cuando se utilizaron las semillas de teca para los ensayos de crioconservación (Cuadro 3), se observó, al igual que cuando se congelaron

los frutos, un incremento de la germinación provocado por el congelamiento. Además, se observó un efecto positivo de los reguladores del crecimiento adicionados al medio de cultivo sobre la germinación (0,5 a 1,5 mgL⁻¹ de BA y 0,1 a 66,6 mgL⁻¹ GA₃), siendo el efecto estimulador mayor con la presencia del GA₃. Resultados similares a los obtenidos en esta investigación, con respecto a la estimulación de la germinación de frutos y semillas causado por este último regulador del crecimiento, fueron observados en estudios con melina (*Gmelina arborea*) y teca (Abdelnour-Esquivel *et al.*, 2007). El GA₃ es un regulador de crecimiento conocido por estimular la germinación de las semillas de muchas especies (Flores-Vindas, 1999; Taiz and Zeiger, 2002) y de acuerdo con los resultados obtenidos, la teca no es una excepción

Cuadro 3: Supervivencia al congelamiento en nitrógeno líquido (+NL) de semillas de teca (*Tectona grandis*), con un contenido de humedad del 6%, recuperadas en condiciones *in vitro* en un medio M&S complementado con benciladenina (BA) o ácido giberélico (GA₃).

Concentración de BA (mgL ⁻¹)	Germinación (%)	
	-NL	+NL
0	18	28
0,5	20	25
1	33	38
1,5	15	38
Concentración de GA ₃ (mgL ⁻¹)		
0,0	40	45
0,1	45	55
1	53	40
10	25	45
33,3	-	40
66,6	-	53
100	-	35

Por otra parte, al evaluarse el efecto del congelamiento en NL de semillas de cedro, leucaena, cenízaro y madero negro, se observó supervivencia en las cuatro especies (Cuadro 3). Sin embargo, los porcentajes de germinación en cedro variaron considerablemente al comparar la recuperación en condiciones *in vitro* e invernadero, obteniéndose los mayores porcentajes de recuperación de plantas *in vitro*. Una de las

mayores ventajas del cultivo *in vitro* es que permite proveerle las condiciones físicas y químicas óptimas para el desarrollo del material vegetal, eliminando problemas como falta o exceso de riego, temperaturas mayores o menores a las requeridas, deficiencias nutricionales, ataques de plagas y otros factores que podrían afectar negativamente la recuperación del material de interés (Engelmann, 2007). Por otra parte, la posibilidad de recuperar, en condiciones de invernadero o propagadores, los materiales que hayan sido almacenados en NL, permitiría al personal de bancos de germoplasma, que no cuentan con facilidades de laboratorio de cultivo de tejidos, establecer metodologías seguras y eficientes de crioconservación, de manera que puedan hacerse responsables del almacenamiento a largo plazo del recurso genético problemático, con la misma infraestructura que cuenta un banco de semillas convencional (Abdelnour *et al.*, 2007). Por lo anterior y considerando que el material utilizado en esta investigación fue capaz de germinar en condiciones de invernadero, sería recomendable evaluar condiciones más controladas en cuanto a humedad, sustratos y otros, para tratar de incrementar los porcentajes de sobrevivencia y poder disponer de una metodología sencilla y eficiente para laboratorios y bancos de semillas convencionales .

Cuadro 4: Sobrevivencia al congelamiento en nitrógeno líquido (+NL) de semillas de cedro (*Cedrela odorata*), con un contenido de humedad del 8%, recuperadas en condiciones *in vitro* en un medio M&S complementado con 0,5 mgL⁻¹ de benciladenina (BA) y en condiciones de invernadero.

Especie (Contenido de humedad)	Germinación (%)			
	In vitro		Invernadero	
	-NL	+NL	-NL	+NL
Cedro (8%)	90	86	52	25
Leucaena (5%)	22	24	-	-
Cenízaro (8)	-	-	40	3
Madero negro (13%)	73	78	93	95

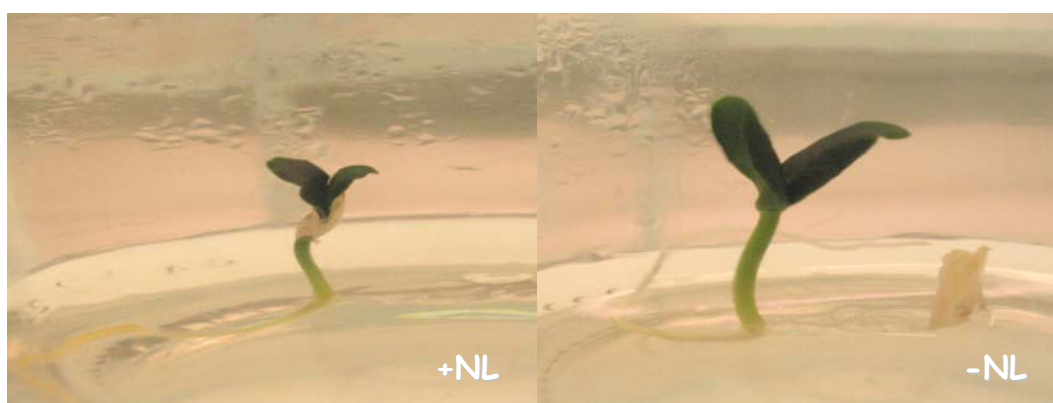


Figura 2. Plántulas de cedro (*Cedrela odorata*) recuperadas en condiciones de invernadero (A) e *in vitro* después del congelamiento de las semillas en nitrógeno líquido.

En cuanto a los frutos de pilón, estos no mostraron sobrevivencia en ninguno de los tratamientos evaluados. Estudios preliminares previos a esta investigación mostraron que esta especie es verdaderamente problemática para el almacenamiento y pierde su capacidad de germinación de tres a cuatro días después de la cosecha si no se manipula apropiadamente. Además, los resultados obtenidos en esta investigación nos motivaron a estudiar el estado de los frutos y decidir si utilizar solamente la semilla para los procesos de almacenamiento. Después de evaluar el interior de dos lotes de frutos, se encontró que el 90% de ellos se encontraban dañados por avispas de la familia Eurytomidae, importante plaga de esta especie forestal (figura 1), lo que explicó claramente los resultados obtenidos durante los ensayos de germinación y congelamiento.

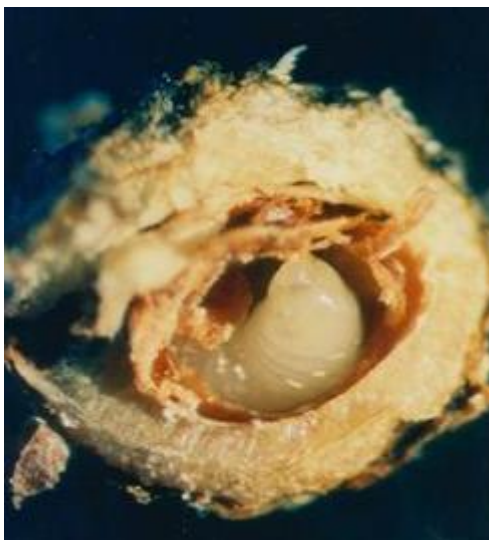


Figura 3. Semilla de pilón (*Hyeronima alchorneoides*) dañada por larva de una avispa de la familia Eurytomidae.

Todas las semillas de las especies estudiadas, exceptuando pilón, fueron capaces de sobrevivir al congelamiento en nitrógeno líquido. Debido a que todas estas semillas fueron obtenidas de un banco convencional de semillas (almacenadas en condiciones que no serían las más adecuadas para este tipo de semillas), no es de extrañar que los porcentajes de germinación fueran bajos, aún en los tratamientos que no incluyeron la congelación. En general, los resultados indicaron el potencial de la técnica de criopreservación para el almacenamiento de las semillas de especies forestales. A la vez, los resultados parecen indicar la importancia de dirigir la investigación a establecer las condiciones óptimas en que deben estar las semillas, tanto a la hora de la colecta, como a la hora de realizar el congelamiento, ya que estas dos etapas del proceso son críticas, de manera que se puedan obtener resultados confiables y metodologías eficientes y sencillas de conservación para estas especies problemáticas para el almacenamiento a largo plazo.

Las técnicas de criopreservación se utilizan actualmente para el almacenamiento de gran diversidad de células y tejidos de animales y vegetales, y para el almacenamiento de microorganismos varios. En plantas, la mayoría de las técnicas de criopreservación se han desarrollado utilizando materiales producidos por cultivo de tejidos, por lo que el uso de infraestructura y equipo costoso se hace necesaria tanto para establecer los métodos, como para regenerar el material almacenado. Sin embargo, los resultados obtenidos durante la experimentación con frutos y semillas de

estas especies mostraron no solo el potencial de la técnica de crioconservación para el almacenamiento de estas y otras semillas de especies arbóreas tropicales, sino también que las facilidades de un laboratorio de cultivo de tejidos no son necesarias para establecer este tipo de colecciones. Por lo tanto, bancos de germoplasma tradicionales pueden fácilmente desarrollar investigación en crioconservación y, por ende, contar con otro método de almacenamiento que asegure la conservación a largo plazo de los materiales bajo su responsabilidad.

Agradecimientos

La investigadora agradece el apoyo financiero de la Vicerrectoría de Investigación y Extensión del Instituto Tecnológico de Costa Rica. También agradece el apoyo recibido de la Empresa MACORI y del Banco de Semillas Forestales del CATIE por donar el material experimental. Un agradecimiento especial a la Ing. Ana Hine y al Sr. Michael Zúñiga por asistencia en el desarrollo de esta investigación.

Bibliografía

- Abdelnour-Esquivel, A.; Rojas, G.; Alfaro, U.** 2007. Estudios preliminares para la crioconservación de especies forestales arbóreas. *Tecnología en marcha*. 20(1): 98-103.
- Ashmore, S.** 1997. Status report on the development and application of *in vitro* techniques for the conservation and use of plant genetic resources. International Plant Genetic Resources Institute, Roma.
- Ahuja, M.R.** 1989. Storage of forest tree germplasm at sub-zero temperatures. In: *Application of Biotechnology in Forestry and Horticulture*. Vibha Dhawan (Ed.), Plenum Press, New York. Pp. 215-228.
- Engelmann, F.** 2007. Use of biotechnologies for conserving plant biodiversity. *Acta Horticulturae, Proc. 3rd International Symposium on Acclimatization and Establishment of Micropropagated Plants*. Sept. 12-15, 2007. Faro, Portugal.
- Engelmann, F.** 2000. Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources. In: *Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application*. Japan International Research Center for Agricultural Science, Tsukuba, Japan/International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. Pp. 8-20.

Flores-Vindas, E. 1999. La Planta: estructura y función. Libro Universitario Regional. Cartago, Costa Rica. Pp. 697-699.

Millar, C.I. 1993. Conservation of germplasm in Forest trees. In: Clonal Forestry II. Conservation and Application. Arauja, M.R. and Libby, W.J. (eds.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Pp. 42-65.

Roberts, H.F. 1973. Predicting the viability of seeds. *Seed Sci. Tech.* 1:499-514.

Taiz, L.; Zeiger, E. 2002. Plant Physiology. 3d. Ed. Sinauer Associates. Sunderland, Massachussets. Pp. 461-492.

Villalobos, V.M.; Engelmann, F. 1995. *Ex situ* conservation of plant germplasm using biotechnology. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 11: 375-382

Objetivo 2

Transferir las técnicas desarrolladas a personal involucrado en la conservación de semillas y a profesionales responsables de bancos de germoplasma.

Para cumplir con este objetivo la investigadora siguió el siguiente plan:

- A) Diseñar y organizar un curso de capacitación para personal profesional de Mesoamérica y el Caribe.
- B) Búsqueda de financiamiento para cubrir los costos del curso
- C) Invitación de expertos que colaboraran en la organización e impartición del curso
- D) Preparación de materiales didácticos
- E) El curso propiamente dicho

Diseño y organización del curso de capacitación para personal profesional de Meso América y el Caribe

Se diseñó un curso teórico-práctico que incluyera tópicos como la importancia de los recursos fitogenéticos, modalidades de conservación de germoplasma, ventajas y desventajas de cada una de ellas, las técnicas de conservación *in vitro*, enfatizando en las diferentes técnicas de crioconservación (Anexo 1).

Búsqueda de financiamiento para cubrir los costos del curso

- Se preparó una propuesta de curso y fue enviada a consideración de varias organizaciones involucradas en el estudio de los recursos genéticos, entre ellas la Universidad de las Naciones Unidas, específicamente al programa de Biotecnología para América Latina (UNU-BIOLAC). El financiamiento solicitado pretendió cubrir pasajes aéreos, transporte aeropuerto-Cartago-aeropuerto y hospedaje de los participantes extranjeros, alimentación de todos los participantes, incluidos los profesores invitados, materiales didácticos, reactivos y materiales de laboratorio, etc.

Financiamiento aprobado por BIOLAC: \$22 000

- También se preparó una propuesta para lograr el financiamiento de la traída del experto en crioconservación desde Montpellier, Francia, para que participara como conferencista principal: Dr. Florent Engelmann. Esta solicitud la realizó directamente la investigadora de este proyecto ante la Embajada de Francia en Costa Rica.

Financiamiento aprobado por la Embajada de Francia: \$2 000

- La Vicerrectoría de Investigación del ITCR contribuyó con el transporte local y el chofer asignado al curso.

Expertos que colaboraron en la organización e impartición del curso

Además de la investigadora principal de este proyecto, se logró la participación de:

- Dr. Florent Engelmann, IRD, Montpellier, Francia. Conferencista principal.
- Dra. María Elena Aguilar, CATIE, Turrialba, Costa Rica. Conferencista invitada para el tema de crioconservación de suspensiones celulares.
- MSc. Silvana Alvarenga, profesora curso Cultivo de Tejidos II, Carrera de Ingeniería en Biotecnología, ITCR. Instructora de prácticas de laboratorio.
- MSc. Vilma Jiménez, profesora curso Cultivo de Tejidos II, Carrera de Ingeniería en Biotecnología, ITCR. Instructora de prácticas de laboratorio.
- MSc. Giovanni Garro, Coordinador logístico del curso.

Preparación de materiales didácticos

Se prepararon y entregaron los siguientes materiales didácticos:

- Carpeta con programa del curso y artículos científicos recomendados para que los participantes estudiaran después de las clases teóricas y antes de las prácticas, hojas, lapiceros e información del ITCR y la Escuela de Biología (Anexo 2)
- Folleto de Prácticas de laboratorio (Anexo 3)
- CD con artículos científicos relacionados con los contenidos temáticos del curso y fotografías de los participantes durante su estancia en el ITCR.
- Cinco libros publicados por IPGRI sobre temas afines al curso, donados por el conferencista principal (Anexos 4).

El curso propiamente dicho

- Se contó con la participación de 16 profesionales de Costa Rica, Panamá, Nicaragua, El Salvador, México y Cuba. La evaluación final del curso por parte de los participantes fue de muy bueno a excelente. A continuación se presentan los nombres y direcciones de los participantes.

Nombre	País	Email
Lázaro Vallejo Claudia	Mexico	claudi1982@hotmail.com
Montes Ayala Ma. Elena	El Salvador	maria.montes@unico.edu.sv
Murcia Campos Maria Irma	El Salvador	biotecnologiacentra@hotmail.com
Quintanilla Moreno Karla María	El Salvador	karlimary@gmail.com
Lopez Ventura Yanelis E.	El Salvador	<u>yanira.lopez@ues.edu.sv</u>
Pérez González Aymara	Cuba	aymara271176@hotmail.com
Castilla Valdés Yanelis	Cuba	yanelis@inca.edu.cu
Alvarado de González Priscila	Panamá	algonza53@yahoo.com.mx
Aguilar Reyes Sanya	Panamá	reytzel@hotmail.com
Dávila Prado Maria Inés	Nicaragua	maidavila2000@yahoo.es
Pastora Cárcamo Rebeca Maria	Nicaragua	pastrebeca@yahoo.es
Hine Gómez Ana Lizeth	Costa Rica	ahine@una.ac.cr
Mora Ramírez María Isabel	Costa Rica	mmora@cariari.ac.cr, isamora@gmail.com
Jarquín Cordero Montserrat	Costa Rica	mocordero@itcr.ac.cr
Vargas Castillo Maria del Pilar	Costa Rica	<u>mdpilarvc@gmail.com</u>
Rojas Parajeles Fabiana	Costa Rica	farojas@itcr.ac.cr

APORTES DE LA INVESTIGACIÓN

1. Permitió la familiarización de la investigadora con las prácticas de germinación y manejo de semillas forestales.
2. Permitió el desarrollo de protocolos de crioconservación de frutos y semillas de varias especies forestales tropicales.
3. Dio luz sobre algunas limitantes que pueden presentarse para transferir la metodología desarrollada a especies con semillas con mayor grado de recalcitrancia al almacenamiento, por lo que la estrategia podrá ser modificada con base en los resultados obtenidos.
4. Permitió el desarrollo de conocimiento básico para continuar este tipo de investigación y preparar nuevas propuestas de investigación, de las cuales dos fueron aprobadas y están en etapa de desarrollo a la fecha:
 - Rescate de especies forestales en peligro crítico de extinción. Financiada por el Fondo del Sistema-CONARE
 - Desarrollo de modelos de crioconservación para la crioconservación de semillas y material clonal de especies forestales de Costa Rica en peligro de extinción y seleccionadas en programas de mejoramiento genético. Financiada por FORINVES-CONICIT.
5. Se logró organizar y financiar con fondos externos a la Institución el curso de capacitación "Crioconservación de germoplasma vegetal", que permitió la capacitación de 16 profesionales del área de Meso América, entre ellos cinco costarricenses y con el mismo se logró la actualización en el tema de cuatro docentes de la Escuela de Biología, que participamos además, como docentes e instructores de las prácticas de laboratorio.
6. Se logró la participación en el LIII Reunión Anual del PCCMCA, que se llevó a cabo del 23 al 27 de abril de 2007 en Antigua, Guatemala, a presentar la ponencia "Propagación *in vitro* y crioconservación de especies forestales tropicales".
7. Se participó como conferencista invitada en el Seminario Herramientas Biotecnológicas para el Mejoramiento Forestal. Realizado del 5 al 6 de diciembre de 2007 en León Nicaragua y organizado por el Centro de Investigación Forestal de la UNAN, con el patrocinio del Programa de Cooperación Española, con la conferencia "Micropropagación y crioconservación de especies forestales".

8. Se logró la publicación del siguiente artículo:

Abdelnour-Esquivel, A.; Rojas, G.; Alfaro, U. 2007. Estudios preliminares para la crioconservación de especies forestales arbóreas. *Tecnología en Marcha*. 20: 98-103.

AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento especial a la Vicerrectoría de Investigación y Extensión del Instituto Tecnológico de Costa Rica y a su Dirección de proyectos por todo el apoyo financiero y logístico recibido durante el desarrollo de este proyecto.



A los integrantes del Centro de Investigación en Biotecnología y sus asistentes, especialmente al estudiante Michael Zúñiga y a la Ing. Ana Hine, egresada de la Carrera de Biotecnología.

ANEXOS

ANEXO 1: PROGRAMA
CURSO: CRIOCONSERVACIÓN DE GERMOPLASMA VEGETAL
CARTAGO, COSTA RICA, 21 AL 27 DE NOVIEMBRE 2007

HORA	MIÉRCOLES	JUEVES	VIERNES	Sábado	LUNES	MARTES
8:00 a 9:30 am	Inscripción (8:30 a 9 am)	Tema 1: El método de deseccación y congelamiento rápido de frutos, semillas y embriones (Florent)	Salida a Turrialba (7 am)	Salida a Heredia (8 am)	Tema 3: El método de encapsulamiento/ Deseccación (Ana)	Tema 4: El proceso de vitrificación (Florent)
9:30 a 10 am	Inauguración (9 a 9:30 am)	Café	Tema 2: Crioconservación de suspensiones celulares Congelamiento lento (Ma. Elena)	Visita al Instituto Nacional de Biodiversidad (INBIO)	Café	Café
10 am a 12:00 md	Conferencia inaugural (10 a 11:30 ó 12) (Florent)	Práctica 1 Crioconservación de frutos, semillas y embriones	Práctica 2 Crioconservación de suspensiones celulares (Ma. Elena)		Práctica 3: Crioconservación de meristemas por encapsulamiento/ deshidratación	Práctica 4: Preparación de soluciones vitrificadas y congelamiento de meristemas
12 a 1:30	Almuerzo	Almuerzo	Almuerzo	Almuerzo	Almuerzo	Almuerzo
1:30 a 3 pm	Conferencia Bases fisiológicas para el proceso crioconservación (Técnicas clásicas) (Florent)	Continúa Práctica 1 Deseccación y congelamiento rápido de frutos, semillas y embriones	Continúa Práctica 2 Crioconservación de suspensiones celulares	Regreso a Cartago	Continúa Práctica 3:	Conferencia Final y Discusión (Florent)
3 a 3:30	Café	Café	Café		Café	Acto de clausura (3:30 pm)
3:30 a 5 pm	Visita a los laboratorios y preparación de materiales para Práctica 1	Continuación : Preparación de soluciones y materiales de Práctica 3 Noche típica-Cena (Salida 6 pm)	Continuación de Práctica 2 Regreso a Cartago		Continua Práctica 3: Preparación de materiales Práctica 4	Café Cena de clausura (7:30 pm)



ANEXO 2

 **Curso Internacional** 

Crioconservación de Germoplasma Vegetal

Costa Rica, del 21 al 28 de noviembre, 2007

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

 Instituto Tecnológico de Costa Rica 

ANEXO 3

Folleto de Prácticas de laboratorio (Adjunto)

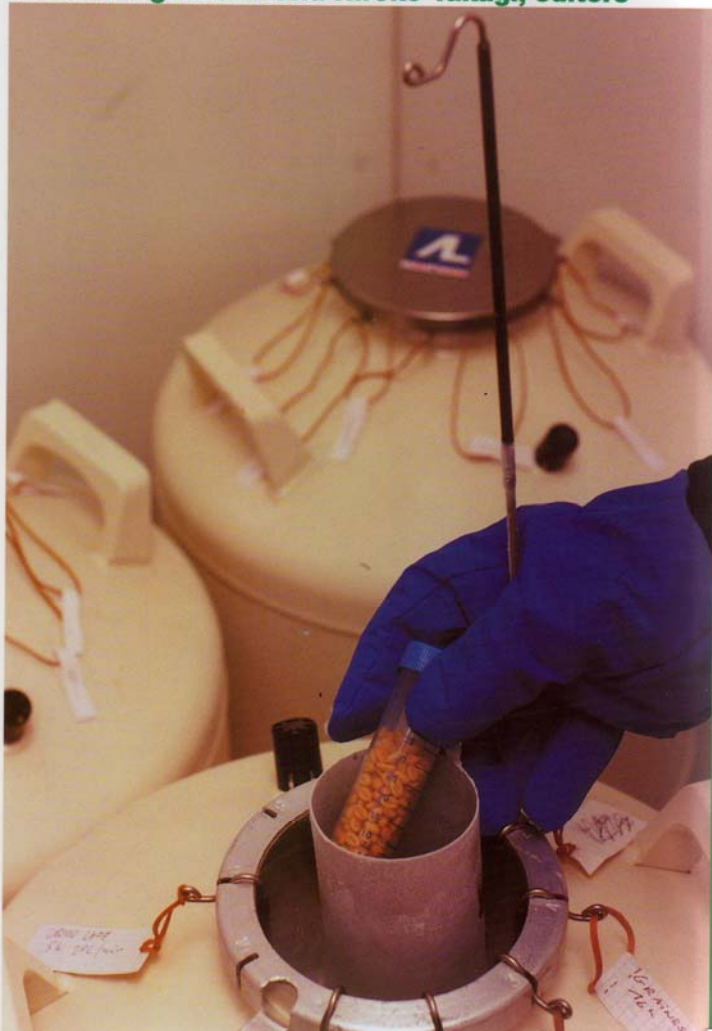
ANEXO 4



Cryopreservation of tropical plant germplasm

Current research progress and application

Florent Engelmann and Hiroko Takagi, editors



Japan International
Research Center for
Agricultural Sciences
Tsukuba, Japan



In vitro collecting techniques
for germplasm conservation

Valerie C. Pence, Jorge A. Sandoval, Victor M. Villalobos A. and Florent Engelmann, editors



CATIE
Tropical Agricultural Research
and Higher Education Center

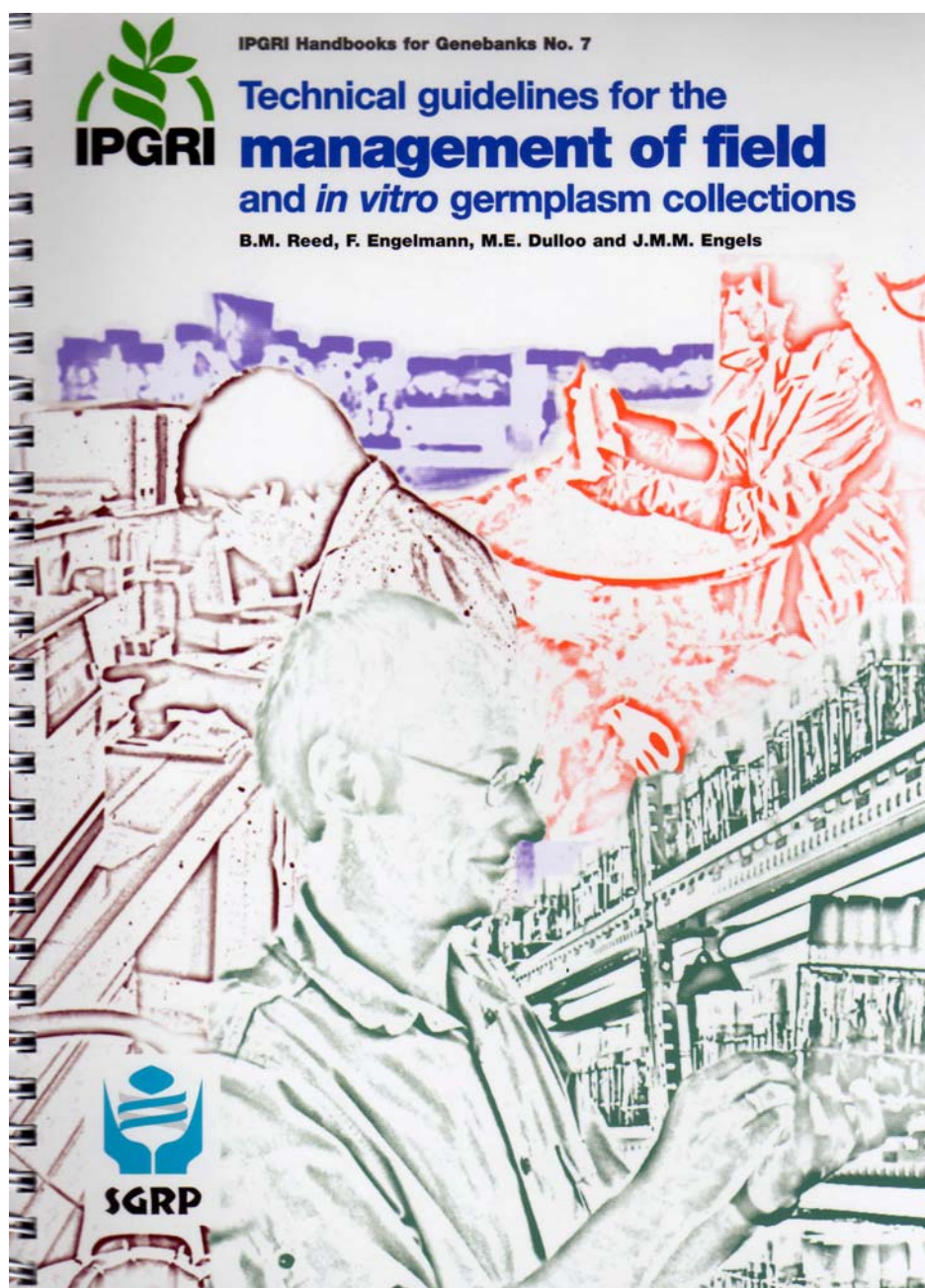




Conserving coffee genetic resources

F. Engelmann, M.E. Dulloo, C. Astorga, S. Dussert and F. Anthony (editors)

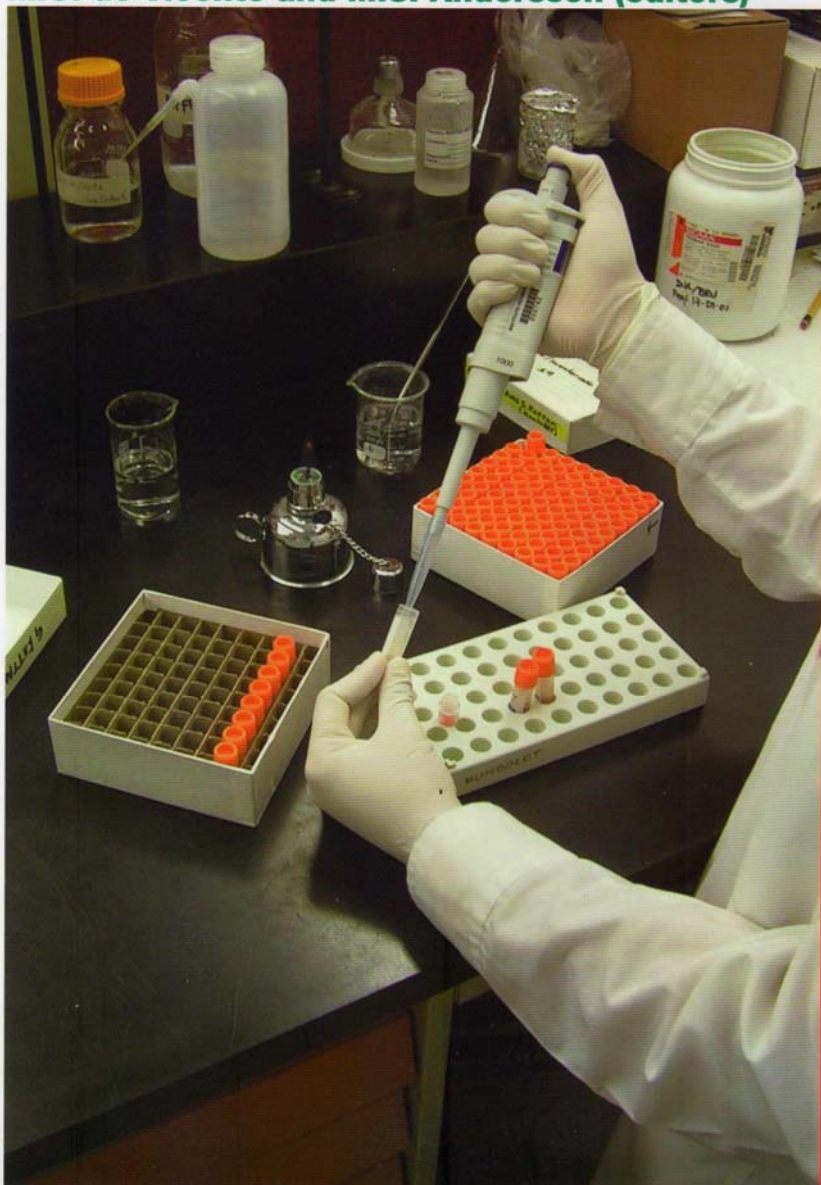






DNA banks – providing novel options for genebanks?

M.C. de Vicente and M.S. Andersson (editors)



ANEXO 5

Artículo científico publicado (Adjunto)

Abdelnour-Esquivel, A.; Rojas, G.; Alfaro, U. 2007. Estudios preliminares para la crioconservación de especies forestales arbóreas. *Tecnología en Marcha*. 20: 98-103.