

Instituto Tecnológico de Costa Rica
Centro de Investigación en Biotecnología
Informe final de proyecto de investigación y extensión

Crioconservación de especies leñosas

Dra. Ana Abdelnour Esquivel
Dra. María Elena Aguilar Vega
MSc. Silvana Alvarenga Venutolo
BSc. Jason Pérez Chaves

2015

Contenido

Datos generales.....	7
Introducción	9
Pilón (<i>Hyeronima alchorneoides</i>)	11
Uña de gato (<i>Uncaria tomentosa</i> Willd.) D.C.....	12
Tempate (<i>Jatropha curcas</i> L.).....	14
Criopreservación.....	16
Técnicas de criopreservación.....	17
Objetivos	20
Literatura citada.....	20
Capítulo 1	24
Criopreservación de ápices de pilón (<i>Hyeronima alchorneoides</i>) utilizando las técnicas de encapsulamiento-deshidratación y vitrificación	24
Resumen.....	24
Introducción	25
Materiales y métodos	26
Encapsulamiento-Deshidratación	26
Vitrificación	28
Recuperación de los ápices	29
Encapsulamiento-Vitrificación	30
Evaluación de las soluciones y procedimientos pre y post tratamiento para la criopreservación por inmersión en nitrógeno líquido.....	30
Recuperación de los ápices	30
Resultados	31
Encapsulamiento-Deshidratación	31
Determinación del porcentaje de humedad de las cápsulas de alginato	31

Sobrevivencia y regeneración de los ápices encapsulados y deshidratados (NL-)	32
Tratamientos para la crioconservación por inmersión en nitrógeno líquido	33
Recuperación de los ápices encapsulados	34
Vitrificación	35
Precultivo de los ápices	35
Evaluación de las soluciones y procedimientos pre y post tratamiento para la crioconservación por inmersión en nitrógeno líquido	36
Recuperación de los ápices	42
Evaluación de las soluciones y procedimientos pre y post tratamiento para la crioconservación por inmersión en nitrógeno líquido	43
Discusión	44
Encapsulamiento-Deshidratación	44
Vitrificación	45
Encapsulamiento-Vitrificación	46
Literatura citada	49
Capítulo 2	52
Crioconservación de uña de gato (<i>Uncaria tomentosa</i>)	52
Resumen.....	52
Introducción	53
Materiales y métodos	54
Material Vegetal.....	54
Vitrificación de ápices	55
Encapsulamiento-deshidratación de ápices.....	56
Vitrificación de suspensiones celulares.....	58
Crioconservación de semillas	59
Resultados	60

Vitrificación de ápices	61
Encapsulamiento-deshidratación de ápices.....	63
Vitrificación de suspensiones celulares.....	68
Crioconservación de semillas	71
Discusión	74
Vitrificación de ápices	74
Encapsulamiento-deshidratación de ápices.....	76
Vitrificación de suspensiones celulares.....	78
Crioconservación de semillas	81
Literatura citada	83
Capítulo 3	89
Crioconservación de semillas y embriones de <i>Jatropha curcas</i> L.	89
Resumen.....	89
Introducción	90
Materiales y Métodos	91
Desección y congelamiento rápido de semillas	91
Desección y congelamiento rápido de embriones cigóticos	92
Vitrificación de embriones cigóticos	93
Análisis estadístico	94
Resultados	94
Desección y congelamiento de semillas.....	94
Desección y congelamiento de embriones cigóticos	96
Vitrificación de embriones	98
Discusión	100
Literatura citada	103
Capítulo 4	106

Micropropagación de tempate (<i>Jatropha curcas</i>) a partir de brotes axilares y callos organogénicos	106
Resumen.....	106
Introducción	107
Material vegetal	109
Manejo de las plantas madre en invernadero	109
Inducción de brotes axilares a partir plántulas <i>in vitro</i>	109
Inducción de brotes.....	110
Desarrollo de brotes.....	110
Enraizamiento	110
Aclimatación de plantas	111
Inducción de brotes adventicios a partir de hojas	111
Tipo de explante.....	111
Desinfección de explantes.....	111
Inducción de callo organogénico.....	111
Regeneración de brotes	112
Desarrollo de brotes.....	112
Enraizamiento	112
Aclimatación de plantas	112
Análisis estadístico	113
Resultados	113
Inducción de brotes axilares a partir plántulas <i>in vitro</i>	113
Inducción de brotes.....	113
Desarrollo de brotes.....	114
Enraizamiento y aclimatación	114
Inducción de brotes adventicios a partir de hojas	116

Inducción de callo.....	116
Regeneración de brotes	120
Desarrollo de brotes.....	121
Enraizamiento y aclimatación	122
Discusión	123
Literatura citada	126
Capítulo 5	129
Divulgación de resultados	129
Agradecimientos	131

Datos generales

Código y título del proyecto: 5402-1510-8501 Crioconservación de especies leñosas

Autores y direcciones: Dra. Ana Abdelnour Esquivel, Coordinadora
MSc. Silvana Alvarenga, Investigadora
Ing. Jason Perez Chaves, Investigador
Dra. Ma. Elena Aguilar Vega, Colaboradora

Resumen

La crioconservación (almacenamiento a ultra bajas temperaturas, nitrógeno líquido, NL, -196°C) fue evaluada en tres especies leñosas de interés comercial: pilón (*Hyeronima alchorneoides*), especie de gran valor por su rápido crecimiento y calidad de su madera, con semilla recalcitrante y problemas de reproducción natural; uña de gato (*Uncaria tomentosa*) utilizada para la producción comercial de alcaloides, en la cual el cultivo *in vitro* ha sido clave para la multiplicación y producción de líneas celulares y tempate (*Jatropha curcas*) especie leñosa no domesticada con semillas recalcitrantes y con potencial como cultivo bioenergético para la producción de biodiesel. En pilón, cuando se evaluó la técnica de encapsulamiento-deshidratación, el tratamiento que permitió la mayor sobrevivencia de los ápices consistió en el precultivo en medio suplementado con 0.3M sacarosa por un día y la deshidratación por 3.5 horas (humedad cercana al 21%) (88.60% de ápices verdes siete días después del ensayo). En el caso de la vitrificación, el protocolo más exitoso consistió en el precultivo por un día en 0.3M sacarosa seguido del tratamiento por 20 min con la solución de carga y 5 min con la solución vitrificadora PVS2 o PVS4 (92.62% y 88.74% respectivamente). No se observó supervivencia cuando se evaluó la técnica de encapsulamiento-vitrificación. En uña de gato, la vitrificación de los ápices utilizando la solución vitrificadora PVS2 permitió altos porcentajes de sobrevivencia después del congelamiento, siendo el tratamiento que consistió de precultivo en sacarosa por un día, la incubación en la solución de carga por 20 min, seguida de la incubación en PVS2 por 30 min el que permitió los mayores porcentajes (82%). Cuando se evaluó la técnica de encapsulamiento-deshidratación en los ápices, los porcentajes de sobrevivencia después del congelamiento fueron estadísticamente similares para todos los tratamientos

observándose valores entre 31,8 % para los ápices encapsulados sin precultivo en sacarosa y 52,8 % para los precultivados en 0,3 M y 0,4 M sacarosa, 24 h en cada concentración; sin embargo, los tratamientos presentaron baja regeneración después de las cuatro semanas de cultivo (10%). Por otra parte, la crioconservación de suspensiones celulares fue posible al utilizar la técnica de precultivo en 0,15M sacarosa por un día + 5% DMSO por 1h antes del congelamiento en NL (57,14% de sobrevivencia como formación de callos). Al crioconservar las semillas, aquellas que presentaban un contenido de humedad de aproximadamente 8,7 % lograron los mayores porcentajes de sobrevivencia y germinación. Tanto en suspensiones celulares como en semillas se utilizaron pruebas de tinción para evaluar la sobrevivencia, sin embargo, los resultados no correlacionaron con la evaluación del crecimiento celular y la germinación por lo que no se recomiendan como únicas pruebas. La crioconservación de semillas y embriones cigóticos de *J. curcas* fue realizada utilizando 2 metodologías; 1) la desecación e inmersión directa de las semillas en NL, y la desecación de embriones cigóticos en cámara de flujo laminar durante 0, 30 y 60 minutos, seguida de la inmersión en NL; 2) la vitrificación de embriones cigóticos. La germinación de las semillas después de su congelamiento a -196°C fue del 100%, la mejor respuesta en el desarrollo se logró cuando las semillas fueron inoculadas en arena. La respuesta de los embriones cigóticos a la crioconservación también fue muy exitosa alcanzando porcentajes de sobrevivencia del 100% si mostrar diferencias significativas entre los tratamientos. Sin embargo, el mejor desarrollo (100%) y longitud de las plántulas (51.77 mm) fue alcanzado cuando los embriones fueron sometidos un tiempo de secado de 60 minutos al flujo laminar. Aunque el uso de la técnica de vitrificación de embriones cigóticos no permitió ninguna señal de sobrevivencia después de la congelación en NL, los resultados graduales de sobrevivencia observados en cada una de las fases previas a la inmersión en NL, permiten ampliar el conocimiento sobre la tolerancia de estos embriones a las diferentes sustancias crioprotectoras y sus concentraciones y su efecto durante la congelación. Adicionalmente se afinó la metodología de micropropagación de tempate a partir de brotes vegetativos y segmentos de hoja. Otro de los logros del proyecto fue la incorporación de estudiantes a la investigación y la divulgación de los resultados en congresos científicos.

Los resultados de la investigación se presentan en cinco capítulos: 1. Crioconservación de ápices de pión (*Hyeronima alchornoides*), 2. Crioconservación de uña de gato (*Uncaria tomentosa*), 3. Crioconservación de semillas y embriones de tempate (*Jatropha curcas*), 4. Micropropagación de tempate (*Jatropha curcas*) y 5. Divulgación de resultados.

Palabras clave: Crioconservación, nitrógeno líquido, *Hyeronima alchorneoides*, *Uncaria tomentosa*, *Jatropha curcas*, vitrificación, encapsulamiento, desecación.

Introducción

La erosión genética que están sufriendo los recursos genéticos genera gran preocupación, ya que está conduciendo a la pérdida de materiales que podrían ser utilizados comercialmente y en la conservación de ecosistemas. Esta pérdida incluye principalmente las áreas boscosas, y las razones que se dan son el cambio en el uso de la tierra hacia agricultura y ganadería, urbanizaciones para responder al aumento de la población y la tala indiscriminada de individuos valiosos en las escasas áreas de bosque. Como resultado, tanto los árboles maderables, como otras especies leñosas asociadas a ellos, han ido declinado en vigor y capacidad reproductiva, lo que repercute directamente en el aprovechamiento de estas especies. El presente proyecto continuó con los estudios realizados por el CIB en el área de crioconservación de germoplasma de especies leñosas, de manera que se pudo optimizar el protocolo de crioconservación de material vegetativo de pilón (*Hyeronima alchorneoides*), evaluando las técnicas que fueron previamente evaluadas con éxito en otras especies leñosas como cedro (*Cedrela odorata*), teca (*Tectona grandis*), que ya han sido previamente estudiadas y especies que se están incorporando al estudio como uña de gato (*Uncaria tomentosa*) y *Jatropha curcas*, de gran interés nacional y definida como una de las especies de interés del PITTA nacional sobre Bioenergía conformado en 2010 y el uso de la crioconservación de semillas será una manera ideal de catalogar las diferentes procedencias para proteger la diversidad de la especie; además, el establecimiento del método de micropropagación de esta especie permitirá hacer selección de líneas y su propagación vegetativa masiva. La propuesta permitió desarrollar las metodologías de crioconservación de estas tres especies leñosas. La disponibilidad de estos protocolos para pilón, uña de gato y tempate permitirá tomar la responsabilidad a nivel nacional de la conservación de germoplasma de estas y otras especies recalcitrantes y materiales producidos en el laboratorio, que a la fecha no pueden almacenarse para ser utilizadas a mediano y largo plazo.

Antecedentes

Como resultado de la erosión genética que están sufriendo los recursos, tanto los árboles maderables, como otras especies leñosas asociadas a ellos, han ido declinado en vigor y capacidad reproductiva, lo que repercute directamente en el aprovechamiento de estas especies (Corea 2009). Costa Rica no escapa de esta realidad, por consiguiente, el agotamiento de los bosques ha generado la necesidad de establecer plantaciones forestales, con el fin de satisfacer la demanda de madera y promover la protección del medio ambiente (Murillo *et al.* 2013). Sin embargo, la gran variabilidad en la calidad de las plantaciones forestales ha obligado a incorporar el mejoramiento genético como una herramienta para lograr los objetivos de producción. Este es el caso *Hyeronima alchorneoides* (pilón) en nuestro país, especie de gran valor por su rápido crecimiento y la calidad de su madera. Desde el año 2001 la Cooperativa de Mejoramiento y Conservación Genética Forestal de Costa Rica (GENFORES), trabaja en un programa de mejoramiento de pilón, que se fundamenta en la clonación a partir de estacas (Murillo y Badilla 2003). Además, el CIB, en colaboración con la UNA, ha venido trabajando desde hace varios años en el desarrollo y optimización del protocolo de micropropagación a partir de brotes vegetativos (Abdelnour, Aguilar y Valverde 2011). Más recientemente, esta especie se incorporó al proyecto de desarrollo de modelos de crioconservación de especies forestales (MICIT/CONICIT-ITCR-CATIE) mismo que finalizó en el 2010, con resultados para la crioconservación de semillas y resultados preliminares para ápices. Por otra parte, la uña de gato (*Uncaria tomentosa*), es una especie leñosa, no maderable, que produce metabolitos que muestran efecto medicinal, se recomiendan como inmuno estimulante, documentado en enfermos de cáncer y sida y a la factibilidad de uso combinado con antivirales (Verpoorte y Hoopen 2006). Estos productos se comercializan actualmente en varias presentaciones. En el CIB se han trabajado los métodos de micropropagación y suspensiones celulares y el escalamiento de las mismas, se seleccionaron varias líneas celulares de uña de gato como las mayores productoras de estos metabolitos y la necesidad de almacenar estas líneas y el material genético por métodos que aseguren su estabilidad genética y viabilidad se ha hecho evidente, por lo que es una de las especies prioritarias en esta investigación que se propone. La *Jatropha curcas* L. es una potente planta medicinal de gran valor económico, es resistente a la sequía y ha recibido la atención mundial debido a que del aceite de las semillas se pueden obtener biocombustibles (Rajore y Batra, 2005).

Pilón (*Hyeronima alchorneoides*)

El pilón (*Hyeronima alchorneoides*) pertenece a la familia Euphorbiaceae, alcanza dimensiones de 30 m a 45 m de altura y 1,2 m a 1,7 m de diámetro (dap). Es abundante en el bosque tropical húmedo y muy húmedo (Solís y Moya 2004, Montero *et al.* 2007). En Costa Rica se le puede encontrar en las dos vertientes, específicamente en los bosques lluviosos de las zonas bajas del Norte y del Atlántico, a altitudes de 0 a 800 msnm, con precipitaciones de 2000 a 5000 mm.año⁻¹ y temperaturas de 24 a 32°C. Experiencias de reforestación indican que se adapta bien a las zonas del Pacífico Central y Sur (Solís y Moya 2004, Montero *et al.* 2007). La madera madura de pilón es de gran valor y demanda debido a su versatilidad, densidad y durabilidad y se usa para elaborar productos de ebanistería, construcciones, puentes, pisos, carrocerías, soportes, postes, barriles para sólidos, durmientes de ferrocarril y barcos. La madera también resulta ser muy resistente a termitas por lo que se recomienda para postes de cercas, estacas y construcción marina. El tanino es utilizado en la preparación de tintes y en el curtido de cueros. En Guyana se usa la infusión de la corteza contra la tos. El aceite extraído de las semillas parece tener propiedades contra lombrices. Es también una fuente de alimento para pájaros y animales del bosque que consumen sus frutos (OFI y CATIE 2003, Solís y Moya 2004, Montero *et al.* 2007). En cuanto a sus características para la conservación del germoplasma es importante señalar que el árbol es dioico y el fruto una drupa elipsoide indehisciente que va cambiando de color verde a rojo y morado oscuro en la madurez; generalmente con una sola semilla viable, encerrada en una pulpa carnosa de sabor dulce. En Costa Rica, la floración ocurre en dos épocas, una de enero a febrero en el noreste y otra de julio a octubre en el suroeste del país. La producción de fruto, ocurre en un periodo extenso de enero a abril y de agosto a octubre (OFI y CATIE 2003, Solís y Moya 2004, Montero *et al.* 2007). Las semillas de pilón son recalcitrantes, es decir, pierden su viabilidad pocos días después de la cosecha. Experiencias previas han demostrado que una semana después de su cosecha, este material pierde hasta 50% de viabilidad cuando se almacena a 5°C y aún más, en condiciones ambientales (Valverde 2000, Abdelnour *et al.* 2007). Valverde (2000) estableció un protocolo para la micropropagación del pilón, protocolo que fue optimizado (Abdelnour, Aguilar y Valverde 2011) y ha permitido al laboratorio de cultivo de tejidos del Centro de Investigación en Biotecnología la obtención de plántulas *in vitro*. Más tarde, en 2006, el CIB continuó con la investigación en especies forestales que incluyó el pilón, tratando de desarrollar un protocolo para la crioconservación de semillas. Las grandes

limitaciones en la investigación con esta especie fue la recalcitrancia de la semilla (pierde su viabilidad en pocos días), además, los frutos son atacados por una avispa que destruye los embriones, daño que se observó en varios lotes de semilla en años consecutivos (Abdelnour *et al.*, 2007). La investigación en crioconservación de especies forestales (MICIT-CONICIT FV-006-07 y VIE) continuó con varios maderables y se incluyó de nuevo al pilón, presentándose los mismos problemas y limitaciones con el material sexual. Por lo anterior se decidió trabajar con explantes vegetativos (ápices) y se evaluaron preliminarmente las técnicas de vitrificación, mostrando los resultados el potencial que tienen estas técnicas para la conservación a largo plazo de la especie, por lo que su inclusión en la presente propuesta, para completar su estudio y optimizar los métodos de crioconservación de material vegetativo se consideró prioritario.

Uña de gato (*Uncaria tomentosa* Willd.) D.C.

U. tomentosa (Willd.) D.C, conocida como uña de gato, rangayo o bejuco de agua, es una liana tropical propia del bosque tropical lluvioso; se distribuye de forma natural desde Perú hasta Belice. Perteneció a la familia Rubiaceae, taxa caracterizada por la producción de diferentes metabolitos secundarios empleados como fuente del café, la quinina, tintes, colorantes y otros. En la medicina tradicional del Perú, los indígenas Asháninka y otras etnias emplean la corteza de la raíz de la uña de gato principalmente por sus efectos como anti inflamatorio (Keplinger *et al.*, 1999) y contraceptivo; se usa asimismo para el tratamiento de la artritis, gastritis y cáncer (Aquino *et al.*, 1991; Verpoorte y Hoopen 2006). El interés científico en esta planta se incrementó con la comprobación de propiedades estimulantes del sistema inmunológico atribuida a alcaloides oxindólicos (Blumenthal, 1995).

En efecto, existe demanda comercial de los extractos de *U. tomentosa* originada por los descubrimientos de la actividad biológica de la planta, desde hace más de tres décadas, incrementada por las manifestaciones acerca de su poder curativo basado en su acción inmuno estimulante, documentado en enfermos de cáncer y sida y a la factibilidad de uso combinado con antivirales y otros productos inmuno estimulantes (Alvarenga 2010).

El Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR), en su Centro de Investigación en Biotecnología, inició desde 1999 los estudios de la especie *Uncaria tomentosa*. Con el desarrollo de los siguientes proyectos: “Estudio de la Biología, la reproducción vegetativa y

cultivo *in vitro* de *Uncaria tomentosa* (uña de gato) Fundación Neotrópica-ITCR” (1999-2001); “Plan para la promoción del conocimiento y el aprovechamiento de la *Uncaria tomentosa* (uña de gato) en dos comunidades de la región atlántica de Costa Rica (Plan Piloto). ITCR-UNA”, financiado por Fundecooperación, que finalizó en el 2006; “Diversificación de sistemas agroforestales, mediante el fomento en asociaciones de agricultoras(es), de la producción de plantas con componentes bioactivos de la región Huetar Norte y Atlántica de Costa Rica” con el aporte de las universidades estatales de Costa Rica (FEES, ITCR-UCR-UNA-UNED)” (2007-2009); y “Producción de metabolitos secundarios de interés farmacológico mediante la agroinfección de raíces de *Uncaria tomentosa* (uña de gato) con *Agrobacterium rhizogenes*” (ITCR- PIPRA, Public Intellectual Property Resource for Agriculture) con la Universidad de California-Davis.

Durante los últimos años, investigadores del Centro de Investigación en Biotecnología (CIB), han desarrollado los protocolos de micropropagación, inducción de callo y establecimiento de células en suspensión de la uña de gato (Alvarenga *et al.*; 2002). Como resultado de estos proyectos se dispone de los protocolos mencionados, se conoce sobre la fenología de la especie en la región Atlántica de Costa Rica, además se cuenta con los protocolos de cromatografía de alta resolución (HPLC) para la determinación y cuantificación de cuatro alcaloides, así como el establecimiento y validación de los de cuatro sistemas de isoenzimas que han aportado información de la estructura genética de esta especie en el país y de la diversidad genética que se presenta en la región de Guápiles en la que se realizó el estudio. Por otra parte, se ha generado mucha experiencia en la domesticación de la especie y adicionalmente en la industrialización y comercialización por parte asociaciones de mujeres y campesinos de la región Atlántica (Alvarenga *et al.*; 2005). Actualmente se desarrolla en las instalaciones del CIB el proyecto “Escalamiento del cultivo de células de *Uncaria tomentosa* (Willd.) D.C. (uña de gato) en Biorreactor” (2008-2011), planteado en el marco del CENIBiot como parte del proyecto de Cooperación Técnica: “Aplicación de la biotecnología para el aumento de la competitividad del sector agroindustrial de Costa Rica”, presentado al Programa Mexicano de Cooperación para el Desarrollo, aprobado por la XIII Comisión Mixta de Cooperación Científica y Técnica México-Costa Rica. Cabe señalar que para este proyecto se cuenta con la asesoría del CEPROBI (Centro de Desarrollo de Productos Bióticos) del Instituto Politécnico Nacional de México. La inclusión de esta especie en el proyecto dará una alternativa de conservación a largo plazo no solo de semillas, sino también de material vegetativo y líneas celulares, tan

susceptibles a degradarse o mutar con el tiempo, cuando se mantiene creciendo activamente *in vitro*. Por lo cual, el método de crioconservación aseguraría la estabilidad genética y viabilidad de estos materiales a largo plazo.

Tempate (*Jatropha curcas* L.)

La especie *Jatropha curcas* L. (Gr. *latros*: medicinal; *trophe*: alimento) pertenece a la familia Euphorbiaceae. Es originaria de Centroamérica y México. Los portugueses la distribuyeron por todo el mundo a través de sus barcos empezando por el Caribe y Cabo Verde y desde allí a toda África y parte de Asia, por lo que actualmente se distribuye por todas las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Heller 1996). Se puede encontrar a una altitud de 0 a 1500 msnm, con precipitaciones anuales de 300-1000 mm y temperaturas promedio de 18 a 34°C. Se encuentra generalmente en áreas abiertas, es resistente a la sequía y se adapta a una gran variedad de suelos aunque los más óptimos son los suelos bien drenados con buena aireación y bajo contenido en nutrientes. Debido a su amplia distribución geográfica la *J. curcas* es llamada de diferente manera: piñón botija en Cuba, piñoncillo en México; piñol en Perú; tempate en Costa Rica; “physic nut” en países angloparlantes; coquillo en España; cotoncillo en Honduras; piñón en Guatemala y Nicaragua, y también tempate en este último país. Otros nombres son: coquito, capate, higo del duende, barbasco, higo de infierno, purga de fraile, tua tua, pinhao manso y otros (Toral *et al.* 2008). Es una potente planta medicinal de gran valor económico, es resistente a la sequía y ha recibido la atención mundial debido a que del aceite de las semillas se pueden obtener biocombustibles (Rajore y Batra, 2007). Las semillas de *J. curcas* L. contienen de un 40 a un 50% de aceite semi-seco conocido como “aceite curcas”, el cual es un efectivo sustituto de los combustibles fósiles, ya que a partir de éste se puede producir aceite diésel para motor. La importancia de esta especie para la producción de biodiésel radica en que de sus semillas se extrae de 1900 a 2500 litros de aceite por hectárea por año (Kumar y Kumari 2008). Este valor supera al de otros cultivos como la colza (1100 l/ha año), el girasol (960 l/ha año) o la soja (420 l/ha año) los cuales son cultivos alimenticios, pero también utilizados para la producción de biodiésel (Jongschaap *et al.* 2007). Otra ventaja de la *Jatropha* con respecto a los otros cultivos energéticos es que pertenece a los biocombustibles de segunda generación, es decir, que las materias primas utilizadas para la obtención de biodiésel no son utilizadas para la alimentación (Gressel, 2008). El hecho de que esta especie crezca bien en suelos marginales y degradados hace que su implantación no desplace a otros cultivos agrícolas,

por lo que se genera una menor competencia respecto al uso de la tierra (Openshaw 2000). Además el biodiésel que se obtiene cumple con los estándares internacionales y las normas de calidad establecidas para este tipo de combustible en la Unión Europea y Estados Unidos (Alok *et al.*, 2007). Todos estos motivos han hecho que la especie *Jatropha curcas* pasara de ser un simple arbusto cuyas finalidades más comunes eran la ornamental, medicina tradicional y cercas naturales a llamarse el oro el verde y posicionarse como principal cultivo para la obtención de biodiésel en países tropicales y subtropicales. Así en 2009 y según la World Wide Fund for Nature en su informe sobre el “Mercado Global de *Jatropha Curcas*” se cultivaron en el mundo 900.000 hectáreas de las cuales el 85% pertenecían a Asia un 12% al continente Africano y el 3% a Latino América. El país más avanzado del mundo en experiencia, investigación y a escala de proyectos es la India, donde su gobierno está implementando la Misión Nacional en Biodiésel centrado en este cultivo (Alok *et al.*, 2007). A partir del año 2009 el Banco de Semillas Forestales del CATIE inició un proceso de colecta e introducción de accesiones de América Central, Sur América, India y África para ampliar el banco de germoplasma existente, principalmente con materiales de genotipos con alta toxicidad y en el año 2010 se introdujo una accesión procedente de México identificada por su baja toxicidad. A partir de ese mismo año el Laboratorio de Biotecnología inició trabajos en micropropagación que han dado como resultado la regeneración de brotes de *J.curcas* por la vía de organogénesis *de novo* a partir de fragmentos de hoja tanto de la accesión toxica como de la no tóxica. Producto de estos trabajos se desarrollaron dos tesis de grado (Tejedor 2010 y Jiménez 2010). La metodología de micropropagación debió ser puesta a punto para iniciar trabajos en crioconservación de ápices. La inclusión de esta especie en el proyecto permitirá ampliar el conocimiento general sobre esta especie, pero además hará posible iniciar la investigación en la conservación a largo plazo de germoplasma de esta especie (crioconservación), por lo que se aumentará el conocimiento en materia de morfología y fisiología de las yemas y semillas de *J.curcas* que serán utilizados como explantes para desarrollar los protocolos de crioconservación. Debido a que las semillas de tempate son recalcitrantes es de suma importancia desarrollar estrategias de conservación de semillas y de propágulos vegetativos que permitan el almacenamiento y la conservación de accesiones caracterizadas por su alto rendimiento en la producción de aceite o bien por sus bajos niveles de toxicidad.

Crioconservación

El método de crioconservación consiste en llevar material biológico desde su temperatura fisiológicamente normal, hasta ultra bajas temperaturas (generalmente en nitrógeno líquido, -196°C). A esta temperatura la división celular y los procesos metabólicos cesan, por lo que el material puede permanecer almacenado por tiempo indefinido sin que sufra modificaciones o alteraciones. Sin embargo, el éxito del proceso dependerá del acondicionamiento que se dé al material para que resista tanto el congelamiento como el descongelamiento. El acondicionamiento consiste en provocar una deshidratación protectora en las células y tejidos de manera que se evite o disminuya la formación de cristales de hielo que provocan grandes daños en las membranas de la mayoría de células (Gonzalez-Arno y Engelmann 2012). Es reconocida como la única opción disponible para el almacenamiento a largo plazo, en condiciones de alta estabilidad genética, del germoplasma de especies propagadas vegetativamente y especies con semillas clasificadas como recalcitrantes e intermedias en cuanto al almacenamiento (Gonzalez Arno y Engelmann 2012). También esta forma de conservación se utiliza como duplicado o respaldo de colecciones conservadas mediante otras técnicas (Engelmann, 2000). Al ser comparado con el método de conservación *in vitro* a mediano plazo o con bancos de semillas convencionales, el método de crioconservación presenta ventajas considerables. Como el material se almacena en tanques, el espacio para mantener la colección es considerablemente menor ($0,5\text{ m}^2$ para un tanque de almacenamiento con capacidad de 100 litros de nitrógeno líquido y miles de muestras), el costo por labor de mantenimiento es mínimo, donde la labor rutinaria es el llenado del tanque cada semana o semana de por medio, para que el nitrógeno líquido permanezca a un nivel mínimo de seguridad, lo que no toma más de 15 minutos. Además, una vez almacenado los materiales, no se manipulan, se encuentran protegidos de agentes contaminantes y en caso de requerirse una muestra, ésta puede ser descongelada y las plantas recuperadas y multiplicadas en corto tiempo. El factor decisivo en la selección del material a conservar es la disponibilidad de la técnica de cultivo *in vitro* para la especie de interés, con el fin de regenerar fácilmente el explante conservado (Abdelnour *et al.* 2007).

Técnicas de crioconservación

Se reconocen dos grupos de técnicas en la crioconservación: las técnicas clásicas basadas en la deshidratación química parcial con osmoprotectores y el congelamiento programado y las técnicas nuevas basadas en la vitrificación, entendida como el cambio del estado líquido a un estado intermedio vítreo evitando la formación de cristales de hielo, potencial causa de daño mecánico a las membranas durante la congelación (Engelmann 2004). Según Engelmann (2007), dentro de las técnicas nuevas se reconocen siete procedimientos que incluyen: encapsulación-deshidratación, vitrificación *per se*, encapsulación-vitrificación, desecación, pre-crecimiento, pre-crecimiento-desecación y la técnica de la microgota; incluyendo combinaciones de ellas. Estos métodos presentan ventajas en relación a las técnicas de crioconservación clásicas, las que involucran un enfriamiento lento, de no necesitar un equipo sofisticado para inducir el descenso térmico lento. Se describen las de mayor aplicación práctica.

Encapsulamiento-Deshidratación

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; Engelmann, 2004; Abdelnour *et al.*, 2007; Sakai y Engelmann 2007). Ha sido aplicada exitosamente para crioconservar numerosas especies de plantas. En esta técnica, la resistencia a la deshidratación y el congelamiento es inducido por el precultivo de los explantes encapsulados en medio líquido conteniendo niveles altos de sacarosa. El periodo de deshidratación y por tanto el porcentaje de humedad de las cápsulas tiene un efecto significativo en la respuesta de los ápices congelados y no congelados (Shibli *et al.* 2006).

Vitrificación

Cuando una solución está altamente concentrada y por ende viscosa, ésta no permitirá la iniciación de cristales de hielo ni su crecimiento. Si se disminuye rápidamente la temperatura a valores muy bajos, la solución puede llegar a convertirse en un sólido amorfo (vítreo) sin la formación de cristales de hielo. Este proceso se denomina vitrificación y tiene lugar a la temperatura de transición vítrea (T_g : -110°C) (García-Águila *et al*, 2007). El principio del método por vitrificación es deshidratar un ápice por la exposición a una solución de vitrificación con alto potencial osmótico (Wang & Deng, 2004). La vitrificación es realizada previa al congelamiento por medio de una sustancia crioprotectante (Sánchez-Chiang y Jiménez, 2010). Usualmente se utilizan soluciones vitrificadoras a base de glicerol, llamadas PVS2, PVS3 y PVS4 (*Plant Vitrification Solution*). 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 (m/v) preparada en un medio Murashige y Skoog (1962) (MS). Además, se tiene la solución PVS4, la cual consta de un MS + 0.6M sacarosa + 35% glicerol + 20% etilenglicol. 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 y Engelmann, 2007). Como ya se señaló, diferentes soluciones vitrificadoras se han utilizado, pero la conocida como *Plant Vitrification Solution #2* (PVS2) ha sido la más empleada (Sakai, 2000).

Encapsulamiento-Vitrificación

La vitrificación implica el congelamiento de explantes dentro de un periodo corto de tiempo. Sin embargo, es difícil tratar simultáneamente un gran número de muestras con esta técnica, ya que la duración de los pasos sucesivos del protocolo de vitrificación es muy corta; estos pasos requieren una duración muy precisa y el tamaño pequeño de los explantes los hace difíciles de manipular. Por el contrario, la técnica de encapsulamiento-deshidratación requiere de un largo periodo de implementación; sin embargo, los explantes encapsulados son muy fáciles de manipular, gracias al relativamente gran tamaño de las

cápsulas de alginato. Entonces, una nueva técnica denominada encapsulamiento-vitrificación, la cual combina las ventajas de la vitrificación (rápida implementación) y del encapsulamiento-deshidratación (fácil manipulación de explantes encapsulados) ha sido establecida. Con wasabi, el porcentaje de regeneración de brotes crioconservados usando el encapsulamiento-vitrificación fue 30% más alto que la lograda con la crioconservación de ápices por la técnica de encapsulamiento-deshidratación. Además, el proceso de regeneración de los ápices al congelarlos usando esta nueva técnica ocurrió mucho más rápido (Sakai & Engelmann, 2007).

Desde hace más de cincuenta años, cuando se demostró por primera vez la posibilidad de crioconservar eficientemente esperma animal, la técnica se ha experimentado en campos diversos para almacenar células vivas por largos periodos e indefinidamente. La crioconservación se emplea para el almacenamiento de esperma y embriones de animales y humanos que se utilizan para inseminaciones artificiales y fertilizaciones *in vitro*. También se utiliza para el almacenamiento de eritrocitos y ha sido aceptado como el método óptimo para la conservación de la diversidad microbiana. En plantas, la posibilidad de crioconservar desde células hasta órganos ha sido demostrada ampliamente, al igual que su utilidad para la conservación de germoplasma y de material generado en condiciones de laboratorio. De ahí la importancia de evaluar esta modalidad de conservación de las especies propuestas.

Entre las metodologías de crioconservación de mayor aplicación para crioconservar el germoplasma de especies leñosas tales como: *Coffea arabica* (Abdelnour *et al.* 1992), *Citrus deliciosa* (Aguilar *et al.*, 1993; Engelmann *et al.*, 1994), *Citrus madurensis* (Cho *et al.* 2002a, Cho *et al.* 2002b) y *Eucalyptus grandis* (Tsai y Hubscher 2004) entre otras, se encuentran la deshidratación, la congelación rápida, el encapsulamiento-deshidratación y la vitrificación.

Objetivos

Objetivo general:

Establecer los protocolos para la crioconservación de pilón (*Hieronima alchorneoides*), uña de gato (*Uncaria tomentosa*) y tempate (*Jatropha curcas*), tres especies leñosas de importancia económica para el país.

Objetivos específicos:

1. Establecer las condiciones óptimas que permitan la recuperación después de la crioconservación de semillas y material vegetativo de uña de gato (*Uncaria tomentosa*) y tempate (*Jatropha curcas*).
2. Establecer las condiciones óptimas para la recuperación después de la crioconservación de material vegetativo de Pilón (*Hieronima alchorneoides*).
3. Divulgar los resultados obtenidos y sus aplicaciones prácticas mediante la asistencia a congresos nacionales (Congresos agronómico y/o forestal) e internacionales (Red Latinoamericana de Biotecnología, REDBIO) de lograr el apoyo económico requerido y preparación de artículos científicos para revistas especializadas en el tema.

Literatura citada

- Abdelnour, A.; Aguilar, M.; Valverde, L. 2011. Micropropagación de pilón (*Hieronima alchorneoides*). *Agronomía Costarricense*. 32(2).
- Abdelnour-Esquivel, A.; Rojas, G.; Alfaro, U. 2007. Estudios preliminares para la crioconservación de especies forestales arbóreas. *Tecnología en marcha*. 20(1): 98-103.
- Abdelnour E, A; Villalobos, V; Engelmann, F. 1992. Cryopreservation of zygotic embryos of *Coffea spp.* *Cryoletters* 13: 297-302
- Aguilar ME, Engelmann F, Michaux-Ferriere, N. 1993. Cryopreservation of cells suspensions of *Citrus deliciosa* Tan and histological study. *Cryo-Letters*.14: 217 - 228.
- Alok Kumar, T; Akhilesh, K. y Hifjur, R. 2007 Biodiesel production from *Jatropha* oil (*Jatropha curcas*) with high free fatty acids: An optimized process. *Biomass and Bioenergy*, 31:569–575
- Alvarenga, S. 2010. Establecimiento in vitro y cultivo de células de uña de gato (*Uncaria tomentosa*) (Willd.) *Tecnología en Marcha*. 23(5): 24-33.

- Blumenthal, M. 1995. Una de gato (Cat's claw). Rainforest herb gets scientific and industry attention. Herbal update, Una de gato (Cat's claw). Whole foods magazine October 1995. P. 62, 64, 66, 68, 78. Disponible en <http://www1.shore.net/~jm/claw2.html>.
- Cho, EG; Hor, YL; Kim, HH; Rao, VR; Engelmann, F. 2002 a. Cryopreservation of *Citrus madurensis* embrionic axes by encapsulation-dehydration. Cryoletters 23: 325-332
- Cho, EG; Hor, YL; Kim, HH; Rao, VR; Engelmann, F. 2002 b. Cryopreservation of *Citrus madurensis* embrionic axes by vitrification: importance of loading and treatment with vitrification solution. Cryoletters 23: 317-324
- Corea, E. 2009. Mejoramiento genético forestal (entrevista). Heredia, CR, Universidad Nacional.
- Engelmann, F., Aguilar, M.E., Dambier, D., Cabasson, C., Michaux - Ferriere, N., Ollitrault, P. 1994. Advantages of cryopreservation of cell suspensions and embryogenic calli for Citrus breeding programmes. Fruits: 49 (1):23 - 30.
- Engelmann, F. 2000. Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources. Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm: current research progress and application. Eds. F Engelmann; H Takigi. Tsukuba, JP, JIRCAS / Rome, IT, IPGRI. p. 8
- Engelmann, F. 2004. Plant cryopreservation: progress and prospects. *In Vitro Cellular and Development Biology-Plant*. 40(5):427-433.
- Engelmann, F. 2007. Curso Internacional: Crioconservación de germoplasma vegetal. Cartago, CR, ITCR. 1 disco compacto.
- García-Águila, L; de Fera, M; Acosta, K. 2007. Aspectos básicos de la conservación *in vitro* de germoplasma vegetal. Cuba. Biotecnología Vegetal. 7(2). p. 67-79.
- Gonzalez Arnao, MT, Engelmann, F. 2012. Introducción a la conservación *ex situ* de los recursos genéticos vegetales. Eds. M.T. Gonzalez Arnao y F. Engelmann, In: Crioconservación de plantas en América Latina y el Caribe. Editorial Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, San José, Costa Rica. pp: 39-48.
- Gressel, J. 2008. Transgenics are imperative for biofuels crops. *Science Direct*, 174:246-263.
- Heller, J.1996. Physic nut (*Jatropha curcas* L.). Promoting the conservation and use of underutilization and neglected crops. Plant Genetics Resources Institute (IPGRI). Rome, Italy. Disponible en: <http://www.ipgri.cgiar.org/publications/pdf/161.pdf>. Consulta: Agosto 2011.

- Jimenez, M. 2010. Potencial del cultivo en inmersión temporal usando recipientes RITA® para la multiplicación in vitro de especies leñosas tropicales. Tesis de grado, Escuela de Biología, Ingeniería en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago. 96 p.
- Jongschaap, R; Corre, W; Bridraban, P. y Bradenburg, W. 2007. Claims and Facts of *Jatropha curcas* L. Global evaluation of *Jatropha curcas*. Breeding and Propagation Programe. Plant research International.B.V. Wageningen, 158 pp 66.
- Keplinger, K., Laus, G., Wuem, M., Dierich, M.P. & Teppner, H. 1999. *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. Ethnomedicinal use and new pharmacological, toxicological and botanical results. *Journal of Ethnopharmacology* 64: 23-34
- Kumar, Kumari. (2008) Molecular characterization of *Jatropha* genetic resources through inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Mol. Biol. Rep.* DOI 0.1007/s11033-008-9404-3
- Montero, M; De los Santos, H; Kanninen, M. 2007. *Hyeronima alchorneoides*: ecología y silvicultura en Costa Rica. Turrialba, CR, CATIE. 50 p.
- Murashige, T; Skoog, F. 1962. A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497
- Murillo, O; Badilla, Y. 2003. Potencial de mejoramiento genético forestal de la teca *Tectona grandis*: En Seminario sobre teca (*Tectona grandis*) (en línea). San José, CR. INISEFOR. Consultado 8 ago. 2006. Disponible en <http://www.una.ac.cr/inis/docs/Teca/temas/Olmanmejoram.pdf>
- Murillo-Gamboa, O.; Badilla-Gamboa, Y.; Villalobos-Araya, M.; Rojas-Parajales, F. 2013. Optimización de la tecnología de propagación vegetativa in vivo y plantación de teca y pilón. Instituto Tecnológico de Costa Rica.
- Obregón, L. 1997. "Uña de Gato" "Cat's claw" Género *Uncaria*. Estudios botánicos, químicos y farmacológicos de *Uncaria tomentosa* y *Uncaria guianensis*. Tercera Edición. Instituto de Fitoterapia Americano. Lima, Perú. P. 169
- Openshaw, K. 2000. A review of *Jatropha curcas*: an oil plant of unfulfilled promise. *Biomass Bioenergy*, 19:1–15.
- Rajore, S. y Batra, A. 2005. Efficient plant regeneration via shoot tip explant in *Jatropha curcas* L. *J Plant Biochemistry Biotechnology*, 14:73–75.
- Sakai, A. 2000. Development of cryopreservation techniques. En: Engelmann F, Takagi H (eds.). *Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application*, JIRCAS, Tsukuba, Japón/IPGRI, Roma. p. 1-7.

- Sakai, A; Engelmann, F. 2007. Vitrification, Encapsulation-Vitrification and Droplet-Vitrification: A Review. *Cryo-letters*. 28(3). p. 151-172.
- Sánchez-Chiang, N.; Jiménez, V.M. 2010. Técnicas de conservación *in vitro* para el establecimiento de bancos de germoplasma en cultivos tropicales. *Revista Agronomía Mesoamericana*. Universidad de Costa Rica. San José, C.R. 21(1): p. 196-200.
- Shibli, RA; Shatnawi, MA; Subai, WS; Ajlouni, MM. 2006. In vitro conservation and cryopreservation of plant genetic resources: A review. *World Journal of agricultural sciences* 2 (4): 372-382
- Solis, M; Moya, R. 2004. *Hyeronima alchorneoides* en Costa Rica. Disponible en línea: http://www.fonafifo.go.cr/text_files/proyectos/hyeronima.pdf.
- Tejedor, B. 2010. Micropropagación de *Jatropha curcas* L. Trabajo Final de carrera. Facultad de Ingeniería Agronómica, Universidad Politécnica de Valencia. España, p. 74.
- Toral, O; Iglesias, J.M; Montes, S, Sotolongo, J.A, García, S, Torsti, M. 2008. *Jatropha curcas* L., una especie arbórea con potencial energético en cuba. *Pastos y Forrajes* 31: (3):191-207.
- Tsai, CJ; Hubscher, SL. 2004. Cryopreservation in *Populus* functional genomics. *New Phytologist* 164: 73-81
- Valverde, L. 2000. Propagación *in vitro* del pilón (*Hyeronima alchorneoides*). *UNICIENCIA* 17:35-38
- Verpoorte, R.; Hoopen, H. J. G. 2006. Plant Cell biotechnology. IN: Basic Biotechnology. Third Edition. Edited by C. Ratledge and B. Kristiansen. United Kingdom Cambridge University Press pp: 549-578.
- Wang, Z; Deng, X. 2004. Cryopreservation of shoot tips of citrus using vitrification: effect of reduced form of glutathione. *Cryo-Letters*. 25. pp. 51-58.

Capítulo 1

Crioconservación de ápices de pilón (*Hyeronima alchorneoides*) utilizando las técnicas de encapsulamiento-deshidratación y vitrificación

Resumen

Pilón es una especie forestal muy explotada por la riqueza de su madera, razón por la cual su frecuencia en el bosque natural se ha reducido significativamente, lo que aunado a la recalcitrancia de su semilla la convierte en una especie amenazada. Las técnicas de cultivo de tejidos aparecen como una alternativa para el rescate y la multiplicación masiva de esta especie y también para su conservación a mediano y largo plazo. Las técnicas de cultivo *in vitro* permiten conservar material vegetal como semillas, embriones, meristemos y ápices en condiciones asépticas, por corto, mediano o largo plazo. De las técnicas de conservación a largo plazo se menciona la crioconservación, que incluye diversos procedimientos como el encapsulamiento-deshidratación y la vitrificación entre otros. El primero incluye el uso de alginato para formar un polímero dentro del cual queda inmerso el explante y se somete a deshidratación hasta lograr el porcentaje de humedad deseado que permita su sobrevivencia al congelamiento; la vitrificación busca el tratamiento del material, sin encapsular, pero empleando soluciones vitrificadoras con capacidad crioprotectora. En este estudio se evaluaron en pilón (*Hyeronima alchorneoides*) las diferentes etapas del proceso de crioconservación. Con el encapsulamiento-deshidratación el mejor tratamiento consistió en el precultivo en medio suplementado con 0.3M sacarosa por un día y la deshidratación por 3.5 horas (humedad cercana al 21%); se logró un porcentaje de ápices verdes de 88.60% siete días después del ensayo. De forma similar, en el caso de la vitrificación, el protocolo consistió en el precultivo por un día en 0.3M sacarosa seguido del tratamiento por 20 min con la solución de carga y 5 min con la solución vitrificadora PVS2 o PVS4; los porcentajes de sobrevivencia una semana después del proceso se mantenían altos, 92.62% y 88.74%, respectivamente. Las condiciones de cultivo como luminosidad y temperatura a lo largo del proceso fueron factores que influyeron en los resultados. La modificación del medio de regeneración al adicionar reguladores de crecimiento como las citoquininas, entre ellas el BA y la KIN ayudó a que el material respondiera mejor durante la recuperación. Sin embargo, sería recomendable profundizar los estudios en las etapas posteriores a la crioconservación.

Palabras clave:

Hyeronima alchorneoides, pilón, crioconservación, nitrógeno líquido, encapsulamiento, vitrificación.

Introducción

El pilón (*H. alchorneoides*) es una especie maderable tropical con gran demanda en el mercado, razón por la cual la frecuencia de pilón en el bosque natural se ha reducido significativamente (Solís y Moya, 2004). Adicionalmente, la semilla de pilón es recalcitrante, perdiendo su viabilidad a los pocos días de la recolecta (Abdelnour *et al.*, 2011). Los frutos son dañados por avispas (*Eurytoma sp*) de la familia *Eurytomidae* (*Hymenoptera*) y el porcentaje de frutos dañados puede superar el 50% dependiendo de la época, lo que dificulta su propagación por esta vía. La propagación por estacas se utiliza en esta especie (Murillo-Gamboa, Badilla-Valverde, Villalobos- Araya; Rojas-Parajeles, 2013) y las técnicas de cultivo de tejidos aparecen en la actualidad como una alternativa para el rescate y la multiplicación masiva de esta especie (Abdelnour *et al.*, 2011) y también para su conservación a mediano y largo plazo (Dolce *et al.*, 2004). En particular, la crioconservación, conservación de células vivas y organismos a ultra bajas temperaturas (-196°C) en nitrógeno líquido, ha sido evaluada en muchas especies para la conservación de polen, meristemas, ápices, embriones cigóticos, embriones somáticos y suspensiones celulares por un lapso indefinido asegurando la estabilidad genética del germoplasma en las colecciones *in vitro* (Benson *et al.*, 2006; García-Águila *et al.*, 2007; Garcia-Rojas y Abdelnour-Esquivel 2013). A esta temperatura, las divisiones celulares y los procesos metabólicos se detienen, por lo que el material vegetal puede ser almacenado sin alteración por un período de tiempo teóricamente ilimitado (Gonzalez-Arno y Engelmann 2012). Por estas razones es empleado en la conservación de los recursos fitogenéticos especialmente de especies recalcitrantes, sensibles a la desecación, cuyo potencial para ser conservadas o comercializadas se ve limitado (Martínez *et al.*, 2003); así como en especies en peligro de extinción que debido a su escasez o por algún factor de su biología particular se encuentran gravemente amenazadas de desaparecer (Abdelnour *et al.*, 2007).

Se reconocen dos grupos de técnicas en la crioconservación: las técnicas clásicas basadas en la deshidratación química parcial con osmoprotectores y el congelamiento programado y las técnicas basadas en la vitrificación, entendida como el cambio del estado líquido a un estado intermedio vítreo evitando la formación de cristales de hielo, potencial causa de daño

mecánico a las membranas durante la congelación (Engelmann y Takagi, 2000). Dentro de estas últimas técnicas se reconocen la encapsulación-deshidratación, la vitrificación *per se* y la encapsulación-vitrificación. Los objetivos principales de esta investigación fueron evaluar estas metodologías de crioconservación en ápices de pilón (*Hyeronima alchorneoides*) y establecer las condiciones que permitieran su sobrevivencia y regeneración después de la crioconservación.

Materiales y métodos

El material experimental consistió de plántulas de pilón creciendo *in vitro*, de acuerdo a las recomendaciones de Abdelnour *et al.*, (2011). Este se multiplicó periódicamente empleando el medio de cultivo descrito por Murashige y Skoog (MS) (1962) con las sales reducidas al 50%. Las condiciones de crecimiento fueron de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ y un fotoperiodo de 16 horas luz, con una intensidad lumínica de 3000 lux.

Encapsulamiento-Deshidratación

Para la evaluación del método de encapsulación-deshidratación se siguió la metodología descrita por Fabre y Dereuddre (1990). Se preparó una solución de alginato del sodio al 3% y con ayuda de un gotero estéril, se dejaron caer gotas de esta solución en un beaker conteniendo una solución 100 mM de cloruro de calcio, donde permanecieron durante 20 min para permitir la polimerización del alginato y la formación de las cápsulas. Posteriormente, se descartó la solución y las cápsulas fueron transferidas a placas Petri con papel de filtro estéril para eliminarles el exceso de humedad. Para la determinación del porcentaje de humedad de las cápsulas después de varios periodos de deshidratación (curva de deshidratación), se emplearon dos métodos de desecación, con sílica gel y por exposición al flujo de aire estéril de la cámara de transferencia de flujo laminar. Se colocaron las capsulas de alginato (sin ápices) en cámaras de deshidratación (frascos de vidrio herméticamente sellados) conteniendo 50 g de sílica gel previamente deshidrata en estufa, esterilizada en autoclave y posteriormente enfriada a temperatura ambiente. Los periodos de deshidratación evaluados fueron de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 15, 17, 19, 21, 23 y 25 horas. Pasado cada periodo de deshidratación, las cápsulas fueron pesadas en una balanza analítica para determinar el peso fresco y luego fueron transferidas a erlenmeyers de 25 ml, que 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 contenido de humedad (%), utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ CH} = (\text{Peso fresco} - \text{Peso seco} / \text{Peso fresco}) \times 100 \text{ (ISTA 2008)}.$$

Cuando la desecación se llevó a cabo utilizando el flujo de aire estéril de la cámara de transferencia, las cápsulas fueron colocadas sobre placas Petri y expuestas al flujo de aire por diferentes periodos (0, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5; 4, 5, 6, 7 horas). Se determinó el porcentaje de humedad y se graficaron los resultados. Para estos experimentos se tomaron dos muestras de 10 cápsulas cada una, con tres repeticiones por cada periodo de deshidratación.

Para el encapsulamiento, ápices apicales fueron disectados de vitroplantas con la ayuda de un estereoscopio y se colocaron en un medio de cultivo MS sin reguladores de crecimiento por 24 horas para su recuperación. Transcurrido este periodo, los ápices fueron sumergidos en el medio de cultivo MS líquido con 3% de alginato de sodio y con ayuda de un gotero estéril se tomó una gota del medio conteniendo un meristemo y se dejó caer al medio de cultivo con 100 mM de cloruro de calcio. 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. Como pretratamiento, los ápices fueron precultivados en medio MS líquido (50 ml), en agitación, suplementado con varias concentraciones de sacarosa, por uno o dos días en cada uno de ellos o haciendo transferencias de un medio de menor concentración a otro de mayor concentración de sacarosa (cuadro 1).

Cuadro 1. Concentraciones de sacarosa evaluadas para el precultivo en los ápices encapsulados de pilón (*Hyeronima alchornoides*).

Tratamiento
Control (ápices encapsulados)
MS + 0.3 M sacarosa 1 d
MS + 0.3 M sacarosa 2d
MS + 0.5 M sacarosa 1d + MS + 0.75 M sacarosa 1d
MS + 0.75 M sacarosa 1d
MS + 0.75 M sacarosa 2d

Para el congelamiento de los ápices encapsulados y precultivados en sacarosa, estos fueron deshidratados, entre 3.0 y 3.5 horas (determinados como los mejores periodos de deshidratación). Los ápices disectados y previamente cultivados en el medio MS al 50% por un día, fueron encapsulados de la manera descrita previamente e inoculados en el medio líquido de precultivo MS + 0.3M sacarosa (aproximadamente 20 cápsulas en un frasco con 50 ml de solución). Pasadas 24 horas se tomaron los ápices fueron colocados en platos Petri para desecarlos en el flujo estéril de la cámara de transferencia por diferentes periodos (horas) en evaluación. Pasado dicho tiempo, se tomaron de 5 a 10 cápsulas deshidratadas conteniendo los ápices y se introdujeron en un criovial de polipropileno de 1,2 ml para ser inmediatamente inmersos en NL donde permanecieron por 24 horas. Pasado este periodo, los crioviales fueron colocados en baño maría a 40 °C por dos minutos para recuperar el material. El procedimiento se repitió con cada tratamiento de precultivo y para cada tiempo de deshidratación. Después del descongelamiento, los ápices fueron cultivados en el medio de regeneración (MS con la concentración de sales al 50 %) y mantenidos en el cuarto de crecimiento a una temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Durante la primera semana post-descongelamiento los cultivos se mantuvieron en condiciones de oscuridad, y luego en luz difusa (1000 lux) para finalmente ser expuestos a luz directa con una intensidad de 3000 lux. Para mejorar la respuesta de los ápices a la regeneración, se extrajeron de la cápsula para que quedarán en contacto directo con el medio de cultivo.

Vitrificación

Para efectuar las pruebas de vitrificación se siguió la metodología básica descrita por Sakai *et al.*, 2008. Se evaluó el efecto del precultivo de los ápices en el medio MS con 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6 y 0,7 sacarosa por un día, en condiciones de oscuridad y una temperatura de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Se determinó que concentraciones mayores de 0,5M sacarosa resultaron letales para los ápices (datos no se muestran). Por consiguiente, en las pruebas posteriores se evaluaron las concentraciones menores de sacarosa (0,2, 0,3, 0,4 y 0,5 M). Los ensayos se repitieron como mínimo en dos veces y cada tratamiento contó como mínimo con tres repeticiones de diez ápices cada una. El siguiente paso consistió en evaluar el efecto del periodo de incubación en la solución de carga (LS, Medio de cultivo líquido complementado con 0,4 M sacarosa y 2 M glicerol) sobre la supervivencia de los ápices. Se colocaron de 10 a 15 ápices en un criotubo de polipropileno de 1,2 ml con 1,0 ml de la solución de carga y se incubaron durante 10, 20 y 30 min. La solución se mantuvo fría (sobre hielo).

Finalizado cada periodo de incubación, se descartó la solución de carga con ayuda de un gotero estéril y los ápices fueron transferidos a placas Petri con papel de filtro estéril para drenar el exceso de humedad y luego cultivados en el medio de regeneración (MS al 50 %). Los cultivos se mantuvieron una semana en condiciones de oscuridad y luego fueron transferidos a luz (2000 lux).

Una vez seleccionado el periodo de incubación en la solución de carga, se procedió a evaluar la sobrevivencia de los explantes a la incubación en las soluciones vitrificadoras PVS2 (medio de cultivo MS líquido con 0,4 M sacarosa, 15% (v/v) DMSO, 15 % (v/v) etilenglicol, 30 % (v/v) glicerol), PVS4 (medio con 0,6 M sacarosa, 20 % (v/v) etilenglicol, 35 % (v/v) glicerol) y PVS3 (medio con 50 % (m/v) de sacarosa y 50 % (v/v) de glicerol). Se evaluó el efecto de la incubación en cada solución vitrificadora por varios periodos, siempre manteniéndolas frías sobre hielo. Para estos ensayos se colocaron de 10 a 15 ápices por criotubo con 1 mL de la solución a evaluar. Pasado el periodo de incubación se descartó la solución con gotero estéril y se agregó la solución de lavado (MS + 1,2 M sacarosa) por 5 min y luego se descartó la solución de lavado y se recuperaron los ápices, colocándolos en placas Petri con papel filtro estéril para eliminar residuos de las soluciones y cultivarlos luego en el medio de regeneración (MS 50 %). Para la recuperación de los ápices, inicialmente fueron cultivados una semana en oscuridad y luego se transfirieron a condiciones de luminosidad (2000 lux) en un cuarto de crecimiento a 21 °C. Posteriormente se efectuaron varias pruebas (resultados no se muestran), en las que se variaron algunos parámetros como la temperatura, la luminosidad y otras, para finalmente mantener los ápices durante 7 a 10 días en oscuridad, luego mínimo 7 días en luz difusa (1000 lux) y finalmente a luz directa para determinar la supervivencia. Una vez establecida la sobrevivencia de los ápices posterior al descongelamiento (cultivo en MS 50 %), fue evaluado el efecto de varias citocininas agregadas al medio de cultivo (MS) para la regeneración: 1 y 2 mg L⁻¹ BA, 1 y 2 mg L⁻¹ KIN, y 0,01 mg L⁻¹ TDZ. Los ápices empleados en estas pruebas provenían de ensayos utilizando PVS2 y la PVS4 antes del congelamiento en NL (mayores porcentajes de supervivencia logrados en pruebas previas).

Recuperación de los ápices

Posterior al congelamiento, una vez establecida la supervivencia de los ápices cultivados en el medio de recuperación (MS 50 %), se realizaron numerosas pruebas (datos no se muestran) para mejorar la respuesta de los ápices a las distintas etapas del proceso de

vitrificación, también se evaluó el efecto del enriquecimiento del medio de cultivo con varias citocininas: MS+1mg/l BA, MS+2mg/l BA, MS+1mg/l KIN, MS+2mg/l KIN y MS+0,01mg/l TDZ. Los ápices evaluados provenían de ensayos que consistieron en la incubación en PVS2 y PVS4 y congelados en NL (mayores porcentajes de sobrevivencia logrados en pruebas previas).

Encapsulamiento-Vitrificación

Se evaluó un procedimiento alternativo que combina las dos técnicas descritas arriba y que es conocido como encapsulamiento-vitrificación. Los ápices fueron encapsulados e incubados en el medio líquido suplementado con 0,3 M de sacarosa durante 24 horas, como se estableció previamente para las pruebas de encapsulamiento-deshidratación.

Evaluación de las soluciones y procedimientos pre y post tratamiento para la crioconservación por inmersión en nitrógeno líquido

Al igual que en el procedimiento de vitrificación, los ápices encapsulados fueron incubados en la solución de carga por 20 min. Luego, se evaluaron diferentes periodos de incubación en la solución PVS2 previo al congelamiento en NL. Para el descongelamiento, los criotubos conteniendo los ápices fueron sumergidos en un baño de agua a 40°C por 2 min.

Recuperación de los ápices

Los ápices descongelados fueron cultivaron en el medio MS al 50%, en condiciones de oscuridad por una semana y luego transferidos a luz. Dos días después de la prueba se sacaron los ápices de la cápsula para estimular su respuesta.

Resultados

Encapsulamiento-Deshidratación

Determinación del porcentaje de humedad de las cápsulas de alginato

Cuando se utilizó sílica gel anhidra para deshidratar las cápsulas y calcular su porcentaje de humedad, se determinó que el porcentaje inicial fue de alrededor del 90% y después de un periodo de 7 horas de deshidratación el contenido de humedad era muy elevado (80,74%). En periodos aún mayores de deshidratación, 15 y 25 horas, los porcentajes de humedad disminuyeron hasta 12,18 y 11,13% respectivamente, sin que se lograra alcanzar contenidos de humedad alrededor del 20% en los periodos evaluados (de 0 a 25 horas) (Datos no se muestran).

Empleando el flujo de aire de la cámara de transferencia, el porcentaje de humedad inicial de las cápsulas de alginato se mantuvo en 91,62% y alcanzó un mínimo de 15,34% después de 7 horas bajo el flujo de aire. Después de 3 horas de deshidratación, el porcentaje de humedad fue de 27% y disminuyó drásticamente de las 2 a las 2,5 horas (69,92% a 30,20% respectivamente). El porcentaje continuó disminuyendo a 27.76% a las 3h y 20,88 a las 3.5h. Los cambios en el porcentaje de humedad fueron lentos para los restantes periodos hasta llegar a un mínimo de 16,49% a las 7 h (figura 1).

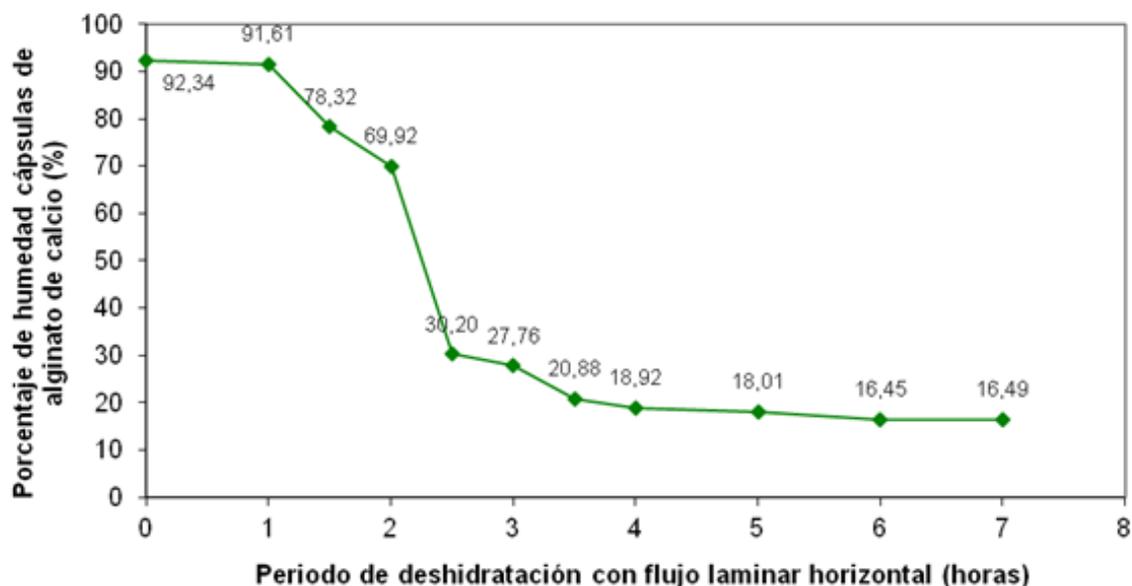


Figura 1. Porcentaje de humedad de las cápsulas de alginato sometidas a diferentes periodos de deshidratación empleando flujo laminar horizontal.

Sobrevivencia y regeneración de los ápices encapsulados y deshidratados (NL-)

Para seleccionar el periodo óptimo de deshidratación, antes de realizar las pruebas congelamiento en nitrógeno líquido (+NL), se evaluó la sobrevivencia de los ápices encapsulados y deshidratados en el flujo de aire (cuadro 2, figura 2). Los periodos fueron seleccionados tomando en consideración la curva de deshidratación y la información en la literatura que indica que el porcentaje de humedad óptimo suele encontrarse entre 30 y 20% de humedad (González-Arno y Engelmann 2004).

Cuadro 2. Sobrevivencia y regeneración de ápices de pilón (*Hyeronima alchorneoides*) encapsulados y sometidos a diferentes periodos de deshidratación empleando flujo de aire de la cámara de transferencia, después de cuatro semanas de cultivo.

Deshidratación (horas)/ Contenido de humedad (%)	Sobrevivencia (%)	Regeneración (%)
0,0 / 92,34	91,00	85,89
2,0 / 69,92	86,00	83,34
2,5 / 30,20	85,00	75,62
3,0 / 27,22	87,00	66,67
3,5 / 20,88	82,00	67,89
4,0 / 18,92	49,00	43,00

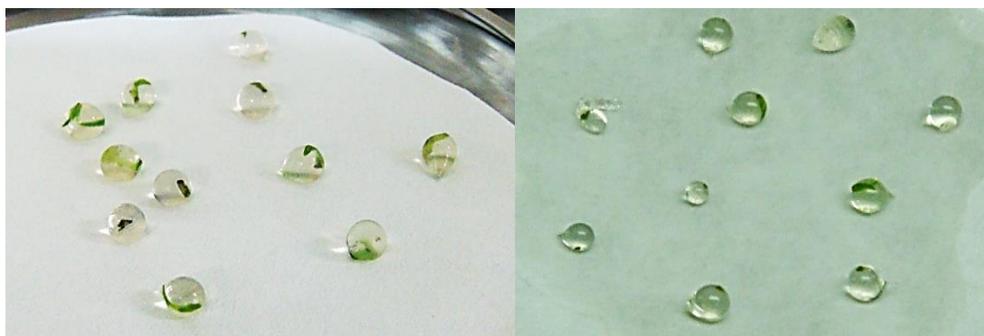


Figura 2. Ápices de *Hyeronima alchorneoides* encapsulados para las pruebas de deshidratación empleando la exposición directa al flujo laminar horizontal.

Precultivo de los ápices encapsulados

Cuando se evaluó el efecto del precultivo de los ápices encapsulados en el medio líquido enriquecido con diferentes concentraciones de sacarosa, se observó que el porcentaje de sobrevivencia en el medio con 0,3M sacarosa por un día se mantuvo por encima del resto de tratamientos con sacarosa (con un 83% de sobrevivencia a la tercera semana del tratamiento) (cuadro 3).

Cuadro 3. Porcentaje de sobrevivencia de los ápices de pilón encapsulados y sometidos a varios tratamientos de precultivo con concentraciones diferentes de sacarosa. Datos obtenidos durante las tres semanas posteriores al ensayo.

Tratamiento Medio precultivo líquido (MS)	Supervivencia (%)*
Control (sin precultivo en sacarosa)	89,70
0,3 M sacarosa 1 día	82,61
0,3 M sacarosa 2 días	45,50
0,3 M sacarosa 1 día + 0,5M 1 día	36,34
0,5M 1 día	21,91
0,5M 2 días	28,97
0,5M 1 día + 0,75M 1 día	22,64
0,75M 1 día	18,76
0,75M 2 días	20,03

* Después de tres semanas de cultivo en el medio de regeneración (MS 50%). Dos días después del descongelamiento, los ápices se extrajeron de las cápsulas y se dejaron en contacto directo con el medio de regeneración.

Tratamientos para la crioconservación por inmersión en nitrógeno líquido

Una vez determinadas las mejores condiciones de pretratamiento en sacarosa (0,3 M sacarosa por 1 día) y los periodos de deshidratación (3,0, 3,5, y 4 horas), se evaluó el efecto del congelamiento en NL (cuadro 4). Se observó que los mayores porcentajes de sobrevivencia se obtuvieron al emplear 3 horas y 3,5 horas de deshidratación (79,20% y 81,91% de ápices supervivientes. El porcentaje de supervivientes después de 4 horas de desecación disminuyó significativamente (49,43%). El análisis de Varianza (ANDEVA)

determinó que no existieron diferencias significativas entre los tratamientos de deshidratación de 3,0 y 3,5 horas después del congelamiento. Sin embargo, las observaciones realizadas al final del periodo de evaluación parecen indicar que el mejor tratamiento fue el que incluyó 3,5 horas de deshidratación (aproximadamente 27% de humedad de los ápices encapsulados).

Cuadro 4. Supervivencia de los ápices de pilón (*Hyeronima alchornoides*) encapsulados, precultivados en medio con 0,3 M sacarosa por 1 día y deshidratados empleando el flujo de aire de una cámara de transferencia por varios periodos y congelados en nitrógeno líquido (NL).

Deshidratación (h) /Contenido de Humedad (%)	Supervivencia (%)	
	-NL	+NL
3,0 / 27,22	82,45	79,20
3,5 / 20,88	86,02	81,91
4,0 / 18,92	62,90	49,43
Control precultivo en sacarosa	92,38	-
Control de aislamiento	95,40	-

Recuperación de los ápices encapsulados

En otras pruebas la supervivencia a la primera semana era alta, pero a la segunda semana la mayoría no había respondido. Por ejemplo, la supervivencia al deshidratar las cápsulas por 3 horas se obtuvo un 80,38% de ápices verdes a los 7 días. Si se conservan dentro de la cápsula tardan más en responder o mueren. Lo mejor es extraerlos de la cápsula cuidadosamente para no dañarlos en el proceso (figura 3).

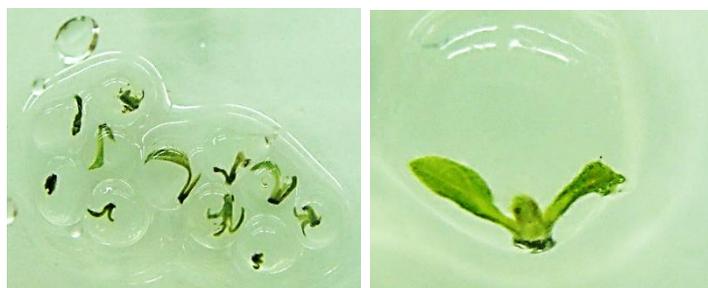


Figura 3. Ápices de pilón que sobrevivieron a los diferentes tratamientos de encapsulamiento-deshidratación y sometidos a tratamientos +NL. Se muestran algunos explantes verdes a una semana postcongelamiento.

Vitrificación

Precultivo de los ápices

En ensayos previos (datos no se muestran) se logró determinar que el precultivo de los ápices en medio con concentraciones menores a 0,2 M sacarosa la sobrevivencia fue de casi el 100% mientras que en concentraciones de 0,5 M o mayores los ápices presentaron daños evidentes y porcentajes de germinación del 50% o menores. Cuando se evaluaron concentraciones intermedias de sacarosa en los medios de precultivo semisólidos (cuadro 5) se observó que tanto los porcentajes de sobrevivencia como de regeneración se mantuvieron altos después de tres semanas de cultivo, obteniéndose entre 85% y 83% de sobrevivencia en 0,3M y 0,4M sacarosa respectivamente y alrededor del 100% de regeneración en ambas concentraciones.

Cuadro 5. Sobrevivencia y regeneración de ápices de pílón (*Hyeronima alchorneoides*), después de tres semanas de precultivo en sacarosa.

Concentración de sacarosa (M)	Sobrevivencia (%)	Regeneración (%)
0,2	94,44	100,00
0,3	85,35	100,00
0,4	83,33	98,77
0,5	35,99	53,49

Después de la tercera semana de evaluación la sobrevivencia se mantuvo estable y de los ápices verdes (sobrevivientes) mostraron claras muestras de regeneración como hojas nuevas y elongación. En cuanto a los cultivados en 0,2 M sacarosa se desarrollaron normalmente, buen crecimiento. El tratamiento seleccionado fue el de 0,3 M sacarosa que presentó resultados intermedios entre 0,2 y 0,4 M sacarosa, siempre con altos porcentajes de sobrevivencia y regeneración (figura 4).



Figura 4. Respuesta de los ápices de pilón (*Hyeronima alchornoides*) sometidos a precultivo en MS + 0.3 M de sacarosa por un día y cultivados en MS al 50%.

Evaluación de las soluciones y procedimientos pre y post tratamiento para la crioconservación por inmersión en nitrógeno líquido

Posterior al precultivo, se evaluó el periodo óptimo de incubación en la solución de carga. Los resultados indicaron que el mejor tratamiento fue el de 20 minutos, ya que después de tres semanas de cultivo se logró obtener alrededor del 67% y 89% de sobrevivencia y regeneración respectivamente. Diez minutos suele considerarse muy poco para asegurar la eficacia del proceso, mientras que 30 minutos suele ser demasiado tiempo y la mayoría de los ápices no resisten el tratamiento y mueren. Además, los resultados para estos procedimientos son de valores más elevados de sobrevivencia y regeneración al emplear como precultivo 0.3M sacarosa (cuadro 6, figura 5). Estos valores se ven claramente disminuidos al emplear como precultivo el medio con 0.4M sacarosa (cuadro 7, figura 6). Por esto, hasta este punto se determina que el mejor tratamiento sería precultivo en MS+0.3M sacarosa seguido de la incubación por 20 minutos en la solución de carga.

Cuadro 6. Efecto del periodo de incubación en la solución de carga (LS) en la sobrevivencia y regeneración de ápices de pilón (*Hyeronima alchornoides*), previo precultivo en el medio con 0,3M sacarosa.

Tiempo	Sobrevivencia (%)			Regeneración (%)		
	1	2	3	1	2	3
10 min	64,48	57,96	36,11	50,00	66,66	81,92
20 min	78,70	78,18	67,85	72,01	74,64	89,86
30 min	49,49	48,82	34,33	61,67	53,33	59,22

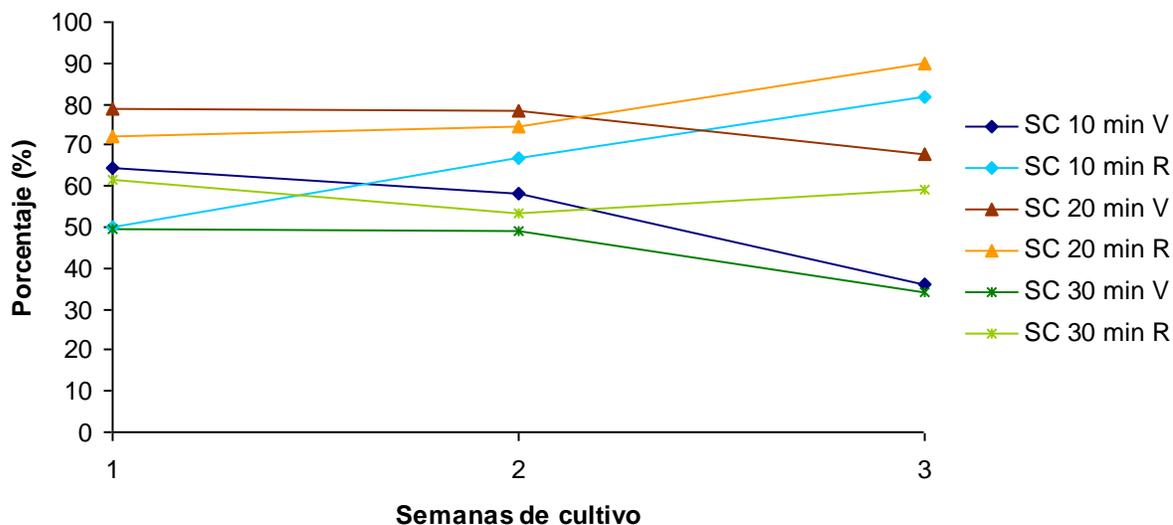


Figura 5. Porcentaje de sobrevivencia (V) y regeneración (R) de los ápices de pilón tratados por 1 día en precultivo 0,3 M sacarosa y después sometidos a tres periodos de exposición a solución de carga.

Cuadro 7. Porcentajes de ápices vivos y regenerados de tratamientos por tres periodos en solución de carga, durante las tres semanas posteriores al ensayo. El precultivo se hizo en MS + 0,4 M sacarosa.

Tiempo	Sobrevivencia (%)			Regeneración (%)		
	1	2	3	1	2	3
10 min	67,51	37,50	33,67	35,71	30,00	30,00
20 min	62,50	33,33	33,33	50,00	50,00	62,56
30 min	59,60	34,59	19,86	42,50	48,89	51,20

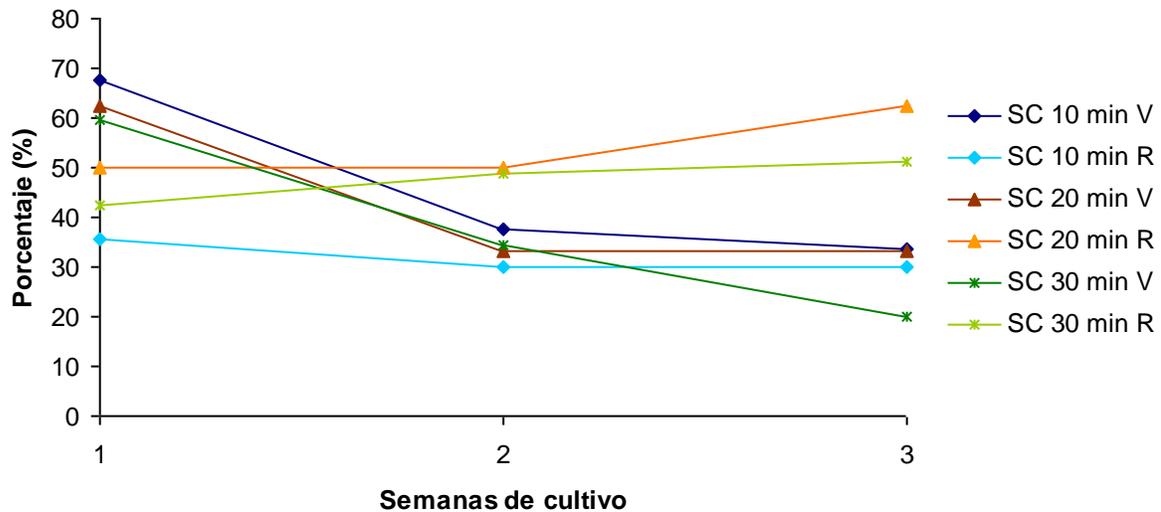


Figura 6. Porcentaje de sobrevivencia (V) y regeneración (R) de los ápices de pilón tratados por 1 día en precultivo 0.4 M sacarosa y después sometidos a tres periodos de exposición a solución de carga.

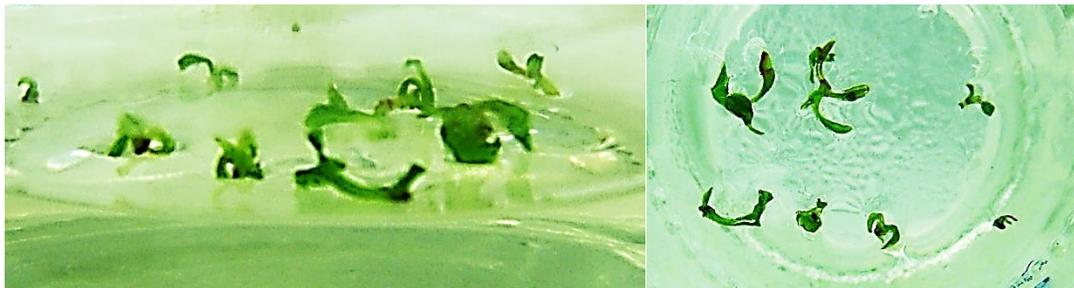


Figura 7. Ápices de pilón (*Hyeronima alchornoides*) provenientes de las pruebas con solución de carga.

Inicialmente, se evaluaron diferentes tiempos de incubación en la solución vitrificadora sin incluir el congelamiento. Para esto, se inició con periodos elevados de forma que se lograra observar qué tanto resistía el material. Dado que aún con el periodo más bajo de 30 minutos la sobrevivencia fue cercana al 50% (cuadro 6) se evaluaron periodos inferiores (cuadro 7) y se lograron buenos resultados de sobrevivencia al emplear solo 5 minutos así como explantes regenerantes en mayor proporción y mejor respuesta.

Cuadro 8. Porcentaje de sobrevivencia de los ápices sometidos a precultivo en MS + 0,3M sacarosa; 20 min en solución de carga y diferentes periodos en PVS2. Resultados a una semana del ensayo. NL-.

Tratamiento	% Sobrevivencia
30 min PVS2	54,26
60 min PVS2	42,96
90 min PVS2	34,81
SC, 20 min	92,67

Debido a los bajos porcentajes de sobrevivencia a los tiempos evaluados inicialmente, tiempos inferiores fueron ensayados.

Cuadro 9. Porcentaje de sobrevivencia y regeneración de los ápices sometidos a precultivo en MS+0,3M sacarosa; 20 min en solución de carga y diferentes periodos en PVS2. Resultados a una semana del ensayo.

PVS2 (min)	Sobrevivencia (%)	Regeneración (%)
5	80,30	35,83
10	74,24	18,33
20	68,69	15,08

Con base en los resultados anteriores se procedió a evaluar la incubación de los ápices en la solución PVS2 por 5 y 10 min, previo a la inmersión en NL. Para la primera semana post-descongelamiento el material presentó mayores porcentajes de sobrevivencia empleando 5 min de tratamiento (cuadro 10), tanto el ensayo NL+ (85%) como el NL- empleado como control (93%). Otros ensayos mostraron resultados similares. Evaluación a los 7 días de la prueba.

Cuadro 10. Ápices sobrevivientes de pruebas de la incubación en PVS2 por cinco y diez minutos, con y sin congelamiento en nitrógeno líquido (+NL).

Tratamiento	Sobrevivencia (%)	
	5	10
PVS2 (min)		
NL+	85,18	50,33
NL-	93,00	73,03

Tratando de optimizar los resultados, otras soluciones vitrificadoras fueron evaluadas, la PVS4 y PVS3. Con la PVS4 en ensayos previos (resultados no se muestran) se observó un comportamiento muy similar a la PVS2 (porcentajes de sobrevivencia -NL a los 7 días cercanos al 90%), siendo los mejores tratamientos también la incubación por 5 minutos (cuadro 11). Según estos resultados, las soluciones que permiten mantener la sobrevivencia más alta con el paso de los días son la PVS4 y la PVS2, por lo que se continuó realizando ensayos con estas y no así con la PVS3. Cabe resaltar que a la tercera semana el material se transfirió a luz directa y la sobrevivencia empezó a decaer.

Cuadro 11. Porcentaje de sobrevivencia, de los ápices de pilón congelados empleando tres diferentes soluciones vitrificadoras, obtenidos en las tres semanas posteriores al descongelamiento NL+.

Tratamiento	Sobrevivencia (%)		
	1	2	3
Semana			
PVS4, 5 min	93,73	79,50	35,27a
PVS2, 5 min	94,84	75,03	32,49a
PVS3, 5 min	96,30	77,89	25,40b
PVS3, 10 min	86,53	61,45	15,07bc
PVS3, 25 min	77,20	56,42	13,89bc

Consecuentemente, ensayos más específicos NL+ con la solución PVS2 y PVS4 por 5 minutos, muestran mejores resultados de sobrevivencia, como se muestra en el cuadro 11 y figura 8. A diferencia del ensayo anterior, en este caso a la tercera semana el material aún se mantenía en condiciones de luz difusa y la sobrevivencia aún era bastante alta. Eventualmente todo el material murió al no lograr responder. Cabe mencionar que en esta prueba se realizó también un Análisis de Varianza (ANDEVA) para los resultados de los tres tratamientos +NL durante la primera y la tercera semana de cultivo. Se determinó que,

en ambos casos, no existieron diferencias significativas en los valores de sobrevivencia de los ápices sometidos a los tratamientos de crioconservación con las soluciones PVS2 y PVS4. Además, en cuanto a características observables de apariencia del material podría considerarse ligeramente superior el uso de PVS4, pero en general los resultados estadísticos avalan lo observado, o sea, resultados similares con ambas soluciones.

Cuadro 12. Ápices vivos de pilón (*Hyeronima alchornoides*) durante las tres semanas posteriores a su congelamiento en NL.

Tratamiento	%	Sobrevivencia	
Semana	1	2	3
PVS4, 5 min, NL+	92,62a	84,33	66,67a
PVS2, 5 min, NL+	88,74a	79,15	61,28a

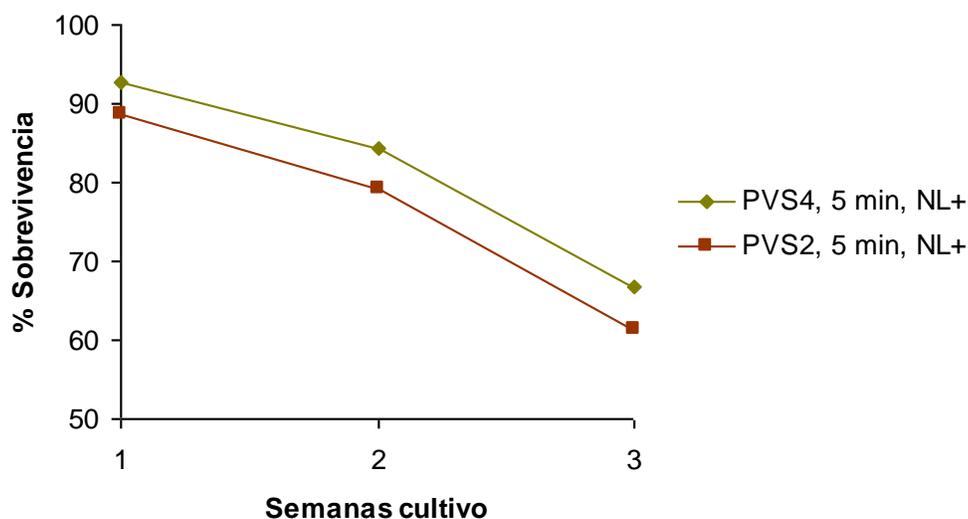


Figura 8. Ápices de pilón vivos durante las tres semanas siguientes a su tratamiento con PVS2 y PVS4 por 5 minutos previo a su congelación en Nitrógeno líquido (+NL).

Se realizaron algunas pruebas similares para obtener ápices sobrevivientes del proceso de crioconservación y emplearlos para evaluar nuevos medios de regeneración con diferentes reguladores de crecimiento. Así, por ejemplo, empleando la solución PVS4 por 5 min, a los 3 días post-descongelamiento, los ápices verdes fueron un 98, 67% y se pasaron de su

medio MS al 50% a los medios a ensayar, lo mismo se hizo con la PVS2 tratamiento con el que se tuvo un 97,46% de ápices verdes en ese momento.

Recuperación de los ápices

Empleando los ápices verdes resultantes de las pruebas anteriores de crioconservación, se realizaron una serie de ensayos con diferentes concentraciones de reguladores del crecimiento (cuadro 13). Aunque no se muestran, cuando se evaluaron estos y otros medios colocando papel filtro sobre la superficie del medio de cultivo, los resultados de sobrevivencia fueron prácticamente nulos. Además, cabe mencionar que los resultados mostrados no son contundentes, este paso final para lograr la regeneración de los ápices crioconservados suele ser de los más laboriosos y se requiere además de modificar otras condiciones de crecimiento del material a fin de lograr su respuesta. Se ha logrado observar señales de regeneración en algunos explantes, pero al transferirlos a luz directa se tornan necróticos. De estos resultados preliminares se puede observar cómo el mejor tratamiento es el que posee KIN en una concentración de 1mg/l seguido del que tiene BA en esa misma concentración; también, puede descartarse el uso del TDZ que no funcionó para esta especie. La permanencia de los ápices en recuperación podría verse favorecida si estos se mantienen en oscuridad y luz difusa por un periodo mayor.

Cuadro 13. Sobrevivencia y respuesta de los ápices de pilón (*Hyeronima alchorneoides*) provenientes de pruebas de congelamiento, durante tres semanas de cultivo en medios con diferentes reguladores de crecimiento.

Medio cultivo	Sobrevivencia (%)			Regeneración (%)	
	1	2	3	2	3
MS 50% + 1 mg/l BA	96,32	89,66	62,56	21,42	6,50
MS 50% + 2 mg/l BA	92,15	85,01	58,17	15,02	4,25
MS 50% + 1 mg/l KIN	97,60	90,76	66,28	20,68	8,33
MS 50% + 2 mg/l KIN	94,98	88,74	60,33	14,47	3,95
MS 50% + 0,01 mg/l TDZ	87,73	70,62	27,87	-	-

Encapsulamiento-Vitrificación

Evaluación de las soluciones y procedimientos pre y post tratamiento para la crioconservación por inmersión en nitrógeno líquido

Se iniciaron algunos ensayos que abarcaron el precultivo por un día en 0,3 M sacarosa (según resultados previos del proceso de deshidratación) así como el tratamiento por 20 minutos en solución de carga (como es común). Se evaluaron consecuentemente diferentes periodos en PVS2 (-NL), fueron más elevados respecto al proceso de vitrificación pues en este caso el material estaba encapsulado y se pretendía lograr un proceso eficaz de deshidratación. Los resultados fueron muy bajos (cuadro 14). Se realizaron algunas pequeñas pruebas de forma esporádica (resultados no se muestran) pero los datos no fueron alentadores; así pues, no se ensayaron periodos menores pues se decidió dejar de lado esta técnica y continuar con las anteriores en las que ya se contaban con numerosos ensayos y se tenía enfocada la atención para los fines planteados en esta investigación. Para considerar esta técnica como una opción se requieren de pruebas más detalladas como se realizó en los casos de encapsulamiento-deshidratación y vitrificación.

Cuadro 14. Resultados de sobrevivencia y respuesta de los ápices encapsulados de pión sometidos a tratamiento con la solución PVS2 por tres periodos de tiempo así como un control sometido a la solución de carga por 20 min.

Minutos	Sobrevivencia (%)		Regeneración (%)
	1	2	2
30	43,33	37,22	29,63
60	33,33	14,54	10,83
90	16,67	6,06	11,43
SC 20 min	71,60	66,84	14,32

Discusión

Encapsulamiento-Deshidratación

Según los resultados obtenidos, los ápices aislados no tuvieron problemas en regenerar y el encapsulamiento por sí sólo tampoco representó mayor obstáculo para que se regeneraran exitosamente, pero en este caso el proceso sí fue un poco más lento. Esto puede explicarse dado el tipo de cobertura, ya que la cápsula de alginato de calcio constituye un mecanismo efectivo para evitar que el explante sufra de daños mecánicos así como por el estrés que puede causar su oxidación (Suzuki *et al*, 2005).

Según Shatnawi y Johnson (2004), el periodo de deshidratación y por tanto el porcentaje de humedad de las cápsulas tiene un efecto significativo en la respuesta de los ápices congelados y no congelados. Ha sido generalmente observado que el contenido de humedad de las cápsulas que permite una sobrevivencia óptima se encuentra entre 15 y 25%. En la presente investigación, para pilón, se escogieron por tanto los periodos de 3,0, 3,5 y 4,0 h, con porcentajes de humedad cercanos al 28, 21 y 19% respectivamente. Luego de las pruebas con ápices encapsulados, tanto -NL como +NL, se determinó que la mayor sobrevivencia y regeneración se logró con 3,5 h de deshidratación empleando el flujo laminar logrando porcentajes superiores al 80% de ápices verdes, durante las tres semanas posteriores a los tratamientos.

En este estudio, se seleccionó la deshidratación hasta un contenido de humedad de aproximadamente 21% pues fue el que permitió mayor sobrevivencia de los ápices encapsulados. Este porcentaje de humedad se encuentra dentro del rango que ha sido determinado como el mejor por varios autores. Por ejemplo, en el estudio de Wang y colaboradores (2002), encontraron que para los ápices de cítricos ("Troyer" citrance), con menos de un 21,8% de humedad, la sobrevivencia comenzaba a decaer. Por otro lado, se observó que en la crioconservación de ápices de (*Melia azedarach* L.), realizada por Scocchi y colaboradores (2004), tanto en los ápices congelados como los no congelados, la sobrevivencia decaía cuando se alcanzaba un porcentaje de humedad del 25%. También se ha observado que en raíces vellosas (*hairy roots*) de *Vinca 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).

El precultivo 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 (Takagi, 2000). En cuanto al precultivo de pilón, el medio líquido MS suplementado con 0,3 M sacarosa por 1 día fue el que resultó más exitoso, al igual que se ha reportado en otras especies. Aunque se evaluaron otras concentraciones, tanto únicas como en incremento, esta resultó la más apta en este caso con ápices encapsulados de *H. alchorneoides*. Según Martínez y colaboradores (1999), el pre-cultivo se puede realizar tanto en el aumento progresivo de la concentración de sacarosa o en la concentración más adecuada.

Vitrificación

El precultivo de los ápices con medios enriquecidos con sacarosa antes de la deshidratación ha reportado ser efectivo para mejorar la sobrevivencia post-tratamiento en algunas especies. Esto debido a que la acumulación de azúcares aumenta la estabilidad de las membranas bajo condiciones severas de deshidratación (Takagi, 2000).

Para los ápices de pilón, el mejor tratamiento de precultivo consistió en medio MS semisólido suplementado con 0,3 M sacarosa. Sakai y Engelman (2007) reportan que se ha observado que después de la escisión de las plántulas *in vitro*, el precultivo de los ápices en medio solidificado suplementado con 0.3 a 0.7 M sacarosa por 1 o 2 días ha sido reportado muy efectivo para mejorar la sobrevivencia después de la crioconservación. Se ha mostrado que el precultivo con 0,3 M sacarosa por 16 a 24 h produce la más alta formación de brotes a partir de ápices de wasabi crioconservados. Estos mismos autores indican que para muchas especies, el precultivo con sacarosa parece ser insuficiente para generar altos niveles de sobrevivencia por vitrificación y que para muchas otras la exposición directa a las altas concentraciones de las soluciones vitrificadoras resultan tóxicas; por tanto, en esta técnica, se hace necesario el uso de una solución de carga con una concentración intermedia para preparar a los explantes al restante proceso de vitrificación. La que ha resultado mejor es la mezcla de 2,0 M de glicerol junto con 0,4 M de sacarosa. En la presente investigación, se empleó dicha solución como “solución de carga” y se determinó que el mejor tiempo de exposición a la misma (determinado en este ensayo y el empleado a en las pruebas de congelamiento), fue el de 20 min. Según Takagi (2000), de esta forma, se minimizan los efectos adversos de las soluciones vitrificadoras, especialmente con cultivos sensibles a la PVS2.

La llave del éxito del proceso de crioconservación por vitrificación es el control cuidadoso del procedimiento de deshidratación y prevenir el daño por la toxicidad química o el estrés osmótico extremo durante el tratamiento con la solución PVS2 (Sakai y Engelman, 2007; Sakai *et al.*, 2008; Gonzalez-Arno y Engelmann 2012).

En algunos estudios se ha encontrado que la solución vitrificadora PVS4 produce casi los mismos porcentajes de crecimiento como la PVS2 (Takagi, 2000). En este trabajo, con la técnica de vitrificación, se observó un comportamiento similar al mencionado al emplear la PVS2 y la PVS4, con las que se lograron los mayores porcentajes de sobrevivencia. También se ensayó la PVS3, pero los porcentajes de sobrevivencia logrados fueron más bajos. Con el avance de las evaluaciones se logró evidenciar una ligera superioridad de los resultados obtenidos con la PVS4 respecto a la PVS2. En relación a esta última, cabe mencionar que se ha encontrado que soluciones con productos como DMSO pueden ser tóxicas para algunas especies tropicales. La plasmólisis excesiva y el choque osmótico también pueden tener efectos negativos sobre el tejido, provocando daños después de la descongelación y durante la regeneración (Sánchez-Chiang y Jiménez, 2010). Además, con forme aumentan los periodos de exposición a estos crioprotectantes se causa un mayor daño del material vegetal, en este caso 5 min fue el periodo óptimo para permitir la sobrevivencia de los ápices de pilón. Resultados similares fueron obtenidos con especies forestales como el cedro (García, 2011).

Un aspecto importante en estas pruebas, fue la incubación en todas las soluciones en frío, en los procesos de deshidratación. Takagi (2000) registra efectos positivos del uso de bajas temperaturas, 0°C, durante la deshidratación con las soluciones vitrificadoras. Esto ha sido muy efectivo sobre todo con especies tropicales, que son relativamente susceptibles a los procesos de deshidratación. Por ejemplo, se menciona que en *Dioscorea alata*, la sobrevivencia post-tratamiento fue drásticamente mejorada de un 47 a 91% por disminución de la temperatura de 25 a 0°C durante la deshidratación por PVS2.

Encapsulamiento-Vitrificación

Los resultados de los ensayos iniciales que se realizaron no fueron muy alentadores, sin embargo puede considerarse como una opción por implementar trabajando más a fondo en ella. Sakai y Engelman (2007) mencionan un ejemplo de esta técnica, en este los ápices de wasabi, después de ser precultivados con 0,3 M sacarosa fueron encapsulados en cápsulas

de alginato, tratados con la solución de carga por 30 min y luego deshidratados con la PVS2 en un beaker de 100ml en un agitador rotatorio (100 rpm) por 70 a 100 min a 0°C. Cerca de 10 cápsulas fueron suspendidas en 0.7 ml de PVS2 e inmersas en NL. Para el descongelamiento rápido, se pusieron en un baño de agua a 40°C. Se drenó la PVS2 y se adicionó la solución de lavado. Los ápices encapsulados lavados se transfirieron el medio de cultivo. En este caso, el porcentaje de regeneración fue 30% más alto que el de los ápices crioconservados por la técnica de encapsulamiento-deshidratación. Además, el porcentaje de regeneración de los ápices congelados con esta nueva técnica tomó lugar mucho más rápido. Desde que se estableció, este método ha sido usado exitosamente en un amplio rango de especies vegetales de 22 géneros.

Regeneración ápices

El medio MS con sales reducidas a un 50%, empleado en la regeneración de los ápices, fue efectivo al permitir la respuesta rápida y exitosa de los explantes no sometidos a ninguna prueba; así como los provenientes de ensayos iniciales de precultivo, solución de carga y vitrificadoras, sin incluir el congelamiento. No fue así en etapas posteriores al descongelamiento del material incubado en NL. Se cree que el estrés al que fueron sometidos estos meristemas afectó su capacidad de respuesta y se hizo necesario incentivar este proceso mediante el uso de reguladores de crecimiento. En las pruebas iniciales se logró observar una mejor respuesta al emplear las citoquininas KIN y BAP, ambas en una concentración de 1mg/l.

Usualmente en los meristemas y ápices la citoquinina endógena es baja debido a que el principal sitio de síntesis son las raíces, por lo que la adición exógena de citoquinina en los medios de establecimiento es generalizada. La importancia de adicionar este regulador se debe a que la biosíntesis, conjugación, oxidación, transporte y efectos de auxinas y citoquininas sobre el órgano de crecimiento; se postula que son las raíces las principales zonas de biosíntesis de citoquininas y las exporta hacia los brotes, donde se promueve su desarrollo (Reyes & Vera, 2004). Reyes & Vera (2004) encontraron que de los tratamientos evaluados, el MS + 1,0mg/l de BAP presentó un promedio de 68,75%, siendo el más alto. Este dato se registró a los 21 días de iniciada la siembra lo que indica que este tipo de explantes responde favorablemente a los medios propuestos.

Finalmente, es importante señalar que una condición sobresaliente en todos los ensayos realizados a lo largo de este estudio fue el mantenimiento de los ápices en la oscuridad

durante los primeros días de cultivo, en cualquiera de los medios empleados y antes de pasarlos a luz directa, someterlos a luz difusa por una o dos semanas. Esto debido a que en algunos tratamientos iniciales se observó que los ápices morían rápidamente al exponerlos a la luz después de su aislamiento. Bajo condiciones de oscuridad se mantuvieron verdes y una vez que se empezó a dar la respuesta (regeneración) fue necesario eliminar las condiciones de oscuridad.

Los ápices de pilón sobreviven al tratamiento de crioconservación tanto al usar la técnica de encapsulamiento-deshidratación como con la de vitrificación. En el primer caso, el mejor tratamiento consistió en la deshidratación por 3,5 horas, donde se lograron porcentajes de sobrevivencia de hasta un 88,60% en la primera semana post tratamiento. Por otro lado, con la vitrificación, los mejores resultados se lograron previa incubación por 5 min e inmersión en NL, con la solución PVS4 y PVS2; con porcentajes de sobrevivencia siete días después del descongelamiento de 92,62% y 88,74%, respectivamente.

Con respecto a los ápices encapsulados, su sobrevivencia al congelamiento se mantuvo bastante alta (hasta 81,91% tres semanas después), esto cuando a los 3-5 días post tratamiento se extrajeron de las cápsulas y se cultivaron directamente en el medio semisólido. Aunque con el paso de los días la sobrevivencia se mantuvo ligeramente superior en relación a las pruebas de vitrificación, aun en este caso no se observaron señales de respuesta como sí fue más evidente con el uso de las soluciones vitrificadoras; aunque en ambos casos no se logró la regeneración exitosa.

Para procurar la sobrevivencia del material sometido a crioconservación es importante controlar las condiciones ambientales de su cultivo, tanto luminosidad, temperatura y composición del medio de regeneración. En este caso, cabe resaltar que es necesario que el material tratado se mantenga en oscuridad por al menos una semana y que luego se transfiera a condiciones de luz indirecta por una o dos semanas. El paso a luz directa suele desembocar en la muerte del material.

No se logró inducir regeneración de brotes a partir de los ápices descongelados. Las pruebas iniciales mostraron buen comportamiento del material vegetal a los reguladores de crecimiento BAP y KIN.

Se recomienda realizar pruebas más detalladas en los medios de regeneración de los ápices de pilón sometidos a congelamiento, esto al emplear diferentes reguladores y

variando sus concentraciones en rangos más estrechos así como posibles combinaciones de dichos compuestos. Además, determinar variantes específicas en las condiciones de cultivo (luz, temperatura, entre otros) que permitan que los ápices sobrevivientes respondan de manera adecuada y en el menor tiempo posible.

También, se sugiere que se retome, en ensayos más detallados, el empleo de la técnica de encapsulamiento-vitrificación, pues los resultados iniciales no fueron concluyentes y es una posible opción que en otros estudios ha permitido mejorar los resultados respecto a otras técnicas de crioconservación.

Otra recomendación abarca el empleo de las soluciones vitrificadoras ya empleadas, pero modificadas, así por ejemplo utilizar la PVS2 con concentraciones menores de DMSO.

Literatura citada

- Abdelnour, A; Rojas, G; Alfaro, U. 2007. Estudios preliminares para la crioconservación de especies forestales arbóreas. *Tecnología en Marcha*. 20(1). pp. 1-6.
- Abdelnour, A.; Aguilar, M.; Valverde, L. 2011. Micropropagación de pión (*Hieronyma alchorroides*). *Agronomía Costarricense*. 32(2):9-19.
- Benson, E; Johnston, J; Muthusamy, J; Harding, K. 2006. Physycal and engineering perspectives of *in vitro* plant cryopreservation. *Plant Tissue Culture Engineering*. 5(6): 441-476.
- Fabre, J.; Dereuddre, J. 1990. Encapsulation-dehydration: a new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot tips. *CryoLetters* 11:413-426.
- Dolce, N; Scocchi, A; Mroginski, L. 2004. Crioconservación de ápices de *Citrus sinensis*. *FACENA. IBONE. Argentina*. 20(1): 37-38, 41.
- Engelmann F, Takagi H. 2000. Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application. JIRCAS, Tsukuba, Japón/IPGRI, Roma. 496 p.
- Engelmann, F. 2004. Plant cryopreservation: progress and prospects. *In Vitro Cellular and Development Biology-Plant*. 40(5):427-433.
- García, T. 2011. Crioconservación de ápices de cedro (*Cedrela odorata* L.). Informe de Trabajo Final de Graduación para optar por el título de Bachiller en Ingeniería en

- Biotecnología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Centro de Investigación en Biotecnología. 96p.
- García-Rojas, T.; Abdelnour-Esquivel, A. 2013. Crioconservación de ápices y semillas de cedro (*Cedrela odorata* L.) mediante las técnicas de vitrificación y deshidratación. *Agronomía Costarricense* 37(1): 113-126.
- García-Águila, L; de Fera, M; Acosta, K. 2007. Aspectos básicos de la conservación *in vitro* de germoplasma vegetal. Cuba. *Biología Vegetal*. 7(2): 67-79.
- Gonzalez Arnao, MT, Engelmann, F. 2012 Introducción a la conservación ex situ de los recursos genéticos vegetales. Eds. M.T. Gonzalez Arnao y F. Engelmann, In: Crioconservación de plantas en America Latina y el Caribe. Editorial Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, San José, Costa Rica. pp: 39-48.
- Gonzalez-Arnao, M.T; Engelmann, F. 2004. Cryopreservation of plant germplasm using the encapsulation - dehydration technique: review and case study on sugarcane. *Cryo-Letters*. 27(3):155-168.
- 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.
- International Seed Testing Association (ISTA). 2008. International Ruler For Seed Testing: The germination test. *Seed Science and Technology*. P. 7
- Martínez, R; Azpiroz, H; Rodríguez, J; Cetina, M; Gutiérrez, M. 2003. Aplicación de la biotecnología en los recursos genéticos forestales. *Revista Chapingo*. 9(1):3-5.
- 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.
- Murashige, T; Skoog, F. 1962. A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497
- Murillo Gamboa, O., Badilla Valverde, Y., Villalobos Araya, M., & Rojas Parajeles, F. (2013). *Optimización de la tecnología de propagación vegetativa in vivo y plantación de teca y pilón*. Instituto Tecnológico de Costa Rica.

- Reyes, X.; Vera, J. 2004. Efecto de reguladores de crecimiento en las diferentes fases de la propagación *in vitro* de la malanga (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott). UTEQ. Los Ríos, Ecuador. s.p.
- 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. Pp. 33-50.
- Sakai, A; Engelmann, F. 2007. Vitrification, Encapsulation-Vitrification and Droplet-Vitrification: A Review. *Cryo-letters*. 28(3): 151-172.
- Sánchez-Chiang, N.; Jiménez, V.M. 2010. Técnicas de conservación *in vitro* para el establecimiento de bancos de germoplasma en cultivos tropicales. *Revista Agronomía Mesoamericana*. Universidad de Costa Rica. San José, C.R. 21(1): 196-200.
- 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.
- Shatnawi MA, Johnson KA. 2004. Cryopreservation by encapsulation-dehydration of "Christmas Bush" (*Ceratopetalum gummiferum*) shoot tips. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*; 40: 239-244.
- Solís M, Moya R. 2004. *Hieronyma alchorneoides* en Costa Rica. Disponible en línea: http://www.fonafifo.go.cr/text_files/proyectos/ManualHieronyma.pdf
- 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.
- Takagi, H. 2000. Recent developments in cryopreservation of shoot apices of tropical species. 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. 184-189.
- 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.

Capítulo 2

Crioconservación de uña de gato (*Uncaria tomentosa*)

Resumen

La uña de gato es una planta con potencial para producir diversos metabolitos secundarios, utilizados tradicionalmente por muchas tribus aborígenes y en la actualidad en la medicina alternativa. Se realizan extracciones indiscriminadas de la especie a partir de su hábitat, lo que podría comprometer a futuro su distribución natural. Para aportar una opción de conservación *ex situ* a largo plazo o crioconservación (Nitrógeno líquido, NL, -196°C) de la especie se desarrolló la presente investigación. Se evaluaron las técnicas de vitrificación y encapsulación-deshidratación en los ápices de uña de gato, además vitrificación de suspensiones celulares y semillas. Se ensayaron variaciones en el precultivo, tiempo de exposición a la LS y a la PVS2, resultando el mayor porcentaje de sobrevivencia de los ápices (82%) el tratamiento que consistió en un precultivo en 0,25 M sacarosa seguido de incubaciones por 20 y 30 min en la LS y PVS2 respectivamente, previo al congelamiento en NL. Cuando se evaluó la técnica de encapsulación-deshidratación se discriminaron variables de precultivos en concentraciones crecientes de sacarosa, así como contenidos de humedad de las cápsulas. No se observaron diferencias significativas en la sobrevivencia de los ápices entre los tratamientos después del congelamiento en NL, variando de 31.8% a 52.8%. Sin embargo, en la regeneración se obtuvieron máximos de 10% en los tratamientos en los que se realizaron precultivos en 0.3M seguido de 0.4M sacarosa por 24h en cada concentración y en el tratamiento que incluyó el precultivo en 0.3M seguido de 0.4, 0.5 y 0.6M sacarosa por 24h en cada concentración, en ambos casos con un contenido de humedad de los ápices encapsulados de 22,7%. Se recomienda modificar el medio de cultivo de recuperación, para incrementar los porcentajes de regeneración de plantas. El precultivo de las suspensiones celulares en 0,5 M sacarosa por 24 h generó los mejores resultados después del congelamiento con un 57,14 % de cultivos con regeneración de callos. Las semillas que se vitrificaron presentaron menor porcentaje de sobrevivencia comparadas con las que se sometieron al congelamiento rápido, presentando estas últimas un 89,5 % de semillas germinadas después del congelamiento.

En algunas especies los tratamientos de vitrificación resultan perjudiciales, por lo que se recomienda estudiar primero el comportamiento de las semillas al almacenamiento y de esta forma decidir el mejor tratamiento previo al congelamiento.

Palabras clave: *Uncaria tomentosa*, uña de gato, crioconservación, nitrógeno líquido, vitrificación, encapsulamiento.

Introducción

Uncaria tomentosa comúnmente conocida como uña de gato es una planta ampliamente utilizada en la medicina tradicional de algunos países como Perú, China y Japón, aprovechando la gran variedad de alcaloides con efectos positivos sobre algunas enfermedades, tanto en la prevención como en el tratamiento (Flores *et al.*, 2002). Entre los principales efectos que poseen los metabolitos de la uña de gato se reportan anti cáncer (Pilarski *et al.*, 2010; Díaz & Vargas, 2012; Dietrich *et al.*, 2014; Xi *et al.*, 2014) y antiinflamatorios (Aguilar *et al.*, 2002; Feria *et al.*, 2005; Caon, *et al.*, 2014).

Esta planta es altamente explotada, los productos hechos a base de extractos se comercializan en aproximadamente 30 países, en presentaciones diversas como té, tabletas o cápsulas. El gran interés en su comercialización puede llevar a que en un futuro cercano esta especie se encuentre amenazada y comience a escasear y, dependiendo de las circunstancias, hasta se halle en peligro de extinción (Alvarenga, 2010).

Para mitigar esta problemática, la biotecnología ofrece herramientas útiles tanto en el cultivo de tejidos vegetales (con protocolos para el establecimiento y propagación a gran escala *in vitro*) como en la optimización de bioprocesos dirigidos a la producción de metabolitos (Huerta *et al.*, 2009) y el establecimiento de protocolos o procedimientos para la conservación de especies con intereses tan marcados (Sonwa *et al.*, 2005).

Entre los procedimientos para la conservación de germoplasma se destaca la crioconservación, que permite el almacenamiento de organismos vivos en un estado de suspensión animada por periodos extensos a ultrabajas temperaturas utilizando generalmente nitrógeno líquido (-196 °C). Esta técnica permite la conservación tanto de semillas como embriones, meristemos, ápices y células (Keller & Senula, 2010). El procedimiento de encapsulamiento-deshidratación consiste en recubrir el explante a conservar en alginato de calcio a manera de una semilla artificial, facilitando la manipulación

de tejidos que son delicados, se logra una protección directa durante los procesos de deshidratación, congelamiento y descongelamiento (Barnicoat *et al.*, 2011; Cruz-Cruz, González-Arno, & Engelmann, 2013) y se evitan los efectos tóxicos de los crioprotectores como las soluciones vitrificadoras, además, no se requieren congeladores programables de elevados costos (Burrit, 2008; Peng-Fei, Li-Ping, & Jian-Jun, 2011).

Por otra parte, la técnica de vitrificación consiste en la deshidratación del tejido de interés por exposición a soluciones con alto potencial osmótico, mezclas crioprotectoras muy concentradas conocidas como formulaciones PVS (*Plant Vitrification Solution*), compuestas por sustancias como sacarosa, glicerol, polietilenglicol y DMSO, entre otros, lo que facilita la ocurrencia de la transición vítrea durante el enfriamiento rápido por inmersión directa de las muestras al NL (Wang & Deng, 2004; Engelmann, 2011; González-Arno & Engelmann, 2013).

Las ventajas de la crioconservación y la necesidad de contar con una opción para la conservación a largo plazo de uña de gato, motivó el desarrollo de la presente investigación. Se desarrollaron protocolos para la crioconservación de semillas y suspensiones celulares utilizando la técnica de vitrificación y de ápices utilizando el encapsulamiento-deshidratación y la vitrificación.

Materiales y métodos

La siguiente metodología fue desarrollada en el Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica.

Material Vegetal

Como material experimental se utilizaron vitroplantas de *U. tomentosa* previamente establecidas, siguiendo la metodología descrita por Alvarenga (2010), que consistió en la desinfección de semillas con en una solución de 5 g L⁻¹ de Benomil® y 5 g L⁻¹ de Agri-mycin® en agitación durante 40 minutos, seguido de tres lavados con agua destilada. Posteriormente, se realizó una inmersión en 90% (v/v) de cloro comercial (3,5% hipoclorito de sodio) por 15 minutos. Se realizaron tres lavados con agua destilada estéril y se procedió a inocular de 5 a 6 semillas por frasco conteniendo 20 ml del medio de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962), con 30 g L⁻¹ de sacarosa, pH 5,7 y 3,3 g L⁻¹ de Phytigel. Los

cultivos se mantuvieron en condiciones ambientales controladas, a 25 ± 2 °C, con un fotoperiodo de 16 h luz (bajo luz difusa, 500 lux de intensidad). Una vez germinadas las semillas, cuando los brotes alcanzaron una longitud de 2 a 3 cm (de 1,5 a 2 meses), se inició la etapa de multiplicación periódica (cada cuatro semanas) en el mismo medio de cultivo descrito para la germinación de las semillas, enriquecido con 1 mg L^{-1} de ácido giberélico (AG_3) y 1 mg L^{-1} de pantotenato de calcio (medio de recuperación). Las plantas crecieron a 25 ± 2 °C, con un fotoperiodo de 16 h de luz (2000 lux de intensidad). Tanto para los ensayos de vitrificación como para los de encapsulación-deshidratación, los ápices fueron diseccionados a partir de plantas de dos o tres semanas desde su última multiplicación.

Vitrificación de ápices

Para los ensayos de vitrificación se siguió el protocolo básico desarrollado por Sakai, Kobayashi, y Oiyama (1990), que consiste en el aislamiento y precultivo de los ápices en concentraciones crecientes de sacarosa, seguido por la incubación por 20 min en la solución de carga (Loading Solution, LS, medio MS líquido complementado con 0,4 M de sacarosa y 2 M de glicerol), y por la incubación en la solución vitrificadora PVS2 al 100% (30% glicerol, 15% etilenglicol, 15% DMSO y 0,4 M sacarosa en medio de cultivo) durante varios periodos.

En el presente estudio se evaluaron dos tratamientos de precultivo de los ápices: 0,25 M sacarosa por 24 h y 0,25 M sacarosa por 24 h seguido por 0,5 M sacarosa por 24 h en el medio sólido de multiplicación. Pasado cada periodo de precultivo, se evaluó la sobrevivencia de los ápices en el medio de recuperación (medio de cultivo descrito para la multiplicación) después de cuatro semanas. Para evaluar el efecto de la incubación en la LS, después de cada periodo de precultivo en sacarosa, los ápices fueron transferidos a criotubos de polipropileno de 1,2 mL e incubados en 1 mL de la LS durante 0, 10, 20 y 30 min a 0 °C (sobre bandejas con hielo), para luego evaluar su recuperación en el medio descrito anteriormente, sobre papel de filtro (Fisherbrand® P5) y en condiciones de oscuridad durante una semana y transferidos a luz difusa (500 lux), a una temperatura de 25 ± 2 °C. Una vez evaluados los tiempos de incubación en la LS, se continuaron las pruebas con los tiempos de 10 y 20 min. La LS se eliminó la solución con la ayuda de un gotero estéril y se agregó 1 mL de la solución vitrificadora (PVS2), incubando los ápices por 10, 30 y 50 min a 0 °C aproximadamente. Concluido cada periodo, se reemplazó la PVS2

con 1 mL de la misma solución pero fresca y se procedió al congelamiento rápido en NL, donde permanecieron por al menos una hora. El recalentamiento se efectuó incubando los crioviales conteniendo los ápices en un baño de agua a 40 °C por dos minutos. Finalmente la PVS2 se eliminó del criovial con la ayuda de un gotero estéril y los ápices fueron lavados dos veces, por dos minutos cada lavado, con el medio MS suplementado con 1,2 M de sacarosa, a temperatura ambiente. Los ápices fueron colocados en placas Petri sobre papel de filtro estéril para drenar el exceso de las soluciones y luego colocados en el medio de recuperación enriquecido con 0,5 M de sacarosa, donde permanecieron por 48 h en oscuridad. Pasado este periodo, los ápices fueron transferidos al medio de recuperación y cultivados a 25 ± 2 °C, en oscuridad durante la primera semana y bajo luz difusa hasta la brotación de los ápices. Se evaluó la sobrevivencia y se analizaron los datos después de dos semanas. Todos los ensayos consistieron de 10 unidades experimentales (ápices), cada tratamiento se realizó por triplicado y el análisis estadístico se realizó con el programa R versión 3.1.0 (2014) mediante una comparación de medias por ANDEVA de múltiples factores.

Encapsulamiento-deshidratación de ápices

Para evaluar la técnica de encapsulamiento-deshidratación para la crioconservación de ápices, se siguió el protocolo desarrollado por Fabre y Dereuddre (1990), que consiste en encapsularlos en alginato de calcio, cultivarlos en medios líquidos con concentraciones de sacarosa altas durante diferentes periodos. Previo al congelamiento en nitrógeno líquido, las cápsulas son parcialmente deshidratadas. En la presente investigación los ápices fueron aislados y cultivados en el medio de recuperación (indicado anteriormente) por 24 h en oscuridad, para que superaran el estrés causado por la disección, luego fueron encapsulados en alginato de calcio. Para esto, los ápices fueron suspendidos en el medio de cultivo líquido sin calcio y con 3% de alginato de sodio. Con ayuda de una pipeta de transferencia estéril se goteó este medio conteniendo un ápice en el medio MS líquido con exceso de calcio (100 mM de CaCl_2). Los ápices se mantuvieron bajo estas condiciones por 20 min, para permitir la polimerización del alginato y la formación de las cápsulas. Los ápices encapsulados fueron transferidos a placas Petri sobre papel de filtro estéril (Fisherbrand® P5), para drenar el exceso de humedad y luego incubados en el medio de cultivo MS líquido con concentraciones crecientes de sacarosa (0,3 M; 0,4 M; 0,5 M; 0,6 M; 0,7 M y 0,8M), durante 24 h en cada una, en agitación a 100 rpm, 25 ± 2 °C de temperatura

y en oscuridad. Finalizado cada periodo de incubación, las cápsulas fueron transferidas a placas Petri sobre papel de filtro estéril para eliminar el exceso de humedad y luego cultivados en el medio de recuperación durante una semana en condiciones de oscuridad y luego en luz difusa (500 lux) y 25 ± 2 °C hasta la evaluación de la sobrevivencia a las cuatro semanas.

Antes de iniciar la etapa de deshidratación de los ápices encapsulados, se determinó la curva de deshidratación utilizando cápsulas vacías. Bajo el flujo de aire estéril de una cámara de transferencia fueron colocadas 15 cápsulas sobre placas Petri por cada periodo de deshidratación (0, 1, 2, 2.5, 3, 3.5, 4 y 5 horas), con tres repeticiones cada uno. Pasado cada periodo de deshidratación, las cápsulas fueron pesadas para determinar el peso fresco. Luego fueron colocadas en Erlenmeyer de 25 ml sellados con papel aluminio y secadas en la estufa durante 72 horas a 70° C para determinar el peso seco. Se calculó el porcentaje de humedad de acuerdo con las recomendaciones del ISTA (2008):

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

Una vez determinados los datos porcentajes de humedad de las cápsulas en cada periodo de deshidratación se estableció la curva de deshidratación. Con base en la misma, se seleccionaron dos periodos de deshidratación que permitieron una humedad de las cápsulas de alrededor del 20% (Engelmann, 2011). A continuación, los ápices encapsulados fueron deshidratados en el flujo de aire estéril por 3 y 3,5 h. La mitad de los ápices encapsulados fueron cultivados en el medio de recuperación (-NL) y la otra mitad fue congelada rápidamente en criotubos de polipropileno de 2 mL por inmersión en NL (+NL), donde permanecieron por al menos una hora. Se descongelaron rápidamente incubando los criotubos en un baño de agua a 40 °C durante dos minutos. Después de cada una de las etapas del proceso de crioconservación, los ápices encapsulados fueron cultivados en el medio de recuperación y mantenidos a 25 ± 2 °C, en oscuridad durante la primera semana y luego en luz difusa para inducir la brotación. La sobrevivencia se evaluó después de cuatro semanas. Todos los ensayos se realizaron por triplicado, con 10 unidades experimentales en cada tratamiento, y el ensayo se repitió dos veces. El análisis estadístico se realizó con el programa R versión 3.1.0 (2014), mediante un ajuste de modelo lineal generalizado.

Vitrificación de suspensiones celulares

Se utilizaron suspensiones celulares provenientes de callos, establecidos siguiendo el protocolo desarrollado por Alvarenga (2010), que consiste en colocar segmentos de hoja de 1 cm², provenientes de vitroplantas, sobre el medio base Gamborg B5 (Gamborg, Miller, & Ojima, 1968) complementado con 2 mg L⁻¹ de 2,4-D, 1 mg L⁻¹ de AIB, 30 g L⁻¹ de sacarosa, 8,4 g L⁻¹ de agar y un pH ajustado a 5,7 (medio para inducción de callo). Los cultivos se mantuvieron a 25 ± 2 °C en oscuridad por cuatro semanas, hasta obtener callos friables. Para iniciar las suspensiones, se tomaron 2,5 g de callo y fueron colocados en Erlenmeyer de 125 mL conteniendo 25 mL de Medio base Gamborg complementado con 1 mg L⁻¹ de 2,4-D, 0,5 mg L⁻¹ de AIB, 20 g L⁻¹ de sacarosa, con un pH ajustado a 5,7 (medio para suspensiones celulares). Los cultivos fueron mantenidos durante una semana a 25 ± 2 °C, con un fotoperiodo de 16 horas de luz y una intensidad lumínica de 2000 lux, en un agitador orbital a 90 rpm. Para su mantenimiento y multiplicación, con base en la curva de crecimiento (datos no se muestran), las suspensiones fueron subcultivados cada 7 días tomando 7,5 mL de VCE y 17,5 mL del medio para suspensiones celulares fresco para una suspensión celular al 30 % de VCE, que se cultivaron en Erlenmeyers de 125 mL, en las mismas condiciones señaladas para la inducción de suspensión.

Una vez establecidas las condiciones de cultivo y mantenimiento de las suspensiones, se procedió a ensayar los tratamientos para la criopreservación. Las suspensiones fueron precultivadas por 24 h en agitación, en el medio de cultivo para suspensiones celulares enriquecido con diferentes concentraciones de sacarosa (0,15 M, 0,3 M y 0,5 M). Pasado este periodo, se transfirieron alícuotas de 950 µL de la suspensión a crioviales de polipropileno de 1,5 ml sobre una cama de hielo y se agregó a cada criovial 50 µL de DMSO (solución al 5 % DMSO) y fueron incubados durante una hora y luego congelados rápidamente en NL. Después de una hora los criotubos conteniendo las suspensiones fueron incubados en un baño de agua tibia a 40 °C por dos minutos. Para su recuperación las suspensiones se colocaron en el medio de inducción de callo sobre papel de filtro estéril (para facilitar la manipulación de las células). El papel conteniendo las células se transfirió a medio de cultivo fresco luego de una hora, 24 h y 48 h después del descongelamiento para eliminar los residuos de DMSO, y transferidas a medio fresco cada cuatro semanas para el subcultivo. Los cultivos fueron mantenidos a 25 ± 2 °C en oscuridad, evaluado la

sobrevivencia después de un mes, como porcentaje de cultivos mostrando recrecimiento de las células.

Adicionalmente, se analizó la viabilidad celular utilizando el método de tinción con azul de Evans (Sommer, Evans, & Schwartz, 1972; Xi, von Rad, & Durner, 2002). Inmediatamente después del tratamiento correspondiente se colocaron 500 μL de células tratadas en un tubo eppendorf de 1 mL y se incubaron con 50 μL de azul de Evans por 10 min, luego fueron centrifugadas a 1000 rpm durante 10 min. Se descartó el sobrenadante y se adicionó 500 μL de agua destilada estéril, se agitó manualmente y se colocaron 15 μL en un portaobjetos. Se observó al microscopio de luz a 10 X, considerando que las células viables permanecieron incoloras. Tanto las pruebas de regeneración de callo como las de viabilidad por tinción se aplicaron a cada una de las etapas del proceso de crioconservación y se realizaron por triplicado.

Crioconservación de semillas

Se colectaron frutos de uña de gato, se extrajeron las semillas y fueron almacenadas en una botella de vidrio cerrada herméticamente, que fue mantenida en condiciones de refrigeración a 5 °C. Se evaluaron dos metodologías de crioconservación: deshidratación y vitrificación.

Para la primera metodología se determinó el contenido de humedad de las semillas, con base en el método gravimétrico recomendado por el ISTA (2008). Se utilizaron 18 muestras de 1000 semillas (aproximadamente 0,1 g de semillas por muestra). Estas semillas fueron congeladas rápidamente en NL y la sobrevivencia se determinó como porcentaje de germinación.

Para los ensayos de vitrificación se utilizaron 70 semillas por tratamiento, y se evaluó la incubación en la solución de carga por 0, 10 y 20 min y en la solución vitrificadora PVS2 por 0, 25 y 50 min. Todos los tratamientos incluyeron un control sin congelar. Las semillas de uña de gato fueron colocadas en crioviales de polipropileno de 1 mL sobre una cama de hielo y se agregó 1 mL de la LS. Pasado cada periodo de incubación la solución fue sustituida por 1 mL de la PVS2. El congelamiento se realizó por inmersión de los criotubos en NL donde permanecieron por al menos una hora. Para la recuperación de las semillas, los crioviales fueron incubados en un baño de agua a 40 °C por cinco minutos. Una vez descongelados, la solución vitrificadora fue eliminada y se realizaron tres lavados con el

medio de cultivo básico MS con 1,2 M sacarosa, durante dos minutos cada uno a temperatura ambiente. Se realizó un cuarto lavado con agua destilada y finalmente las semillas fueron colocadas en una placa Petri conteniendo tres capas de papel toalla y abundante agua. Las condiciones para la germinación fueron luz difusa (500 lux de intensidad) con un fotoperiodo de 16 h de luz y una temperatura de 25 ± 2 °C. Después de seis semanas se evaluó la sobrevivencia como el número de semillas germinadas por placa. Cada semilla constituyó una unidad experimental y cada tratamiento contó con 70 unidades experimentales y tres repeticiones. Los datos se analizaron mediante una comparación utilizando el Modelo Lineal General y mediante un ANDEVA de múltiples factores.

La sobrevivencia de las semillas también se evaluó utilizando el método de tinción con 2,3,5-trifenil de tetrazolio (TTC) (Stemponkus & Lamphear, 1967), en la cual las semillas teñidas de rojo son consideradas viables. Se tomaron 10 semillas por cada uno de los tratamientos señalados anteriormente y fueron colocadas por 24 h en una placa Petri conteniendo tres capas de papel toalla humedecidas con agua destilada. Luego las mismas fueron transferidas a una nueva placa con agua destilada con sacarosa al 3 % (m/v) donde permanecieron por 48 h adicionales en oscuridad a 30 °C. Se incubaron en la solución de TTC al 1 % en oscuridad a 30 °C por 72 h y las semillas fueron analizadas utilizando el estéreo microscopio, contabilizando las semillas teñidas como viables. El experimento de tinción se repitió cinco veces.

Resultados

Las evaluaciones de sobrevivencia se realizaron de acuerdo con las recomendaciones hechas por Pence, Winget, Lindsey, Plair, & Charls (2009), tomando en cuenta el porcentaje de ápices que mostraban una coloración verde y signos de crecimiento al momento de realizar la evaluación. Se consideró un ápice muerto aquel que mostraba una coloración marrón u oscura. En el caso de las suspensiones celulares se consideraron dos metodologías para evaluar la sobrevivencia, el crecimiento de callo y la presencia de células no teñidas con azul de Evans. Para las semillas la sobrevivencia se evaluó como el porcentaje de semillas que regeneraron una planta y las semillas que se tiñeron de rojo en la prueba del TTC.

Vitrificación de ápices

Ninguno de los tratamientos de precultivo de los ápices en las concentraciones de sacarosa ensayadas afectó negativamente su sobrevivencia, observándose 100 % de sobrevivencia. Cuando se evaluó el efecto de la incubación en la LS (10, 20 y 30 min), se observaron altos porcentajes de sobrevivencia en todos los tratamientos (100, 95,5 y 91,7 % respectivamente para los precultivados 0,25 M sacarosa por 24 h y alrededor de 90 % para los precultivados por 0,5 M de sacarosa por 24 h adicionales) (Figura 1). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las medias, ni interacciones significativas entre los factores LS y precultivo ($p = 0,33$) de acuerdo al ANDEVA de múltiples factores. Para ensayos posteriores se seleccionaron los tiempos de exposición de 10 y 20 min en la LS.

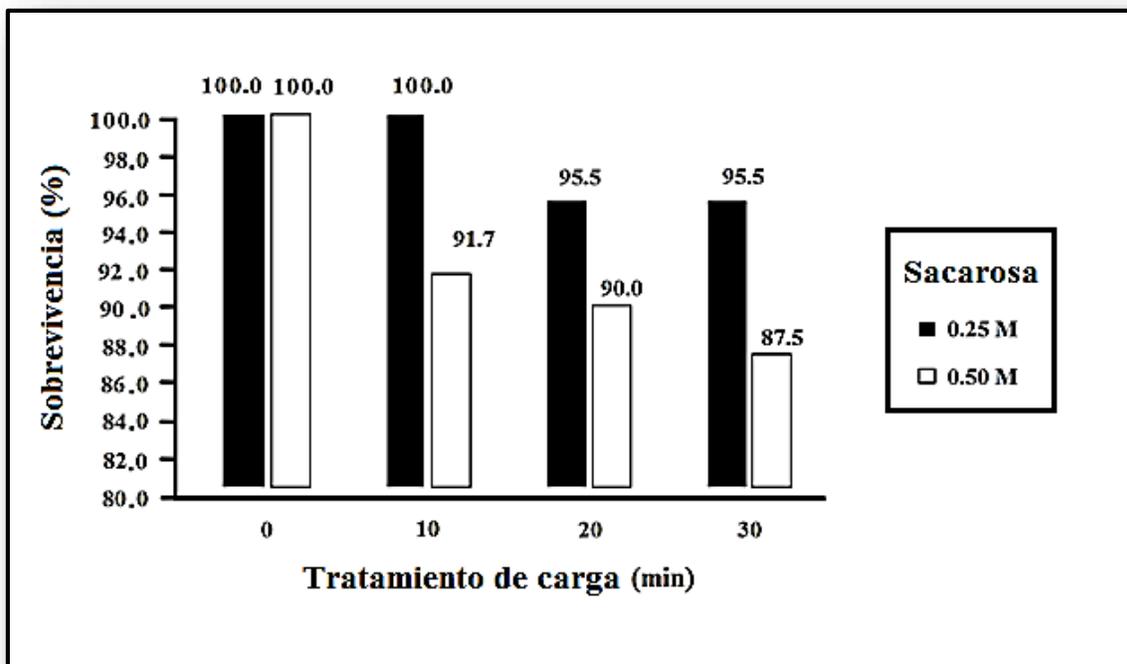


Figura 1. Efecto de la exposición a la solución de carga (LS) en la sobrevivencia de los ápices de uña de gato (*Uncaria tomentosa*), sin congelarse (-NL), después de siete días de cultivo en el medio de recuperación.

Al combinar la incubación de los ápices por 10 y 20 min en la LS seguida de la incubación por 10, 30 y 50 min en la solución vitrificadora PVS2, se determinó que al aumentar el tiempo de exposición a la PVS2, la sobrevivencia disminuyó en todos aquellos ápices precultivados en 0,25 M de sacarosa por un día. Por otra parte, cuando se precultivaron en

0,25 M + 0,5 M sacarosa por 24 h en cada uno, la disminución en la sobrevivencia de los ápices fue mucho menor (figura 2).

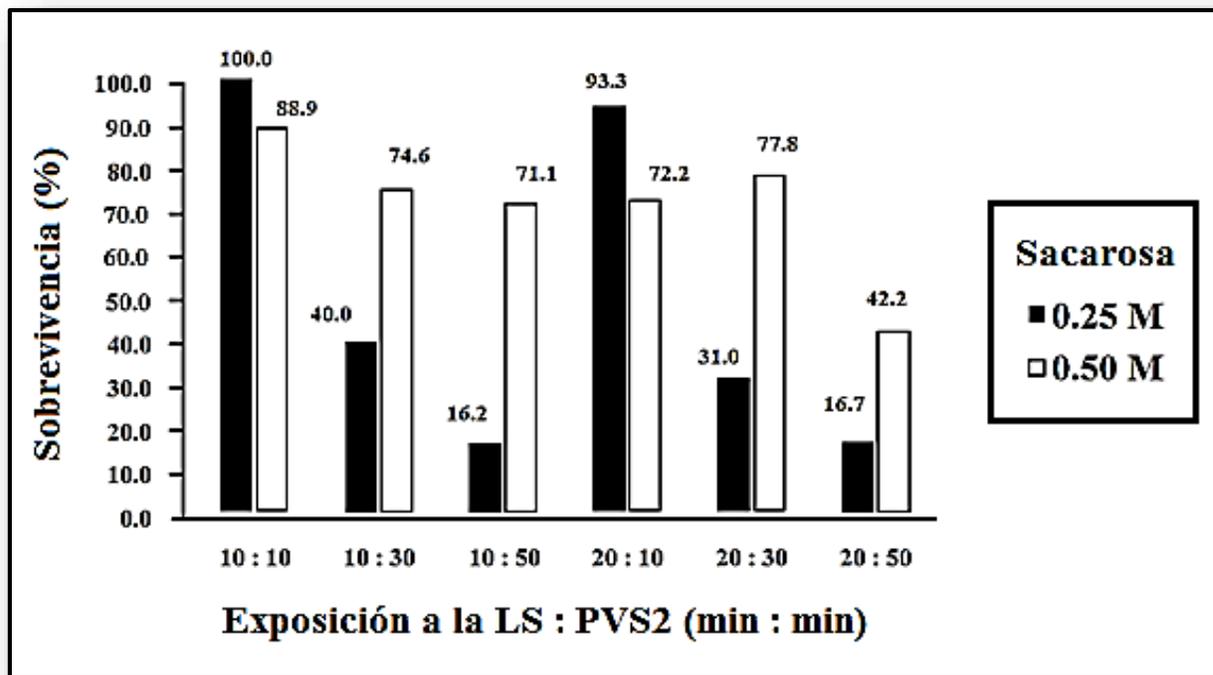


Figura 2. Efecto de la exposición a la solución de carga (LS) y a la solución vitrificadora PVS2 en la sobrevivencia de los ápices de uña de gato (*Uncaria tomentosa*), sin congelar (-NL), después de siete días de cultivo en el medio de recuperación.

Cuando se evaluaron los diferentes pretratamientos seguidos del congelamiento en NL se determinó que las interacciones más importantes en la sobrevivencia fueron la incubación en la PVS2 ($p = 4,30 \times 10^{-5}$) y el precultivo en sacarosa ($p = 4,76 \times 10^{-4}$), mostrando diferencias altamente significativas con respecto del resto de factores evaluados ($p < 0,05$). Los mayores porcentajes de sobrevivencia de los ápices después del congelamiento (+NL) se observaron cuando se realizó el precultivo en la concentración de 0,25 M sacarosa por 24 h, seguido de la incubación en la LS por 20 min y en la PVS2 por 30 min, mostrando una sobrevivencia de 82,2 % (figura 3).

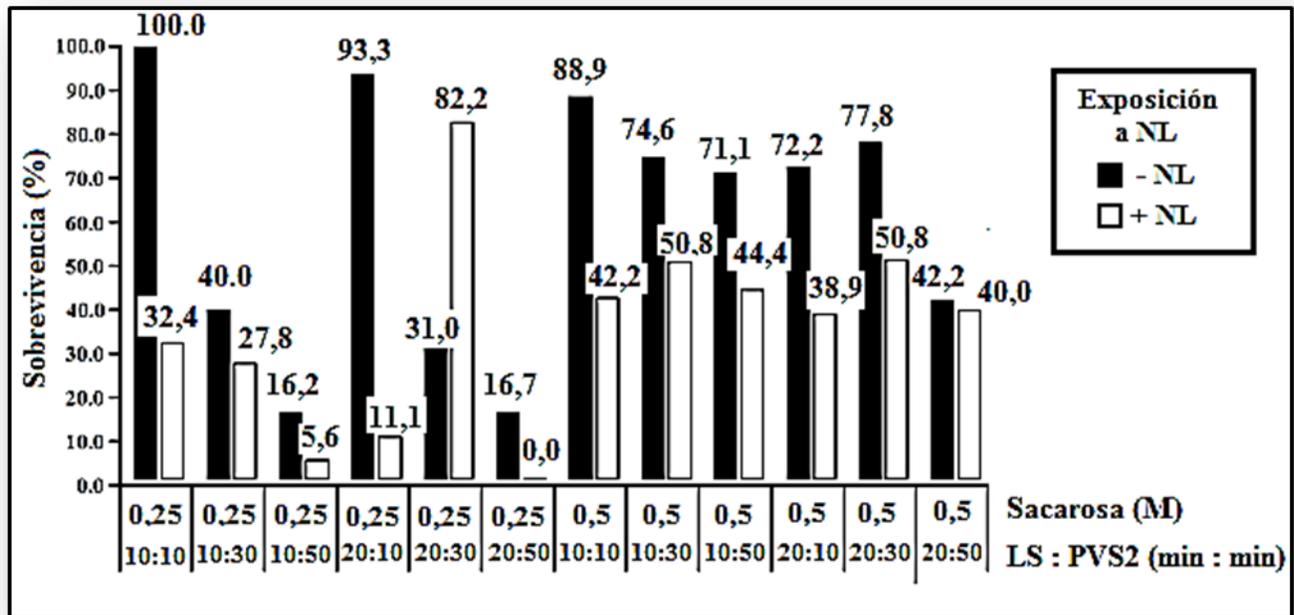


Figura 3. Interacción de los distintos tratamientos de vitrificación en la sobrevivencia de los ápices de uña de gato (*U. tomentosa*) sin congelar (NL-) y congelados en nitrógeno líquido (+NL) después de una semana de cultivo en el medio de recuperación.

Encapsulamiento-deshidratación de ápices

La curva de deshidratación mostró 59,0, 34,5, 22,7, 20,3, 19,3 y 17,0 % de humedad después de 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0 y 5,0 h de deshidratación respectivamente (figura 4).

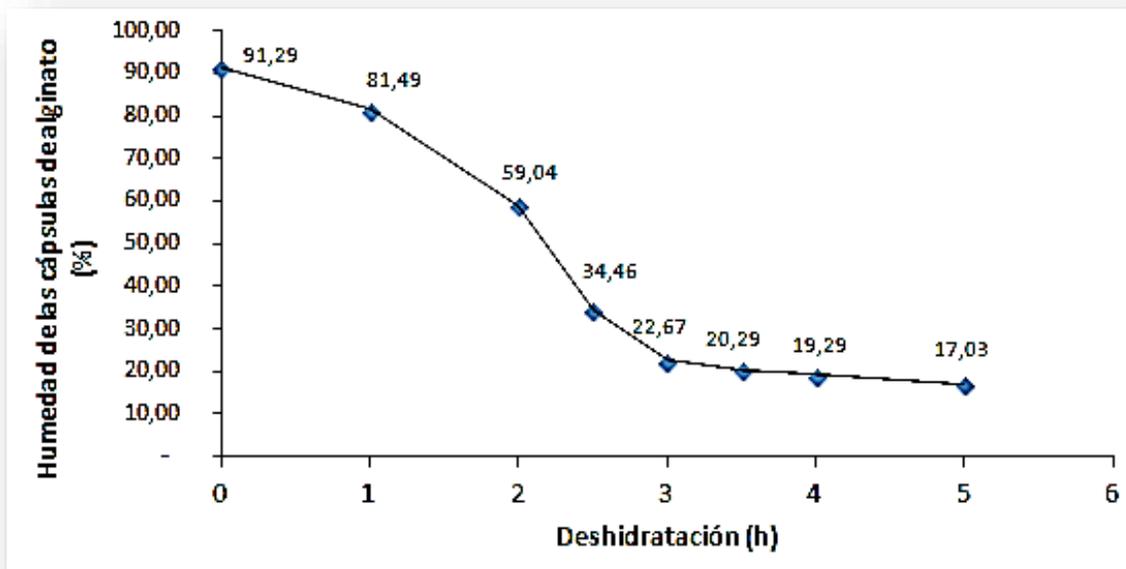


Figura 4. Curva de deshidratación de las cápsulas de alginato utilizando el flujo de aire de una cámara de transferencia.

La sobrevivencia de los ápices después del aislamiento y el encapsulamiento, después de cuatro semanas de cultivo en recuperación, fue de 92,0 % y 94,2 % de sobrevivencia, no presentando diferencias significativas (datos no se muestran).

Cuando los ápices encapsulados fueron precultivados en las concentraciones crecientes de sacarosa (MS + 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7 y 0,8 M) por 24 h en cada concentración, los mayores porcentajes de sobrevivencia y regeneración se observaron en el tratamiento PT4 (MS + 0,3, 0,4, 0,5 y 0,6 M sacarosa por 24 h en cada concentración) y en PT1 (0,3 M por 24 h), alcanzando 78,0 y 71,4 % de sobrevivencia y 78,0 y 40,6 % de regeneración respectivamente (Cuadro 1, Figura 5). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre PT2 (MS + 0,3 y 0,4 M de sacarosa por 24 h en cada una) y PT3 (MS + 0,3, 0,4 y 0,5 M de sacarosa por 24 h en cada una), ni en sobrevivencia ni en regeneración.

Cuadro 1. Supervivencia y regeneración de los ápices encapsulados de uña de gato (*Uncaria tomentosa*) a los tratamientos de precultivo en concentraciones crecientes de sacarosa, después de cuatro semanas de cultivo en el medio de recuperación.

Tratamiento	Supervivencia (%) \pm E.E.*	Regeneración (%) \pm E.E.*
PT1 (MS + 0,3 M sac. 24 h)	71,4 \pm 4,8 ab	40,6 \pm 1,2 bc
PT2 (MS + 0,3 M sac. 24 h + 0,4 M sac. 24 h)	58,1 \pm 4,8 bc	39,1 \pm 1,2 bc
PT3 (MS + 0,3 M sac. 24 h + 0,4 M sac. 24 h + 0,5 M sac. 24 h)	59,5 \pm 4,4 bc	40,7 \pm 1,1 bc
PT4 (MS + 0,3 M sac. 24 h + 0,4 M sac. 24 h + 0,5 M sac. 24 h + 0,6 M sac. 24 h)	78,0 \pm 5,2 ab	78,0 \pm 1,2 a
PT5 (MS + 0,3 M sac. 24 h + 0,4 M sac. 24 h + 0,5 M sac. 24 h + 0,6 M sac. 24 h + 0,7 M sac. 24 h)	40,7 \pm 8,3 b	25,8 \pm 1,2 b
PT6 (MS + 0,3 M sac. 24 h + 0,4 M sac. 24 h + 0,5 M sac. 24 h + 0,6 M sac. 24 h + 0,7 M sac. 24 h + 0,8 M sac. 24 h)	60,7 \pm 8,3 bc	42,3 \pm 1,2 bc

*E.E. Error Estándar. *Medias con una letra común no muestran diferencias significativas ($p < 0,05$).*



Figura 5. Regeneración de los ápices de uña de gato (*Uncaria tomentosa*) encapsulados, y precultivados en (a) PT1 (MS + 0,3 M sacarosa por 24 h), (b) PT2 (MS + 0,3 M + 0,4 M sacarosa por 24 h cada concentración), (c) PT4 (MS + 0,3 M, 0,4 M, 0,5 M, 0,6 M sacarosa por 24 h en cada concentración), después del cultivo por cuatro semanas en el medio de recuperación.

Cuando se determinó el efecto de la deshidratación en los ápices encapsulados fueron elegidos dos periodos, 3 y 3,5 h de desecación que resultaron en 22,7 y 20,3 % de humedad respectivamente. Estos periodos de deshidratación fueron evaluados con los tratamientos

de precultivo PT4, PT1 y PT2 por mostrar sobrevivencia y regeneración altas. En general se observó una disminución en la sobrevivencia y regeneración de los ápices después de la deshidratación. Los controles encapsulados y deshidratados sin el precultivo en sacarosa (PT0) mostraron una disminución en la sobrevivencia y no se observó regeneración de los ápices (Figura 6).

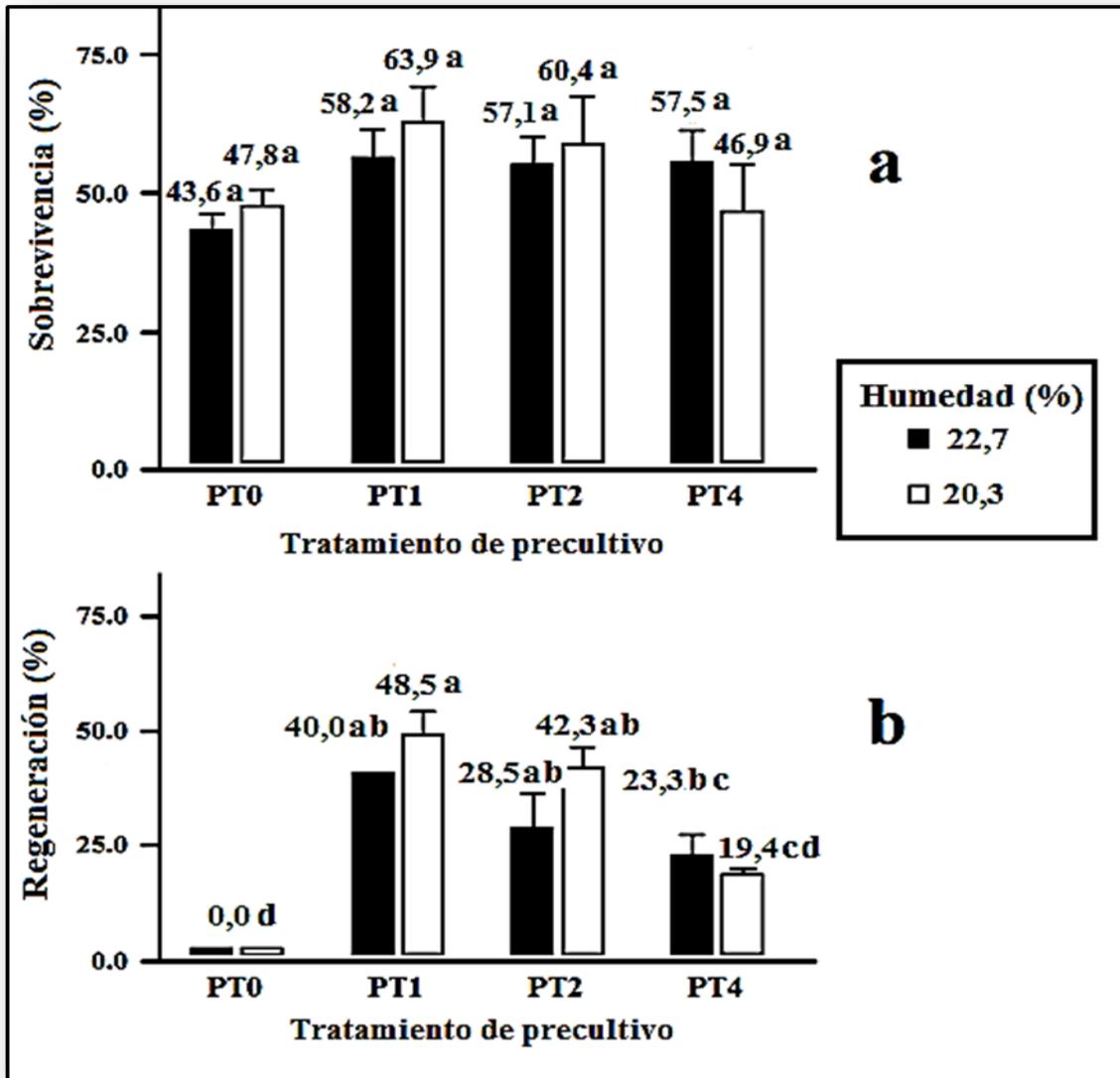


Figura 6. Sobrevivencia y regeneración de los ápices encapsulados de uña de gato (*Uncaria tomentosa*) sin congelar (-NL) después de cuatro semanas de cultivo en el medio de recuperación. Medias con una letra común no muestran diferencias significativas ($p < 0,05$).

Después del congelamiento en NL, los porcentajes de sobrevivencia fueron estadísticamente similares para todos los tratamientos y en los dos contenidos de humedad

evaluados, observándose valores de sobrevivencia entre 31,8 % para PT0 (ápices encapsulados sin precultivo en sacarosa) y 52,8 % de para PT2 (MS + 0,3 M y 0,4 M sacarosa, 24 h cada concentración) (figura 7a). A pesar de la alta sobrevivencia después del congelamiento en NL, los tratamientos presentaron baja regeneración después de las cuatro semanas de cultivo. Los tratamientos que presentaron los mayores porcentajes de regeneración de plantas (10 %) fueron PT2 y PT4 cuando su contenido de humedad fue 22,7 % (figura 7b).

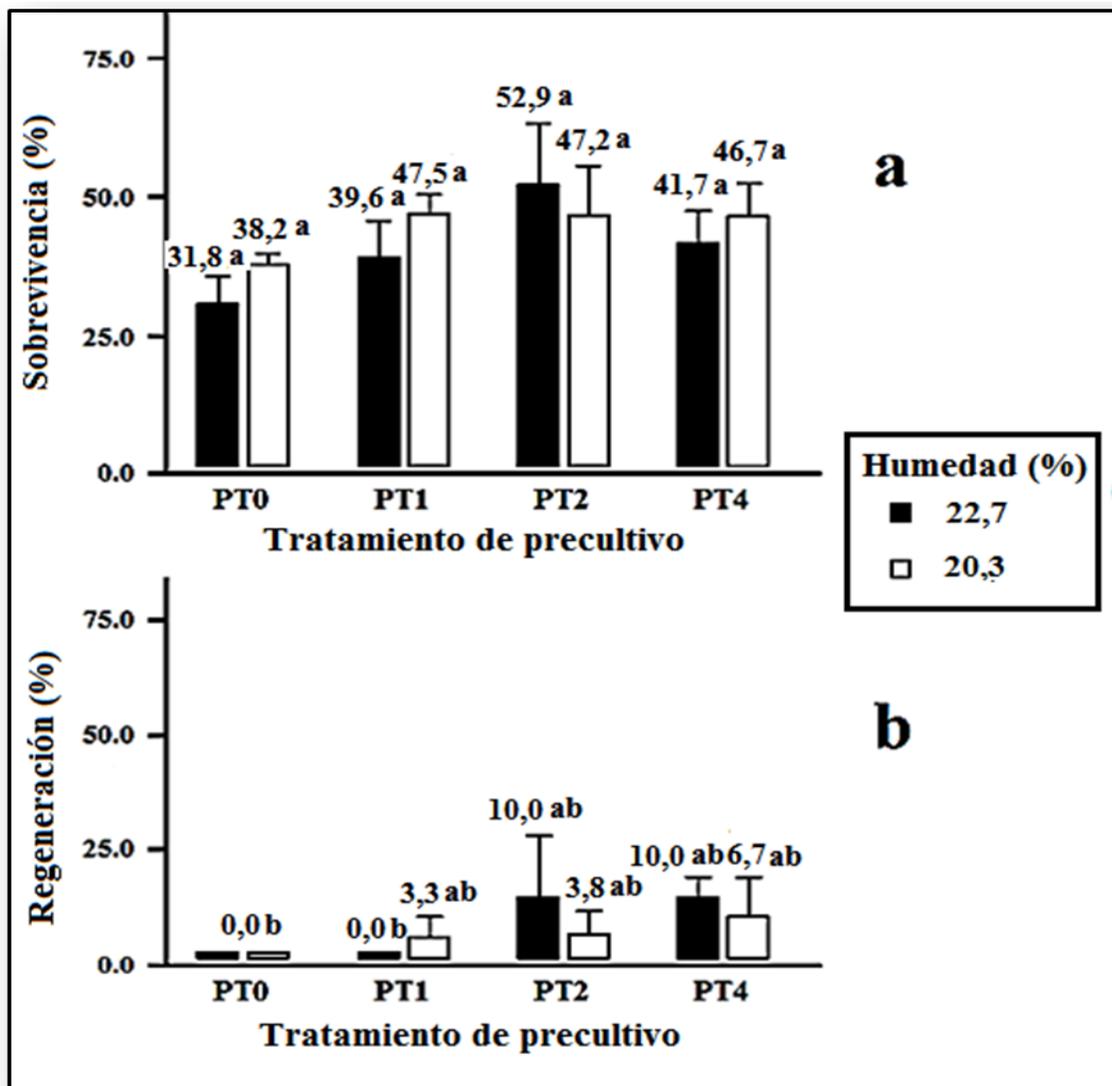


Figura 7. Sobrevivencia y regeneración de ápices encapsulados de uña de gato (*Uncaria tomentosa*) precultivados en sacarosa, desecados en el flujo de aire y congelados en NL (+NL), después de cuatro semanas de cultivo en el medio estándar de recuperación, medias con una letra común no muestran diferencias significativas ($p < 0,05$).

Vitrificación de suspensiones celulares

El tratamiento de precultivo en sacarosa que permitió mayor crecimiento de las células fue 0,50 M sacarosa por 24 h, presentando alta multiplicación de las células en cada uno de los tratamientos ensayados. Cuando se evaluó el porcentaje de sobrevivencia después del congelamiento en NL, previo precultivo en 0,15 M y 0,5 M sacarosa por 24 h y 5 % DMSO por 1 h se observó recrecimiento de callo en 57,14 % de los cultivos en ambos tratamientos. Sin embargo, aquellos callos pretratados con 0,5 M sacarosa mostraron mayor crecimiento de células por cultivo (figura 8). Aquellos tratamientos que incluyeron el precultivo con 0,30 M sacarosa, mostraron una disminución en el porcentaje de sobrevivencia después de la incubación en DMSO y el congelamiento en NL (cuadro 2).



Figura 8. Crecimiento de células de uña de gato (*Uncaria tomentosa*) en medio de recuperación, después del precultivo en sacarosa por 24 h, el pretratamiento con 5 % DMSO por 1 h y el congelamiento en NL. Precultivos en (a) 0,15 M sacarosa, (b) 0,30 M sacarosa, (c) 0,50 M sacarosa. Evaluación realizada después de cuatro semanas en el medio estándar de recuperación.

Cuadro 2. Supervivencia de las células de uña de gato (*Uncaria tomentosa*), como porcentaje de cultivos que formaron callo, después del precultivo en sacarosa, pretratamiento con 5 % DMSO y el congelamiento en nitrógeno líquido.

Tratamiento	Supervivencia (%)
0,15 M sacarosa 24 h	71,43
0,30 M sacarosa 24 h	100,00
0,50 M sacarosa 24h	60,00
0,15 M sacarosa + DMSO 5%	71,43
0,30 M sacarosa + DMSO 5%	25,00
0,50 M sacarosa + DMSO 5%	75,00
0,15 M sacarosa + DMSO 5% + NL	57,14
0,30 M sacarosa + DMSO 5% + NL	25,00
0,50 M sacarosa + DMSO 5% + NL	57,14

Al analizar los porcentajes de supervivencia de las células utilizando la prueba de tinción con azul de Evans (cuadro 3), se observó que el precultivo en las diferentes concentraciones de sacarosa tuvo poco efecto en la disminución de la viabilidad de las células. Sin embargo cuando los precultivos fueron seguidos por el pretratamiento con 5 % DMSO por una hora y el congelamiento en NL el porcentaje de supervivencia disminuyó.

Las pruebas de viabilidad con azul de Evans indicaron que los pretratamientos con 0,15 M sacarosa y 0,5 M sacarosa permitieron los mayores porcentajes de viabilidad. Estos resultados concuerdan con los obtenidos cuando la supervivencia se evaluó como recrecimiento del callo.

Cuadro 3. Promedio del porcentaje de sobrevivencia de las células de uña de gato (*Uncaria tomentosa*) al precultivo en sacarosa, el pretratamiento con 5 % DMSO y congelación en NL, según la prueba de viabilidad con azul de Evans.

Tratamiento	Viabilidad celular \pm DE* (%)
0,15 M sacarosa 24 h	92,33 \pm 6,49
0,30 M sacarosa 24 h	78,46 \pm 13,44
0,50 M sacarosa 24 h	75,85 \pm 0,96
0,15 M sacarosa + DMSO 5 %	73,67 \pm 13,50
0,30 M sacarosa + DMSO 5 %	62,18 \pm 9,47
0,50 M sacarosa + DMSO 5 %	58,38 \pm 7,58
0,15 M sacarosa + DMSO 5 % + NL	30,14 \pm 24,16
0,30 M sacarosa + DMSO 5 % + NL	8,80 \pm 7,53
0,50 M sacarosa + DMSO 5 % + NL	22,05 \pm 5,80

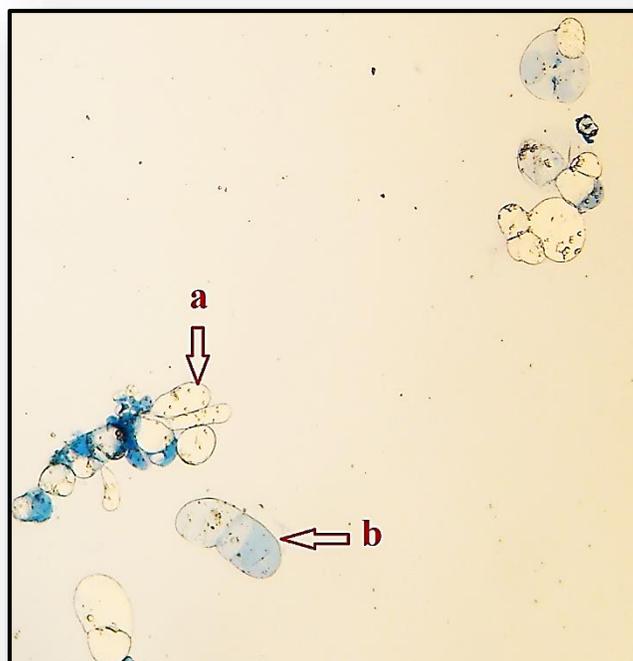


Figura 9. Vista microscópica de células de uña de gato (*Uncaria tomentosa*) teñidas con azul de Evans, donde se muestran las células (a) vivas y (b) muertas, vistas a 10X.

Crioconservación de semillas

El porcentaje de humedad de las semillas provenientes de campo fue en promedio de $8,7 \pm 1,84$ %. La sobrevivencia de las semillas después del congelamiento en NL fue de 89,5 % de germinación.

Cuando se evaluó la metodología de vitrificación, se determinó el impacto de los factores en la sobrevivencia de las semillas mediante un ajuste del modelo lineal general. Los factores con efectos significativos en la sobrevivencia fueron la exposición a la LS por 20 min ($p = 0,0131$) y el tratamiento que incluyó exposición por 10 min a la LS y por 50 min a la PVS2 ($p = 0,0290$). Cuando los tratamientos incluyeron 20 min en la LS la sobrevivencia fue mayor. Por otra parte al exponerlas 50 min a la PVS2 la sobrevivencia decayó indistinto del periodo en la LS (figura 10).

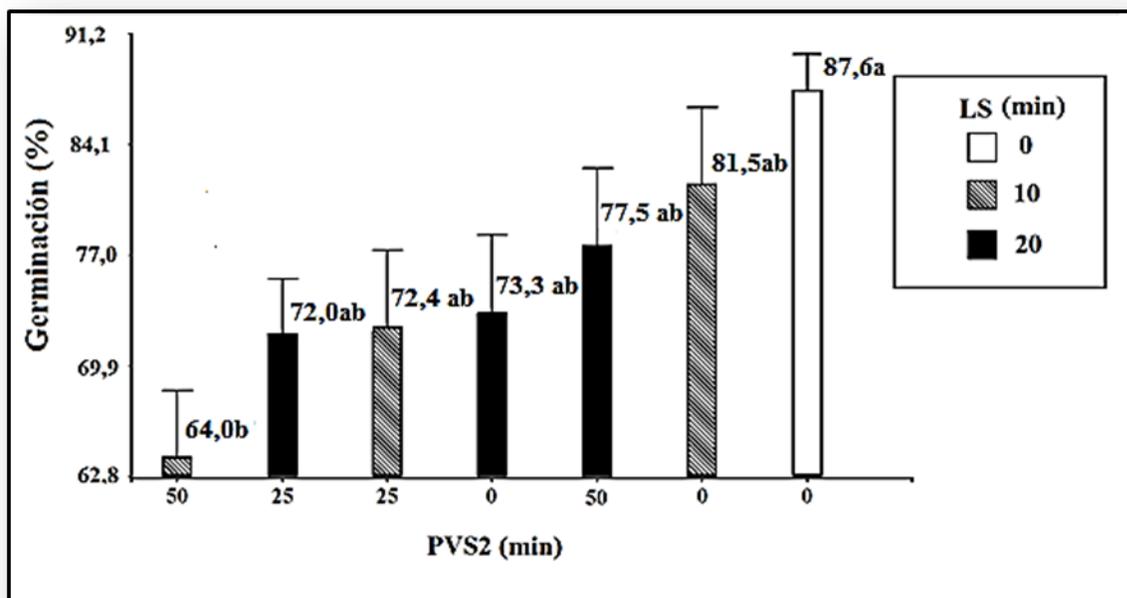


Figura 10. Germinación de las semillas de uña de gato (*Uncaria tomentosa*) a distintos tratamientos de crioprotección aplicando soluciones vitrificadoras. Evaluación realizada luego de seis semanas pos tratamiento.

Las plantas regeneradas después del tratamiento de exposición por 20 min a la LS y por 50 min a la PVS2 mostraron una coloración verde más intensa, además, germinaron en menor tiempo que las regeneradas a partir de semillas tratadas por 10 min en la LS y por 50 min en la PVS2 (figura 11).

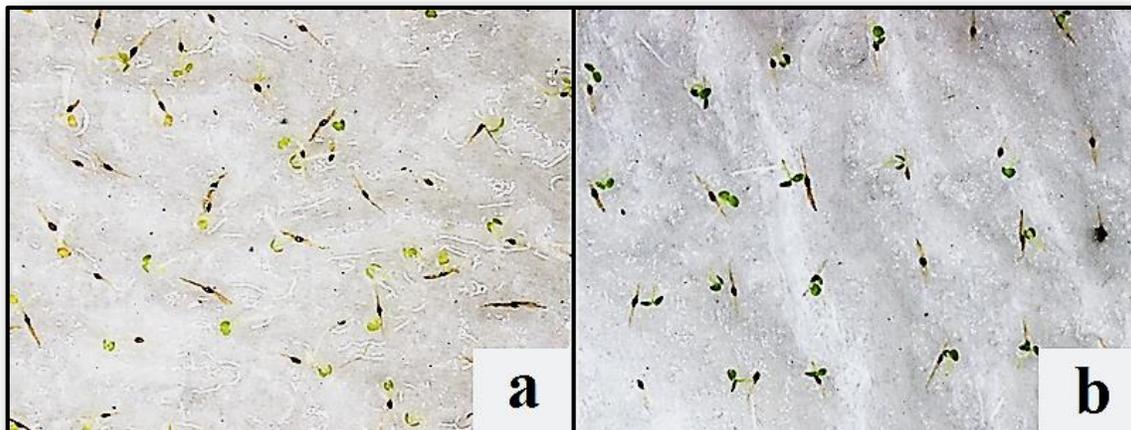


Figura 11. Germinación de las semillas de ña de gato (*Uncaria tomentosa*) en respuesta a los tratamientos de crioprotección: (a) LS por 10 min + PVS2 por 50 min y (b) LS por 20 min + PVS2 por 50 min. Evaluación realizada seis semanas pos tratamiento.

Una vez evaluada la crioprotección se realizó el congelamiento en NL, y se analizó la significancia de los factores mediante el ajuste del modelo lineal general. La incubación en la LS fue también el factor más importante (para 10 min $p = 0,000834$ y para 20 min $p = 0,000651$). Al observar las medias de germinación de los tratamientos empleados, se observó que los mayores porcentajes de germinación se obtuvieron en las semillas congeladas sin ningún tratamiento de crioprotección (89,5 %). Aquellos tratamientos que incluyeron exposición a la LS y a la PVS2 mostraron valores de sobrevivencia significativamente menores después del congelamiento (figura 12).

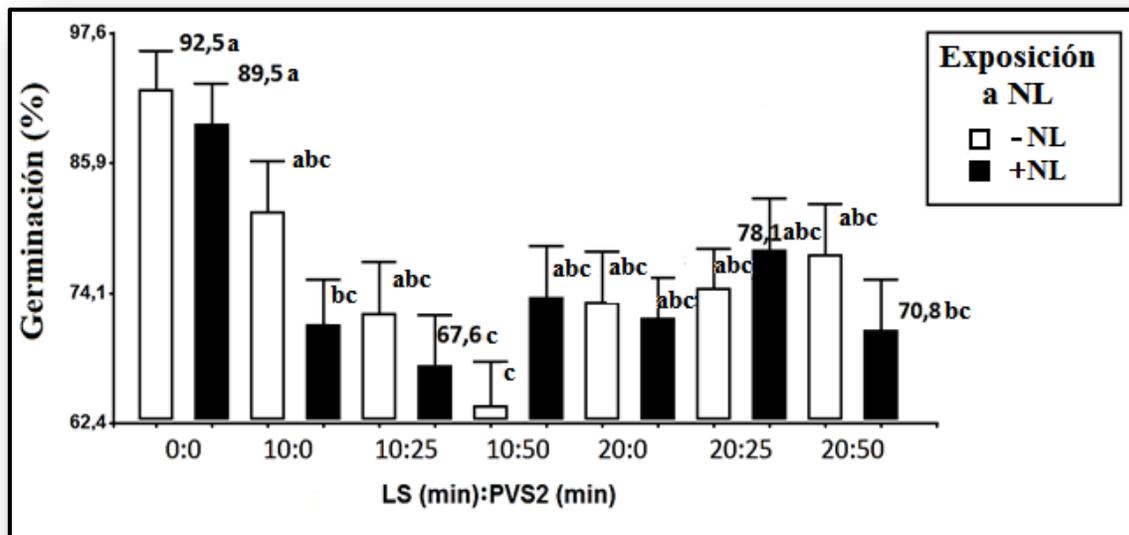


Figura 12. Germinación de las semillas de uña de gato (*Uncaria tomentosa*) a los tratamientos de criopreservación por la técnica vitrificación. Evaluación realizada luego de seis semanas pos tratamiento.

Al evaluar la viabilidad de las semillas por tinción con TTC se realizó una correlación con los datos de sobrevivencia mediante un ajuste de modelo de regresión lineal con el coeficiente de Pearson, y se obtuvo un R cuadrado cercano a 0,0 determinándose que no se presentó correlación entre germinación y viabilidad. Los tratamientos de vitrificación mostraron altos porcentajes de viabilidad en la prueba de tinción, sin embargo las semillas que no recibieron ningún pretratamiento y mostraron un 8,7 % de humedad presentaron porcentajes de viabilidad de 64 % de semillas teñidas, lo que semeja los resultados obtenidos en las pruebas de germinación después del congelamiento rápido en NL sin los tratamientos de vitrificación (cuadro 4).

Cuadro 4. Sobrevivencia de las semillas de uña de gato (*Uncaria tomentosa*) a los tratamientos de crioprotección y congelación en nitrógeno líquido, según la prueba de viabilidad con TTC.

Tiempo de exposición a la LS (min)	Tiempo de exposición a la PVS2 (min)	Exposición a NL	Viabilidad \pm E. E. (%)
0	0	No	74,0 \pm 4,9 b
0	0	Sí	64,0 \pm 4,9 ab
10	0	No	78,0 \pm 4,9 b
10	0	Sí	54,0 \pm 4,9 ab
20	0	No	48,0 \pm 4,9 a
20	0	Sí	64,0 \pm 4,9 ab
10	25	No	68,0 \pm 4,9 ab
10	25	Sí	60,0 \pm 4,9 ab
10	50	No	72,0 \pm 4,9 ab
10	50	Sí	54,0 \pm 4,9 ab
20	25	No	64,0 \pm 4,9 ab
20	25	Sí	70,0 \pm 4,9 ab
20	50	No	62,0 \pm 4,9 ab
20	50	Sí	58,0 \pm 4,9 ab

*E.E. Error Estándar. *Medias con una letra común no muestran diferencias significativas ($p < 0,05$).*

Discusión

Vitrificación de ápices

Los precultivos en sacarosa y la incubación en PVS2 fueron los factores más importantes en este ensayo, ya que como lo señalan Suzuki, Tandon, Ishikawa, & Toyomasu (2008) los compuestos osmóticos poseen la capacidad para transmitir señales que inducen la tolerancia a la deshidratación y por ende obtener una mayor tolerancia al congelamiento. Las concentraciones de 0,25 y 0,50 M de sacarosa por 24 h en cada una, coinciden con las utilizadas por Ching, Anthony, Poobathy, & Subramaniam (2012) al almacenar protocormos de *Dendrobium* spp. en NL por 24 h utilizando la técnica de encapsulamiento-vitrificación.

La sacarosa es el compuesto empleado con más frecuencia como fuente de carbono en los medios de cultivo para el crecimiento de plantas y asimismo es ampliamente utilizado como osmótico en la crioprotección, debido a que estabiliza las membranas celulares y mantiene el turgor en los tejidos (Sharaf, Shibli, Kasrawi, & Baghdadi, 2011).

La incubación en la PVS2 tuvo efectos nocivos sobre los tejidos a congelar, ya que al aumentar los tiempos de exposición a la solución pudieron provocarse daños por excesiva deshidratación e incluso por toxicidad. El problema de la vitrificación radica en la necesidad de controlar los tiempos de exposición y la concentración de los compuestos en estas soluciones vitrificadoras (García, De Fera, & Acosta, 2007).

El DMSO es uno de los componentes más importantes en el proceso al ser un crioprotector penetrante, sin embargo al mismo tiempo posee efectos citotóxicos, por lo cual, se puede considerar la modificación de la composición de la solución vitrificadora, aumentando o disminuyendo las concentraciones de los componentes según se requiera (Quan-Nan *et al.*, 2012; García-Rojas & Abdelnour-Esquivel, 2013; Harding & Benson, 2015).

Después de la vitrificación de los tejidos y el congelamiento se obtuvieron bajas sobrevivencias cuando la exposición de los mismos fue por periodos cortos. Las causas se asignan a varios factores como dificultad de la muestra para alcanzar una tolerancia osmótica adecuada con tiempos bajos. Sin embargo cuando los tiempos se aumentaron la PVS2 alcanzó mayor penetración en las muestras mejorando la eficiencia del proceso de vitrificación, evitando en mayor grado la formación de los cristales de hielo perjudiciales para los tejidos conservados (Scoochi & Rey, 2010).

En este trabajo uno de los mayores efectos en la sobrevivencia se generó debido a las exposiciones a la PVS2, específicamente cuando el tiempo fue de 30 min, al exponer los ápices a periodos más altos los efectos de la solución fueron más bien dañinos. Esto tiene relación con otros trabajos realizados como el de Qiaochum, Laamanen, Uosukainen, & Valkonen (2005), ya que tiempos de exposición a la solución vitrificadora relativamente altos generaron porcentajes de sobrevivencia mayores, sin embargo, cuando los tiempos fueron de hasta más de 300 min al realizar la incubación los efectos también fueron perjudiciales. En este trabajo se determinó que el factor más importante para la crioconservación de *U. tomentosa*, mediante vitrificación es la exposición a las sustancias osmóticas, importantes en la deshidratación y protección de los tejidos a conservar. También es preciso señalar que deben optimizarse los tiempos de exposición a las soluciones, así como también elegir

los componentes de las mismas y su concentración de manera que no resulten tóxicos para los tejidos tratados.

Si bien la PVS2 es la solución vitrificadora más ampliamente utilizada, se recomienda practicar esta técnica utilizando otras soluciones vitrificadoras cuyos componentes sean menos tóxicos, como la PVS3 o la PVS4, o incluso modificando la concentración de sus componentes, principalmente el DMSO.

Asimismo en este trabajo hubo tratamientos para la crioconservación con porcentajes de sobrevivencia de hasta 82,2 %, sin embargo la regeneración fue baja, por lo que es recomendable que en próximos ensayos de este tipo se elija cuidadosamente el medio de regeneración y las condiciones ambientales para este fin, ya que la reanimación del metabolismo se puede facilitar significativamente basándose en estos factores como el aseguramiento de las condiciones de oscuridad, temperatura adecuada o incluso proveer una fase de poscultivo para un correcto reacondicionamiento a las condiciones de baja presión osmótica, que muchas veces ocasiona hiperhidricidad en los tejidos, oxidación u otros efectos adversos.

Encapsulamiento-deshidratación de ápices

Los porcentajes de humedad de 22,7 y 20,3 % (obtenidos con 3 y 3,5 h de deshidratación respectivamente) se encuentran en el rango de humedad recomendado por muchos autores, entre ellos Engelmann (2011) y Peng-Fei *et al* (2011), quienes afirman que el contenido de humedad óptimo de los explantes encapsulados a crioconservar se debe encontrar entre 20 y 30 %. Por esta razón, se infirió que al evaluar la deshidratación por estos periodos ocurrió un adecuado proceso de vitrificación de los contenidos celulares durante el congelamiento, evitando la formación de cristales de hielo letales (Surenciski, Flachslund, Terada, Mroginski, & Rey, 2012).

La deshidratación osmótica tiene una función básica crioprotectora, en procura de una deshidratación paulatina de los tejidos, de manera que los mismos no sufren una pérdida de agua drástica en un periodo de tiempo corto, sino que concentran los solutos en el citoplasma de las células (Mikula, Tomiczak, & Rybczyński, 2011). En el proceso las muestras son colocadas en una solución con una presión osmótica mayor, por lo tanto simultáneamente se difunde agua desde la muestra hacia la solución y soluto hacia la

muestra (Abbasi, Ghaffari, & Bayat, 2012; Kumar, Kumar, & Sharma, 2012). Los agentes con propiedades osmóticas mayormente utilizados son la glucosa, el inositol y la sacarosa, sin embargo; se señala a este último como el mejor agente crioprotector (Day & Stacey, 2007; Burrit, 2008; Qiaochum *et al.*, 2005).

En un estudio realizado por Arias *et al.* (2011), se indicó que al aumentar la concentración del osmótico y el tiempo de exposición al mismo, cuando los meristemas encapsulados aún no son congelados, la sobrevivencia disminuyó desde 100% (0,5 M de sacarosa por 1 día) hasta 3% (0,5 M de sacarosa por 5 días). Este comportamiento es similar al mostrado en la presente investigación, ya que el tratamiento que mostró mayores sobrevivencias en los ensayos de precultivo fue al realizarlo en 0,3 M de sacarosa por 24 h.

Aunque la sacarosa tiene una función importante en la crioprotección, algunos tratamientos pueden resultar nocivos, ya sea por las concentraciones o por los tiempos de exposición en los distintos medios de precultivo. Las concentraciones elevadas de sacarosa pueden aumentar la formación de compuestos fenólicos en los explantes y promover el marchitamiento de los mismos vía oxidación, lo que causa una disminución en la sobrevivencia (Poobathy *et al.*, 2013).

El porcentaje de humedad es importante a nivel celular para el ordenamiento de los fosfolípidos y la conformación de las proteínas, sin embargo durante el congelamiento en NL, un contenido de humedad fisiológico puede producir cristales de hielo letales, tanto en el congelamiento como en el descongelamiento (Day y Stacey, 2007; Gogoi, Kumaria, & Tandon, 2013). Los porcentajes de humedad evaluados permitieron sobrevivencias aceptables, no así porcentajes de regeneración, y esto fue coherente con lo registrado en la investigación de Gupta & Reed (2006) en la crioconservación de mora y frambuesa, que encontraron una correlación inversa entre la sobrevivencia de los ápices encapsulados y el contenido de humedad en el rango desde 26 hasta 20 %.

Quiaochum *et al.* (2005) señalan que el aumento en la sobrevivencia se debe a que los precultivos con elevadas concentraciones de un osmótico incrementan la concentración de proteínas solubles y azúcares en los tejidos tratados, facilitando la vitrificación de los contenidos intracelulares al bajar la temperatura. Se consideró que los resultados se debieron a que el periodo de exposición y la concentración de sacarosa u otros osmóticos usados como aditivos para estimular la adaptación y resistencia al frío, siempre requieren

una optimización genotipo-específica (Day y Stacey, 2007) por lo que en cada especie se deben evaluar múltiples variaciones en los ensayos de precultivo.

A través del establecimiento de la curva de deshidratación de las cápsulas fue posible relacionar los tiempos de deshidratación con los porcentajes de humedad de las cápsulas, con lo que se pudo identificar el rango de humedad óptimo recomendado para el congelamiento de los meristemos encapsulados, desde aproximadamente tres hasta tres y media horas de deshidratación. Existe suficiente evidencia (reflejada en los porcentajes de sobrevivencia al congelamiento) para afirmar que en uña de gato el rango de humedad evaluado fue adecuado, infiriendo que se dio un adecuado proceso de vitrificación de los contenidos celulares durante el congelamiento, evitando la formación de los cristales de hielo letales.

Comparado con la regeneración de meristemos desnudos, se confirmó que el encapsulamiento no tuvo un efecto adverso en su regeneración. También se pudo observar el efecto potenciador del cultivo de los meristemos encapsulados en concentraciones crecientes de sacarosa, así como la deshidratación en el flujo de aire estéril, en su sobrevivencia al congelamiento en nitrógeno líquido.

Se recomienda evaluar algunos tratamientos en la etapa de recuperación, como el cultivo en concentraciones decrecientes de sacarosa y modificaciones en los componentes del medio de recuperación. Es importante también en ensayos posteriores la extracción de los meristemos de las cápsulas de alginato de calcio para facilitar la regeneración.

Vitrificación de suspensiones celulares

Las células aumentan de tamaño debido principalmente a la elongación, resultado del ingreso de agua y el consecuente aumento de la presión de turgencia (Azcon, 2008). Una célula con estas características tendría una baja posibilidad de sobrevivencia al congelarse, ya que al poseer gran cantidad de agua se propicia el congelamiento intracelular y por consiguiente el estrés osmótico al ser congeladas y descongeladas. El hielo intracelular forma cristales que pueden producir daños mecánicos dentro de la célula, mientras que el estrés osmótico produce un desequilibrio del agua disponible en el citoplasma (Woods, Benson, Agca, & Crister, 2004).

En estudios realizados en mandarina (*Citrus deliciosa*) por Aguilar, Engelmann, & Michaux-Ferriere (1993) definieron que el mejor momento para tomar muestras de suspensiones celulares para criopreservar fue al comienzo de la fase exponencial a los 8-10 días luego del último subcultivo, al igual que lo realizado en esta investigación. De la misma manera lo hicieron Kobayashi, Niino, & Kobayashi (2005) en Tabaco (*Nicotiana tabacum*).

Tanto la sobrevivencia como la proliferación de las células criopreservadas varían según la mezcla y concentraciones de crioprotectores utilizados durante el pretratamiento. Según Aguilar *et al.* (1993), emplear una mezcla de dos crioprotectores tiene un mayor efecto que utilizar uno solo, la combinación de sacarosa y DMSO ha mostrado muy buenos resultados ya que presentan una buena interacción, mientras que la sacarosa promueve una rápida deshidratación de la célula, el DMSO impide la formación de cristales de hielo que pueden romper la membrana. Ávila *et al.* (2006) indicaron que un crioprotector no penetrante como la sacarosa, suele utilizarse en asociación con un crioprotector penetrante como el DMSO. Además se ha demostrado en varios estudios que la mezcla de estos dos crioprotectores es muy eficiente (Kobayashi *et al.*, 2005).

En el presente estudio se utilizó DMSO en una concentración del 5%, ya que es un agente citotóxico y en concentraciones de aproximadamente 15% es sumamente tóxico para las células (Aguilar *et al.*, 1993). Por lo tanto se utilizó una baja concentración para así evitar la pérdida por destrucción de las células a causa del crioprotector. La principal función de la sacarosa es deshidratar la célula para evitar la generación de cristales de hielo intracelulares, y aunque se debe tener cuidado con la concentración utilizada, Day y Stacey (2007) indican que el periodo de exposición, la concentración de sacarosa u otros osmóticos usados como aditivos para estimular la adaptación al frío, siempre requieren de una optimización genotipo-específica, por lo que es imperativo evaluar en cada especie diversas concentraciones y tiempos de exposición del osmótico en los ensayos de precultivo.

Si el medio extracelular es altamente hipertónico por la mayor concentración de soluto, se provoca que la célula pierda agua debido a la presión osmótica, si la concentración es muy alta la célula puede sufrir plasmólisis provocando que la membrana plasmática se separe de pared celular y por ende la muerte celular por deshidratación extrema, si la célula llega a un 30% de deshidratación se llega a un punto donde el proceso es irreversible (Devireddy, Swanlund, Roberts, Pryor, & Bischof, 2000). Contrario a los resultados del presente trabajo, en *Coffea arabica* perteneciente a la misma familia de la *Uncaria tomentosa* se encontró

que la relación de 5% DMSO y 0,15 M de sacarosa es la mejor combinación (Hermoso & Méndez, 2000), lo mismo han establecido Aguilar *et al* (1993) en *Citrus deliciosa*.

El colorante utilizado conocido como azul de Evans permite diferenciar las células vivas de las muertas, esto por medio de la permeabilidad selectiva de las células, mientras estas se encuentren con vida no permiten el paso de colorante a su interior ya que este no puede atravesar la membrana celular, pero al morir las células o encontrarse dañadas pierden su selectividad y el tinte entra a la célula, así cuando se mostraron con una coloración azulada las células se encontraron muertas, mientras si no estuvieron coloreadas aún, pudo inferirse que se encontraron viables (Hamer, McGeachie, Davies, & Grounds, 2002).

Por otra parte, cabe señalar que si bien las células que fueron precultivadas con 0,50 M de sacarosa presentaron porcentajes de viabilidad menores, se puede explicar una mejor regeneración de callo en este tratamiento en el hecho de que la gran mayoría de las células viables al momento de congelarse se encontraron bien preparadas para los eventos de congelamiento y descongelamiento, por lo que la calidad de los callos que se sometieron a la crioconservación con 0,50 M de sacarosa en su precultivo siempre fue mayor, en comparación con los callos que se regeneraron cuando las células congeladas pasaron por alguno de los otros precultivos.

La calidad de las suspensiones celulares está sujeta a la calidad de los callos a trabajar ya que si estos no son friables y presentan raíz es posible que su crecimiento o comportamiento sea errático, si por el contrario el callo es friable su fácil disgregación genera suspensiones celulares homogéneas.

El pretratamiento que brindó los mejores resultados fue la mezcla de los crioprotectores DMSO al 5 % y 0,50 M de sacarosa, pese a esto, los otros dos mostraron sobrevivencia y no hubo una pérdida total de sobrevivencia en ninguna de las muestras. Cabe mencionar también que el descongelamiento tiene que hacerse rápidamente en agua tibia a una temperatura constante de 40 °C y de mejor manera un criovial a la vez para así obtener un descongelamiento uniforme y más rápido.

Finalmente, el uso de papel filtro en las placas Petri a la hora de colocar las células en medio de regeneración de callo fue de gran ayuda ya que permitió drenar el remanente de

DSMO, que es el componente más tóxico para las células en este ensayo y especialmente a temperatura ambiente.

Crioconservación de semillas

La sensibilidad a la desecación de los tejidos vegetales es el factor crítico para el éxito en la crioconservación y la respuesta a la desecación de órganos como las semillas es determinada por las características intrínsecas de las mismas, que las clasifica en recalcitrantes, intermedias y ortodoxas (Omar, Al Zoubi, & Normah, 2015). En el presente estudio fue determinado que el porcentaje de humedad de las semillas de *U. tomentosa* se encontraba aproximadamente en 8,7 %, por lo cual se puede inferir que las mismas se clasifican como ortodoxas, pudiendo alcanzar rangos de hasta 1 a 5 % de humedad y bajas temperaturas para el almacenamiento sin presentar daños significativos (Mendez-Ferreira, Covarrubias-Robles, & Beltrán-Peña, 2013).

En el ensayo de vitrificación, la exposición por 20 min a la LS el principal aporte en la sobrevivencia, resultados similares a los reportados por Haeng-Hong *et al.* (2010), quienes al realizar un ensayo para determinar la mejor composición de la LS y el tiempo de exposición más adecuado a la misma en *Rubia akane*, encontraron que el tiempo óptimo para realizar este paso en el proceso de crioconservación se encuentra entre 20 y 30 min. Al comparar los resultados de este trabajo con los obtenidos en la investigación realizada por Prada *et al.* (2015) para crioconservación de semillas y embriones de *Jatropha curcas* se puede notar que de la misma manera el tratamiento vitrificador tuvo efectos adversos en la crioconservación, mientras que las semillas únicamente sometidas a deshidratación presentaron mayor sobrevivencia y mejor desarrollo.

En el presente estudio, el tratamiento con mayor sobrevivencia fue el que incluyó una exposición por 25 min a la PVS2, mientras que una exposición por 50 min más bien ocasionó un descenso en la germinación a la hora de congelar las semillas. Un comportamiento similar mostró el trabajo realizado por Osorio *et al.* (2011) en la crioconservación de ápices de crisantemo mediante vitrificación, donde al realizar la exposición por más de 30 min a la solución vitrificadora empleada en cada tratamiento la sobrevivencia disminuyó significativamente. Por último fue realizada una determinación de la viabilidad de las semillas como una medida de la capacidad germinativa, utilizando la tinción por reducción de TTC y aunque no se logró correlación entre los datos de

sobrevivencia y los datos de viabilidad, se pudo confirmar que el tratamiento con mejores resultados fue el mencionado anteriormente.

Según lo afirmado por Sakai *et al.* (1990), la PVS2 es una solución vitrificadora que previene efectivamente la formación de cristales de hielo durante la crioconservación y esto ha sido comprobada por numerosos estudios en muchas especies como en los trabajos de Suranthran *et al.* (2012) en palma aceitera, Fernandes *et al.* (2014) en *Dendrobium* spp. y Panta *et al.* (2015) en papa, entre otras especies. Sin embargo, debe prestarse especial atención a los tiempos de exposición a las soluciones vitrificadoras, ya que en la composición de las mismas se encuentran sustancias que en altas concentraciones presentan toxicidad para los tejidos tratados, además se puede presentar una excesiva deshidratación, desencadenamiento de procesos de oxidación, entre otros efectos nocivos (García, De Fera, & Acosta, 2007; González-Arno & Engelmann, 2013).

Al practicar la técnica de vitrificación en las semillas de *U. tomentosa* se determinó primeramente que el porcentaje de humedad se encontraba en 8,7 % aproximadamente, sin recibir ningún tratamiento de deshidratación, por lo cual se puede inferir que la especie presenta un comportamiento ortodoxo al almacenamiento. Al someterlas por diferentes periodos a la LS y a la PVS2 se llegó a la conclusión de que los tratamientos de vitrificación presentan más bien efectos negativos en las mismas, es así que es mucho más recomendable la técnica de deshidratación para realizar la crioconservación de la especie utilizando semillas.

Se determinaron también los efectos de los tiempos de exposición a la LS y PVS2, encontrándose que el mayor impacto positivo en la sobrevivencia fue la exposición por 20 min a la LS, mientras que el mejor tiempo de exposición a la PVS2 fue 25 min resultando esta combinación en el mayor porcentaje de germinación luego del congelamiento.

Asimismo se ensayó la tinción de las semillas con TTC para determinar la viabilidad de las mismas luego de cada paso en el proceso de crioconservación, y no se logró correlación con la sobrevivencia, por lo que se presume que la tinción no fue un buen parámetro, posiblemente por una mala ejecución de la misma o porque las semillas perdieron viabilidad en el proceso de germinación. Puede considerarse adicionalmente que previo a incluir los resultados de este análisis debe estandarizarse la técnica.

Literatura citada

- Abbasi, B., Ghaffari, A., & Bayat, Y. 2012. Mathematical modeling of moisture and solute diffusion in the cylindrical green bean during osmotic dehydration in salt solution. *Food and Bioproducts Processing*, 90: 64-71. doi:10.1016/j.fbp.2010.11.015
- Aguilar, J., Rojas, P., Marcelo, A., Plaza, A., Bauer, R., Reininger, E., Merfort, I. 2002. Anti-inflammatory activity of two different extracts of *Uncaria tomentosa* (Rubiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 81: 271-276.
- Aguilar, M., Engelmann, F., & Michaux-Ferriere, N. 1993. Cryopreservation of cell suspensions of *Citrus deliciosa* Tan and histological study. *CryoLetters*, 14: 217-228.
- Alvarenga, S. (2010). Establecimiento in vitro y cultivo de células de la Uña de Gato (*Uncaria tomentosa*) (Willd). D.C. *Tecnología en Marcha*, 23(5): 24-33.
- Arias, M., Frattarelli, A., Sgueglia, A., Condello, E., Damiano, C., & Caboni, E. 2011. Cryopreservation of white mulberry (*Morus alba* L.) by encapsulation-dehydration and vitrification. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 108: 167-172. doi:10.1007/s11240-011-0017-5
- Ávila, L., Madero, J., López, C., León, M., Acosta, L., Gómez, C., & Delgado, L. 2006. Fundamentos de criopreservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 54(4): 291-300.
- Azcon, J. 2008. *Fundamentos de Fisiología Vegetal* (2 ed.). España: McGraw-Hill/Interamericana de España, S.A.
- Barnicoat, H., Cripps, R., Kendon, J., & Sarasan, V. 2011. Conservation in vitro of rare and threatened ferns-case studies of biodiversity hotspot and island species. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant*, 47: 37-45. doi:10.1007/s11627-010-9303-x
- Burrit, D. 2008. Efficient cryopreservation of adventitious shoots of *Begonia x erythrophylla* using encapsulation-dehydration requires pretreatment with both ABA and proline. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 95: 209-215. doi:10.1007/s11240-008-9434-5
- Caon, T., Kaiser, S., Feltrin, C., de Carvalho, A., Marques, T., González Ortega, G., & Oliveira Simoes, C. 2014. Antimutagenic and antitumor activities of different preparations from *Uncaria tomentosa* (cat's claw). *Food and Chemical Toxicology*, 66: 30-35. doi:10.1016/j.fct.2014.01.013
- Ching, L., Anthony, J., Poobathy, R., & Subramaniam, S. 2012. Encapsulation-vitrification of *Dendrobium sonia*-28 supported by histology. *Plant OMICS*, 5(4): 345-350.

- Cruz Cruz, C., González-Arno, M., & Engelmann, F. 2013. Biotechnology and Conservation of Plant Biodiversity. *Resources*, 2: 73-95.
- Day, J., & Stacey, G. (Eds.). 2007. *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*. New Jersey, USA: Humana Press.
- Devireddy, R., Swanlund, D., Roberts, K., Pryor, J., & Bischof, J. 2000. The effect of extracellular ice and cryoprotective agents on the water permeability parameters of human sperm plasma membrane during freezing. *Hum Reprod*, 15: 25-35.
- Díaz, C., & Vargas, M. 2012. Estudio de validación preclínica del uso tradicional anti-tumoral de *Uncaria tomentosa* (Uña de Gato). *Revista Médica de la Universidad de Costa Rica*, 6(1): 24-31.
- Dietrich, F., Kaiser, S., Rokenbach, L., Figueiró, F., Scussel, L., Monte da Cunha, F., . . . Oliveira, A. 2014. Quinovic acid glycosides purified fraction from *Uncaria tomentosa* induces cell death by apoptosis in the T24 human bladder cancer cell line. *Food and Chemical Toxicology*, 67: 222-229. doi:doi:10.1016/j.fct.2014.02.037
- Engelmann, F. 2011. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant*, 47: 5-16. doi:DOI 10.1007/s11627-010-9327-2
- Fabre, J., & Dereuddre, J. 1990. Encapsulation Dehydration - a new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot-tips. *CryoLetters*, 11: 413-426.
- Feria, I., Lazo, E., Ponce, T., Cerda, C., & Ramos, A. 2005. Induced accumulation of oleanolic acid and ursolic acid in cell suspension cultures of *Uncaria tomentosa*. *Biotechnology Letters*, 27: 839-843. doi:10.1007/s10529-005-6215-7
- Fernandes, R., Macedo, E., de Faria, R., & Vendrame, W. 2014. Seedling development and evaluation of genetic stability of cryopreserved *Dendrobium* hybrid mature seeds. *Appl Biochem Biotechnol*, 172: 2521-2529.
- Flores, I., Ortega, J., Montes, M., & Ramos, A. 2002. Biosynthesis of sterols and triterpens in cell suspension cultures of *Uncaria tomentosa*. *Plant Cell Physiol*, 43(12): 1502-1509.
- Gamborg, O., Miller, R., & Ojima, K. 1968. Nutrients requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50(1): 151-168. doi:10.1015/0014-4827(68)90403-5
- García, L., De Feria, M., & Acosta, K. 2007. Aspectos básicos de la conservación in vitro de germoplasma vegetal. *Biología Vegetal*, 7(2): 67-79.

- García-Rojas, T., & Abdelnour-Esquivel, A. 2013. Crioconservación de ápices y semillas de cedro (*Cedrela odorata* L.) mediante las técnicas de vitrificación y deshidratación. *Agronomía Costarricense*, 37(1): 113-126.
- Gogoi, K., Kumaria, S., & Tandon, P. 2013. Cryopreservation of *Cymbidium eburneum* Lindl. and *C. hookerianum* Rchb. f., two threatened and vulnerable orchids via encapsulation dehydration. *In Vitro Cell.Dev.Biol. Plant*, 49: 248-254. doi:10.1007/s11627-013-9505-0
- González-Arno, M., & Engelmann, F. 2013. Consideraciones teóricas y prácticas para la crioconservación de germoplasma vegetal. In M. González-Arno, & F. Engelmann (Eds.), *Crioconservación de plantas en América Latina y el Caribe* (pp. 38-51). San José: IICA.
- González-Arno, M., & Engelmann, F. 2013. Introducción a la conservación ex situ de los recursos genéticos vegetales. In M. González-Arno, & F. Engelmann (Eds.), *Crioconservación de plantas en América Latina y el Caribe* (pp. 39-48). San José, Costa Rica: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura.
- Gupta, S., & Reed, B. 2006. Cryopreservation of shoot tips of blackberry and raspberry by encapsulation-dehydration and vitrification. *CryoLetters*, 27(1): 29-42.
- Haeng-Hong, K., Popova, E., Jung-Yoon, Y, Gyu-Taek, C., Sang-Un, P., Sheong-Chun, L., & Engelmann, F. 2010. Cryopreservation of hairy roots of *Rubia akane* (Naka) using a droplet-vitrification procedure. *CryoLetters*, 31(6): 473-484.
- Hamer, P., McGeachie, J., Davies, M., & Grounds, M. 2002. Evans blue dye as an in vitro marker of myofibre damage: optimising parameters for detecting initial myofibre membrane permeability. *J Anat.*, 200(1), 69-79. doi:10.1046/j.0021-8782.2001.00008.x
- Harding, K., & Benson, E. 2015. Writing standar operating procedures (SOPs) for cryostorage protocols: using shoot meristem cryopreservation as an example. *Methods in molecular biology*, 1257: 431-456.
- Hermoso, L., & Méndez, A. 2000. Multiplicación masiva del café (*Coffea arabica* L. cv. Catimor) mediante el cultivo de suspensiones celulares embriogénicas. *Acta Científica Venezolana*, 51: 90-95.
- Huerta, A., Marín, R., Ponce, T., Cerda, C., Trejo, G., & Ramos, A. 2009. Effect of oxidative stress on the alkaloid production in *Uncaria tomentosa* root cultures. *Engineering in Life Sciences*, 9(3): 211-218.

- International Seed Testing Association (ISTA). 2008. International Ruler for Seed Testing: The germination test. *Seed Science and Technology*, p. 7.
- Keller, J., & Senula, A. 2010. Cryopreservation of plant Germplasm. In M. Davey, & P. Anthony, *Plant Cell Culture: Essential Methods* (pp. 131-151). Oxford, England: Wiley-Blackwell.
- Kobayashi, T., Niino, T., & Kobayashi, M. 2005. Simple cryopreservation protocol with an encapsulation technique for tobacco BY-2 suspension cell cultures. *Plant Biotechnology*, 22(2): 105-112.
- Kumar, V., Kumar, G., & Sharma, P. 2012. Osmotic dehydration of litchi pulp as a pretreatment for drying processes. *Agric Eng Int: CIGR Journal*, 14(3): 146-151. doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Mendez-Ferreira, G., Covarrubias-Robles, A., & Beltrán-Peña, E. 2013. Procesos moleculares involucrados en la protección de las semillas a la desecación. *Biológicas*, 15(2): 42-48.
- Mikula, A., Tomiczak, K., & Rybczyński, J. 2011. Cryopreservation enhances embryogenic capacity of *Gentiana cruciata* (L.) suspension culture and maintains (epi)genetic uniformity of regenerants. *Plant Cell Rep*, 30: 565-574. doi:10.1111/j1399-3054.1962.tb08052.x
- Murashige, T., & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3): 473-497. doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
- Omar, M., Al Zoubi, M., & Normah, N. 2015. Critical moisture content for successful cryopreservation of embryonic axes of *Fortunella polyandra* determined by differential scanning calorimetry (DSC). *Acta Physiol Plant*, 37. doi:10.1007/s11738-014-1727-1
- Osorio, A., Mascorro, J., Rodríguez, J., Melchor, C., & González, M. 2011. Crioconservación de ápices de crisantemo (*Dendranthema grandiflorum* Kitam) por encapsulación-deshidratación y vitrificación. *Rev. Chapingo Ser.Hortic*, 17(spe2): 33-43.
- Panta, A., Panis, B., Ynouye, C., Swennen, R., Roca, W., Tay, D., & Ellis, D. (2015). Improved cryopreservation method for the long-term conservation of the world potato germplasm collection. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 120, 117-125.
- Pence, V., Winget, G., Lindsey, K., Plair, B., & Charls, S. 2009. *In vitro* propagation, cryopreservation, and genetic analysis of the endangered *Hedeoma todosenii* (Lamiaceae). *Madroño*, 56(4): 221-228.

- Peng-Fei, A., Li-Ping, L., & Jian-Jun, S. 2011. Cryopreservation of in vitro-grown shoot-tips of *Rapsodia rubescens* by encapsulation-dehydration and evaluation of their genetic stability. *Plant Cell Organ Cult*, 108(3): 381-387. doi:10.1007/s11240-011-0049-x
- Pilarski, R., Filip, B., Wietrzyk, J., Kuras, M., & Gulewicz, K. 2010. Anticancer activity of the *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. preparations with different oxindole alkaloid composition. *Phytomedicine*, 17(14): 1133-1139.
- Poobathy, R., Xavier, R., Sinniah, U., & Subramaniam, S. 2013. Molecular stability of protocorm-like bodies of *Dendrobium Sonia-28* after encapsulation-dehydration and vitrification. *Australian Journal of Crop Science*, 7(2): 189-195.
- Prada, J., Aguilar, M., Abdelnour-Esquivel, A., & Engelmann, F. 2015. Cryopreservation of seeds and embryos of *Jatropha curcas* L. *American Journal of Plant Sciences*, 6: 172-180.
- Qiaochun, W., Laamanen, J., Uosukainen, M., & Valkonen, M. 2005. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of raspberry (*Rubus idaeus* L.) by encapsulation-vitrification and encapsulation-dehydration. *Plant Cell Rep*, 24: 280-288. doi:10.1007/s00299-005-0936-x
- Quan-Nan, Z., Ai-Hua, S., Zhe, L., Yu-Wei, H., Ze-Hai, J., Tian-Dai, H., . . . Hua-Sun, H. 2012. Cryopreservation and plant regeneration of anther callus in *Hevea* by vitrification. *African Journal of Biotechnology*, 11(28): 7212-7217. doi:10.5897/AJB12.258
- Sakai, A., Kobayashi, S., & Oiyama, I. 1990. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Rep* 9: 30-33.
- Scoochi, A., & Rey, H. 2010. Conservación de germoplasma in vitro. In G. Levitus, V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hoop, & L. Mroginski (Eds.), *Biología y Mejoramiento Vegetal II Argentina* (pp. 179-185). Buenos Aires: Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
- Sharaf, S., Shibli, M., Kasrawi, S., & Baghdadi, S. 2011. Cryopreservation of wild *Shih* (*Artemisa herba-alba* Asso.) shoot-tips by encapsulation-dehydration and encapsulation-vitrification. *Plant Cell Tissue Org Cult*.
- Somer, J., Evans, G., & Shwartz, C. 1972. Influence of experimental aortic coarctation on the pattern of aortic Evans blue uptake in vivo. *Atherosclerosis*, 16: 127-133.
- Sonwa, D., Weise, S., Nkongmeneck, A., Nwaga, D., Zapfack, L., Nzoo, L., & Janssens, M. 2005. Potential contributions of biotechnologies in the management and

- conservation of forest resources of the Congo basin. *International Forestry Review*, 7(1): 59-62.
- Stemponkus, P., & Lamphear, F. (1967). Refinement of the triphenyl tetrazolium chloride method of determining cold injury]. *Plant Physiol.* 42: 1423-1426.
- Suranthran, P., Gantait, S., Sinniah, U., Subrammiam, S., Alwee, S., & Roowi, S. 2012. Effect of loading and vitrification solutions on survival of cryopreservation oil palm polyembroids. *Plant Growth Regul*, 66: 101-109.
- Surenciski, M., Flachslan, E., Terada, G., Mroginski, L., & Rey, H. 2012. Cryopreservation of *Cyrtopodium hatschbachii* Pabst (Orchidaceae) immature seeds by encapsulation-dehydration. *BIOCELL*, 36(1): 31-36.
- Suzuki, M., Tandon, P., Ishikawa, M., & Toyomasu, T. 2008. Development of a new vitrification solution, VSL, and its application to the cryopreservation of gentian axillary buds. *Plant Biotechnology Reports*, 2(2): 123-131. doi:10.1007/s11816-008-0056-5
- Wang, Z., & Deng, X. 2004. Cryopreservation of shoot tips of Citrus using vitrification: effect of reduced form of glutathione. *Cryo-Letters*, 25: 51-58.
- Woods, E., Benson, J., Agca, Y., & Crister, J. 2004. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology*, 48: 146-156.
- Xi, H., von Rad, U., & Durner, J. 2002. Nitric oxide induces transcriptional activation of the nitric oxide-tolerant alternative oxidase in Arabidopsis suspension cells. *Planta*, 215: 914-923. doi:10.1007/s00425-002-0828-z
- Xi, Y., Hongyi, S., Ye, L., Takashi, S., Syotarou, K., Shin, T., . Zhenya, Z. 2014. Anti-cancer activity comparisons of aqueous extracts from *Inonotus obliquus*, *Cordyceps militaris* and *Uncaria tomentosa* in vitro and in vivo. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2(6): 19-25.

Capítulo 3

Crioconservación de semillas y embriones de *Jatropha curcas* L.

Resumen

Jatropha curcas es una especie con variados usos que van desde la obtención de aceite para la producción de biodiesel, hasta medicinales y como fertilizante. La crioconservación de semillas y embriones cigóticos de tempate fue realizada utilizando tres metodologías; la desecación e inmersión rápida de las semillas y embriones en nitrógeno líquido (-196°C) y la desecación de embriones cigóticos en cámara de flujo laminar durante 0, 30 y 60 minutos, seguida de la inmersión en NL y la vitrificación de embriones cigóticos. Previo a la crioconservación se realizó la escarificación manual de las semillas y se determinó el contenido de humedad tanto de las semillas como de los embriones. Después de la crioconservación ambos explantes fueron desinfectados. La germinación de las semillas después del congelamiento fue del 100%. La mejor respuesta en el desarrollo se logró cuando las semillas fueron inoculadas en arena. La respuesta de los embriones cigóticos a la crioconservación también fue muy exitosa alcanzando porcentajes de sobrevivencia del 100% sin mostrar diferencias significativas entre los tratamientos. Sin embargo, el mejor desarrollo (100%) y longitud de las plántulas (51.77 mm) fue alcanzado cuando los embriones fueron sometidos a un tiempo de secado de 60 minutos al flujo laminar (9,4% humedad). Con respecto a la crioconservación, este estudio permitió hacer aportes al conocimiento de las semillas y embriones cigóticos de esta especie y su comportamiento durante la congelación en nitrógeno líquido. Aunque el uso de la técnica de vitrificación de embriones cigóticos no permitió la supervivencia después de la congelación, los resultados graduales de sobrevivencia observados en cada una de las fases previas a la inmersión en el nitrógeno líquido, permiten ampliar el conocimiento sobre la tolerancia de estos embriones a las

diferentes sustancias crioprotectoras y sus concentraciones y su efecto durante la congelación.

Introducción

Jatropha curcas es originaria de México y Centroamérica (Heller 1996); sin embargo, actualmente se cultiva en América del Sur, el Caribe y varios países de África, Asia y Oceanía (Machado y Suarez 2009). Esta especie se encuentra en su mayoría en bajas elevaciones, inferiores a 1200 msnm (CATIE 2003), la temperatura adecuada para el cultivo está entre 18°C y 28,5°C. El género pertenece a la familia Euphorbiaceae, Subfamilia Crotonoideae (Font, 2003) y cuenta con más de 175 especies, 45 de ellas se encuentran en México, donde el 77% son endémicas (Jiménez y Martínez 1994; Martínez *et al.* 2002). La especie *J. curcas* es conocida comúnmente por coquillo, tempate (Costa Rica), tárgaro (Puerto Rico), piñón (Guatemala, Honduras y Nicaragua), piñoncillo (México), piñol (Perú), (Heller 1996) y piñón botija (Cuba) (Bisse, 1988).

A parte del aprovechamiento del aceite para la obtención de biodiesel, el cultivo de *J. curcas*, se hace con otros propósitos como uso medicinal, ya que actúa como antiséptico, anticoagulante (Kone-Bamba *et al.* 1987) y como purgante (Heller 1996); también es usado como insecticida para controlar varias plagas que atacan al algodón, maíz, tomate y patata y como fertilizante ya que las hojas, el exocarpo de los frutos y la torta se obtienen como subproducto del proceso de extracción de aceite; también se utilizan como aporte de materia orgánica al suelo, aportando entre un 3.2 y 3.8% de nitrógeno (Grainge y Ahmed 1988).

J. curcas es una especie generalmente propagada por semilla y algunas publicaciones mencionan que las plantas que han sido propagadas vegetativamente a partir de estacas presentan una baja longevidad y una reducción en la producción de semillas lo que afecta el contenido de aceite (Mukherjee *et al.* 2011). Aunque algunos autores sugieren que las semillas de esta especie son ortodoxas (Zhijun *et al.* 2008), otros mencionan que las semillas pierden el 50% de su viabilidad después de 15 meses de almacenamiento (Joker y Jepsen 2003). Teniendo en cuenta estos inconvenientes se considera que el uso de herramientas de la biotecnología como la micropropagación y la crioconservación podrían contribuir desde el punto de vista práctico a mejorar las posibilidades de multiplicación de genotipos de interés y al almacenamiento de germoplasma de esta especie.

La conservación a largo plazo o crioconservación consiste en la preservación del material biológico mediante su almacenamiento en nitrógeno líquido (NL, -196°C) (González-Arnan y Engelmann 2012). Cuando el material biológico es sometido a estas bajas temperaturas, las células se congelan y se mantienen en un estado de latencia. Los procesos metabólicos cesan y el material puede permanecer almacenado indefinidamente sin cambios en su estructura (Engelmann 1991). En general, el material vegetal que se usa para la crioconservación a temperaturas ultrabajas son los ápices caulinares, meristemos, anteras, embriones, protoplastos, callos y suspensiones celulares (CIAT 1991).

Esta investigación se propuso establecer un método para la conservación a largo plazo de *Jatropha curcas*, mediante la crioconservación de semillas y embriones cigóticos.

Materiales y Métodos

La experimentación en crioconservación se realizó utilizando semillas y embriones cigóticos. El estudio consistió en la evaluación de dos técnicas, la desecación y congelación rápida en nitrógeno líquido (-196°C) de semillas completas y embriones cigóticos aislados y la vitrificación de estos embriones (Hine *et al.* 2013, Engelmann 2011).

Desecación y congelamiento rápido de semillas

Se utilizaron semillas maduras de *J. curcas* aportadas por el Banco de Semillas Forestales del Centro Agronómico de Investigación y Enseñanza (BSF-CATIE), localizado en Turrialba, Costa Rica. Estas semillas fueron sometidas previamente a secado al ambiente durante una semana en las instalaciones del BSF-CATIE. Se determinó el contenido de humedad de las semillas previo a los tratamientos de crioconservación mediante la fórmula siguiente:

$$CHI = \frac{PF-PS}{PF} \times 100 \quad (\text{ISTA 2008})$$

El peso fresco (PF) corresponde al peso de las semillas después de la fase de secado al ambiente. El peso seco (PS) corresponde al peso de las semillas después de un periodo de secado en estufa a 170 °C durante 17 horas.

Las semillas fueron escarificadas manualmente por eliminación de la testa y colocadas en criotubos, en tres réplicas de 10 semillas cada una. Posteriormente los criotubos fueron

colocados directamente en el tanque de nitrógeno líquido a una temperatura de $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, donde permanecieron 24 horas. Pasado este periodo, los criotubos fueron sacados del nitrógeno líquido y colocados en un baño de agua a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ por dos minutos para su descongelación.

Después del descongelamiento todas las semillas fueron desinfectadas en una solución de hipoclorito de sodio al 3,5% durante 30 minutos, seguido de tres enjuagues con agua estéril para su posterior siembra. Se evaluó la recuperación del crecimiento en condiciones de germinación *in vitro* y en condiciones de germinación de cámara de germinación, que consistió en la siembra de las semillas en cajas plásticas con arena las que fueron colocadas en un cuarto de germinación con un fotoperiodo de 24 horas luz, una temperatura de $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y una humedad relativa del 90%, durante dos semanas. En ambos casos se utilizaron tres réplicas de 10 semillas cada una. Para la germinación *in vitro* de las semillas, éstas fueron colocadas en tubos de cultivo conteniendo el medio de germinación de las semillas (Murashige y Skoog 1962). Seguidamente, las muestras fueron colocadas en condiciones de oscuridad durante una semana antes de su cultivo en presencia de luz.

Los experimentos se realizaron bajo un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2×2 .

Desecación y congelamiento rápido de embriones cigóticos

Los embriones cigóticos fueron aislados de las semillas después de su escarificación y desinfección en la cámara de flujo laminar, como ya fue descrito. Seguidamente los embriones fueron colocados sobre cajas Petri que contenían 10 embriones cada una y desecadas bajo el flujo de aire estéril de la cámara de transferencia donde se evaluó el efecto de tres tiempos de desecación (0, 30 y 60 minutos) sobre la sobrevivencia a la congelación en nitrógeno líquido. Se utilizaron 3 réplicas de 10 embriones por tratamiento.

El contenido de humedad de los embriones fue determinado antes y después de la desecación (ISTA 2008). El peso fresco (PF) de los embriones fue tomado después de la desecación en el flujo de aire estéril laminar y el peso seco (PS) después del periodo de desecación y de secado en estufa a $170\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 17 horas.

Después de la desecación, el congelamiento en nitrógeno líquido se efectuó colocando muestras de 10 embriones en criotubos de polipropileno de 2 ml y cada uno fue sumergido rápidamente en nitrógeno líquido (-196 °C). Estas muestras permanecieron 5 días en congelamiento. La descongelación se llevó a cabo incubando los criotubos conteniendo los embriones en un baño de agua a 40°C durante 2 min.

La viabilidad o recuperación del crecimiento se evaluó cultivando los embriones en un medio semisólido MS (100%) con 3% de sacarosa y 7 g de agar para su germinación. Los cultivos fueron colocados en un cuarto oscuro durante dos semanas y posteriormente pasados a un cuarto de crecimiento con un fotoperiodo de 12 horas luz 12 horas oscuridad y temperatura de 29 ± 2 °C durante dos semanas. En este experimento se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial 3x2.

Vitrificación de embriones cigóticos

Los embriones fueron cultivados durante 15 días en el medio de germinación (semisólido) suplementado con una alta concentración de sacarosa (0,3M) para el pre acondicionamiento celular, luego fueron transferidos al mismo medio pero con concentraciones crecientes de sacarosa (0,3, 0,5, 0,75 M), 24 horas en cada concentración. La vitrificación se realizó en dos pasos, primero las muestras fueron incubadas en la solución de carga (Loading solution, LS), que consistió del medio de germinación líquido, suplementado con 2M de glicerol y 0,4 M de sacarosa como sustancias crioprotectoras. En este medio los embriones permanecieron durante 20 minutos. Seguidamente, la solución de carga fue eliminada de las muestras y sustituida por la solución vitrificadora conocida como PVS2, que consiste en el medio MS con 0,4 M de sacarosa, 30% de glicerol (v/v), 15 % de etilenglicol (v/v) y 15 % de DMSO (v/v). Las muestras permanecieron 15 min en una de las siguientes concentraciones 60%, 80% y 100% de la PVS2. Tanto la solución de carga como la solución de vitrificadora fueron agregadas a temperaturas de 0°C y los criotubos conteniendo las muestras permanecieron en un baño de hielo a 0°C durante todo el proceso. Pasado este periodo, los criotubos conteniendo los embriones fueron almacenados en nitrógeno líquido por 24 horas y descongelados en un baño de agua a 40°C. Inmediatamente, la solución vitrificadora fue eliminada y los embriones fueron lavados dos veces, 2 min cada lavado, con una solución de 1,2 M de sacarosa. La recuperación se realizó gradualmente mediante el subcultivo de

las muestras en medio MS 100% con 0.75 M de sacarosa durante 1 hora, seguidamente se transfirieron al medio MS 100% con 0.3 M de sacarosa por un periodo de 24 horas y finalmente fueron subcultivados al medio MS 100% con 0,1 M de sacarosa donde permanecieron a la oscuridad durante una semana.

Como variables se evaluó el efecto de las diferentes concentraciones de la solución PVS2 sobre la supervivencia de los embriones a la congelación.

Se utilizaron 3 réplicas en cada tratamiento y se establecieron réplicas control en cada una de las fases que fueron llevadas a germinación para poder evaluar el efecto de cada tratamiento sobre la supervivencia y recuperación del crecimiento. En este experimento se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo simple de tratamientos.

Análisis estadístico

En los ensayos se realizó un Diseño Completamente Aleatorizado (DCA) con o sin un diseño factorial de los tratamientos y se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) y pruebas de Fisher para la comparación de medias. Las variables de estudio fueron la supervivencia (%) de los embriones después de cada fase del proceso, la germinación (%) de los embriones en la fase de recuperación y el desarrollo (%) y longitud (mm) de las plántulas obtenidas.

Resultados

Desecación y congelamiento de semillas

Las semillas utilizadas en los ensayos presentaron un contenido de humedad (CH) promedio de 7.4% después de la desecación bajo condiciones ambientales realizada de manera rutinaria en el BSF del CATIE (10 semillas por ensayo y cada ensayo se repitió cinco veces). Las semillas utilizadas como testigo (-NL), es decir, que no fueron congeladas en nitrógeno líquido presentaron un 100% de germinación en las dos condiciones de germinación evaluadas, cultivo en cámara de germinación con arena como sustrato y bajo condiciones de cultivo *in vitro*, en el medio MS (100%) gelificado con agar. Sin embargo, las semillas que fueron congeladas en nitrógeno líquido si mostraron diferencias

significativas durante la germinación y el desarrollo posterior de la plántula en función del sustrato y las condiciones de germinación utilizadas.

Las semillas congeladas (+NL) y germinadas en arena presentaron una germinación del 100%, y las plántulas desarrolladas alcanzaron una longitud promedio de 195 mm después de dos semanas de germinación, sin mostrar diferencia significativa con respecto al testigo sin congelar. Asimismo, las semillas germinadas *in vitro* no mostraron diferencias estadísticas entre la germinación de las semillas congeladas (100%) y no congeladas (100%), ni tampoco con respecto a las semillas germinadas en arena (Figura 1). Las condiciones de cultivo *in vitro* utilizadas manifestaron un efecto negativo sobre el desarrollo de las plántulas, tanto para el testigo sin congelar (-NL), donde las plántulas alcanzaron una longitud promedio de 67 mm y para las muestras congeladas (+NL) donde las plántulas apenas alcanzaron una longitud promedio de 28.5 mm (Cuadro 1).

Cuadro 1. Efecto del congelamiento en nitrógeno líquido (-196 °C) de semillas sobre la germinación, desarrollo y longitud de plántulas de *Jatropha curcas*.

Condiciones de crioconservación	Sustrato	Germinación (%)	Desarrollo (%)	Longitud (mm)
-NL	Arena	100a	100 a	195.3 a
	MS 100%	100a	93.3 b	67.83 b
+NL	Arena	100a	100 a	194.3 a
	MS 100%	100a	86.6 c	28.53 c

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (LSD Fisher; $p \leq 0.05$)

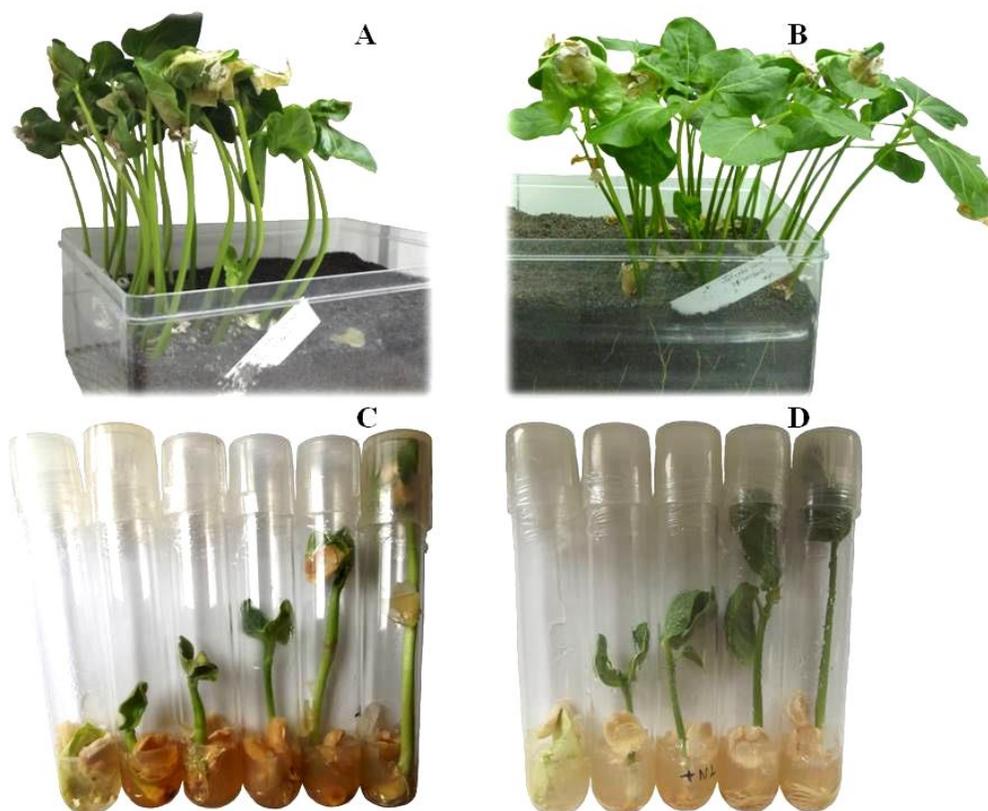


Figura 1. Germinación y desarrollo de semillas de *Jatropha curcas*. Se utilizó arena como sustrato para semillas sin congelar (-NL) y congeladas (+NL) (A – B) y medio de cultivo MS 100% -NL y +NL (C- D).

Desecación y congelamiento de embriones cigóticos

El contenido de humedad (CH) de los embriones antes de la desecación fue de 11.6% (Testigo sin desecar, 0 horas de desecación). Después de 30 minutos de desecación en cámara de flujo laminar el CH de los embriones se redujo al 9.7% y después de 60 minutos de desecación al 9.4%. Los embriones fueron capaces de germinar y desarrollarse de una manera muy similar, indistinto del contenido de humedad y presentaron una longitud de 51.6 mm, 51.1 mm y 49.2 mm respectivamente (Cuadro 2, Figura 2). En cuanto a los embriones cigóticos congelados en +NL, se observó que estos respondieron favorablemente al congelamiento, aún aquellos con el mayor CH (sin desecar). Sin embargo, aunque no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos en cuanto a germinación (100% para todos los tratamientos evaluados), el porcentaje de

plántulas desarrolladas (93,3%, 100% y 100%) y la longitud de estas plántulas (21,3 mm, 45,9 mm y 51,7 mm respectivamente), fue menor al alcanzado por aquellas con los menores CH.

Cuadro 2. Germinación y supervivencia de embriones cigóticos y desarrollo de plántulas de *J. curcas* a las diferentes condiciones de desecación en cámara de flujo laminar y desecación y congelamiento en nitrógeno líquido (+NL).

Inmersión en nitrógeno (-196 °C)	Tiempo de desecación (min.)	Germinación (%)	Desarrollo (%)	Longitud (mm)
-NL	0	100 a	100 a	51,67 a
	30	100 a	100 a	51,17 a
	60	100 a	100 a	49,20 a
+NL	0	100 a	93.3 b	21,30 b
	30	100 a	100 a	45,93 a
	60	100 a	100 a	51,77 a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (LSD Fisher; $p \leq 0.05$).

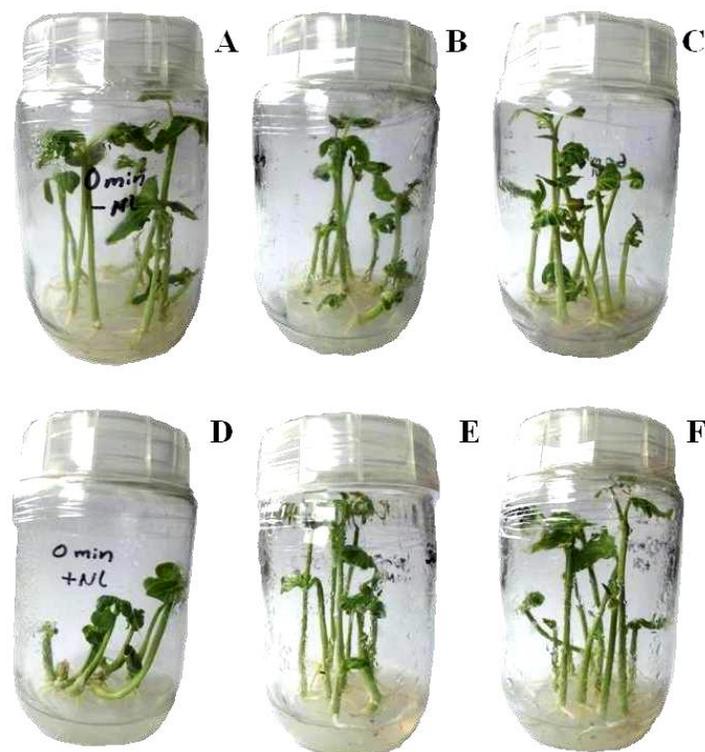


Figura 2. Germinación y desarrollo de embriones cigóticos de *J. curcas* después de la congelación en nitrógeno líquido. A) 0 minutos de desecación (-NL). B) 30 minutos de desecación (-NL). C) 60 minutos de desecación (-NL). D) 0 minutos de desecación (+NL). E) 30 minutos de desecación (+NL) y F) 60 minutos de desecación (+NL).

Vitrificación de embriones

Los embriones cigóticos de *J. curcas* no sobrevivieron a la congelación en nitrógeno líquido después de ser tratados siguiendo la técnica de vitrificación. Sin embargo, los datos mostrados en cada uno de los testigos no congelados (-NL) para cada una de las fases de la vitrificación permiten observar una evolución gradual en la supervivencia de los embriones cigóticos posiblemente influenciada, por lo menos en parte, por las altas concentraciones de las sustancias crioprotectoras utilizadas en esta técnica. En este sentido, tanto los embriones testigo, es decir aquellos que no fueron tratados, como los que sí fueron sometidos al precultivo (0.3M de sacarosa, 15 días) y al pretratamiento en diferentes concentraciones de sacarosa (0.3, 0.5 y 0.75M), presentaron un 100% de supervivencia. No obstante, el efecto de las altas concentraciones de sacarosa durante el pretratamiento se vio reflejado en los porcentajes de supervivencia, clorosis y necrosis

observados en los embriones después de haber sido sometidos a la solución de carga (Loading solution) (Glicerol 2 M + Sacarosa 0.4 M) por 20 minutos (Cuadro 3). Los embriones pretratados con 0.3 M de sacarosa presentaron 100% de sobrevivencia después de la incubación en LS, aquellos que pasaron por el pretratamiento de 0.5 M de sacarosa lograron una supervivencia del 93%; mientras que en los ejes sometidos a la más alta concentración de sacarosa (0.75 M) no hubo desarrollo, el 17% de los embriones manifestaron clorosis y el 83% necrosis de tejidos. El impacto de estas respuestas también fue observado en la supervivencia de los embriones después de ser sometidos a la solución vitrificadora (PVS2) en diferentes concentraciones (60, 80 y 100%).

Los embriones que proceden del pretratamiento con 0.3 M de sacarosa presentaron los porcentajes de desarrollo más altos en concentraciones diluidas de PVS2 (60% PVS2), con una sobrevivencia de 70% y en PVS2 al 80% con sobrevivencia del 60%; en tanto que, los embriones que fueron sometidos a un pretratamiento de 0,75 M de sacarosa mostraron los porcentajes más altos de necrosis, 60 (PVS2-60%), 87 (PVS2-80%) y 80% (PVS2-100%) (cuadro 3).

Cuadro 3. Efecto de los diferentes tratamientos de los embriones cigóticos antes de su inmersión en nitrógeno líquido.

		Respuesta de embriones cigóticos			
Pretratamiento Sacarosa (M)	Solución vitrificadora	Desarrollo (%)	Longitud (mm)	Clorosis (%)	Necrosis (%)
0.3	LS	100.0	24.5	-	-
0.5	LS	93.0	12.3	-	7.0
0.75	LS	0.0	9.7	17.0	83.0
0.3	60%PVS2	70.0	12.6	10.0	20.0
0.3	80%PVS2	60.0	15.0	13.0	27.0
0.3	100%PVS2	47.0	15.8	23.0	30.0
0.5	60%PVS2	53.0	17.1	-	47.0
0.5	80%PVS2	10.0	12.1	37.0	53.0
0.5	100%PVS2	47.0	17.9	40.0	13.0
0.75	60%PVS2	27.0	13.6	13.0	60.0
0.75	80%PVS2	-	7.6	13.0	87.0
0.75	100%PVS2	3.0	15.6	17.0	80.0

Discusión

Se menciona que la crioconservación de material vegetal en la forma de semillas enteras, embriones cigóticos y tejidos reproductores es actualmente muy utilizada (Silva *et al.* 2012). Engelmann (2011) considera que las técnicas de crioconservación para especies propagadas vegetativamente están muy avanzadas y en numerosos casos en experimentación a gran escala. Sin embargo, la investigación es menos avanzada en especies recalcitrantes debido a las características de sus semillas, como su gran tamaño, la alta sensibilidad a la desecación, la complejidad estructural y la heterogeneidad en términos de estados de desarrollo y contenido de agua a la madurez y la falta de funcionamiento de los protocolos de cultivo *in vitro*.

En *J. curcas* la información sobre la biología de las semillas y de tratamientos de conservación es aún limitada y confusa. Mientras algunos autores (Joker y Jepsen 2003, Toral *et al.* 2008) mencionan que las semillas de esta especie no pueden ser almacenadas por más de 15 meses debido a la pérdida de viabilidad; otros (Verma y Gaur, 2009) consideran que estas semillas son ortodoxas y que por lo tanto, pueden ser almacenadas con bajos contenidos de humedad. Además, estos autores consideran que el almacenamiento prolongado de estas semillas puede verse limitado por el alto contenido de aceite. Esto permite sugerir que posiblemente las semillas de *J. curcas* presentan una condición de recalcitrancia intermedia. Sin embargo, existe muchas dudas en la clasificación de semillas tropicales, y algunas especies consideradas inicialmente como recalcitrantes, actualmente son agrupadas como intermedias o subortodoxas (Engelmann 2011), como es el caso de las semillas de café (*Coffea spp*), que son capaces de sobrevivir al congelamiento en nitrógeno líquido, aún presentando contenidos de humedad tan bajos como 7%, representando a la típica especie con semilla intermedia para el almacenamiento (Abdelnour *et al.* 1992).

En el presente estudio las semillas de *J. curcas* con un contenido de humedad de 7.4% después de haber sido sometidas a secado (bajo techo y a temperatura ambiente) y posteriormente escarificadas manifestaron una germinación del 100% después de 5 días de almacenamiento en nitrógeno líquido. De forma similar semillas de esta especie con contenidos de humedad entre 4 y 14% fueron capaces de germinar en un 59.8% después de haber sido almacenadas durante 5 días en nitrógeno líquido (Goldfarb *et al.* 2010). Este autor sugiere que estas semillas con contenidos de agua ideal entre 4 y 8% en base húmeda

se pueden almacenar en nitrógeno líquido a -196°C , manteniendo su calidad fisiológica; siendo el 8% el límite de contenido de agua, que fue el mismo que presentaban las semillas en el momento de colecta en el campo. Silva *et al.* (2012) utilizando también semilla escarificada observó una germinación del 82%, no obstante, este autor no menciona el CH de las semillas. Semillas de otras especies, como *Swietenia macrophylla* consideradas como recalitrantes, escarificadas y con un CH de 5.59% lograron un 77% de recuperación del crecimiento después de la congelación lenta y la inmersión en nitrógeno líquido (Normah *et al.* 2011). Semillas con testa y sin testa de diferentes especies del género *Swietenia* fueron sometidas a inmersión directa en NL después de la desecación a temperatura ambiente (Abdelnour y Aguilar, 2012). En todos los casos la supervivencia fue superior en las semillas escarificadas; las semillas de *S. macrophylla* (CH 6.2 %) presentaron un 80 % de germinación y un 70% se desarrolló en plántula, *S. humillis* (CH 6.1 %) y *S. mahoganii* (CH 5.3 %) presentaron altos porcentajes de germinación (67 % y 73 %, respectivamente) y de plantas desarrolladas (67 % y 60 %, respectivamente) después de la inmersión directa en nitrógeno líquido. Estas autoras consideran que en la mayoría de los casos, los bajos porcentajes de germinación (7-17 %) correspondieron a semillas con testa, que se contaminaron fácilmente, lo cual podría significar que el proceso de escarificación, además de reducir la barrera de germinación permite seleccionar la semilla de mejor calidad. Semillas de *Toona ciliata* fueron crioconservadas con el método de vitrificación y congelado rápido en nitrógeno líquido, alcanzando un 35% de desarrollo de plántulas (Scocchi *et al.* 2004a). Sin embargo, la crioconservación de frutos o semillas de *Melia azedarach*, también Meliaceae no permitió la ulterior obtención de plantas (Scocchi *et al.* 2004b).

En *J. curcas* las semillas que lograron una supervivencia a la inmersión en nitrógeno líquido, presentaron un desarrollo del 100% usando arena como sustrato, y un 86.6% en aquellas que fueron germinadas *in vitro*. Asimismo, se observó un crecimiento en longitud de las plántulas de 194 y 28 mm, respectivamente. Por lo anterior, las semillas responden muy bien al uso de arena como sustrato en comparación al cultivo *in vitro*. Contrariamente las semillas de *Leucaena leucocephala* respondieron mejor a la inoculación *in vitro* (24 % sobrevivencia) después de la congelación directa en nitrógeno líquido y ninguna supervivencia se observó en invernadero (Abdelnour y Aguilar 2013).

La crioconservación de embriones cigóticos de *J. curcas* mediante la técnica de desecación bajo el flujo laminar también fue exitosa en el presente estudio. La sobrevivencia y desarrollo de las plántulas alcanzó el 100% cuando los embriones presentaban CH del 9.7

y 9.4% después de 30 y 60 minutos de desecación, respectivamente. Abdelnour-Esquivel *et al.* (2007) observó que los embriones cigóticos de pilón (*Hieronyma alchorneoides*) no deshidratados (CH 15%) tampoco sobrevivieron al congelamiento, sin embargo, la deshidratación de 15 minutos y hasta los 60 minutos (CH 3 a 4 %), permitió la germinación (2.7 % y 5.3 %) de los embriones congelados. La deshidratación al flujo laminar de ejes embrionarios de caoba (*S. macrophylla*) durante 4 horas permitió altos porcentajes de germinación y desarrollo de las plántulas (90% y 76%) utilizando la técnica de encapsulación-deshidratación (Aguilar y Abdelnour 2010). Engelmann (1991) destaca la importancia de la deshidratación artificial de los explantes previo a la congelación en nitrógeno líquido ya que ésta permite la protección de los posibles daños que puedan ser causados por la cristalización intracelular del agua en hielo durante la crioconservación. Sin embargo, la deshidratación intensa también puede ocasionar daño a los tejidos debido a la alta concentración de sales intracelulares y los cambios que éstos pueda provocar en la membrana celular (Meryman *et al.* 1977).

Los embriones cigóticos que fueron crioconservados en nitrógeno líquido utilizando la técnica de vitrificación, no mostraron ninguna respuesta de supervivencia después de la inmersión en nitrógeno líquido. No obstante, se observó una tendencia de los embriones a perder su capacidad de supervivencia en función de las altas concentraciones de sacarosa utilizadas durante el pretratamiento (0,5 y 0,75M) y en las fases posteriores de la vitrificación, caracterizadas por el uso de sustancias crioprotectoras altamente concentradas (Glicerol y DMSO) y que por lo tanto pueden resultar tóxicas para los tejidos vegetales. De igual manera, durante la vitrificación de ejes embrionarios de *Lansium domesticum*, se observó que el uso de la solución PVS2 por 20 min no afectó la supervivencia cuando los ejes fueron precultivados en un medio MS con 0.3 M de sacarosa por 16 horas; no obstante, los ejes no sobrevivieron al congelamiento en nitrógeno líquido (Normah *et al.* 2011).

González-Arno y Engelmann (2012) consideran que entre los factores más significativos en provocar daños letales durante la crioconservación están la toxicidad química provocada por los agentes crioprotectores que se adicionan, a la presión osmótica que se genera, a la pérdida de agua que se induce y, en especial, a la formación de cristales de hielo en el medio intracelular.

Un balance de las tres técnicas de crioconservación evaluadas en este estudio para *J. curcas* podría indicar que la mejor técnica a utilizar va depender del objetivo de la

crioconservación y por lo tanto de la forma de recuperación del crecimiento. En este sentido, la desecación y congelación directa en nitrógeno líquido de semillas escarificadas es una técnica sencilla, fácil de realizar en cualquier laboratorio o banco de semillas sin requerir de equipos sofisticados, con la única necesidad de un tanque de almacenamiento de nitrógeno líquido. La desventaja sería si se tiene por objetivo el almacenamiento de grandes volúmenes de semillas que requieran de mayor espacio y suministro de nitrógeno líquido. La congelación de embriones aislados es una técnica más elaborada y por lo tanto más limitada en términos de tiempo y la necesidad de contar con las facilidades de un laboratorio de cultivo de tejidos. Sin embargo, puede ser una opción interesante ya que permite la recuperación del crecimiento *in vitro* y puede ser utilizada para estudios posteriores *in vitro*.

Literatura citada

- Abdelnour-Esquivel, A; Rojas, G; Alfaro, U. 2007. Estudios preliminares para la crioconservación de especies forestales arbóreas. *Tecnología en Marcha* 20(1): 98-103.
- Abdelnour-Esquivel, A; Aguilar, ME. 2013. Crioconservación de germoplasma vegetal en Costa Rica. In: Eds. M.T. Gonzalez Arnao y F. Engelmann. *Crioconservación de plantas en America Latina y el Caribe*. Editorial Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, San José, Costa Rica. 113-126.
- Abdelnour-Esquivel, A; Aguilar, ME. 2012. Crioconservación de germoplasma vegetal en Costa Rica. In: Eds. M.T. Gonzalez Arnao y F. Engelmann. *Crioconservación de plantas en America Latina y el Caribe*. Editorial Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, San José, Costa Rica. 103-115. En prensa.
- Abdelnour-Esquivel, A.; Mora, A.; Villalobos, V. 1992. Cryopreservation of zygotic embryos of Musa acuminata (AA) and M. balbisiana (BB). *CryoLetters* 13: 159-164.
- Aguilar, ME; Abdelnour-Esquivel, A. 2010. Desarrollo de modelos para la crioconservación de semillas y material clonal de especies forestales de Costa Rica en peligro de extinción y seleccionadas en los programas de mejoramiento genético. *Boletín de Ciencia y Tecnología* n.º 99. San José, CR, CONICIT. Disponible en <http://163.178.205.6/boletin/boletin99/PalabrasMariaElenaAguilar.html>
- Bisse, J. 1988. *Arboles de Cuba*. Editorial Científico-Técnica. La Habana, Cuba. 154 p. 68

- CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza). 2003. Arboles de Centroamérica: un manual para extensionistas. Cordero, J. y Boshier, D. Turrialba, CR. 1079 p.
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1991. Cultivos de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Roca, W. y Mroginski, L. (eds.). Cali, Colombia. 970 p.
- Engelmann, F. 2011. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. Biotechnologies for conserving biodiversity. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 47:5-16
- Engelmann, F. 1991. *In vitro* conservation of tropical plant germoplasm – a review. *Euphytica*.57: 227-243
- Font, F. 2003. Las especies del género *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae, Crotonoideae) en Argentina. Revista del Círculo de Coleccionistas de Cactus y Crasas de la República de Argentina. 2(1): 4-20.
- Goldfarb, M; Duarte, M; Mata, M. 2010. Armazenamento criogênico de sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) Euphorbiaceae. Revista Biotemas, 23(1), Brasil, págs. 27-33 70.
- Gonzalez Arnao, MT; Engelmann, F. 2012. Introducción a la conservación ex situ de los recursos genéticos vegetales. Eds. M.T. Gonzalez Arnao y F. Engelmann, In: Crioconservación de plantas en América Latina y el Caribe. Editorial Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, San José, Costa Rica. 39-48.
- Grainge, M; Ahmed, S. 1988. Handbook of plants with pest-control Propieties. *John Wiley & Sons.* 470 p.
- Heller, J. 1996. Physic nut. *Jatropha curcas* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 1. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Researchs, Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute. Rome. 66 p.
- Hine Gómez, A., Vargas Castillo P., Abdelnour Esquivel, A. 2013. Crioconservación de semillas de teca (*Tectona grandis* L. f) Agronomía Costarricense 37(1): 51-60.
- INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION (ISTA). 2008. International Ruler For Seed Testing: The germination test. Seed Science and Technology,p. 7.
- Jiménez, R; Martínez, G. 1994. Redescrición de *Jatropha andrieuxii* Muell. Arg. (Euphorbiaceae), una especie endémica del sur de México. Acta Botánica Mexicana. 26:27-32

- Joker, D. y Jepsen, J. 2003. *Jatropha curcas* L. seed leaflet, No 83 August Danida Forest Seed Centre. Demark, pp. 81-108
- Kone-Bamba, D; Pelissier, Y; Ozouko, Z; Ouao, D. 1987. Etude de l'activité hémostatique de quinze plantes médicinales de la "Pharmacopée Traditionnelle Ivoirienne". *Plant. Med. Phytother.*, 21:121-130 72
- Machado, R; Suárez, J. 2009. Performance of three provenances of *Jatropha curcas* in the germoplasm bank of the EEPF "Indio Hatuey". *Pastos y Forrajes*, 32(1): 29-37
- Martínez, G; Jiménez, R; Cruz, R; Juárez, A; Garcia, R; Cervantes, A; Mejía, R. 2002. Los géneros de la familia Euphorbiaceae en México. *Anales del Instituto de Biología, UNAM, Ser. Bot.* 73(2):155-281
- Meryman H. T.; Williams R. J.; Douglas, S. J. 1977. Freezing injury from solution effects and its prevention by natural or artificial cryoprotection. *Cryobiology* 14: 287–302.
- Mukherjee, P; Varhney, A; Johnson, T; Jha, T. 2011. *Jatropha curcas*: A review on Biotechnological Status and Challenges, *Plant Biotech Rep.* doi: 10.1007/s11816-011-0175-2.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* 15(3):473-497.
- Normah, N; Choo, K; Yap, V; Zeti, M. 2011. *In vitro* conservation of Malaysian biodiversity-achievements, challenges and future directions. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Malaysia.* 47:26-36
- Silva, R; Camillo, J; Pereira, S. 2012. A method for seedling recovery in *Jatropha curcas* after cryogenic exposure of the seeds. *Rev. Biol. Trop.* Vol. 60 (1):473-482.
- Scocchi, A; Dieringer, E; Mroginski, E; Mroginski, L. 2004a. Conservación de semillas de cedro australiano (*Toona ciliata*). *Plant Genetic Resources Newsletter* 137:1-4
- Scocchi, AM; Rey, HY. 2004b. Conservación de germoplasma *in vitro*. In *Biología y mejoramiento vegetal*. Echenique, V; Rubinstein, C; Mroginski, L. eds. Buenos Aires, AR, Ediciones INTA. 179-185.
- Toral, O; Igelsias, J; Oca, S; Sotolongo, J; Garcia, S; Torsti, M. 2008. *Jatropha curcas* L., a tree species with energetic potential in Cuba. *Pastos y Forrajes, Cuba.* Vol. 31 (3) 191-207
- Verma, K; Gaur, A. 2009. *Jatropha curcas* L.: Substitute for Conservation Energy. *World Journal of Agricultural Sciences, India.* 5(5): 552-556
- Zhijun, D; ZhenYong, X; HongYan, C; YanJun, L; SongQuan, S. 2008. Preliminary study on development, germination and desiccation tolerance of *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae).

Capítulo 4

Micropropagación de tempate (*Jatropha curcas*) a partir de brotes axilares y callos organogénicos

Resumen

La micropropagación de *J. curcas* fue abordada utilizando dos metodologías: 1) La multiplicación de brotes axilares a partir del cultivo de segmentos nodales de plántulas germinadas *in vitro* de una variedad tóxica y; 2) La inducción de brotes adventicios a partir de segmentos de hoja de plantas establecidas en invernadero. Los segmentos de hojas inmaduras y semimaduras de una variedad tóxica procedente de Nicaragua y otra variedad de baja toxicidad procedente de Veracruz, México, se establecieron en un medio MS 100% con 2 mg/l de BAP y 1 mg/l de AIB. Además, hojas semimaduras de la variedad tóxica se cultivaron con BAP y kinetina (2.0 – 5.0 – 7.0 – 10.0 mg/l) en combinación de AIB (0.0 - 0.5 y 1.0 mg/l) para la formación de callo. El desarrollo de los brotes fue evaluado en los medios MS y WPM con 100 y 200 gr/l de caseína hidrolizada para los brotes axilares; y en el medio MS suplementado con BAP y AIA (0.25 mg/l) en combinación de 0.0 – 0.25 – 0.5 mg/l de GA3 para los brotes adventicios. El enraizamiento de todos los brotes fue realizado en el medio MS en dos tratamientos 1) AIB (3mg/l); 2) AIB (3mg/l), AIA (1.0mg/l) y ANA (3.5 mg/l) en dos tiempos de inducción (96 y 42 horas). El mejor medio para la brotación de yemas axilares en explantes de nudo cotiledonar fue el MS con 0.5 mg/l de BAP que permitió la producción de 2.06 brotes por explante. La regeneración de brotes adventicios fue superior en hojas semimaduras de la variedad tóxica en presencia de 2 mg/l de BAP donde se obtuvo 4.13 brotes/explante. En brotes producidos de explantes nodales el mayor alargamiento no superó los 6.4 mm en un medio MS suplementado con 100 mg/l de caseína hidrolizada. En tanto que, en brotes adventicios producidos por organogénesis se logró una longitud promedio de 15.8 mm solamente en presencia de 0.25 mg/l de AIA. La inducción de raíces en brotes axilares y brotes adventicios fue favorecida cuando se cambió el tiempo de inducción de 96 a 42 horas utilizando el mismo tratamiento auxínico (3 mg/l de AIB, AIA 1 mg/l y ANA 3.5 mg/l). Esta reducción en el tiempo de inducción permitió aumentar el porcentaje de enraizamiento de 8.3% a 50% en brotes axilares y del 50% al 62.5% en brotes adventicios. Con esta investigación se pudo constatar que la propagación *in vitro* de

J. curcas aún encierra limitaciones, asociadas principalmente al desarrollo de los brotes que dificulta la multiplicación y el enraizamiento de los mismos, haciendo difícil la transferencia de las plantas a condiciones de invernadero y suelo; pero también se observó una gran diversidad de respuestas posiblemente relacionadas a las diferencias en el genotipo.

Palabras clave: *Jatropha curcas*, tempate, micropropagación, organogénesis, enraizamiento, aclimatación.

Introducción

Debido a la disminución en los recursos del petróleo se están estableciendo cultivos de semillas oleaginosas para la producción de biodiesel en todo el mundo. Los principales cultivos para la producción del biocombustible incluyen colza (EEUU), girasol (Italia y el sur de Francia), soya (EEUU y Brasil), aceite de palma (Malasia), semillas de lino (España), semilla de algodón (Grecia) y *Jatropha curcas* (Nicaragua y América del Sur) (Jayasingh 2004). *J. curcas* es originaria de México y Centroamérica (Heller 1996); sin embargo, actualmente se cultiva en América del Sur, el Caribe y varios países de África, Asia y Oceanía (Machado y Suarez 2009). En los últimos años ha sido uno de los cultivos de mayor interés como fuente de materia prima para la producción de biodiesel como combustible renovable en países tropicales y subtropicales, ya que presenta un alto rendimiento de aceite a partir de las semillas. Además, se caracteriza por su fácil adaptabilidad en terrenos marginales semi áridos, a diferentes tipos de suelos y su baja exigencia en nutrientes y agua (King *et al.* 2009; Sujatha *et al.* 2005; Cifuentes y Fallot 2009; Verma y Gaur 2009; Fairless 2007). Adicionalmente, de sus semillas se extrae entre 1100 a 1700 litros de aceite por hectárea por año (Nunes 2007). Las semillas contienen entre 35 a 38% de aceite con un alto valor de cetano que puede ser utilizado directamente en motores diesel como un diluyente (Toral *et al.* 2008; Datta *et al.* 2007). Este valor supera al de otros cultivos como la colza (1100 l/ha año), el girasol (960 l/ha año) o la soya (420 l/ha año) los cuales también son utilizados para la producción de biodiesel (Jongschaap *et al.* 2007). Otra de las ventajas de la *J. curcas* como cultivo es que no tiene finalidad alimentaria, por lo tanto, no compite con la demanda de otros cultivos alimentarios. No es un cultivo comestible debido a que el aceite de sus semillas contiene compuestos anti-nutricionales tóxicos como formol ésteres y curricina (Toral *et al.* 2008).

Existen dos variedades de *J. curcas*, una tóxica y otra no tóxica o de baja toxicidad proveniente de México (Heller 1996; Martínez *et al.* 2007). En algunas poblaciones de México, las semillas de la variedad no tóxica las emplean para el consumo humano mediante el tostado (Martínez *et al.* 2007; Schmook y Sánchez 2000). Estas semillas se caracterizan por presentar contenidos muy bajos de formol ésteres, inferiores al 0.11%, por lo anterior no se considera tóxica (Schmook y Sánchez 2000).

La *J. curcas* es una especie generalmente propagada por semillas, con el inconveniente de que los cultivos establecidos a partir de semillas presentan alta heterocigosidad, enfermedades transmitidas de la semilla a la planta y no se puede garantizar el contenido de aceite (Mukherjee *et al.* 2011). Además se ha observado que las plantas que han sido propagadas vegetativamente a partir de estacas presentan una baja longevidad y una reducción en la producción de semillas (Mukherjee *et al.* 2011). Teniendo en cuenta estos inconvenientes se considera que el uso de herramientas de la biotecnología como las técnicas de cultivo *in vitro* puede contribuir desde el punto de vista práctico a mejorar las posibilidades de multiplicación de genotipos de interés.

Aunque existen muchos resultados sobre la micropropagación de *J. curcas* y la producción de brotes a partir del cultivo de yemas axilares (Sujatha *et al.* 2005; y a través de la regeneración directa o indirecta de brotes (Sujatha *et al.* 2005; Deore and Johnson 2008; Kumar *et al.* 2010a y b; Mukherjee *et al.* 2011), la literatura muestra pocas evidencias sobre condiciones de cultivo repetibles para el buen desarrollo y enraizamiento de los brotes. Además, la información referente a la recuperación de plantas durante la aclimatación es escasa. Por lo tanto, esta investigación fue dirigida a mejorar las condiciones de cultivo para favorecer el desarrollo longitudinal de los brotes producidos a partir de la organogénesis indirecta de fragmentos de hoja de plantas en el invernadero. Asimismo, mejorar la respuesta de los brotes durante la formación de raíces; y la sobrevivencia de las plantas durante la aclimatación.

Materiales y métodos

Material vegetal

El material vegetal de *J. curcas* que se utilizó para la experimentación tiene diferentes fuentes: plántulas germinadas *in vitro* provenientes de semillas del Banco de Semillas Forestales del CATIE (BSF-CATIE) y segmentos de hojas tomadas de plantas madre de dos procedencias establecidas en el invernadero: la variedad tóxica catalogada como Nicaragua 196/07A por el BSF-CATIE y una variedad de baja toxicidad procedente de la comunidad de Papantla en Veracruz, México.

Manejo de las plantas madre en invernadero

El material vegetal ya establecido en invernadero fue tratado con fertilización granular (10-30-10) a razón de 20 gramos por planta, cada 4 meses y con la aplicación de Bayfolán® y Nitrofoska® como fertilizante foliar en dosis de 2,5 ml/l cada dos semanas. Para el control fitosanitario se utilizó Benlate® y Agrimicin® como fungicidas sistémicos y Manzate® como fungicida de contacto en dosis de 3 gr/l con aplicaciones cada 3 meses. Estos tratamientos fueron aplicados de manera alterna. También se realizó un control de podas durante cada ciclo de introducción *in vitro* de explantes. El riego de las plantas se hizo manualmente dos días por semana.

Inducción de brotes axilares a partir plántulas *in vitro*

Como explantes se utilizaron segmentos de nudo cotiledonar de 15 mm de longitud que fueron aislados de plántulas de 4 semanas de edad obtenidas por la germinación de semillas *in vitro* de una variedad tóxica. Para esto las semillas se escarificaron manualmente y se desinfectaron con cloro comercial 100% (v/v) (3.5% Sodium hypochlorite) durante 30 minutos, seguido de 3 enjuagues con agua estéril (Tejedor 2010). Luego, las semillas se cultivaron en tubos de vidrio de 2.5 x 15 cm, con un contenido de 10 ml del medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS 1962), suplementado con 30 g de sacarosa, el pH se ajustó a 5.7 y fue solidificado con 7 gr de agar antes de la esterilización en autoclave a 121 °C, 1,2 ATM/cm² de presión, durante 20 minutos. El cultivo se mantuvo dos semanas en oscuridad y dos semanas con un fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad y una temperatura de 27±2 °C.

Inducción de brotes

Los segmentos nodales fueron colocados verticalmente en un medio de cultivo MS al 100% de su composición básica, suplementado con 30 g de sacarosa. Para determinar la capacidad de producción de brotes se usó como regulador del crecimiento la 6- Bencil aminopurina (BAP) en concentraciones de 0.25 y 0.50 mg/l. Se utilizaron 30 repeticiones por tratamiento. Los cultivos fueron llevados a un cuarto de crecimiento con un fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad y una temperatura de 27 ± 2 °C durante 4 semanas.

Desarrollo de brotes

Los brotes de mayor longitud (>5mm) fueron aislados y cultivados en los medios MS y Woody Plant Medium (WPM, Lloyd y McCown 1980) en una concentración del 100% de su formulación en sales minerales, vitaminas y hierro. Estos medios fueron suplementados con 30 g de sacarosa, caseína hidrolizada (100 a 200 mg/l), y glutamina (150 mg/l), dos fuentes de nitrógeno reducidos importantes en el desarrollo de los brotes. El experimento consistió de 38 repeticiones por tratamiento. Los cultivos permanecieron bajo un fotoperiodo de 12 horas luz, 12 horas oscuridad y una temperatura de 27 ± 2 °C.

Enraizamiento

La inducción de raíces en los brotes axilares se realizó por choque auxínico de 96 horas en el medio MS líquido (50% de la concentración de sales) y 30 g de sacarosa, en cuatro tratamientos: 1) 3 y 5 mg/l de ácido indolacético (AIB) por separado; 2) 3 y 5 mg/l de AIB en combinación de 1 mg/l de AIA y 3.5 mg/l de ácido naftalenacético (ANA). Posterior a la inducción, los brotes fueron transferidos a un medio semisólido para la expresión de raíces (MS 50%, 30 g de sacarosa y 0.25 g/l de carbón activado) durante 4 semanas. Cada tratamiento consistió de 12 repeticiones.

Con el fin de mejorar la regeneración de raíces, los brotes se sometieron a un choque auxínico de 42 horas en un medio líquido de inducción constituido del medio MS al 50% en dos tratamientos: 1) 3 mg/l de AIB solo; 2) 3 mg/l de AIB en combinación de 1 mg/l de AIA y 3.5 mg/l de ANA. Seguidamente, los brotes fueron transferidos al medio de expresión de raíces antes mencionado. Cada tratamiento consistió en 7 repeticiones.

Aclimatación de plantas

Las plantas con raíces fueron extraídas de los frascos de cultivo, se eliminó el exceso de medio de las raíces mediante lavado con agua corriente. Seguidamente las plantas fueron sembradas manualmente en pellets (Jiffy®). Las plántulas se colocaron en bandejas bajo un túnel de plástico con riego automático por aspersión, aplicado dos veces al día durante un minuto cada vez, para lograr una humedad relativa cercana al 100%.

Inducción de brotes adventicios a partir de hojas

Tipo de explante

Como explantes se utilizaron hojas de *J. curcas* de las variedades tóxica (T) y no tóxica (NT) en dos estados de madurez, semimaduras (SM) e inmaduras (I). Las hojas fueron tomadas de plantas de 3 años de edad establecidas en el invernadero.

Desinfección de explantes

Las hojas fueron desinfectadas mediante un lavado superficial con agua corriente, seguido de una inmersión en cloro comercial al 25% (v/v) (0.88% Sodium hipochlorite) durante 25 minutos. Finalmente se realizaron 3 enjuagues con agua destilada estéril en la cámara de flujo laminar. Los bordes de las hojas se eliminaron con un bisturí y segmentos de hoja de 1 cm² fueron cultivados con el envés hacia el medio de cultivo.

Inducción de callo organogénico

La inducción de callo organogénico se realizó utilizando como base las condiciones de cultivo definidas por Sujatha *et al* (2005). Inicialmente se usó el medio MS 100%, suplementado con 2 mg/l de BAP, 1 mg/l de AIB, 30 gr de sacarosa y 7 g de agar como gelificante; el pH se ajustó a 5.7. Este medio fue evaluado en hojas inmaduras y semimaduras de las dos variedades antes mencionadas. Los cultivos permanecieron en un cuarto de crecimiento con una temperatura de 27±2 °C en la oscuridad, durante 4 a 6 semanas hasta la formación de callos con presencia de meristemoides y algunos brotes.

Con el fin de optimizar el proceso de inducción de callo organogénico, adicionalmente se evaluaron dos concentraciones de BAP (2.0 y 5.0 mg/l) en combinación con tres concentraciones de AIB (0.0, 0.5 y 1.0 mg/l) en hojas I y SM de la variedad tóxica. Se utilizaron 70 repeticiones por tratamiento.

En otro experimento se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de BAP y Kinetina (2.0 - 5.0 y 7.0 y 10.0 mg/l) utilizadas cada una por separado y en combinación del AIB (0.0, 0.5 y 1.0 mg/l) sobre la inducción de callo organogénico en hojas SM de la variedad tóxica. El experimento consistió de 20 repeticiones por cada tratamiento.

Regeneración de brotes

La capacidad de regeneración de los callos obtenidos en las dos variedades (T y NT) y en los dos tipos de hojas (I y SM) provenientes de la fase de inducción fue evaluada en el medio de regeneración constituido de un MS (100%) suplementado con 2 mg/l de BAP y 0,5 mg/l de AIB, 30g de sacarosa y como agente gelificante se utilizó 7 g de agar, pH 5,7 (Sujatha *et al* 2005).

Desarrollo de brotes

Los mejores brotes que resultaron de los callos de hojas semimaduras de la variedad tóxica fueron inoculados en un medio MS 100% suplementado con BAP (0.25 mg/l) y AIA (0.25 mg/l), cada uno por separado en combinación de tres concentraciones (0.0, 0.25 y 0.5 mg/l) de ácido giberélico (GA_3). Se utilizaron 30 g de sacarosa, 7 g de agar y un pH de 5.7. El experimento consistió de 5 repeticiones por tratamiento.

Enraizamiento

Los brotes que alcanzaron una longitud mayor a 5 mm fueron sometidos a un choque auxínico durante 42 horas para la inducción de raíces, para esto se utilizó el medio MS al 50% líquido, 30 g de sacarosa en dos tratamientos: 1) 3 mg/l de AIB; 2) 3 mg/l de AIB en combinación con 1 mg/l de AIA y 3.5 mg/l de ANA. Posterior a la inmersión de los brotes en el medio de inducción, estos fueron transferidos a un medio semisólido MS 50%, 30 g de sacarosa, pH a 5.7 durante 4 semanas. Se establecieron 8 repeticiones por tratamiento.

Aclimatación de plantas

Las plantas con raíz fueron sometidas a aclimatación de igual forma que aquellas obtenidas de yemas axilares, como se menciona en un párrafo anterior.

Análisis estadístico

Los ensayos se realizaron con un Diseño Completamente Aleatorizado (DCA) con o sin un diseño factorial de los tratamientos y la evaluación de los datos se realizó con un análisis de varianza (ANDEVA) y pruebas de Fisher para la comparación de medias.

Resultados

Inducción de brotes axilares a partir plántulas *in vitro*

Inducción de brotes

El cultivo de nudos cotiledonares para la inducción de brotes axilares mostró diferencias significativas con las concentraciones de 0.25 mg/l y 0.5 mg/l de BAP. El mayor efecto se observó con 0.5 mg/l de BAP, concentración que permitió un promedio de 2.06 brotes por explante. Comparativamente, en presencia de 0.25 mg/l de esta citocinina sólo se desarrolló 1.53 brotes/explante (figura 1).

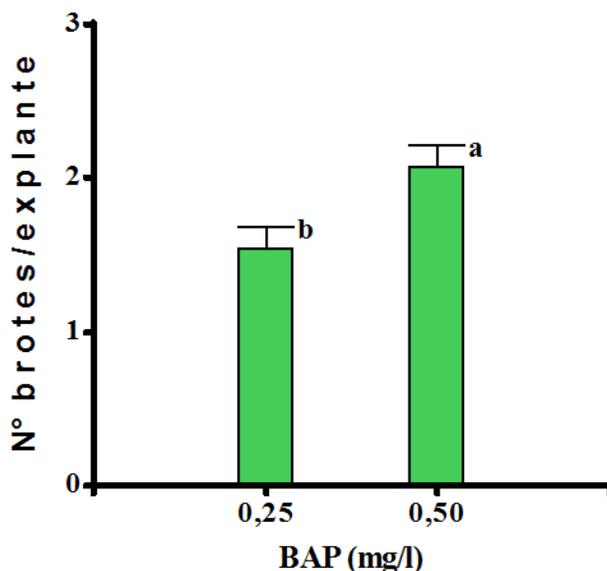


Figura 1. Efecto de la bencilaminopurina (BAP) sobre el desarrollo de brotes axilares en segmentos nodales de *J. curcas*, variedad tóxica. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (LSD Fisher; $p \leq 0.05$).

Desarrollo de brotes

El uso de diferentes concentraciones de caseína hidrolizada (100 y 200 mg/l) en los medios MS y WPM mostró diferencias significativas sobre el desarrollo de los brotes y la longitud de los brotes. Se observó que el medio MS suplementado con 100 mg/l de caseína hidrolizada favoreció el crecimiento en longitud de los brotes (6.4 mm) en comparación con una longitud de 3.6 mm alcanzada por los brotes cultivados en el medio WPM en la misma concentración de caseína hidrolizada. En ambos medios de cultivo el aumento en la concentración de caseína no incrementó la longitud de los brotes (figura 2).

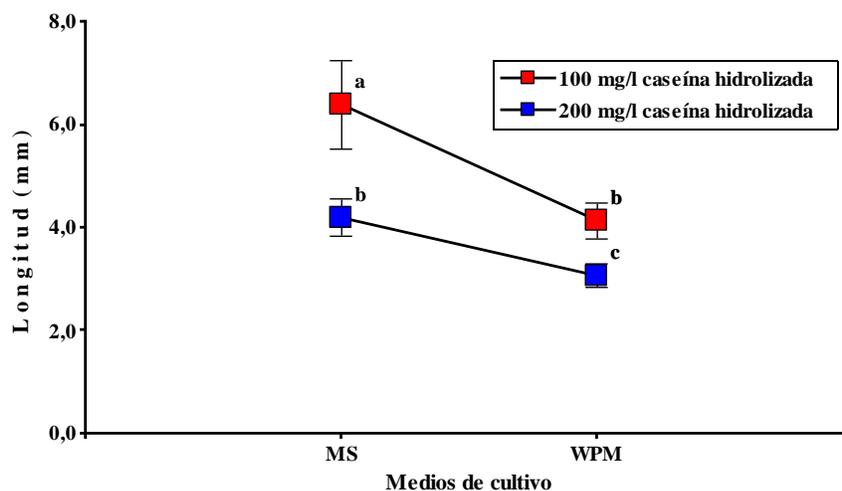


Figura 2. Efecto de los medios de cultivo MS y WPM suplementados con caseína hidrolizada sobre el crecimiento de brotes axilares de *J. curcas*, variedad no tóxica. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (LSD Fisher; $P \leq 0.05$).

Enraizamiento y aclimatación

La inducción de raíces en medio líquido mediante choque auxínico de 96 horas y el subcultivo posterior de los brotes en un medio semisólido sin auxina no permitió un alto porcentaje de regeneración de raíces a partir de los brotes de *J. curcas* (Cuadro 1). Sin embargo, el mayor porcentaje de enraizamiento (25%) y longitud de raíces (173.3 mm) se observó con 3mg/l de AIB (Figura 3A). La combinación de AIB (3 mg/l), AIA (1 mg/l) y ANA (3,5 mg/l) resultó en un enraizamiento inferior con sólo el 8,3% de brotes enraizados (cuadro 1). La concentración de 5 mg/l de AIB sola o en combinación no tuvo efecto sobre el enraizamiento de los brotes.

Cuadro 1. Efecto de la inducción de raíces por choque auxínico de 96 horas con auxinas sobre el enraizamiento de *J. curcas*, variedad tóxica.

AIB	Auxinas (mg/l)		Enraizamiento (%)	N° de raíces	Longitud de raíces (mm)
	AIA	ANA			
3.0	0.0	0.0	25.0 a	0.2 a	173.3 a
3.0	1.0	3.5	8.3 b	0.5 a	28.3 b
5.0	1.0	3.5	0.0 b	0.0 a	0.0 b
5.0	0.0	0.0	0.0 b	0.0 a	0.0 b

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (LSD Fisher; $p \leq 0.05$).

Por otra parte, cuando los brotes fueron sometidos a un periodo de inducción menor (42 horas) utilizando la combinación de reguladores de crecimiento (3mg/l de AIB, 1mg/l de AIA y 3.5 mg/l de ANA) el enraizamiento de los brotes se incrementó significativamente (50%) en comparación con el uso exclusivo de AIB (28.5%), pero la longitud de las raíces fue similar en ambos tratamientos (98.6 y 100.7 mm respectivamente) (cuadro 2, Figura 3 A a C). No obstante, solo unas pocas plantas sobrevivieron a la aclimatación (figura 3 D).

Cuadro 2. Efecto de la inducción de raíces durante 42 horas con auxinas sobre el enraizamiento de *J. curcas*, variedad tóxica.

AIB	Auxinas (mg/l)		Enraizamiento (%)	N° de raíces	Longitud de raíces (mm)
	AIA	ANA			
3.0	0.0	0.0	28.5 b	0.4 a	100.7 a
3.0	1.0	3.5	50.0 a	1.0 a	98.6 a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (LSD Fisher; $p \leq 0.05$).

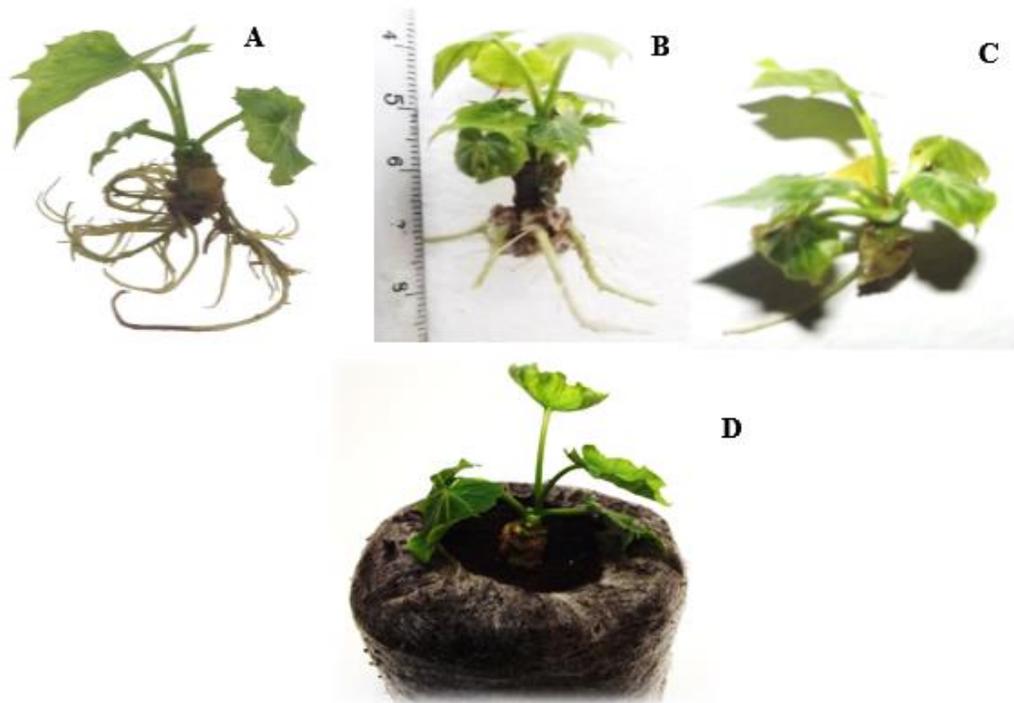


Figura 3. Regeneración de raíces a partir de segmentos nodales de *J. curcas*. Desarrollo de raíces con una inducción de 96 horas con 3.0 mg/l AIB, 1 mg/l de AIA y 3.5 mg/l de ANA (A). Desarrollo de raíces con una inducción de 42 horas con 3.0 mg/l AIB (B); 3.0 mg/l AIB, 1 mg/l de AIA y 3.5 mg/l de ANA (C). Planta aclimatada en pellets después de 15 días en invernadero (D).

Inducción de brotes adventicios a partir de hojas

Inducción de callo

Las variedades T y NT y el estado de madurez de las hojas de *J. curcas* no presentaron diferencias significativas para la formación de callo con características organogénicas en presencia de 2.0 mg/l de BAP y 0.5 mg/l de AIB (Cuadro 3).

Cuadro 3. Efecto de la variedad y el estado de madurez de la hoja sobre la formación de callo en *J. curcas* en presencia de 2.0 mg/l de BAP y 0.5 mg/l de AIB.

Variedad	Estado de madurez de la hoja	Callo (%)
Baja toxicidad (NT)	Inmadura	71.0 ± 3.0 a
Baja toxicidad (NT)	Semi-madura	71.0 ± 3.0 a
Tóxica (T)	Inmadura	66.0 ± 3.0 a
Tóxica (T)	Semi-madura	70.0 ± 3.0 a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (LSD Fisher; $p \leq 0.05$).

En la variedad tóxica, al utilizar diferentes concentraciones de BAP (2 y 5 mg/l) y AIB (0, 0,5 y 1 mg/l) solas y en combinación, la respuesta a los tratamientos fue altamente significativa ($p < 0,0001$). El cultivo de hojas inmaduras con 2 mg/l de BAP y 1 mg/l de AIB presentó la mayor respuesta en la formación de callo con un 90.64%. De forma similar, en el cultivo de hojas semimaduras con 2 mg/l de BAP en combinación de 0.5 y 1 mg/l AIB, se observó una formación de callo entre el 85.1 y 86.6%. La menor formación de callo (11,88%) se observó en hojas semimaduras con 5 mg/l de BAP (cuadro 4).

Cuadro 4. Efecto del estado de maduración de la hoja y de la concentración de BAP en combinación con AIB sobre la inducción de callo en *J. curcas*, variedad tóxica.

Reguladores del crecimiento (mg/l)		Tipo de hoja	Formación de callo organogénico (%)
BAP	AIB		
2.0	0.0	Inmadura	75.9±6.3 abc
2.0	0.5	Inmadura	46.4±6.3 de
2.0	1.0	Inmadura	90.6±6.3 a
2.0	0.0	Semi-madura	39.6±6.3 e
2.0	0.0	Semi-madura	39.6±6.3 e
2.0	0.5	Semi-madura	86.6±6.3 ab
2.0	1.0	Semi-madura	85.1±6.3 ab
5.0	0.0	Inmadura	30.4±6.3 e
5.0	0.5	Inmadura	78.6±6.3 ab
5.0	1.0	Inmadura	59.9±6.3 cd
5.0	0.0	Semi-madura	11.8±6.3 f
5.0	0.5	Semi-madura	38.3±6.3 e
5.0	1.0	Semi-madura	69.2±6.3 bc

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (LSD Fisher; $p \leq 0.05$).

Sin embargo, con el uso de concentraciones crecientes (2, 5, 7 y 10 mg/l) de BAP (figura 4) y Kinetina (figura 5) en combinación del AIB (0, 0.5 y 1 mg/l) se observaron diferencias significativas en la formación de callo utilizando hojas SM. Cuando se utilizó 2 mg/l de BAP en ausencia de AIB se observó una formación de callo de 81.5%, y al utilizar 7 mg/l de BAP sola se observó 8.2% de callos. Sin embargo, al utilizar 10 mg/l de BAP en combinación con 1 mg/l de AIB se logró un 88.2% de callos (figura 4).

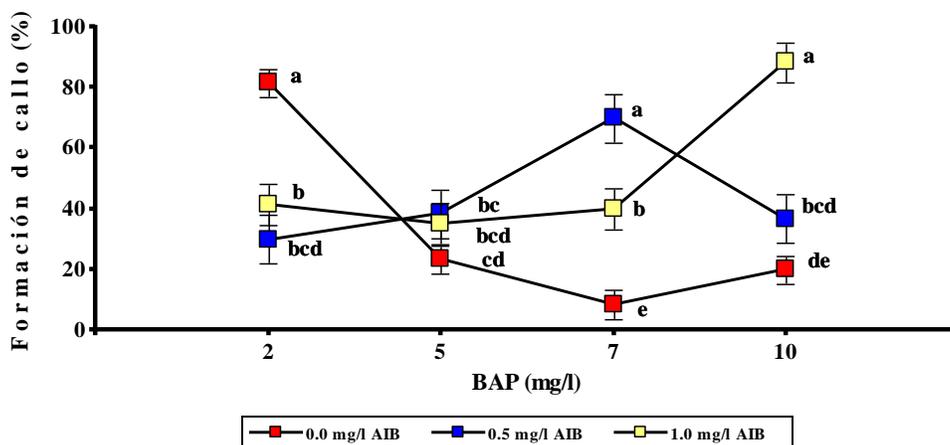


Figura 4. Efecto de la combinación de diferentes concentraciones de BAP y AIB sobre la inducción de callo en hojas semimaduras de *J. curcas*, variedad tóxica. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (LSD Fisher; $P \leq 0.05$).

Por otra parte, cuando se utilizó 10 mg/l de Kinetina y 1 mg/l de AIB el porcentaje de cultivos con callo fue de sólo el 41%; mientras que con 5 y 7 mg/l de Kinetina y 1 mg/l de AIB hubo una mayor formación de callo de 63.3 y 58.2%, respectivamente (figura 5).

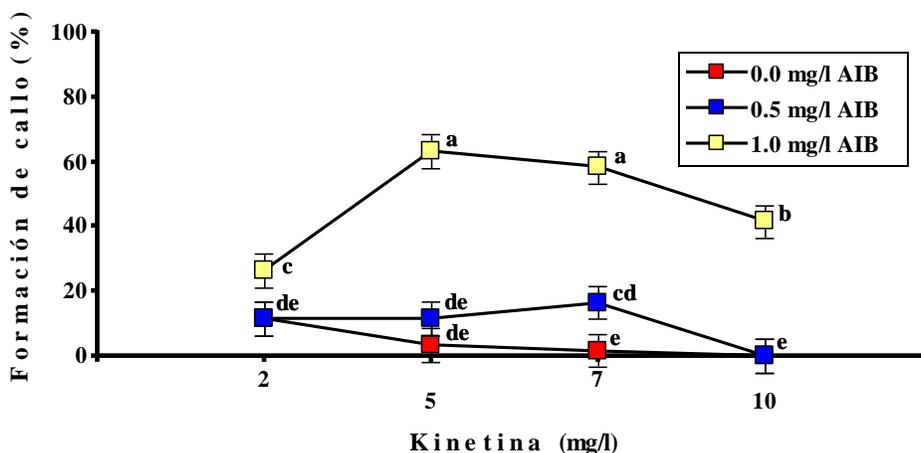


Figura 5. Efecto de la combinación de diferentes concentraciones de Kinetina y AIB sobre la inducción de callo en hojas semimaduras de *J. curcas*, variedad tóxica. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (LSD Fisher; $P \leq 0.05$).

La formación de callo organogénico y la diferenciación de brotes adventicios sobre el mismo callo se observa en el cultivo de hojas SM con 10 mg/l de BAP y 1 mg/l de AIB (Figura 6A), y en menor grado con 2mg/l de BAP sin AIB (figura 6B). Muy poca formación de callo se

observa con 7 mg/l de BAP (figura 6C). En la misma figura (D-F) se observa la formación de callo organogénico con brotes adventicios en presencia de Kinetina.

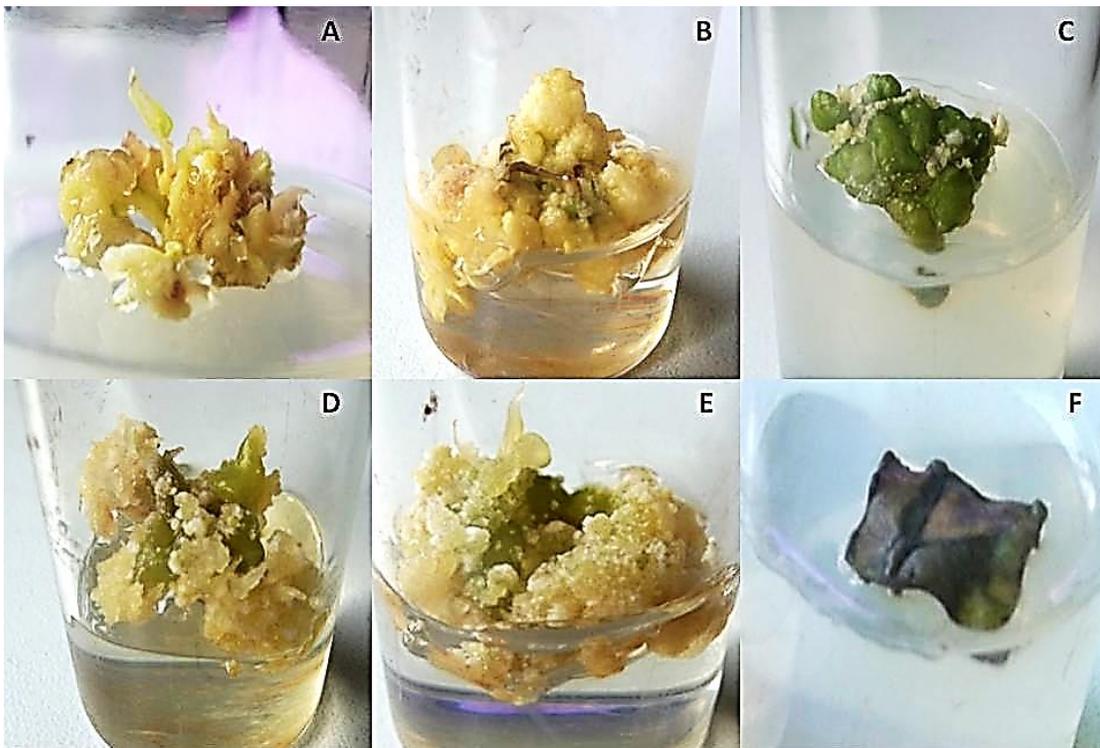


Figura 6. Inducción de callo organogénico y diferenciación de brotes adventicios en explantes foliares de *J. curcas*, variedad tóxica. Callo organogénico y brotes adventicios formados con 10 y 2 mg/l de BAP en presencia de 1 mg/l de AIB, respectivamente (A-B); 7 mg/l de BAP en ausencia de AIB (C). Callo organogénico y brotes adventicios formados con 5 y 7 mg/l de Kinetina y 1 mg/l de AIB, respectivamente (D-E). Explante necrosado con 10 mg/l de Kinetina y 0.5 mg/l de AIB (F).

Regeneración de brotes

Durante la regeneración de brotes a partir de los callos con características organogénicas se observó un efecto altamente significativo ($P < 0.0001$) en la interacción entre la madurez de las hojas utilizadas como explantes y las variedades de alta y baja toxicidad utilizadas. La mayor regeneración de brotes se observó en hojas semimaduras de la variedad tóxica con 4.13 brotes/explante (figura 7) cultivadas en presencia de 2.0 mg/l de BAP y 0.5 mg/l de AIB (figura 9 A). Los demás tratamientos sólo alcanzaron entre 0.2 y 0.47

brotos/explante. La variedad de baja toxicidad resultó ser la menos organogénica para las condiciones de cultivo evaluadas (figura 7).

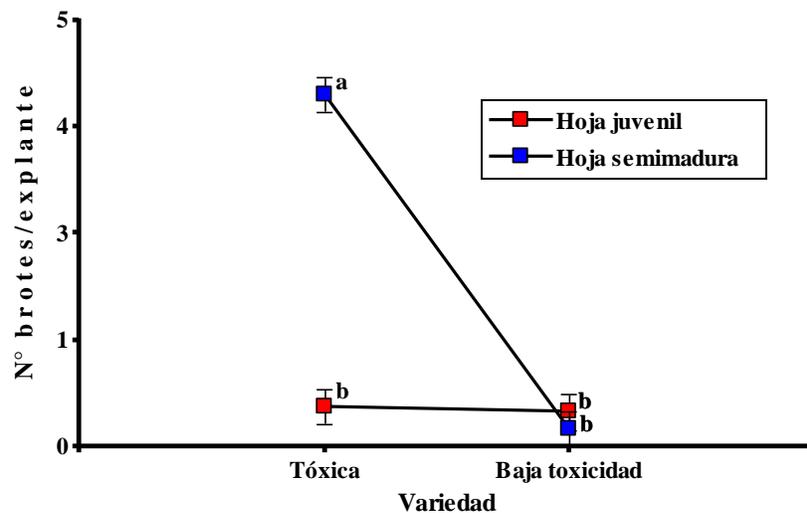


Figura 7. Efecto de las hojas inmaduras y semimaduras de las variedades T y NT de *J. curcas* sobre la regeneración de brotes a partir de callos organogénicos. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (LSD Fisher; $P \leq 0.05$).

Desarrollo de brotes

El desarrollo de brotes a partir de los callos organogénicos presentó diferencias significativas entre el uso de AIA y BAP solas y en combinación de diferentes concentraciones de GA_3 (figura 8). El mejor crecimiento de los brotes se observó en presencia de 0.25 mg/l de AIA (15.8 mm), seguido de 0.25 mg/l de BAP (8.4 mm) en la variedad T (figura 9 B). El uso de GA_3 no estimuló de manera significativa el desarrollo de los brotes. El desarrollo de brotes no fue logrado en la variedad de baja toxicidad.

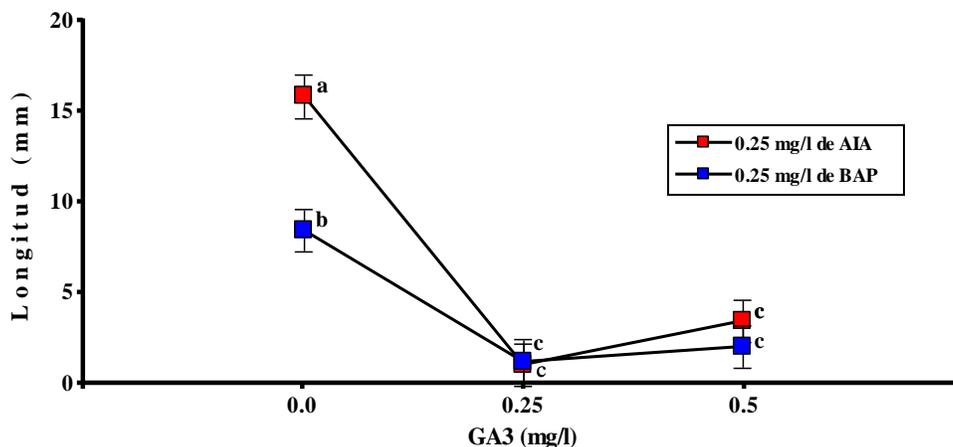


Figura 8. Efecto del AIA y la BAP solas o en combinación de diferentes concentraciones de GA3 sobre el desarrollo y alargamiento de brotes regenerados de callos de *J. curcas*, variedad tóxica. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (LSD Fisher; $P \leq 0.05$).

Enraizamiento y aclimatación

De los experimentos realizados para lograr el enraizamiento de brotes adventicios de *J. curcas*, variedad tóxica, el mejor tratamiento consistió en una inducción de 42 horas en el medio MS líquido suplementado con 3 mg/l de AIB, 1 mg/l de AIA y 3.5 mg/l de ANA (Cuadro 5). Estas condiciones permitieron el porcentaje de enraizamiento más alto (62.5%) y el mayor número de raíces (1.38) de mayor longitud (14.0 mm). Sólo el 13 % de las plantas enraizadas sobrevivieron a la aclimatación (figura 9 C y D).

Cuadro 5. Efecto de la inducción de raíces durante 42 horas con AIB, AIA y ANA sobre la regeneración de raíces de *J. curcas*, variedad tóxica.

Auxinas (mg/l)			Enraizamiento (%)	N° de raíces	Longitud de raíces (mm)
AIB	AIA	ANA			
3.0	0.0	0.0	37.5	0.3±0.38 a	95.0 a
3.0	1.0	3.5	62.5	1.3±0.38 a	140.0 a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (LSD Fisher; $p \leq 0.05$).



Figura 9. Regeneración, desarrollo, enraizamiento y aclimatación de brotes de *J. curcas* obtenidos a partir de hojas semimaduras de la variedad tóxica. A) Brotes inducidos con 2 mg/l de BAP y 0.5 mg/l de AIB. B) Brotes en la fase de desarrollo. C) Brotes enraizados. D) Brotes con 30 días de aclimatación.

Discusión

La importancia del cultivo de *J. curcas* como especie productora de biocarburantes requiere la distribución de grandes volúmenes de plantas hacia los productores en cortos periodos de tiempo. Por lo tanto, esas plantas deben ser capaces de producir altos rendimientos en aceite y tener una morfología y fenología homogénea para facilitar su cultivo; esto significa que la propagación de las plantas seleccionadas por estas características debe ser *in vitro* (Samson *et al.* 2011). Sin embargo, para encontrar una aplicación a nivel industrial en la producción de plantas, los protocolos de multiplicación deben ser fiables, simples y reproducibles. De igual forma, la mejora genética en proceso de desarrollo para esta especie en muchos países del mundo, llevará a la liberación de variedades con

características deseables, como por ejemplo, genotipos con contenidos de aceite mejorados, o con mayor tolerancia a estreses biótico y abiótico (Johnson *et al.* 2011).

A pesar del gran número de publicaciones relacionadas a la micropropagación de *J. curcas*, utilizando todo tipo de explantes y procedimientos (Sujatha *et al.* 2005, Rajore y Batra 2005, Deore y Johnson 2008, Shrivastava y Banerjee 2008, Kumar *et al.* 2010a, entre otros), son pocos los estudios que han documentado la aclimatación exitosa de las plantas (Kumar *et al.* 2010a, 2010b; Kumar *et al.* 2011) y la transferencia a suelo (Deore y Johnson 2008).

En este estudio, se abordó la micropropagación de *J. curcas* utilizando dos metodologías: 1) La multiplicación de brotes axilares a partir del cultivo de segmentos nodales de plántulas germinadas *in vitro* y; 2) La inducción de brotes adventicios a partir de segmentos de hoja de plantas establecidas en invernadero. En ambas metodologías se pudo constatar que la propagación *in vitro* de esta especie aún encierra limitaciones, asociadas principalmente al desarrollo de los brotes que dificulta la multiplicación y el enraizamiento de los mismos, haciendo difícil la transferencia de las plantas a condiciones *ex vitro* (invernadero y suelo).

La información generada con respecto al número de brotes producidos en ambas metodologías nos revela que mientras en el cultivo de segmentos nodales con 0.5 mg/l de BAP se logró la producción de 2.06 brotes por explante; durante la regeneración de brotes adventicios en presencia de 2 mg/l de BAP se obtuvieron 4.13 brotes por explante. Por lo tanto, el mayor rendimiento en la formación de brotes se logró por la vía de la organogénesis a partir de callos formados en hojas semimaduras de la variedad tóxica. En nuestro caso no se logró el desarrollo de brotes en la variedad de baja toxicidad. Nuestros resultados son similares a los obtenidos por Rajore y Batra (2005) utilizando 1 mg/l de BAP en el cultivo de segmentos nodales. Sujatha *et al.* (2005) lograron 2,3 brotes por nudo utilizando la variedad no tóxica procedente de México. Comparativamente, estos datos indican que posiblemente el genotipo también juega un rol importante en el número de brotes producidos durante la multiplicación de *J. curcas* (Samson *et al.* 2011).

Durante la inducción de callo organogénico se determinó que cuando se cultivaron hojas inmaduras y semimaduras con 2 mg/l de BAP y 1 mg/l de AIB se dio la mejor respuesta en la formación de callo organogénico sin haber diferencias entre los tipos de hoja y la variedad tóxica o no tóxica; sin embargo, la diferencia fue manifiesta en la regeneración de brotes, siendo significativamente mayor en hojas semimaduras. Sin embargo, concentraciones crecientes de BAP y AIB mostraron divergencias no muy claras en la formación de callo

organogénico en hojas semimaduras; en este caso no se manifestó una relación directa entre el incremento en la concentración de BAP y la producción de callos. Más de un 80% de callos fueron formados en concentraciones distantes de BAP, es decir, con 2 mg/l de BAP en ausencia de AIB y con 10 mg/l de BAP y 1mg/l de AIB. El uso de Kinetina en las mismas concentraciones permitió definir una tendencia más clara en la formación de callo, aunque éste fue formado en menor cantidad y no se manifestó organogénesis. En este caso la formación de callo fue creciente conforme se aumentó la concentración de Kinetina desde 2 a 7 mg/l para todas las concentraciones de AIB utilizadas; tomando en cuenta que para todas las concentraciones de Kinetina la mayor formación de callo se dio con 1 mg/l de AIB. Tejedor (2010) también encontró que el uso de hojas semimaduras de plantas juveniles favoreció la regeneración de brotes (3.6 brotes/explante) cuando fueron cultivadas con BAP (2.0 mg/l) y AIB (0.5 mg/l); el cultivo de hojas cotiledonares en el mismo medio permitió la regeneración de 4.1 brotes por explante, después de 4 semanas. También Kumar *et al.* (2011) encontraron diferencias entre la regeneración de brotes adventicios en hojas cotiledonares y hojas verdaderas.

Con respecto al desarrollo de los brotes de *J. curcas* producidos por diferentes metodologías *in vitro*, la literatura consultada indica el uso de diferentes reguladores del crecimiento solos o en combinación. Así, brotes procedentes de segmentos nodales de hasta 4.8 cm de longitud fueron obtenidos por Datta *et al.* (2007) utilizando una combinación de AIB (0.5 μ M) y Kinetina (2.3 μ M); y brotes del mismo origen alcanzaron una longitud de 2 cm en un medio suplementado con BAP (21.6 μ M), Kinetina (4.4 μ M) y AIB (0.4 μ M) (Koono *et al.* 2011). Contrariamente, en este estudio el alargamiento de los brotes producidos de explantes nodales no superó los 6.4 mm en un medio MS suplementado con 100 mg/l de caseína hidrolizada. Resultados similares fueron obtenidos por Jiménez (2010) para el alargamiento de brotes de *J. curcas* en medio de cultivo semisólido; sin embargo, al cultivar los brotes en recipientes de inmersión temporal (RITA) logró brotes con una longitud de 1.9 cm.

En este estudio, la elongación de los brotes producidos por organogénesis fue favorecido cuando se utilizó solamente 0,25 mg/l de AIA lográndose una longitud promedio de los brotes de 15.8 mm. Un efecto significativo del AIA (8,5 μ M) en el alargamiento de los brotes también fue encontrado por Kumar *et al.* (2011) al obtener brotes de 3.01 cm de longitud. Se observó que la adición de GA₃ no tuvo efecto positivo sobre la elongación de los brotes, contrario a los resultados presentados por Deore y Johnson (2008), quienes lograron el

desarrollo de brotes procedentes de organogénesis de hoja, con longitudes de entre 2 y 3 cm utilizando una alta relación auxina – citocinina y la adición de GA₃ en el medio de cultivo.

Con respecto al enraizamiento, la inducción de raíces en brotes axilares y brotes adventicios fue favorecida cuando se cambió el tiempo de inducción de 96 horas a 42 horas utilizando el mismo tratamiento auxínico (3 mg/l de AIB, AIA 1 mg/l y ANA 3,5 mg/l). Esta reducción en el tiempo de inducción permitió aumentar el porcentaje de enraizamiento de 8.3% a 50% en brotes axilares y del 50% al 62.5% en brotes adventicios, indicando que los brotes adventicios presentan una mayor aptitud al enraizamiento. Mientras tanto, Kumar *et al.* (2011) al utilizar las mismas auxinas durante 96 horas, lograron un 21.7% de enraizamiento en brotes axilares. En nuestro trabajo el uso de AIB sola (3 mg/l) en una inducción de 96 horas en medio líquido resultó en un 25% de enraizamiento de brotes axilares; en tanto que, Datta *et al.* (2007) y Koona *et al.* (2011) lograron enraizamientos del 52 y 54 % respectivamente en brotes axilares, con solo 0.2 mg/l de la misma auxina. Del mismo modo Deore y Johnson (2008) mencionan el 80% de enraizamiento utilizando una baja concentración de AIB (0.1 mg/l) pero en brotes adventicios. En nuestro caso la longitud de las raíces fue similar en todos los casos donde se utilizó una inducción de 42 horas. Sin embargo, la aclimatación de los brotes enraizados no fue muy exitosa, posiblemente asociada al pequeño tamaño de los brotes obtenidos en la mayoría de los casos.

Sería recomendable continuar estos estudios y evaluar las diferentes condiciones de cultivo que permitan obtener una alta regeneración de brotes adventicios de mayor longitud que facilite el enraizamiento para llevar material en mejores condiciones de sobrevivencia a la fase de aclimatación.

Literatura citada

- Cifuentes, M. y Fallot, A. 2009. *Jatropha curcas* como biocombustible: estado actual del cultivo en Mesoamérica. Recursos Naturales y Ambiente CATIE. CR. 56-57: 165-169.
- Datta, M; Mukherjee, P; Ghosh, B. y Jha, T. 2007. *In vitro* clonal propagation of biodiesel plant (*Jatropha curcas* L.). Current Science, Reseach communications. India, 93(10):1438-1442.
- Deore, A. y Johnson, S. 2008. High-frequency plant regeneration from leaf-disc cultures of *Jatropha curcas* L.: an important biodiesel plant. Plant Biotechnol Rep. 2:7-11.

- Fairless, D. 2007. Biofuel: the little shrub that could: maybe. *Nature* 499: 652-655.
- Heller, J. 1996. Physic nut. *Jatropha curcas* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 1. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Researchs, Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute. Rome. 66 p.
- Jayasingh, M. 2004. The use of biodiesel by the Indian railways. *Jatropha* and Other Perennial Oilseed Crops. BAUF. Development Research Foundation, Pune, India, págs. 31-33.
- Jiménez, M. 2010. Potencial del cultivo en inmersión temporal usando recipientes RITA para la multiplicación *in vitro* de especies leñosas tropicales. Escuela de biología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago. CR. 96 p.
- Johnson, S.; Eswaran, N.; Sujatha, M. 2011. Molecular approaches to improvement of *Jatropha curcas* Linn. As a sustainable energy crop. *Plant Cell Rep* 30:1573-1591.
- Jongschaap, R; Corre, W; Bindraban, P. y Brandenburg, W. 2007. Claim and facts on *Jatropha curcas* L.: Global *Jatropha curcas* evaluation, breeding and propagation programme. Plant Research International. Wageningen UR. Stichting Het Groene Woudt, Laren. 42 p.
- King, A; He, W; Cuevas, J; Freudenberger, M.; Ramiamanana, D. y Graham, L. 2009. Potential of *Jatropha curcas* as a source of renewable oil and animal feed. *Journal of Experimental Botany*, 60(10): 2897-2905.
- Koona, S; Kondeti, S; Doulathabath, M; Pinnamaneni, R. 2011. In vitro clonal propagation of *Jatropha curcas* (L.) using nodal explants and assessment of genetic fidelity through RAPD markers. *Current Biotica* 5 (1): 1-16.
- Kumar, N; Anand, V; Reddy, M. 2010a. Shoot regeneration from cotyledonary leaf explants of *Jatropha curcas*: a biodiesel plant. *Acta Physiol Plant*. DOI 10.1007/s11738-010-0479-9.
- Kumar, N; Anand, V.; Reddy, M. 2010b. *In vitro* plant regeneration of non-toxic *Jatropha curcas* L.: Direct shoot organogenesis from cotyledonary petiole explants. *Crop Sci. Biotech.* 13(3): 189-194.
- Kumar, N; Anand, V. y Reddy, M. 2011. Plant regeneration of non-toxic *Jatropha curcas* _ impacts of plant growth regulators, source and type of explants. *J. Plant Biochem. Biotechnol.* 20 (1):125-133.

- Lloyd, G; McCown, B. 1980. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. Com. Proc. Int. Plant Prop. Soc. 30:421-427.
- Machado, R. y Suárez, J. 2009. Performance of three provenances of *Jatropha curcas* in the germoplasm bank of the EEPF "Indio Hatuey". Pastos y Forrajes, 32(1): 29-37.
- Martínez, J; Evangelista, S. y Martínez, A. 2007. Perfil nutricional de semillas de *Jatropha curcas* L. provenientes de Michoacán. Alimentos Ciencia e Ingeniería. 16:313-314.
- Mukherjee, P. Varhney, A. Johnson, T. Jha, T. 2011. *Jatropha curcas*: A review on Biotechnological Status and Challenges, Plant Biotech Rep. doi: 10.1007/s11816-011-0175-2.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. Physiologia Plantarum 15(3):473-497.
- Nunes, L. 2007. Caracterização de frutos, sementes e plântulas e cultivo de embriões de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Lavras, Brasil, 78 p.
- Rajore, S. y Batra, A. 2005. Efficient plant regeneration via shoot tip explant in *Jatropha curcas* L. Plant Biochem Biotech 14:73-75.
- Samson, M; Mergear, G; Baudoin, J. y Toussaint, A. 2011. Culture *in vitro* de *Jatropha curcas* L. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 15(4) 657-574.
- Schmook, B. y Sánchez, S. 2000. Uso potencial de *Jatropha curcas* L. en la península de Yucatán, México. Foresta Veracruzana 2(2):7-11.
- Shrivastava, S. y Banerjee, M. 2008. *In vitro* clonal propagation of physic nut (*Jatropha curcas* L.): Onfluence de additives. International Journal of Integrative Biology. A journal for biology borders, Bhopal, India. 3 (1): 73 p.
- Sujatha, M; Makkar, H. y Becker, K. 2005. Shoot bud proliferation from axillary nodes and leaf sections of non-toxic *Jatropha curcas* L. Plant Growth Regulation. 47 (1).83-90.
- Tejedor, B. 2010. Micropropagación de *Jatropha curcas* L. Trabajo final de carrera, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Universidad Politécnica de Valencia. Valencia. 72 p.
- Toral, O; Iglesias, J; Oca, S; Sotolongo, J; Garcia, S. y Torsti, M. 2008. *Jatropha curcas* L., a tree species with energetic potential in Cuba. Pastos y Forrajes, Cuba. Vol. 31 (3) 191-207.
- Verma, K. y Gaur, A. 2009. *Jatropha curcas* L.: Substitute for Conservation Energy. World Journal of Agricultural Sciences, India. 5(5): 552-556.

Capítulo 5

Divulgación de resultados

Participación de estudiantes en el desarrollo del proyecto

Estudiante de Maestría en Mejoramiento de Cultivos Tropicales:

- Julián Andrés Prada: Regeneración de plantas vía organogénesis y crioconservación de *Jatropha curcas* L.

Estudiantes de Bachillerato y Licenciatura en Biotecnología:

- Kendall Araya Ramos: Estudio preliminar para el establecimiento de un protocolo de crioconservación de suspensiones celulares de *Uncaria tomentosa*.
- Anny Vannesa Guillén Watson: Desarrollo de un protocolo de crioconservación de ápices de uña de gato (*Uncaria tomentosa* Willd).
- Jason Pérez Chaves: Crioconservación de ápices de uña de gato utilizando la técnica de encapsulamiento-deshidratación.

Estudiantes de Ingeniería en Biotecnología asistentes especiales para investigación:

- Monserrat Briceño Coronado
- Kendall Araya Ramos
- Anny Vannesa Guillén Watson
- Ingrid Méndez Quesada
- Julio Alexander Chaves Serrano
- Shirley Mariel Arias Cordero
- Lester Fabian Vargas Zúñiga

Ingenieros en Biotecnología colaboradores:

- Laura Sánchez Calvo
- Jason Perez
- William Watson Guido
- Tatiana García Rojas

Participación en Congresos:

- Abdelnour-Esquivel, A. 2014. Cryopreservation of Woody Tropical Species. World Forum on Biology. Joint Meeting of the Society for In Vitro Biology and the Society for Cryobiology. May 31-June 4, Savannah, Georgia, USA.
- Abdelnour-Esquivel, A. 2013. Crioconservación de especies leñosas. Congreso de la Red Latinoamericana de Biotecnología (REDBIO), 18 al 22 de noviembre, Mar del Plata, Argentina.
- Abdelnour-Esquivel, A.; Perez, J.; Guillén, A.; Araya, K. 2014. Cryopreservation of cat's claw (*Uncaria tomentosa*). 23º SILAE Congress. 7-12 September, Marsala, Italy.

Publicaciones a la fecha:

- Abdelnour-Esquivel, A.; Aguilar-Vega, M.E. 2013. Crioconservación de germoplasma vegetal en Costa Rica. In: Crioconservación de plantas en América Latina y El Caribe. Gonzalez-Arno, M.T.; Engelmann, F. (Eds.). Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). Pp. 113-126
- Prada, J.A.; Aguilar, M.E.; Abdelnour-Esquivel, A.; Engelmann, F. 2014. Cryopreservation of Seeds and Embryos of *Jatropha curcas* L. American Journal of Plant Sciences, 6: 172-180.

Agradecimientos

Los investigadores agradecen el apoyo recibido por el MICIT-CONICIT, la Vicerrectoría de Investigación y Extensión del Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR) y el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) por el apoyo financiero y logístico para desarrollar esta investigación. También agradecen a los estudiantes asistentes y profesionales que colaboraron con el desarrollo de las actividades del proyecto.