

Actualización

CRIOCONSERVACION DE PLANTAS, ESTADO ACTUAL DE LA INVESTIGACION EN COSTA RICA¹

Ana Abdelnour*

Palabras clave: criopreservación, embriones cigóticos, embriones somáticos, suspensiones embriogénicas, callos.

RESUMEN

En Costa Rica, la investigación en criopreservación es reciente. Inició en 1990 con un proyecto en bananos y plátanos desarrollado en el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), seguido por proyectos de investigación en café, cacao, pejibaye y *Pausteria penetrans*, una bacteria usada para el control de nematodos. En 1995, el Instituto Tecnológico de Costa Rica inició trabajos en criopreservación con un proyecto sobre orquídeas en peligro de extinción y más tarde otros en chayote. Las metodologías empleadas y los resultados obtenidos con cada especie se resumen. Además, se discuten los factores que han limitado el desarrollo de este campo y que inciden en que esta técnica no se utilice rutinariamente en el país. Se dan algunas recomendaciones. Al presente, no se cuenta con colecciones mantenidas en nitrógeno líquido; sin embargo, varias instituciones nacionales realizan esfuerzos para establecer bancos para el mantenimiento a largo plazo de especies nativas de importancia económica y ecológica.

INTRODUCCION

Como proceso natural todo material biológico está sujeto al envejecimiento; la estructura y la función de los organismos cambia y se pierde con el tiempo, hasta alcanzar la muerte. Lo mis-

ABSTRACT

Cryopreservation of plants current status of research in Costa Rica. In Costa Rica the development of cryopreservation research is recent. It started in 1990 with a project on bananas and plantains at the Agronomic Center for Research and Training (CATIE), followed by research on coffee, cocoa, pejibaye, and *Pasteuria penetrans*, a bacterium for biocontrol of nematodes. In 1995, the Costa Rica Institute of Technology (ITCR) initiated work on cryopreservation with a project on endangered species of orchids and chayote (pear squash). Methodologies used and results obtained are summarized. In addition, limiting factors contributing to the slow progress in this field of research and its lack of routine application in the country are discussed. Some recommendations are made. In Costa Rica, no collection is maintained under liquid nitrogen conditions; however, various national institutions are making efforts to establish long-term banks for native species of economical and ecological importance.

mo sucede en los laboratorios con los materiales que los científicos estudian y manipulan. Por estas razones, desde tiempos remotos se han realizado esfuerzos para detener el reloj biológico de los organismos y en la mayoría de los casos, se ha experimentado con la temperatura y el conte-

1/ Recibido para publicación el 25 de setiembre de 1998.

* Centro de Investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica.

nido de agua para lograr este propósito. Las técnicas de refrigeración permiten retardar el proceso de deterioro, pero la utilización de temperaturas mucho más bajas permiten el almacenamiento de organismos vivos en un estado de suspensión animada por periodos extensos. Este proceso de congelamiento a ultra bajas temperaturas ha probado ser un método eficiente para detener el reloj biológico de los organismos y se le conoce como criopreservación o sistema criogénico de almacenamiento (McLellen y Day 1995).

El método de criopreservación 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 provoca grandes daños en las membranas de la gran mayoría de las células (Villalobos y Engelmann 1995).

Aplicaciones de la criopreservación

Desde hace más de 40 años, cuando se demostró por primera vez la posibilidad de criopreservar eficientemente esperma animal, la técnica se ha experimentado en campos diversos para almacenar células vivas por largos periodos y aún indefinidamente. La criopreservación 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 criopreservar desde células hasta órganos ha sido demostrada ampliamente, al igual que su utilidad para la conserva-

ción de germoplasma y de material generado en condiciones de laboratorio (McLellen y Day 1995, Abdelnour 1996).

CRIOPRESERVACION DE PLANTAS

La criopreservación se reconoce como la única opción disponible para el almacenamiento, a largo plazo, del germoplasma de especies propagadas vegetativamente y especies con semillas clasificadas como recalcitrantes e intermedias en cuanto al almacenamiento (Villalobos y Engelmann 1995).

Las especies recalcitrantes, a diferencia de las ortodoxas (cuyas semillas son resistentes a la desecación hasta contenidos suficientemente bajos de agua, que les permite permanecer viables cuando se almacenan a temperaturas entre 5°C y -20°C), no toleran altos grados de desecación y permanecen viables por periodos cortos (semanas o unos pocos meses), aún si se almacenan bajo condiciones óptimas (alta humedad y temperatura) (Roberts 1973). Por otra parte, las especies con semillas intermedias resisten bastante bien la deshidratación hasta contenidos de agua considerablemente bajos (alrededor del 8%), pero no resisten la exposición a las bajas temperaturas que existen en los bancos de semillas ortodoxas (Krishnapillay y Engelmann 1996).

Debido a lo anterior, los métodos de conservación *ex situ* que se han utilizado tradicionalmente para las especies propagadas vegetativamente, intermedias y recalcitrantes, son las colecciones de campo y más recientemente las colecciones *in vitro*. En esta última opción de conservación, se realizan modificaciones en las condiciones de cultivo para inducir un crecimiento más lento en los materiales (reducción de la iluminación y la temperatura, modificaciones en la composición del medio de cultivo), por lo cual se considera una opción de almacenamiento a mediano plazo. A pesar de ser muy utilizadas, estas opciones de conservación no aseguran la existencia, a largo plazo, de los materiales a salvaguardar. Los recursos fitogenéticos en colecciones de campo permanecen expuestos a plagas, enfermedades y desastres naturales como sequías, inundaciones, etc., además los requerimientos de terreno

y los costos de mantenimiento son considerablemente altos, en particular en el caso de plantas grandes como los árboles y especies de ciclo corto que requieren constante renovación. La conservación *in vitro*, que se efectúa en condiciones de laboratorio, permite extender los intervalos de subcultivo a unos 12 meses o pocos años para muchas especies y comparado con las colecciones de campo, se reduce considerablemente el espacio y la mano de obra requerida para el mantenimiento de las colecciones. También permite la multiplicación rápida de los materiales cuando se desean utilizar. A pesar de que los riesgos de pérdida se reducen al permanecer bajo condiciones asépticas, siempre existe incertidumbre durante el proceso de subcultivo. La estabilidad genética del material así conservado, es un factor a analizar regularmente (Engelmann 1991).

Las ventajas de la crioconservación

La crioconservación es el método de conservación *in vitro* a largo plazo. El almacenamiento a ultra bajas temperaturas durante la crioconservación permite la suspensión del metabolismo, donde no ocurre división celular y por lo tanto, el material permanece sin modificaciones o alteraciones por tiempo indefinido.

La utilización de nitrógeno líquido asegura las ultra bajas temperaturas (entre -196°C y -150°C lo cual depende de que el material permanezca en la fase líquida o gaseosa del nitrógeno) sin la dependencia de la electricidad. Además, el nitrógeno líquido puede adquirirse fácilmente y no es inflamable.

Al ser comparado con el método de conservación *in vitro* a mediano plazo, el método de crioconservación presenta ventajas considerables. Como el material se almacena en tanques, el espacio para mantener la colección en el laboratorio es considerablemente menor (0.5 m^2 para un tanque de almacenamiento con capacidad para 100 L de nitrógeno líquido y miles de muestras), el costo por labor y mantenimiento es mínimo, donde la única labor rutinaria es el llenado del tanque cada semana o semana de por medio, para que el nitrógeno líquido permanezca a un ni-

vel mínimo de seguridad, lo que no toma más de 15 min del tiempo del asistente o técnico del laboratorio. Además, una vez almacenados los materiales, no se manipulan, se encuentran protegidos de posibles agentes contaminantes y en caso de necesitarse una muestra específica, ésta puede ser descongelada y las plantas recuperadas y multiplicadas en corto tiempo (Villalobos y Engelmann 1995).

LA SELECCION DEL MATERIAL A CRIOCONSERVAR

Para la selección del material a crioconservar se deberán tomar en cuenta factores como la estructura genética de la población y el germoplasma disponible. Se pueden almacenar ápices, meristemas, semillas, embriones cigóticos y somáticos, polen y células. Sin embargo, 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 plantas a partir del material almacenado. Por lo tanto, para lograr el éxito en un programa de crioconservación es indispensable establecer *a priori*, un protocolo eficiente para la micropropagación de la especie de interés (Ashmore 1997).

LOS PROCEDIMIENTOS DE CRIOCONSERVACION

Se pueden identificar 2 grandes grupos de procedimientos utilizados para la crioconservación. Los métodos clásicos que consisten en el pretratamiento del material con sustancias crioprotectoras como el sulfóxido de dimetilo (DM-SO), el glicerol, la sacarosa y el polietilenglicol y mezclas de ellas durante unos minutos, horas o días, para lograr la deshidratación lenta de las células. El pretratamiento es seguido por un congelamiento controlado que se lleva a cabo lentamente (0.3°C a $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$) hasta -40°C , luego se almacenan las muestras en nitrógeno líquido. Este procedimiento ha resultado más eficiente con unidades pequeñas de morfología uniforme como cultivos de protoplastos, suspensiones de

células y callos, y menos eficiente con unidades mayores como embriones cigóticos, embriones somáticos maduros y brotes. Otra limitante de estos métodos es la inversión que se debe realizar en un congelador programable, para poder obtener resultados precisos y reproducibles.

Para los materiales de mayor tamaño, recientemente se han desarrollado procedimientos eficientes y reproducibles sin necesidad del congelador programable. El encapsulamiento/deshidratación, que se basa en la tecnología desarrollada para la producción de semillas sintéticas, consiste en encapsular meristemos, ápices y embriones somáticos en alginato y cultivarlos en medio líquido con concentraciones altas de sacarosa durante diferentes períodos. Antes de congelarse rápidamente en nitrógeno líquido, las cápsulas son parcialmente deshidratadas bajo el flujo laminar de aire estéril de una cámara de transferencia o utilizando sílica gel. Para la recuperación, las muestras se colocan en el medio de cultivo estándar (Fabre y Dereuddre 1990). Otro procedimiento utilizado es la **vitrificación**, que consiste en el pretratamiento de las muestras con soluciones concentradas de crioprotectores (sacarosa, glicerol y DMSO) por unos minutos, seguido por el congelamiento en nitrógeno líquido para alcanzar un estado de vitrificación de los solutos internos. Como estas soluciones son tóxicas para las células, es importante controlar cuidadosamente el tiempo de incubación y removerlas gradualmente después de descongelar las muestras (Sakai et al. 1990). Encapsulamiento/vitrificación es otro método que se ha desarrollado recientemente y combina los procedimientos utilizados en las técnicas descritas anteriormente. Las muestras encapsuladas se congelan en presencia de las soluciones vitrificadoras y el porcentaje de recuperación es mayor que utilizando cada procedimiento por separado; al parecer, el encapsulamiento en alginato reduce la toxicidad de las soluciones vitrificadoras y como la manipulación de las muestras es menor antes del congelamiento, se disminuye la duración del procedimiento (Matsumoto et al. 1995). El procedimiento de *desección* es sencillo y muy eficiente, principalmente para la crioconservación de embriones cigóticos. Consiste en la des-

hidratación de los embriones, por varios periodos, bajo un flujo de aire estéril o utilizando envases con sílica gel herméticamente cerrados. El congelamiento es rápido, directamente en nitrógeno líquido (Engelmann et al. 1995). Este procedimiento también es combinado con el precultivo, precultivo/deshidratación, en sacarosa u otra sustancia crioprotectora para aumentar el éxito en la crioconservación de ápices y embriones (Ashmore 1997). Un procedimiento utilizado exitosamente con 150 variedades de papa, el congelamiento por microgotas, ha permitido la recuperación de meristemos en porcentajes considerablemente altos. Este procedimiento consiste en pretratar los meristemos por un período de 2-3 h con DMSO en medio líquido, para luego colocarlos en gotas de 2.5 µl del mismo medio sobre papel aluminio y congelarlos en nitrógeno líquido (Schafer-Menuhr 1995).

Algunos de los métodos desarrollados más recientemente, requieren una mayor manipulación de las muestras y el tiempo invertido antes del congelamiento es mayor (encapsulamiento, precultivo/encapsulamiento); sin embargo, todos presentan la gran ventaja de no requerir el costoso congelador programable y permitir la regeneración de materiales de tamaño considerable. Estas características de los nuevos procedimientos de crioconservación los hacen accesibles a países y laboratorios con recursos económicos limitados.

Para la mayoría de las especies vegetales los protocolos de crioconservación están en estado de experimentación; sin embargo, esta técnica de conservación ya se utiliza de manera rutinaria para el almacenamiento de un gran número de genotipos de los géneros *Rubus*, *Pyrus*, *Solanum* y *Elaeis guineensis* (Ashmore 1997). Al presente, Costa Rica no mantiene colecciones vegetales en nitrógeno líquido, pero la investigación en este campo está tomando mayor importancia, conforme se va despertando el interés y la conciencia sobre la importancia de salvaguardar nuestros recursos fitogenéticos.

LA INVESTIGACION EN CRIOCONSERVACION EN COSTA RICA:

En Costa Rica el desarrollo de investigación en crioconservación es reciente. Inició en

1990 con un proyecto en CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza) apoyado por el IBPGR (Consejo Internacional para los Recursos Fitogenéticos). El objetivo general fue desarrollar un método para crioconservar el germoplasma de bananos y plátanos (*Musa* spp.). En 1992, con el apoyo de USAID (Agencia Internacional de Desarrollo de los Estados Unidos), CATIE junto con la Universidad de Florida, iniciaron trabajos en crioconservación de café (*Coffea* spp.). Además, se trabajó en pejíbaye (*Bactris gasipaes*), cacao (*Theobroma cacao*) y la bacteria *Pausteria penetrans*, un biocontrolador de nematodos. Para 1995, el Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR), junto con la Universidad a Distancia (UNED) y con el apoyo del Gobierno de Italia inició trabajos en crioconservación de especies de orquídeas en peligro de extinción. El ITCR continúa la investigación en crioconservación en especies como orquídeas, forestales maderables y chayote. El CATIE continúa la investigación en café y recientemente inició trabajos con especies forestales.

Varios métodos han sido evaluados en nuestro país para la crioconservación de especies tropicales, los métodos utilizados y los resultados obtenidos se describen brevemente.

Musa spp.

Para los diploides fértiles de bananos y plátanos, *Musa acuminata* (AA) y *Musa balbisiana* (BB), el método de aislamiento del embrión, desecación en un flujo de aire estéril y congelamiento rápido en nitrógeno líquido (NL) (Normah et al. 1986) fue evaluado. Este estudio reportó una exitosa crioconservación de los embriones cigóticos. Los embriones maduros fueron muy resistentes a la desecación y la tasa de sobrevivencia al congelamiento en NL fue alta (83% y 94% para las 2 especies respectivamente), cuando presentaron contenidos de agua alrededor del 15%; aún con contenidos de humedad menores (9%) se obtuvo sobrevivencia. Plantas regeneradas a partir de los embriones congelados fueron sembradas en el campo y comparadas con plantas regeneradas a partir de embriones no congelados, no se observaron diferencias morfológicas entre los materiales (Abdelnour-Esquivel et al. 1992a).

Debido a que los embriones somáticos, los callos y las suspensiones celulares embriogénicas son muy útiles para la micropropagación, la transformación genética y para la conservación de germoplasma, se desarrolló investigación en estas áreas. Se experimentó en crioconservación de embriones somáticos y pequeños agregados de 3 a 4 embriones de banano, *Musa* AAA cv Gran Enano, inducidos a partir de flores masculinas de acuerdo a la metodología descrita por Escalant y Teisson (1994). El material experimental fue cultivado por 1-3 días en un medio con concentraciones crecientes de sacarosa (0.3 a 1 M) y 1 h antes del congelamiento, los embriones fueron incubados en medio líquido con 5% DMSO. El congelamiento se llevó a cabo lentamente, 1°C/min hasta -40°C y luego los embriones se introdujeron en NL. Se obtuvo sobrevivencia a través de la germinación directa de los embriones (40%) y también por producción de callos (35%); sin embargo, los embriones que sobrevivieron como callo rápidamente produjeron embriones somáticos. Los embriones germinaron normalmente y fueron transferidos al invernadero para su aclimatización (Abdelnour-Esquivel y Escalant 1994). Para la crioconservación de callos, el pretratamiento con concentraciones crecientes de sacarosa y el congelamiento lento utilizando un congelador programable resultó en el mayor porcentaje de sobrevivencia (Prado 1991). Por otra parte, se optimizó el protocolo de crioconservación desarrollado por Panis et al. (1990) para suspensiones celulares embriogénicas de *Musa* spp. a partir de flores masculinas (Yah 1998).

Coffea spp.

En café se ha experimentado en crioconservación de embriones cigóticos y somáticos y con brotes apicales.

Con brotes apicales de *C. arabica* cv Catimor, el protocolo de vitrificación descrito por Towill (1988) fue evaluado. La incubación de los brotes en un medio con sacarosa al 0.4 M y PVS2 (30% glicerol, 15% etilenglicol y 15% DMSO) al 20% por 20 min antes de congelarlos rápidamente en NL, fue el único tratamiento que permitió la

sobrevivencia de los brotes (28%). La recuperación de los brotes fue a través de producción de callos (Abdelnour-Esquivel, datos sin publicar).

Con respecto a los embriones cigóticos, se experimentó con 3 genotipos *Coffea arabica* cv Caturra, *C. canephora* cv Robusta y el híbrido Arabusta (*C. arabica* x *C. canephora*) y 2 estadios de maduración de los embriones: frutos verdes (2 meses antes de la cosecha) y frutos amarillos (4 días antes de la cosecha). El método de desecación por flujo de aire estéril y congelamiento rápido en NL fue utilizado debido a su simplicidad y eficiencia en muchas especies. Las mayores tasas de sobrevivencia se obtuvieron con los embriones maduros, aislados de los frutos amarillos (96% de sobrevivencia para *C. arabica* al 16% de humedad), comparado con los aislados de frutos verdes (50% de sobrevivencia al 21% de humedad). Sin embargo, el enriquecimiento del medio de recuperación con AG₃, conocido por promover el crecimiento de embriones inmaduros, permitió la sobrevivencia de un mayor porcentaje de embriones inmaduros de *C. arabica*, comparable al porcentaje obtenido con los embriones maduros (83% de sobrevivencia) (Abdelnour-Esquivel et al. 1992b).

Para la experimentación con embriones somáticos se utilizó 2 genotipos: *C. arabica* cv Catimor y *C. canephora* cv Robusta. Los cultivos embriogénicos se iniciaron colocando secciones de hoja de 1.5 cm² en el medio de inducción. El protocolo de criopreservación reportado por Bertrand-Desbrunais et al. (1988) fue evaluado. Este consiste en el cultivo de los embriones en concentraciones crecientes de sacarosa (hasta 0.75 M), seguido de infiltración en 5% DMSO y congelamiento lento, 0.5°C/min hasta -40, antes del almacenamiento en NL. La tasa promedio de recuperación de Robusta fue del 61%; sin embargo, para Catimor fue muy baja, alcanzando en el mejor de los casos el 9%. Los resultados obtenidos con *C. arabica* pudieron deberse a lo inadecuado de los medios, tanto de embriogénesis como de recuperación, ya que durante el proceso de embriogénesis, la aparición de embriones anormales fue muy frecuente, además, el porcentaje de germinación fue muy bajo en este cultivar. Estos resultados enfatizan la necesidad de contar

con protocolos de cultivo *in vitro* eficientes antes de iniciar la investigación en criopreservación (Abdelnour-Esquivel et al. 1993). Debido a los altos porcentajes de sobrevivencia obtenidos con los 3 materiales estudiados, sería recomendable continuar la investigación y evaluar la respuesta de un mayor número de genotipos para poder mantener, bajo condiciones de criopreservación, una copia de la colección que actualmente se mantiene en campo.

Pausteria penetrans

La criopreservación es una técnica muy útil para la conservación no sólo de material vegetal sino también de agentes biológicos de control y en esta línea de investigación, se trabajó con la bacteria *Pausteria penetrans*, un parásito de nematodos como *Meloidogine incognita* y *M. arabidica*, importantes plagas del café. Los resultados de la investigación indican la factibilidad de establecer colecciones a largo plazo de estos organismos. El procedimiento utilizado consistió en la incubación de extractos puros de la bacteria en DMSO (0-30%) durante 0-60 min. El congelamiento rápido por inmersión directa en NL fue utilizado en todos los casos. Todos los tratamientos evaluados permitieron la sobrevivencia de la bacteria. El mayor porcentaje de sobrevivencia (87%) se obtuvo cuando se utilizó 20% DMSO como crioprotector durante un periodo de 15 min; sin embargo, se obtuvo un resultado comparable (82%) cuando se utilizó DMSO al 5% por 30 min antes del congelamiento. La sobrevivencia se evaluó con base en el porcentaje de bacterias adheridas a los nematodos (Rojas 1993).

Theobroma cacao

La recuperación de embriones cigóticos y somáticos de cacao después del congelamiento en NL fue posible, cuando embriones cigóticos inmaduros fueron incubados en concentraciones crecientes de sacarosa (hasta 0.6 M) y congelados rápidamente en NL; el 70% de los embriones sobrevivió como callo. Cuando estos

embriones fueron cultivados por 3 días en un medio de cultivo enriquecido con 1 g/L de caseína hidrolizada y 10% de agua de coco e incubados durante 12 h en un medio con 1 M de sacarosa antes del congelamiento (0.5°C/min hasta -40°C+NL), el 14% de los embriones se recuperó a través de embriogénesis somática. Por otra parte, cuando los embriones somáticos fueron incubados durante 24 h en un medio de cultivo con 0.75 M sacarosa y congelados tanto lentamente (0.5°C/min hasta -40°C + NL) como rápidamente (directo en el NL), la sobrevivencia alcanzó el 20% (Cisne 1992). Este porcentaje de sobrevivencia muestra claramente la necesidad de continuar con la investigación y evaluar tanto otras velocidades de enfriamiento como las nuevas metodologías de crioconservación, que pueden resultar en una mayor sobrevivencia. Sin embargo, es recomendable que primero se de énfasis a la investigación en el cultivo *in vitro* de esta especie.

Bactris gasipaes

El pejibaye (*Bactris gasipaes*) es una palma nativa de la Amazonia y de las tierras bajas de Centro América, presentando gran potencial agroindustrial para las áreas húmedas del trópico. La comercialización de sus frutos y palmitos se está incrementando rápidamente; por lo tanto, la colecta, evaluación y conservación de germoplasma de esta especie está tomando mayor relevancia, sobre todo al incursionar en el mejoramiento genético. Con el fin de estudiar el potencial de la técnica de crioconservación en pejibaye se realizaron algunos experimentos preliminares con embriones cigóticos. A pesar de que se obtuvo sobrevivencia por germinación directa de los embriones, la falta de apoyo financiero no permitió continuar la investigación, lo que evidencia uno de los problemas más serios que enfrenta la investigación en el área de la conservación de los recursos fitogenéticos (Abdelnour-Esquivel 1993, sin publicar).

Lycaste bradeorum

La familia de las orquídeas es la más grande y diversa de las angiospermas. De acuerdo con estudios conservadores, Costa Rica posee 1416 especies agrupadas en 179 géneros, que van desde la gran vainilla hasta la diminuta orquídea del musgo; sin embargo, muchas de estas orquídeas nativas están en peligro de desaparecer debido a la deforestación, urbanización y la sobrecolecta para fines comerciales (Mora-Retana y García 1992). En 1995, el ITCR inició un proyecto de investigación que utilizó técnicas del cultivo *in vitro* con el fin de contribuir al rescate, multiplicación masiva y conservación de estos materiales. Se experimentó en crioconservación de yemas de *Lycaste bradeorum* utilizando la solución vitrificadora PVS2 como crioprotector y el congelamiento rápido en nitrógeno líquido, técnica utilizada en varias especies agrícolas. La incubación de las yemas en PVS2 por 30, 45 y 60 min redujo la sobrevivencia al 67, 67 y 20% respectivamente; sin embargo fue posible obtener crecimiento organizado después del congelamiento en nitrógeno líquido, 14, 33 y 3% respectivamente. Mayores esfuerzos deberán ser dedicados a la conservación de las orquídeas, pero estos resultados iniciales indican el potencial de la crioconservación para su almacenamiento a largo plazo (Abdelnour y Muñoz 1997).

Otras especies en estudio

En 1998 se inició un proyecto de investigación en chayote (*Sechum edule*) bajo la responsabilidad del ITCR, con el objetivo de desarrollar una metodología que asegure la disponibilidad de los materiales a largo plazo para los programas de mejoramiento genético. Durante el presente año, también bajo la responsabilidad del ITCR, se iniciaron estudios sobre el potencial de la crioconservación para el almacenamiento de semillas y embriones de varias especies forestales tropicales. En 1998, CATIE inició un proyecto en crioconservación de caoba (*Swietenia macrophylla*) y continúa desarrollando investigación en café (*Coffea arabica*).

CONCLUSIONES

La crioconservación, como método para el establecimiento de bancos de germoplasma de especies problemáticas para el almacenamiento, presenta gran potencial, especialmente para países en desarrollo como Costa Rica, en donde la diversidad de plantas es una de las mayores riquezas.

Entre las ventajas de establecer este tipo de conservación en el país se puede mencionar que, la mayor parte del equipo requerido para ejecutar los procedimientos se encuentra en los laboratorios de cultivo de tejidos, infraestructura que existe en muchas instituciones nacionales; lo mismo que personal entrenado en las técnicas del cultivo *in vitro*, que son básicas para desarrollar los procedimientos de crioconservación. La inversión en equipo específico, un tanque de almacenamiento de muestras y un tanque surtidor de nitrógeno líquido, es mínima, ya que actualmente se utilizan metodologías eficientes de crioconservación que no requieren el uso del costoso congelador programable.

Como el método de crioconservación consiste en el almacenamiento en nitrógeno líquido, frecuentes interrupciones en el fluido eléctrico no tienen consecuencias negativas sobre los materiales conservados. El bajo costo de mantenimiento de la colección, que comprende únicamente la compra del nitrógeno líquido para el llenado periódico del tanque de almacenamiento y el poco tiempo que invierte el técnico de laboratorio en esta labor, representan otras de las grandes ventajas de la crioconservación, sobre todo para los países como el nuestro, donde los recursos económicos y el personal asignado a la conservación de germoplasma son limitados.

La crioconservación, para la conservación de material vegetal, está en etapa experimental en nuestro país, pero los resultados obtenidos con una variedad de especies y materiales (embriones cigóticos, somáticos, callos, suspensiones celulares embriogénicas y ápices) indican claramente la factibilidad de implementarla en bancos de germoplasma. La investigación en crioconservación se ha caracterizado por desarrollarse a través de proyectos cortos con reducido apoyo financiero, lo que no ha permitido optimizar las metodo-

logías básicas establecidas durante el periodo de ejecución del proyecto.

Son varios los factores que han contribuido a que el progreso en este campo sea lento y que han incidido en que las técnicas de crioconservación aún no se apliquen rutinariamente en el país. Entre los más importantes se pueden mencionar la falta de un número significativo de personal entrenado y de apoyo sostenido por parte de las instituciones gubernamentales nacionales e internacionales responsables de la conservación de los recursos fitogenéticos. Otro aspecto a considerar es la limitada divulgación de las grandes ventajas que ofrece de la crioconservación sobre otros métodos de conservación, principalmente para especies recalcitrantes y propagadas vegetativamente. En muchos casos, la ausencia de protocolos eficientes para el cultivo *in vitro* de la especie de interés ha retrasado o limitado el inicio de la investigación en crioconservación; por lo tanto, futuros proyectos de investigación deberán tomar este factor en consideración.

Tratando de solventar el problema de capacitación, en los últimos años se han ofrecido en Costa Rica una serie de cursos dirigidos a profesionales tanto nacionales como del resto de América Latina. El CATIE y el ITCR han sido las instituciones responsables de los cursos y el IPGRI, FAO y RELAB (Red Latinoamericana de Botánica) han apoyado estas iniciativas. Además, el ITCR ha incluido dentro del curriculum de la carrera de Ingeniería en Biotecnología, capacitación en recursos fitogenéticos y métodos de conservación de germoplasma *in vitro*, con el fin de preparar profesionales con conocimientos en estos campos.

RECOMENDACIONES

Es necesario promover la divulgación de los beneficios que ofrece la técnica de crioconservación para el almacenamiento a largo plazo de especies clasificadas como intermedias y recalcitrantes y especies propagadas vegetativamente, de manera que se estimule su adopción por parte de las instituciones nacionales responsables de mantener los recursos fitogenéticos.

Es altamente recomendable que la investigación en crioconservación sea dirigida hacia el desarrollo de protocolos eficientes para especies nativas y exóticas (alimentarias, ornamentales y forestales) de interés económico y ecológico para el país, principalmente aquellas especies que no estén bajo la responsabilidad de Centros Regionales e Internacionales.

Es necesario promover la capacitación en el área de la crioconservación y el trabajo en equipo, de manera que un buen número de profesionales experimentados en cultivo de tejidos se involucre en este campo para que el impacto en el país sea mayor y los resultados se obtengan en forma acelerada.

El financiamiento racional y sostenido debe ser garantizado. Por lo tanto, instituciones internacionales, regionales y nacionales, grupos organizados de productores y empresarios deberán ser motivados para que colaboren con esta tarea.

LITERATURA CITADA

- ABDELNOUR-ESQUIVEL, A. 1996. Papel de la crioconservación en la fitoprotección. *In: Memorias X Congreso Nacional Agronómico y de Recursos Naturales. Volumen 1. Ed. por Bertsh F., Badilla W. y García J. San José, Costa Rica. p. 89-91.*
- ABDELNOUR-ESQUIVEL, A.; ENGELMANN, F.; HIBJAN, C.; VILLALOBOS, V.; GRAY, D.; DUFOUR, M. 1993. Zygotic and somatic embryo cryopreservation in coffee (*Coffea arabica*, *C. canephora* and Arabusta). *In: 15th International Scientific Colloquium on Coffee, Montpellier, Francia. p. 751-753.*
- ABDELNOUR-ESQUIVEL, A.; ESCALANT, J.V. 1994. Crioconservación de embriones somáticos de *Musa Gran Enano* (AAA). *In: Resúmenes XI Reunión ACORBAT, 13-18 Febrero, San José, Costa Rica. (s.p.)*
- ABDELNOUR-ESQUIVEL, A.; MORA, A.; VILLALOBOS, V. 1992a. Cryopreservation of *Musa acuminata* (AA) and *M. balbisiana* (BB) *CryoLetters 13:159-164.*
- ABDELNOUR-ESQUIVEL, A.; MUÑOZ A. 1997. Rescate, multiplicación y conservación de orquídeas en peligro de extinción. Informe Final de Proyecto. Vicerrectoría de Investigación y Extensión, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 23 p.
- ABDELNOUR-ESQUIVEL, A.; VILLALOBOS, V.; ENGELMANN, F. 1992b. Cryopreservation of zygotic embryos of *Coffea* spp. *CryoLetters 13:297-302.*
- ASHMORE, S.E. 1997. Status Report on the development and application of *in vitro* techniques for the conservation and use of plant genetic resources. International Plant Genetic Resources Institute, Roma, Italia. 67 p.
- BERTRAND-DESBRUNAIS, F.; ENGELMANN, F.; DEUREUDDRE, J.; CHARRIER, A. 1988. Reprise d'embryogenese adventite d'embryons de caféier (*Coffea arabica*) apres leur congélation dans l'azote liquide. *C.R. Acad Sci Paris. 307:795-801.*
- CISNE, J.D. 1992. Crioconservación de embriones cigóticos y somáticos de cacao (*Theobroma cacao* L.). Tesis Magister Sc. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 85 p.
- ENGELMANN, F. 1991. Tropical plant germplasm conservation. *In: Biotechnology for tropical crop improvement in Latin America. Ed. by Nabors M.W. Fourth conference of the international plant biotechnology network (IPBNet). San José, Costa Rica. p. 51-62.*
- ENGELMANN, F.; DUMET, N.; CHABRILLANGE, A.; ABDELNOUR-ESQUIVEL, A.; ASSY-BAH, B.; DEREUDDRE, J.; DUVAL, Y. 1995. Cryopreservation of zygotic and somatic embryos from recalcitrant and intermediate-seed species. *IPGRI/FAO. Plant Genetic Resources Newsletters 103:27-31.*
- ESCALANT, J.V.; TEISSON, C. 1994. Embriogénesis somática amplificada a partir de flores masculinas de los cultivares triploides de banano y plátano. *In: Resúmenes XI Reunión ACORBAT, 13-18 Febrero, San José, Costa Rica. (s.p.)*
- FABRE, J.; DEREUDDRE, J. 1990. Encapsulation-dehydration: a new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot tips. *CryoLetters 11:413-426.*
- KRISHNAPILLAY, D.B.; ENGELMANN, F. 1996. Alternative methods for the storage of recalcitrant and intermediate seed: slow growth and cryopreservation. *In: Intermediate/recalcitrant tropical forest tree seeds. Ed. by Quedraogo A.S., Poulsen K. y Stubsgaard F. IPGRI, Roma. p. 34-39.*
- MATSUMOTO, T.; SAKAI, A.; TAKAHASHI, C.; YAMADA, K. 1995. Cryopreservation of *in vitro*-grown meristems of wasabi (*Wasabi japonica*) by encapsulation-vitrification method. *CryoLetters 16:189-196.*
- MORA-RETANA, D.E.; GARCIA, J. 1992. Lista actualizada de las orquídeas de Costa Rica. *Bremesia 37:70-124.*

- NORMAH, M.N.; CHIN, H.F.; HOR, Y.L. 1986. Desiccation and cryopreservation of embryogenic axes of *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. *Pertanika* 9:299-303.
- PANIS, B.; WITHERS, L.A.; DE LANGE, E.A.L. 1990. Cryopreservation of *Musa* suspension cultures and subsequent regeneration of plants. *CryoLetters* 11:337-350.
- PRADO, M.I. 1991. Crioconservación de callos de *Musa* Gran Enano (AAA) y *Musa acuminata* (AA). Tesis Magister Scientiae, CATIE, Turrialba, Costa Rica. 69 p.
- ROBERTS, E.H. 1973. Predicting the viability of seeds. *Seed Science Technology* 1:499-514.
- ROJAS, T. 1993. *Pausteria penetrans*: Adherencia y parasitismo en *Meloidogine incognita* y *M. arabicida*. Tesis Magister Sc. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 110 p.
- SAKAI, A.; KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I. 1990. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Orb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Reports* 9:30-33.
- SCHAFFER-MENUHR, A. 1995. Refinement of cryopreservation techniques for potato. IPGRI Project Report. International Plant Genetic Resources Institute, Roma. 47 p.
- TOWILL, L.E. 1988. Survival of shoot tips from mint species after short-term exposure to cryogenic conditions. *HortScience* 23:839-841.
- VILLALOBOS, V.; ENGELMANN, F. 1995. *Ex situ* conservation of plant germplasm using biotechnology. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 11:375-382.
- YAH, E.V. 1998. Crioconservación de suspensiones celulares embriogénicas de *Musa* spp. Iniciadas a partir de flores inmaduras. Tesis Magister Scientiae, CATIE, Turrialba, Costa Rica. 79 p.