

# Estudios preliminares para la crioconservación de especies forestales arbóreas

Abdelnour-Esquivel, A.;<sup>1</sup>  
Rojas, G.<sup>2</sup>  
Alfaro, U.<sup>1</sup>

*La crioconservación presenta numerosas ventajas con respecto a otras técnicas que se utilizan rutinariamente para la conservación y almacenamiento de germoplasma.*

## Palabras clave

Especies forestales, crioconservación, almacenamiento de semillas.

## Resumen

La crioconservación presenta numerosas ventajas con respecto a otras técnicas que se utilizan rutinariamente para la conservación y almacenamiento de germoplasma. Algunas de estas ventajas son los bajos costos de labor durante el mantenimiento de las colecciones y la conservación de la estabilidad genética por tiempo indefinido. El presente estudio muestra los resultados obtenidos en la crioconservación de frutos y semillas de melina (*Gmelina arborea*), teca (*Tectona grandis*), pilón (*Hyeronima alchorneoides*), cenízaro (*Pithecellobium saman*) y madero negro (*Gliricidia sepium*) utilizando la técnica de desecación y congelamiento rápido en nitrógeno líquido. Los frutos recibieron un tratamiento previo a la congelación con 10 mgL<sup>-1</sup> de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) o agua, o el lijado del endocarpo duro.

Una vez descongelados, los materiales fueron sembrados en el invernadero para evaluar la sobrevivencia. Se encontró que tanto los frutos como las semillas de las especies evaluadas sobrevivieron al congelamiento. El estudio también mostró la importancia de la colecta y el manejo que se dé a las semillas antes de realizar experimentación en crioconservación. Los resultados obtenidos mostraron la factibilidad de utilizar esta técnica para la conservación de forestales y el potencial que presenta para que pueda ser evaluada en otras especies forestales de interés.

## Introducción

Por lo general los programas de conservación son motivados por amenazas a los recursos naturales, ya sea por una crisis inmediata o por un factor de riesgo potencial para el futuro. Debido a los múltiples beneficios que aportan, tanto al hombre como a las zonas silvestres, los árboles se enfrentan a más amenazas que la mayoría de los organismos. El uso de clones representa una amenaza especial a

1. Centro de Investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Correo electrónico: [abdelnour@itcr.ac.cr](mailto:abdelnour@itcr.ac.cr).
2. Correo electrónico: [grojas@twyford.com](mailto:grojas@twyford.com).

*El almacenamiento de semillas permite la conservación de la diversidad genética, la que es importante para proveer de materia prima en programas de mejoramiento, para evitar los efectos nocivos de la autogamia y en la protección contra riesgos de destrucción por plagas y patógenos (Millar, 1993).*

la diversidad genética, cuando se trata de reforestar y realizar mejoramiento genético de árboles ya que, con la habilidad de reproducir genotipos exactos, sobreviene el potencial de reducir la diversidad en bosques restaurados y en plantaciones debido a la siembra de muchas copias de uno o unos pocos genotipos (Millar, 1993).

El almacenamiento de semillas permite la conservación de la diversidad genética, la que es importante para proveer de materia prima en programas de mejoramiento, para evitar los efectos nocivos de la autogamia y en la protección contra riesgos de destrucción por plagas y patógenos (Millar, 1993). Por lo general, las semillas de las especies forestales son almacenadas en rangos de temperatura que varían de 4°C a -20°C; pero, en la mayoría de los casos, las semillas almacenadas a estas temperaturas empiezan a perder viabilidad en poco tiempo. La criopreservación es una técnica de conservación de germoplasma que consiste en el almacenamiento del germoplasma de interés en nitrógeno líquido (-196°C), y la gran ventaja que presenta sobre otras modalidades de conservación es que permite la conservación a largo plazo sin pérdida de viabilidad ya que, una vez que el material es congelado, todas las funciones metabólicas cesan y, por lo tanto, no ocurre división, mutaciones ni deterioro celular, por lo que se mantiene la estabilidad genética. (Abdelnour, 1999; Villalobos y Engelmann, 2000). Para las especies forestales arbóreas, la conservación *in situ* comprende la preservación de los bosques naturales, y la conservación *ex situ* comprende la preservación del germoplasma como semillas, huertos clonales, muestras bajo cultivo *in vitro*, secuencias de ADN y polen. Por lo tanto, la conservación de la diversidad genética de manera que se proteja el germoplasma en la forma deseada puede llevarse a cabo utilizando una gran variedad de métodos (Ahuja, 1989; Engelmann, 2000).

Experimentando con la técnica de criopreservación en semillas de varias

especies recalcitrantes, la autora encontró que estas sobrevivían al congelamiento en nitrógeno líquido y eran capaces de germinar y formar una nueva planta en condiciones *in vitro*. El objetivo de esta investigación fue evaluar la técnica de criopreservación conocida como desecación y congelamiento rápido en nitrógeno líquido, en varias especies forestales que presentan problemas de almacenamiento a largo plazo en bancos de semillas convencionales, y lograr así su recuperación como plantas en condiciones de *ex vitro*.

## Objetivo

El presente estudio tuvo como objetivo examinar la habilidad de frutos y semillas de varias especies forestales para resistir el congelamiento en nitrógeno líquido.

## Materiales y métodos

Como material experimental se utilizaron frutos de melina (*Gmelina arborea*), teca (*Tectona grandis*) y pilón (*Hyeronima alchorneoides*) y semillas de cenízaro (*Pithecellobium saman*) y madero negro (*Gliricidia sepium*). Los frutos de melina (endocarpio más semilla) fueron incubadas en agua o en una solución de 10 mgL<sup>-1</sup> de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) durante 30 min. Para la criopreservación, los frutos fueron deshidratados en el flujo de aire de una cámara de transferencia de flujo laminar por varios periodos de tiempo (0 a 36 horas). Al final de cada periodo de deshidratación, se tomaron muestras para determinar el contenido de humedad de las semillas. El congelamiento se realizó envolviendo grupos de cinco semillas en papel de aluminio e introduciéndolos rápidamente a un criotermostato que contenía nitrógeno líquido (NL, -196°C). Para los ensayos de criopreservación de teca y pilón y para cenízaro y madero negro, los frutos y semillas fueron deshidratados utilizando una cámara de desecación que contenía sílica gel y ventilación, hasta

*Los frutos de teca mostraron un porcentaje de germinación del 40% y el 20% después de la deshidratación y del tratamiento de deshidratación e incubación en GA<sub>3</sub>, respectivamente.*

que alcanzaron porcentajes de humedad aproximadamente del 8%. En los frutos de teca y pilón, que al igual que melina presentan un endocarpio duro, se efectuó un lijado del endocarpio (papel lija # 100) y posteriormente se incubaron en la solución de 10 mg/l de GA<sub>3</sub> por una hora antes del congelamiento. El congelamiento de los frutos y semillas se efectuó por inmersión directa en el NL. Después de una hora en almacenamiento, los materiales se sacaron del nitrógeno líquido y se dejaron descongelar por media hora a temperatura ambiente. Pasado este periodo, los materiales se llevaron al invernadero, donde fueron sembrados directamente en el sustrato de germinación (suelo y granza de arroz, 1:1) y se aplicó riego diariamente. La sobrevivencia se evaluó después de 6 a 8 semanas, con base en el porcentaje de semillas germinadas.

## Resultados y discusión

Los frutos de melina presentaron porcentajes de humedad que variaron del 14,1% al 7,3% después de periodos de deshidratación de 0 a 36 horas (cuadro 1) y los frutos mostraron porcentajes de germinación de alrededor del 50%, excepto cuando los frutos presentaron un 9,3% de humedad, que la germinación fue del 70%. Cuando los frutos se incubaron en GA<sub>3</sub>, se observó un incremento en el porcentaje de germinación, y alcanzaron porcentajes del 86% al 63% dependiendo del contenido de humedad. Cuando los frutos fueron congelados en NL sin haber recibido el tratamiento previo con GA<sub>3</sub>, se observaron porcentajes de germinación similares a aquellos que presentaron los frutos tratados con GA<sub>3</sub> y sin congelar, lo que parece indicar que en estos casos el rango de humedad que presentaban los frutos de melina en el momento del congelamiento fue adecuado. Una situación similar se observó al comparar la germinación de frutos incubados en el regulador del crecimiento. Aquellos frutos que presentaban contenidos

de humedad del 9,7% mostraron un 83% y un 90% de germinación en los tratamientos sin NL (-NL) y congelados en NL (+NL) respectivamente; mientras que los frutos que presentaban un 8,3% de humedad mostraron un 63% y un 76% de germinación, respectivamente. El GA<sub>3</sub> es un regulador de crecimiento conocido por estimular la germinación de las semillas de muchas especies (Flores-Vindas, 1999; Salisbury y Ross, 1994) y, de acuerdo con los resultados obtenidos, melina no es una excepción. Por otra parte, la deshidratación de los tejidos evita la formación de cristales de hielo que pueden romper o desestabilizar las membranas durante el congelamiento y descongelamiento de los materiales, lo que permite una mayor sobrevivencia (Engelmann, 2000). Los mayores porcentajes de germinación obtenidos con las semillas incubadas en el regulador de crecimiento y desecadas durante 12 y 24 horas (90% y 76% de germinación, respectivamente) pudo deberse en parte al contenido de humedad (alrededor del 9%), pero, sobre todo, al efecto del GA<sub>3</sub>.

Los frutos de teca mostraron un porcentaje de germinación del 40% y el 20% después de la deshidratación y del tratamiento de deshidratación e incubación en GA<sub>3</sub>, respectivamente. Sin embargo, los porcentajes de germinación mostrados por esta especie después del congelamiento en NL fueron muy cercanos al 50% para los dos tratamientos mencionados y cuando, sumado a estos dos tratamientos se evaluó el efecto del lijado, en todos los casos se observó un incremento de la germinación, un 53% para aquellas semillas no congeladas y un 60% de germinación para las congeladas en nitrógeno líquido (cuadro 2). El endocarpio duro en la semilla dificulta su imbibición, por lo que, al liarlos, se permitiría un mayor movimiento de agua y del regulador del crecimiento hacia el interior de la semilla y por ende, se estimularía la germinación (Flores-Vindas, 1999).

### Cuadro 1

Sobrevivencia de frutos de melina (*Gmelina arborea* Roxb) a la deshidratación y al congelamiento en nitrógeno líquido (LN), seguido de un periodo de incubación en 10 mg/L de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>).

Duración de la deshidratación (horas)	Contenido de humedad (%)	Sobrevivencia* (% germinación)			
		-LN		+LN	
		-GA3	+GA3	-GA3	+GA3
0	14,1	55	86	55	40
12	9,7	70	83	45	90
24	8,3	55	63	50	76
36	7,3	50	70	50	40

\*Los resultados de sobrevivencia son el promedio de tres experimentos, con un error estándar no mayor de  $\pm 2.5$ .

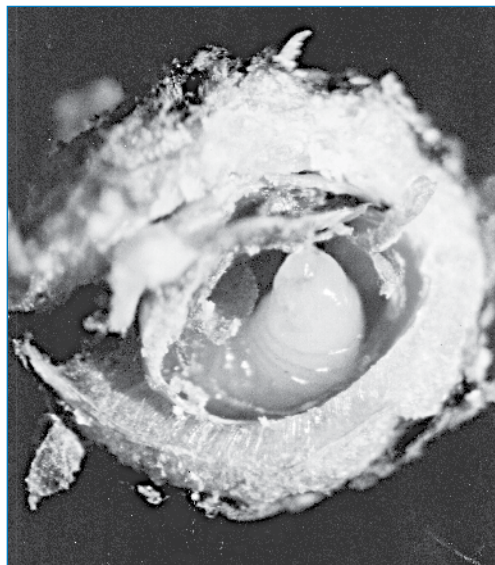
### Cuadro 2

Sobrevivencia de frutos de teca (*Tectona grandis*) y pilón (*Hyeronima alchorneoides*) al congelamiento en nitrógeno líquido (NL, -196C), después de la deshidratación a contenidos de humedad cercanos al 8%.

Tratamientos	%Germinación	
	-NL	+NL
<b>Deshidratación (8%)</b>		
Teca	40	50
Pilón	0	0
<b>Deshidratación + incubación en 10 mg/L GA<sub>3</sub> 1 hora antes de la siembra</b>		
Teca	20	47
Pilón	3,3	0
<b>Semillas lijadas y sumergidas en GA<sub>3</sub> 1 hora antes de la siembra</b>		
Teca	53	60
Pilón	0	0

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

*Las técnicas de crioconservación se utilizan actualmente para el almacenamiento de gran diversidad de células y tejidos de animales y vegetales, y para el almacenamiento de microorganismos varios.*



**Figura 1.** Semilla de pilón (*Hyeronima alchorneoides*) dañada por larva de una avispa de la familia Eurytomidae.

Por otra parte, al evaluarse el efecto del congelamiento en NL de semillas de cenízaro y madero negro, se observó sobrevivencia en las dos especies (cuadro 3). Sin embargo, el porcentaje de germinación en ambas varió considerablemente

con respecto a los tratamientos sin congelamiento en nitrógeno líquido, lo que parece indicar que será necesario evaluar otras condiciones o pretratamientos en las semillas antes del congelamiento para tratar de incrementar los porcentajes de sobrevivencia.

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

## Conclusiones

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

### Cuadro 3

Sobrevivencia al congelamiento en nitrógeno líquido (NL) de semillas de cenízaro (*Pithecellobium saman*) y madero negro (*Gliricidia sepium*) después de la deshidratación al 8% de humedad.

Tratamientos	%Germinación	
	-NL	+NL
Deshidratación (8%)		
Cenízaro	40	3
Madero negro	91	53

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

### Bibliografía

- Abdelnour, A. 1999. Situación actual y perspectivas de las aplicaciones biotecnológicas en la conservación y uso de los recursos fitogenéticos. XI Congreso Nacional Agronómico y de Recursos Naturales. Memoria: Manejo de Cultivos. UNED, Colegio de Ingenieros Agrónomos. San José, Costa Rica. Pp. 299-306.
- Ahuja, M.R. 1989. Storage of forest tree germplasm at sub-zero temperatures. In: Application of Biotechnology in Forestry and Horticulture. Vibha Dhawan (Ed.), Plenum Press, New York. Pp. 215-228.
- Engelmann, F. 2000. Importance of cryopreservation for the conservation of plant

genetic resources. In: Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application. Japan International Research Center for Agricultural Science, Tsukuba, Japan/International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. Pp. 8-20.

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

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

Salisbury, F.B.; Ross, C.W. 1994. Fisiología Vegetal. Grupo Editorial Iberoamérica. México. Pp. 411-421.

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

### Agradecimientos

Las autoras agradecen el apoyo de la Vicerrectoría de Investigación y Extensión del Instituto Tecnológico de Costa Rica, al Ministerio de Ciencia y Tecnología (MICIT), al Consejo Nacional para Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT) y a la Empresa MACORI.