



PROGRAMA BIODIVERSIDAD PARA EL DESARROLLO

**CRIOPRESERVACIÓN DE EMBRIONES DE
PINO COLOMBIANO (*Retrophyllum rospigliosii* (Pilg. C.N. Page))**

**CONTRATO
3454
DIECIEMBRE 2001**

**CONTRATISTA:
ROBINSON MARÍN**

**INTERVENTORES :
I.F. MARTA LIGIA GOMEZ
I.A. OSCAR QUINTERO**

**CORANTIOQUIA
2003**

In Memoriam.

A mi padre.

Benjamin Marín Marquéz

(1927–2001).

A mi Madre y Abuela.

Por ser la fuerza que hace que cada mañana me despierte con ganas de luchar.

A Marisol.

Por todo las cosas lindas que juntos vivimos.

Agradecimientos

Deseo dar gracias primero que todo a Dios por la vida.. Expreso mis más sinceros agradecimientos a las siguientes personas por haber hecho posible el desarrollo de este trabajo.

Dr. Rafael Arango. Profesor de la Universidad Nacional sede Medellín y Director de la Unidad de Biotecnología Vegetal, CIB, por toda su colaboración y apoyo.

A la Corporación Autónoma Regional del Centro de Antioquia, en especial al Ingeniero Forestal Juan Lázaro Toro por creer en esta propuesta de trabajo y apoyarla para sacarla adelante.

Igualmente, a Marta Ligia Gómez Ingeniera Forestal, Interventora de este proyecto por su acompañamiento . Así mismo, al Ingeniero Agrónomo Oscar Quintero por sus acertados consejos y recomendaciones.

Al profesor Edgar Piedrahita por todo su interés y apoyo.

A Luis Emilio Trujillo, director de la planta de procesamiento de semen de la Universidad Nacional de Colombia por su valiosa colaboración en la realización de este trabajo.

A mis amigos de carrera por todos los gratos momentos vividos en especial a Julián Guzmán "El Galán", Freddy Benjumea "El Flaco", Wilson Lara "El Wicho", Huber Vanegas "El Petiso" y Juan Manuel Velez "Morrongo".

A Marisol Valencia por acompañar mi soledad en mi vida universitaria.

A mis hermanas Doris Janeth y Martha Elena por su incondicional apoyo en las duras jornadas.

A mis compañeros de Unidad porque hicieron más grato mi estadía y por su valiosa colaboración en los momentos difíciles.

A Lucerito, Magdalena y Doña Marta por toda su dedicación en su noble labor.

A Jose Vicente y Aida laboratoristas de la Universidad Nacional por su desinteresada y valiosa colaboración.

A la Universidad Nacional de Colombia, en especial al cuerpo de profesores del Departamento de Ciencias Forestales por todas sus enseñanzas.

A todas aquellas personas que de una u otra manera contribuyeron a la realización de este proyecto de vida.

Una simple hoja es un día de creación del sol.

W. Whitman

CONTENIDO

Página

<i>1. INTRODUCCIÓN</i>	
<i>2. REVISIÓN DE LITERATURA</i>	<i>1.</i>
<i>2.1 Los bosques en Colombia</i>	<i>1.</i>
<i>2.2 La familia Podocarpaceae</i>	<i>3.</i>
<i>2.3 Consideraciones previas a la criopreservación</i>	<i>6.</i>
<i>2.4. Morfogénesis in vitro de Embriones</i>	<i>6.</i>
<i>2.5. Encapsulación de tejidos</i>	<i>10.</i>
<i>2.6. Criopreservación</i>	<i>13</i>
<i>2.6.1. Criopreservación de embriones zigóticos</i>	<i>15.</i>
<i>3. METODOS Y MATERIALES</i>	<i>18.</i>
<i>3.1 Localización</i>	<i>18.</i>
<i>3.2 Material Vegetal</i>	<i>18.</i>
<i>3.3. Regeneración de embriones de pino colombiano</i>	<i>19.</i>
<i>3.4. Encapsulación de embriones de pino colombiano</i>	<i>19.</i>
<i>3.5. Criopreservación de embriones de pino colombiano</i>	<i>20</i>
<i>3.5.1. Técnica de Encapsulación/Deshidratación</i>	<i>20</i>
<i>3.5.2. Técnica de Encapsulación /Vitrificación</i>	<i>21</i>
<i>3.5. 3. Técnica de Desecación</i>	<i>22</i>
<i>3.5.4 Técnica de vitrificación</i>	<i>23</i>
<i>3.6 Análisis de los datos.</i>	<i>24</i>
<i>4. RESULTADOS.</i>	
<i>4.1. Recuperación de embriones de pino colombiano.</i>	<i>25</i>
<i>4.1.1 Efecto de la sacarosa en la recuperación de embriones de pino colombiano.</i>	<i>25</i>
<i>4.1.2 Efecto de la concentración de sales en la recuperación de embriones de pino colombiano.</i>	<i>26</i>
<i>4.1.3 Efecto de las hormonas de crecimiento en la recuperación de embriones de pino colombiano.</i>	<i>27</i>
<i>4.1.4 Efecto de otras sustancias en la recuperación de embriones de pino colombiano.</i>	<i>29</i>
<i>4.2 Encapsulación de embriones de pino colombiano.</i>	<i>30</i>
<i>4.3. Criopreservación de embriones de pino colombiano</i>	<i>31</i>
<i>4.3.1 Técnica de Desecación</i>	<i>33</i>
<i>4.3.2 Técnica de Encapsulación/Deshidratación</i>	<i>35</i>

<i>4.3.3 Técnica de vitrificación.</i>	<i>36</i>
<i>5. Discusión</i>	<i>39</i>
<i>6. Conclusiones</i>	<i>45</i>
<i>7. Recomendaciones</i>	<i>46</i>
<i>8. Abreviaturas</i>	<i>47</i>
<i>9. Bibliografía</i>	<i>48</i>
<i>10. Anexos</i>	<i>52</i>

LISTA DE TABLAS

	<i>Pgs.</i>
<i>Tabla 1. Composición de medios de cultivo comúnmente usados</i>	9.
<i>Tabla 2. Geles utilizados para la encapsulación de tejidos</i>	10.
<i>Tabla 3. Ensayos de criopreservación con embriones y ejes embrionarios de algunas especies de semillas recalcitrantes e intermedias</i>	17.
<i>Tabla 4. Efecto de la sacarosa en el cultivo in vitro de los embriones de pino colombiano.</i>	25
<i>Tabla 5. Efecto de las sales MS en la recuperación de los embriones de pino colombiano.</i>	26
<i>Tabla 6. Efecto el ácido giberélico en la regeneración de embriones de pino colombiano.</i>	28
<i>Tabla 7. Resumen tratamientos de encapsulación.</i>	28
<i>Tabla 8. Efecto de otras sustancias en la regeneración en la regeneración de los embriones de pino colombiano.</i>	29
<i>Tabla 9. Tratamientos de encapsulación.</i>	32
<i>Tabla 10. Efecto de la concentración de sacarosa en el medio de precultivo y de la función de la deshidratación en la supervivencia (%) del control LN(-) y criopreservación LN(+) de embriones de Pino colombiano.</i>	34
<i>Tabla 11. Efecto de la deshidratación y el contenido de humedad (% de base de peso fresco) en la supervivencia (%) de control LN (-) y embriones encapsulados y congelados LN(+) de pino colombiano.</i>	36
<i>Tabla 12. Efecto de varios tratamientos de vitrificación en la supervivencia de embriones de pino colombiano</i>	37

.

.

.

LISTA DE FIGURAS

	<i>Pgs.</i>
<i>Figura 1. Deforestación del planeta.</i>	5.
<i>Figura 2. Tratamiento con AIA.</i>	27
<i>Figura 3. Tratamiento de regeneración de embriones de pino colombiano</i>	29
<i>Figura 4. Embriones encapsulados con raíces oxidadas.</i>	30
<i>Figura 5. Embriones encapsulados con raíces sanas.</i>	30
<i>Figura 6. Germinación artificial de embrión de pino colombiano.</i>	31
<i>Figura 7. Tratamiento de Encapsulación/Deshidratación.</i>	36
<i>Figura 8. Crecimiento de los embriones después de la criopreservación .</i>	38
<i>Figura 9. Emergencia del embrión y daños asociados.</i>	39
<i>Figura 10. Comportamiento del contenido de humedad del embrión y la cápsula durante la deshidratación.</i>	41
<i>Figura 11. Resumen proceso cultivo in vitro de embriones de pino colombiano.</i>	42
<i>Figura 12. Protocolo de encapsulación de embriones de pino colombiano</i>	43
<i>Figura 13. Protocolo de criopreservación para embriones de pino colombiano.</i>	44

LISTA DE ANEXOS

	Pgs
<i>Medios de crecimiento utilizados para la criopreservación de Embriones de Pino Colombiano</i>	52
<i>Callogénesis en Embrios de Pino Colombiano</i>	53

Resumen

*Se realizaron ensayos de regeneración de embriones de pino colombiano (**Retrophyllum rospigliosii** (Pilg.) C.N. Page) obteniendo el mejor resultado cuando se cultivaron en presencia de sales MS (Murashige & Skoog) diluidas a un cuarto de su concentración y suplementadas con 5% (p/v) de sacarosa más 0.05% (p/v) de CA durante 12 semanas, presentado un porcentaje de supervivencia del 100%. Además, se estableció un protocolo de encapsulación para los embriones, el cual consiste en una matriz de alginato de sodio a una concentración de 2.5% (p/v) más 50 mM de CaCl₂ con un tiempo de reacción de 20 minutos, mostrando un nivel de eficiencia del 50% en la emergencia de los individuos. Así mismo, se estableció un protocolo de criopreservación utilizando embriones desnudos bajo la técnica de vitrificación, la cual consistió en el precultivo de los embriones en sales ¼ MS y suplementadas con 2 M de glicerol y 0.4 M de sacarosa durante 1 día, luego los embriones se sumergieron en solución PSV3 a una temperatura de 4 ° C durante 180 minutos, posteriormente sumergidos rápidamente en nitrógeno líquido. Para su descongelamiento los crioviales fueron calentados en agua a 40° C durante 3 minutos y lavados con sales ¼ MS más 1.2 M de sacarosa durante 10 minutos, para luego sembrarlos en medio basal, obteniendo un porcentaje de supervivencia del 80%, con crecimiento en forma de callo.*

INTRODUCCIÓN

La importancia de la biodiversidad para la humanidad ha sido reconocida en las últimas décadas, como un componente esencial para el desarrollo sostenible de las actividades humanas y su propia supervivencia. A la fecha, se han realizado numerosos esfuerzos para mejorar, no solo las diferentes formas de aprovechamiento sino también, los métodos de conservación de modo que, permitan mantener los recursos amenazados en el largo plazo.

La conservación de la diversidad biológica ha venido adoptando una visión holística sobre la crisis ambiental y la pérdida de especies; en particular, se reconoce como fundamental la participación de las comunidades dueñas de los recursos para su protección, así como también una mayor relevancia en las actividades de conservación ex situ de la biodiversidad (Rao et. al., 2002)

Han sido notables los esfuerzos de carácter nacional e internacional que se están llevando a cabo con miras a coleccionar recursos genéticos vegetales, especialmente enfocados hacia componentes de la agrobiodiversidad como consecuencia, existe una gran cantidad de accesiones almacenadas bajo condiciones ex situ en varios centros alrededor del mundo (Damania, 1996).

Sin embargo, existen una gran cantidad de recursos genéticos silvestres en peligro, que aun no han sido objeto de estrategias de conservación claras y definidas que garanticen su permanencia. En especial, los recursos forestales dadas sus condiciones de lento crecimiento, sobre-explotación y desconocimiento en casi todos los casos de sistemas efectivos de propagación, así como las dificultades encontradas para el almacenamiento de germoplasma en forma de semillas, están llevando a la extinción una gran cantidad de estos recursos.

En cualquier caso, la conservación y protección de la diversidad genética debe por lo tanto tener una alta prioridad en el manejo de los bosques; los árboles normalmente son las especies claves en los ecosistemas naturales y muchas asociaciones de fauna y flora dependen de su existencia y de los ambientes creados por ellos (Rajora et al., 2000).

En las próximas décadas, el reto de mantener nuestra base de recursos biológicos será de vital importancia para la estabilidad del planeta, se hace necesario entonces, establecer nuevos compromisos éticos entre la conservación y el uso de estos recursos. La conservación desde el punto de vista del aislamiento del individuo no resuelve el problema de extinción, por el contrario, es urgente un cambio de actitud en las relaciones hombre – entorno con propuestas de uso verdaderamente sostenibles que garanticen no solo la permanencia del recurso sino también el crecimiento económico y social de las poblaciones dueñas de esta riqueza.

Estamos en un momento crucial, pues sabemos que el número de especies en peligro de extinción va a la delantera de los recursos destinados para su conservación, la pregunta clave es entonces; ¿Cómo proteger el mayor número de especies por cada peso de capital invertido ?

Es indudable, el desconocimiento que tenemos acerca de todo el potencial de nuestra biodiversidad de cualquier manera, estos recursos representan la materia prima no solo de los procesos biológicos como la evolución, adaptación y supervivencia de las especies, sino también en elementos con un vasto potencial de usos actuales y futuros.

Hoy no alcanzamos siquiera imaginar, lo que podrán llegar a realizar los hombres de ciencia en el futuro lejano con la base de recursos biológicos que logremos salvar. La propuesta de conservación de recursos biológicos de especies silvestres y en particular, la utilización de la criopreservación de tejidos vivos, sin lugar a dudas resulta innovadora y de suprema importancia para la futura estabilidad y desarrollo de los humanos del futuro.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Los Bosques en Colombia

Colombia tiene una extensión continental de 114´ 174. 800 hectáreas, que representan aproximadamente el 0.7% de la superficie continental mundial. En esta área se encuentra el 10% de la biodiversidad del planeta, lo que convierte a Colombia en un país "megadiverso" (IIAvH,1998).

Sin embargo, toda esta biodiversidad se encuentra gravemente amenazada por las actividades antropicas. En Colombia, los bosques naturales se vienen utilizando de tiempo atrás para la explotación de productos maderables con rendimientos muy por debajo del óptimo, ocasionando pérdidas considerables en la obtención de los productos finales. La eficiencia de las operaciones de aprovechamiento forestal resultan alarmantes si se tiene en cuenta el rendimiento del volumen neto aserrado, comparado con el volumen en pie, calculado en un 25%, lo que significa, que el desperdicio de madera entre el bosque y los aserraderos es superior al 70% (Castaño, 1990).

Los mecanismos más comunes de deterioro ambiental, han estado relacionados con la implantación de estrategias productivas y tecnologías inadecuadas, ajenas a la diversidad cultural y ecológica de sus contextos de aplicación y orientadas hacia una insostenible maximización de los beneficios en el corto plazo (Bernal, 2001).

La transformación de ecosistemas naturales resultante de las actividades humanas es una de las principales causas directas de pérdida de diversidad biológica, actividades como la deforestación con fines madereros o para abrir tierras agrícolas y la construcción de obras civiles, convierten los hábitats naturales que son complejos y diversos, en hábitats biológicamente simplificados e inhóspitos para la vida silvestre. frente a esto, las especies con distribuciones geográficas restringidas (i.e. especies endémicas) tienen una alta vulnerabilidad global, pues esta transformación estaría eliminando todas las poblaciones de la especie (IIAvH Tomo II, 1998).

Por motivos históricos, geográficos y ecológicos, la mayoría de la población humana del país esta concentrada en la región Andina y en la planicie Caribe. Por lo tanto, estas regiones son las más afectadas por la transformación de los ecosistemas naturales. Las cordilleras y los valles interandinos han sido lentamente transformados y fragmentados y algunas regiones están virtualmente deforestadas; el 85% del área de bosques premontanos y montanos han sido alterados en algún grado, la mayor parte de manera severa, aún las áreas del Sistema de Parques Nacionales Naturales, que a pesar de tener extensiones relativamente grandes, se están convirtiendo en islas rodeadas de hábitats adversos para la preservación de la biodiversidad (IIAvH, Tomo II 1998).

Aunque no existe un consenso en cuanto al área deforestada anualmente, ni sobre sus tendencias actuales, se ha calculado que más del 40% de la cobertura vegetal original del país ha desaparecido. Se estima que en la región Andina se ha perdido más del 74% de la cobertura forestal y de los bosques secos tropicales tan solo queda el 1.5% de la extensión original. Las causas a las cuales se le atribuye la deforestación son, en orden de importancia, la expansión de la frontera agropecuaria y la colonización (73.3%), producción maderera (11.7%), consumo de leña (11.0%), incendios forestales (2%) y los cultivos ilícitos (2%) (IIAvH, 1998).

Otras causas que fomentan la pérdida de especies, son el desconocimiento del valor potencial de la biodiversidad y de sus servicios ambientales que han sido tradicionalmente subestimados dentro de las políticas de desarrollo del estado y de los diferentes sectores. Si bien existe, cada vez más conciencia del potencial estratégico de la biodiversidad tanto en el ámbito gubernamental como de la sociedad civil, aún no se le ha dado al tema la importancia requerida. El potencial estratégico de la biodiversidad reside en mantener los servicios ambientales que hoy en día presta y en utilizar estratégicamente las opciones de uso sostenible que los recursos de la diversidad ofrecen. (IIAvH, 1998).

De igual manera, la deforestación y pérdida de biodiversidad es un fenómeno repetitivo en toda la geografía mundial, en este nuevo siglo uno de los más grandes retos que enfrenta la humanidad será entender los mecanismos mediante los cuales las actividades humanas están alterando el ambiente y la biota de nuestro planeta. Los humanos hemos transformado entre el 40 - 50% de la superficie terrestre (Figura 1), usamos el 54% del agua fresca disponible con una proyección de uso del 70% para el 2050 y estamos presenciando el sexto mayor evento de extinción en la historia de la vida en la tierra. Evento único, porque esta biológicamente manejado por las actividades humanas, al contrario de los primeros eventos de extinción que fueron causados por impactos de asteroides y otros eventos físicos (Chapin, 2003).

De otro lado, en las últimas décadas han sucedido varios fenómenos para valorizar en forma extraordinaria los recursos genéticos, siendo los más decisivos el desarrollo de modernas biotecnologías y la acelerada pérdida de la diversidad biológica. Los recursos biológicos y en particular los recursos genéticos son el fundamento en el que se basa la agricultura moderna, por tanto los diferentes sistemas de conservación han adquirido también un valor creciente. En particular, la conservación ex situ, que a través de las diferentes formas de bancos de germoplasma se ha convertido en un mecanismo crítico para transformar la biodiversidad indiferenciada y desconocida de los hábitats naturales, en un recurso definido y evaluado, aprovechable para diferentes usos económicos, sociales y ambientales (IIAvH Tomo III, 1998).

Un banco de germoplasma no es solo un medio de conservación de recursos genéticos en peligro, sino ante todo un medio para transformar un potencial estimado en una oportunidad real a través de distintos procesos de caracterización, evaluación y mejoramiento (IIAvH Tomo III, 1998).

Los bancos de germoplasma pueden realizarse de dos maneras: a través de la conservación in situ, refiriéndose a la conservación de ecosistemas y hábitats naturales y el mantenimiento y recuperación de especies viables en sus entornos naturales, modalidad practicada por generaciones de agricultores con variedades locales para su subsistencia. Estas variedades basadas en la innovación del agricultor fueron, son y serán la base para el desarrollo de futuras variedades comerciales. La conservación ex situ comprende la conservación de los componentes de la diversidad fuera de los hábitats naturales, se realiza

mediante dos mecanismos. *in vivo* a través de jardines clonales, colecciones establecidas en campo o colecciones de semillas previamente desecadas y mantenidas a bajas temperaturas, también bajo condiciones *in vitro* a través de estrategias de crecimiento mínimo o utilizando la criopreservación. (IIAvH, 1998).

El país cuenta con aproximadamente 922.500 ejemplares de colecciones, de los cuales 730.000 son de plantas, 81.500 de anfibios y reptiles, 78.500 de aves y 32.500 de mamíferos. Según Corpoica, en bancos de germoplasma se encuentran 1.735 colecciones de cultivos industriales en algodón cacao, caña panelera y tabaco; 7.792 colecciones de cereales en arroz, maíz, sorgo y trigo; 947 colecciones de frutales y 2.539 colecciones de hortalizas. Con respecto a las colecciones mayores y más importantes a nivel mundial, las de Colombia en condiciones *ex situ* ocupan las siguientes posiciones: segundo lugar para la papa con el 13% del total de las muestras mundiales, quinto lugar para la palma de aceite y el cocotero con el 1 y 11% del total de las muestras mundiales respectivamente; y por último el sexto lugar para el maíz, el tomate, el café y el cacao con porcentajes entre el 3 y el 5% del total de las muestras mundiales. En todos los casos, no existen planes de colección sobre taxas nativos, haciendo que los bancos de conservación *ex situ* nacionales estén cumpliendo un papel poco importante en la conservación de nuestra biodiversidad (IIAvH, 1998).

La conservación *ex situ* generalmente se aplica en situaciones bien definidas, como salvaguardar poblaciones que están en peligro de destrucción física o frente a una intensa presión sobre una especie importante o sobre, la zona donde crece y no es posible efectuar una protección *in situ*. Cuando una especie desaparece perdemos acceso a las estrategias de supervivencia codificadas en sus genes, a través de millones de años de evolución, estrategias que podrían ser esenciales para nuestra supervivencia como especie (Bernal, 2001).

2.2 La Familia Podocarpacea

Con pino colombiano al igual que con la mayoría de las especies del bosque natural, surgen serias dificultades a la hora de encontrar información sobre aspectos de su biología y manejo, la poca información disponible se encuentra en la mayoría de los casos dispersa. Sin embargo, en el país se han llevado a cabo algunos estudios especialmente con *Retrophyllum rospigliosii* sobre aspectos de su propagación que nos han permitido conocer un poco más acerca de estos fósiles vivientes.

En Colombia, la revisión más detallada acerca del conocimiento de la familia Podocarpaceae fue escrita por la ingeniera forestal Adriana Marín; quien reitera además que es poca la información sobre los aspectos ecológicos que se tiene sobre la familia, debido fundamentalmente porque son especies de poco interés comercial. Sabemos por su revisión que las podocarpaceas son especies preferiblemente con distribución natural austral, distribuyéndose en América desde los 20° de latitud norte hasta los 10° de latitud sur; los árboles de Pino colombiano (*Retrophyllum rospigliosii*) han sido reportados en algunos relictos de bosque natural remanente en las cordilleras occidental, central y oriental en alturas entre los 1.700 y 3.200 m.s.n.m. son especies asociadas a las formaciones Bosque muy húmedo montano bajo (bmh-MB) con una marcada preferencia hacia los ambientes con una elevada humedad relativa. (Marín, 1998)

Igualmente, la especie ha sido catalogada como secundaria tardía o climática, porque en los estados iniciales de la germinación necesita sombra para su crecimiento y en los estado juvenil y adulto requiere de condiciones de plena exposición a la luz para su desarrollo. Los meses de mayor recolección de frutos son junio y agosto y la mayoría del material es recolectado una vez cae al suelo. La propagación por semilla ha sido la manera como tradicionalmente se ha multiplicado la especie, sin embargo presenta algunos inconvenientes entre los cuales se destacan una baja viabilidad, prolongados periodos entre la siembra y la germinación y e tiempo de permanencia de las plántulas en el vivero antes de plantación en campo, alrededor de dos años para alcanzar entre 30-40 cms (Marín, 1998). Algunas iniciativas se han adelantado por parte de las universidades, realizando investigación en los temas de propagación de la especie, obteniendo resultados muy poco satisfactorios, principalmente por la escasa formación de tallos y raíces.

Gómez, 2002. En ensayos con semillas evaluó dos temperaturas para acelerar la germinación de pino colombiano, utilizando técnicas de estratificación en caliente y frío, los resultados obtenidos permiten concluir que el tiempo de germinación se alcanzo a los 110 y 129 días respectivamente frente a los 200 días necesarios para la germinación en los tratamientos testigos.

Marín, 1998. Recomienda que el pino colombiano es una especie que debe ser utilizada para enriquecer ecosistemas más que para el establecimiento de plantaciones, (especie de crecimiento muy lento) deberá estar cultivada con especies de mayor crecimiento para proporcionarle sombra, creando un dosel protector, ya que las plantaciones a campo abierto y a plena exposición han sido un fracaso.

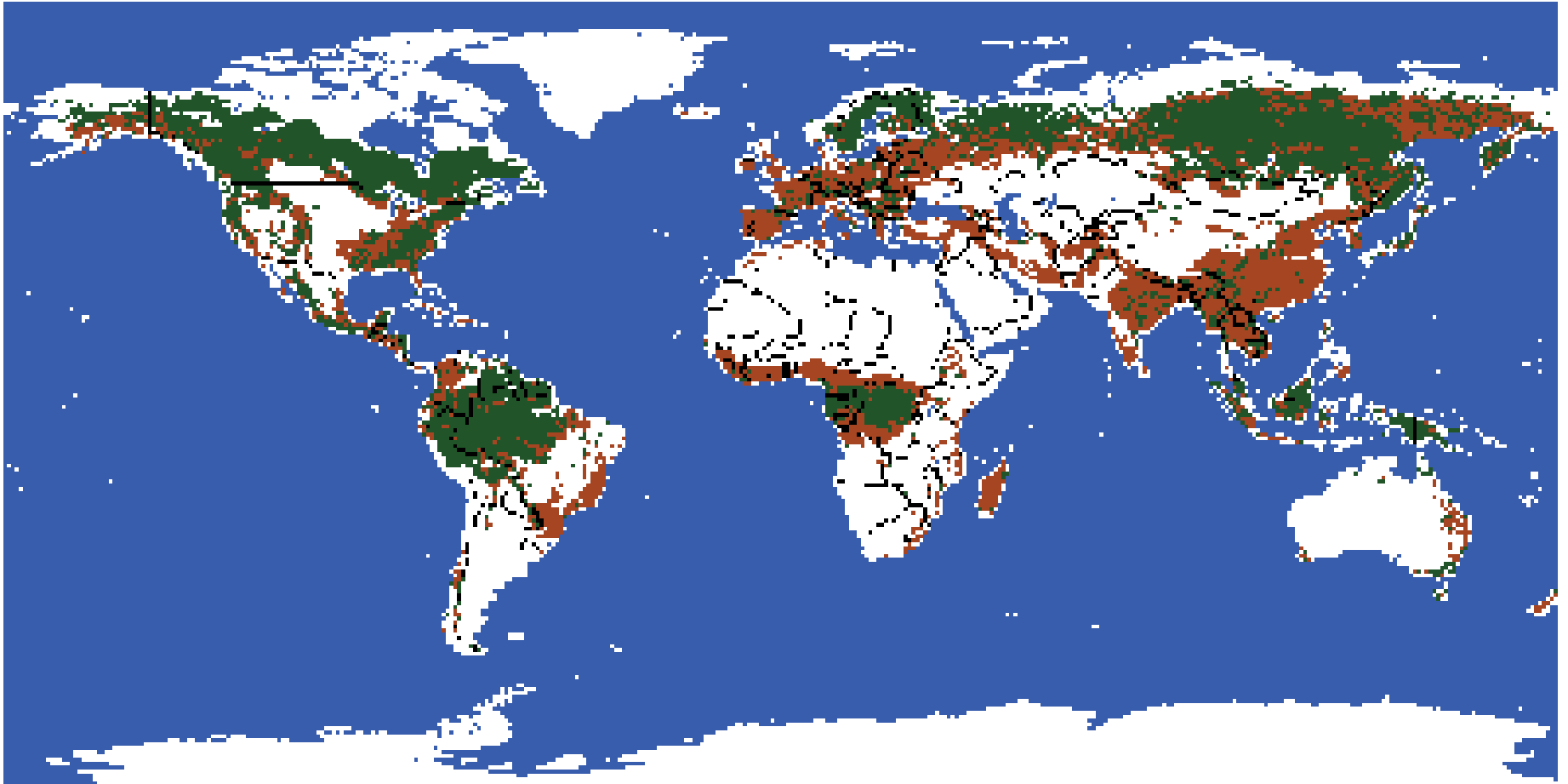


Figura 1. Deforestación del planeta.

*La sombra roja representa antiguas zonas cubiertas por bosques.

**La sombra verde representa el área de bosques remanentes.

2.3 Consideraciones previas a la criopreservación.

Realizar un trabajo de criopreservación con especies silvestres implica, en la mayoría de los casos comenzar desde cero, poco o nada conocemos acerca del comportamiento fisiológico de la mayoría de las especies de los bosques tropicales. Sin embargo, su conservación tanto in situ como ex situ a través de diferentes mecanismos, es una tarea necesaria para mantener la estabilidad de los ecosistemas naturales. En el caso del pino colombiano, se han hecho avances en el conocimiento de aspectos sobre sus semillas en la búsqueda de sistemas de propagación eficientes a través del cultivo in vitro de yemas vegetativas con resultados poco satisfactorios. La implementación de un protocolo de criopreservación para el pino colombiano resulta bastante ambicioso máxime, cuando todavía hay muchos problemas por resolver, aun en la etapa de propagación sexual. De este modo, la regeneración in vitro de embriones de pino colombiano podría convertirse en una nueva alternativa válida para avanzar en la propagación, conservación y manipulación de la especie.

Para la criopreservación de tejidos vegetales vivos, es necesario garantizar de antemano condiciones de regeneración y desarrollo adecuadas, ya que un medio que no cumpla con los requerimientos necesarios para estimular el desarrollo determina en gran medida con los resultados obtenidos después de la congelación.

Las actividades básicas en la implementación de un protocolo de criopreservación para especies poco conocidas implica:

- 1. Regeneración del tejido a través de técnicas de cultivo in vitro.*
- 2. Evaluación del efecto de las sustancias crioprotectores en la capacidad morfogénica del tejido.*
- 3. Evaluación de la deshidratación y su efecto sobre el tejido.*
- 4. La congelación del tejido.*
- 5. Recuperación adecuada del tejido congelado.*

2.4 Morfogénesis in vitro de Embriones.

La morfogénesis puede definirse como el desarrollo de órganos (tallos, raíces y flores) y estructuras completas en forma de planta. La morfogénesis vegetal in vitro puede generarse de dos formas, a través de la organogénesis o embriogénesis somática. La organogénesis involucra la formación separada de nuevos órganos a partir de células que son inducidas a dividirse, formando zonas de división celular las cuales, subsecuentemente conducen a la organización de centros meristemáticos dando lugar directa o indirectamente (callogénesis) a la formación de una nueva planta. En contraste, la embriogénesis somática origina una nueva planta a partir de la división activa de células somáticas en las cuales, se forman ejes meristemas tanto radicales como apicales sin ningún tipo de conexión vascular con el tejido madre. Una vez iniciado el embrión somático, se desarrolla de una manera similar a un embrión cigótico. (Ramage et al., 2002).

En gimnospermas, se han identificado tres fases en la embriogénesis: i) la fase de proembrión que incluye todos los procesos después de la formación del cigoto y antes de la elongación del suspensor, ii) la fase

temprana del embrión, que incluye todas las etapas después de la elongación del suspensor y antes de la iniciación de los cotiledones y iii) la fase de embrión que incluye desde la iniciación de los cotiledones hasta el completo establecimiento de meristemos polares y los cotiledones (Ho, 1992).

Un embrión es esencialmente una estructura multicelular con desarrollo bipolar conformada por meristemos apicales y radicales que tienen el potencial de formar una nueva planta (Sharma, et. al. 1996). Por su parte, el cultivo in vitro de embriones vegetales se define como el desarrollo y mantenimiento in vitro de embriones maduros e inmaduros bajo condiciones controladas en medios artificiales de composición conocida y surge a partir de los problemas encontrados en la germinación de las semillas de muchas especies, causados por el efecto de inhibidores, endospermos degenerados, embriones inmaduros y por la formación de híbridos interespecíficos. En el cultivo in vitro de los embriones se distinguen dos clases; pregerminal y postgerminal. El cultivo de embriones pregerminal es el mantenimiento de embriones inmaduros hasta su desarrollo en embriones maduros. Por su parte, el cultivo postgerminal implica la germinación de los embriones maduros o inmaduros y su posterior desarrollo en plantas viables (Ho, 1992).

Los embriones inmaduros son heterotróficos, por lo cual dependen de una fuente nutricional externa para su desarrollo, ya sea un megagametofito o un endospermo, después de la iniciación de los cotiledones los embriones comienzan su etapa autotrófica y crecen fácilmente en los medios de cultivo. Se ha detectado que el medio necesario para cumplir con los requerimientos de los embriones autotróficos, es menos complejo en composición que el medio utilizado para los embriones heterotróficos, los cuales requieren de una composición más compleja de nutrientes para su desarrollo. (Ho, 1992)

Se han identificado tres factores que tienen influencia en la morfogénesis de los embriones vegetales :

- 1. Estado fisiológico del embrión.*
- 2. Manipulaciones in vitro.*
- 3. Variabilidad natural de las poblaciones y estrés fisiológico de la planta madre.*

El estado fisiológico de la planta madre influye significativamente en el éxito de la morfogénesis. Según Roca et al., 1991. Es ideal en la selección del explante contar con material sano y juvenil. Sin embargo, en algunas ocasiones la selección puede estar limitada como sucede con poblaciones silvestres muy pequeñas y amenazadas, en donde no hay una amplia disponibilidad de tejidos para iniciar su regeneración. Igualmente, la forma de reproducción de la planta madre (sexual, asexual) es importante en términos de la aplicación biotecnológica, la selección del explante y el método de cultivo (Benson, 2000).

El cultivo in vitro de embriones ha sido usado para acortar los ciclos de reproducción, prevenir el aborto de los embriones y como punto de partida para la propagación vegetativa. Otra gran aplicación ha sido para la conservación de in vitro (Engelman, 1991).

La capacidad de las plantas para reproducirse asexualmente ha sido una gran ventaja aplicada en la biotecnología vegetal a través, de la micropropagación clonal (vía embriogénesis somática, organogénesis y cultivo nodal). En Algunas familias se ha observado una alta capacidad de regeneración pero en otras, especialmente las forestales, la propagación vegetativa in vitro ha sido más difícil. La filogenia puede tener un impacto inmediato en la recalcitrancia del tejido, por ejemplo; se ha observado diferencias muy

marcadas en la respuesta *in vitro* entre las especies del grupo de las monocotiledóneas y dicotiledóneas determinadas por la morfología de estos dos grupos de angiospermas. Por ejemplo, en las monocotiledóneas el meristema apical es usualmente basal en su origen, su tejido vascular esta aleatoriamente disperso a través del tallo y frecuentemente el tejido meristemático se localiza en zonas muy diferentes a las dicotiledóneas (Benson, 2000).

Una gran cantidad de formulaciones se han establecido para el cultivo de plantas leñosas (Tabla 1), donde las diferencias reflejan una significancia biológica poco conocida. Algunos factores tienen una mayor influencia sobre el desarrollo de los embriones como es el caso de las sales minerales y la sacarosa, la cual es utilizada en el cultivo no solo como fuente de energía sino también como regulador osmótico (Sharma, et. al. 1996).

Otro factor importante en el cultivo son los reguladores de crecimiento los cuales, han tenido diferentes efectos en el crecimiento de los embriones, tanto inhibitorio como estimulador dependiendo de la concentración y tipo del regulador, así como la especie bajo estudio. Aunque los reguladores de crecimiento tales como el ácido giberélico, auxinas y citiquininas han sido ampliamente usadas, se ha encontrado que los efectos de estas sustancias han sido bastante inconsistentes, ya que estas sustancias no son nutricionales, es probable que su función este asociada de alguna manera con la permeabilidad de la célula y la captura de algunos iones (Sharma, et. al. 1996).

Los embriones son alternativas interesantes para la implementación de programas de conservación *in vitro* de especies silvestres, porque es relativamente fácil recuperarlos, presentan variabilidad genética y son una excelente fuente para procesos de multiplicación masiva como la embriogénesis somática.

En el mundo se han realizado numerosos trabajos en el cultivo *in vitro* de embriones de gimnospermas de interés económico, en la mayoría de los casos el punto crítico ha sido la pobre formación de raíces *in vitro*. Mathur et al. (1999), utilizando embriones maduros de *Pinus wallichiana* indujo una alta formación de yemas adventicias, el enraizamiento fue inducido cuando los vástagos fueron cultivados con bajos porcentajes de sacarosa y en presencia de carbón activado alcanzando 79.5% de plántulas con formación de raíces.

Mata et al (2001) cultivaron embriones inmaduros de *Picea chihuahuana* para obtener yemas adventicias, sin embargo el estudio reporta solo un 5% de enraizamiento de los vástagos limitando su establecimiento *ex vitro*. Así mismo para *Cycas revoluta* Rinaldi (1999) obtuvo solo un 20% de vástagos enraizados.

En general, altas concentraciones de sacarosa son usadas para el cultivo de embriones inmaduros y bajas concentraciones para los embriones maduros. Así mismo, bajas concentraciones de auxinas han favorecido el normal crecimiento, mientras que altas concentraciones han tenido un efecto inhibitorio o favorecido un crecimiento desorganizado. El efecto del GA₃ ha sido más o menos consistente en el alargamiento de los embriones, mientras que las citiquininas han resultado frecuentemente en inhibición del crecimiento (Sharma, et. al. 1996).

Tabla 1. Composición de medios de cultivos vegetales comúnmente usados.

Medio/ Abreviación	Hoaglan d & Snyder H&S	White W	Murashige & Skoog MS	Gamborg Et al. B5	Shenk & Hilderbrandt S&H	Chu et al. N ₆
Macronutrientes ^a						
KNO ₃	506	80	1900	2500	2500	2830
NH ₄ NO ₃	-	-	1650	-	-	-
Ca(NO ₃) ₂ *4H ₂ O	1180	300	-	-	-	-
CaCl ₂ *2H ₂ O	-	-	440	150	200	166
MgSO ₄ *7H ₂ O	493	720	370	250	400	185
KCL	-	65	-	-	-	-
KH ₂ PO ₄	136	-	170	-	-	400
NH ₄ H ₂ PO ₄	-	-	-	-	300	-
NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	-	16.5	-	150	-	-
Na ₂ SO ₄	-	200	-	-	-	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	-	-	134	-	463
Micronutrientes ^a						
MnSO ₄ *H ₂ O	-	7.0	22.3	-	-	-
MnSO ₄ *4H ₂ O	-	-	-	10.0	10.0	4.4
ZnSO ₄ *7H ₂ O	-	3.0	8.6	2.0	1.0	1.5
H ₃ BO ₃	-	1.5	6.2	3.0	5.0	1.6
KI	-	0.75	0.83	0.75	1.0	0.8
CuSO ₄ *5H ₂ O	-	-	25µg	25µg	0.2	-
NaMoO ₄ *2H ₂ O	-	-	250µg	250µg	0.1	-
CoCl ₂ *6H ₂ O	-	-	25µg	25µg	0.1	-
FeSO ₄ *7H ₂ O	-	-	27.8	-	15.0	27.85
NaFeEDTA	-	-	-	28.0	-	-
Na ₂ EDTA*2H ₂ O	-	-	37.3	-	20.0	37.25
Fe ₂ (SO ₄) ₃	-	2.5	-	-	-	-
Vitaminas ^a						
Myo-Inositol	-	-	100	100	1000	-
Thiamina-HCl	-	-	0.1	10.0	5.0	1.0
Acido nicotínico	-	-	0.5	1.0	5.0	0.5
Pirodoxina-HCL	-	-	0.5	1.0	0.5	0.5
Ca D- Pantotenato	-	-	-	-	-	-
Biotina	-	-	-	-	-	0.05
Acido folico	-	-	-	-	-	0.5
Riboflavina	-	-	-	-	-	-
Acido ascorbico	-	-	-	-	-	-

^a expresados en mg.

Adaptado de Ramage et al.

2.5 Encapsulación de Tejidos

La encapsulación o semilla artificial consiste, en el recubrimiento de un tejido por una capa protectora de alginato de calcio que proporciona los nutrientes esenciales, brindando resistencia contra las manipulaciones mecánicas. Para la encapsulación se ha utilizado en la mayoría de los casos el alginato de sodio por su bajo efecto tóxico y su fácil manipulación. También otros compuestos han sido utilizados con algún nivel de éxito (Tabla 2). La semilla artificial contiene en su interior los nutrientes que proporcionan la energía requerida para la germinación asemejando un endospermo natural. Además de una barrera mecánica protectora la cápsula es un sistema de inmovilización celular que ha sido usado para retardar el crecimiento y prolongar el tiempo de almacenamiento (Gupta et al., 1993).

Las técnicas de encapsulación han sido diseñadas para la producción a gran escala de semilla artificial, basadas en la utilización de embriones somáticos. En la actualidad existen algunos factores limitantes, para su implementación como la disponibilidad de protocolos de regeneración que permitan obtener embriones somáticos, capaces de permanecer en estado de dormancia y presentar una alta frecuencia de germinación y conversión en plantas. Sumado a esto, existen otras limitaciones de orden tecnológico, como la implementación de procesos de escalado que permitan la producción de un elevado número de embriones en biorreactores, el desarrollo de máquinas para la encapsulación y métodos de encapsulación que permitan almacenar la semilla manteniendo su viabilidad y capacidad de conversión, garantizando a la vez protección contra plagas y enfermedades (Jiménez et al., 1998).

Tabla 2. Geles para la encapsulación de tejidos.

Agente gelificante	Concentración (%)	Agente Acomplejante	Concentración (mM)
Alginato de Sodio ó Alginato de Potasio	0.5 – 5.0	CaCl ₂ LaCl ₂ CoCl ₂ FeCl ₂ Ca(NO ₃) ₂ Ca(OH) ₂	30 - 100
Agar	5 – 8	Tánico	100
Gelrite	0.15 – 0.25	Ninguno	-
Pectato de sodio	2.0	CaCl ₂ CaSO ₄	100 100

Tomado de Gupta et al.,(1993).

Existen varios tipos de semilla artificial, siendo la más utilizada aquella que contiene un embrión somático (Nieves et al., 1998). Varios sistemas de encapsulación de embriones se han evaluado, obteniendo los mejores resultados con los métodos basados en la gelación. El hidrogel de alginato ha sido el más utilizado para la matriz de la semilla artificial, debido a su viscosidad moderada y baja toxicidad, insignificante disminución del poder germinativo, así como rapidez y sencillez en el proceso de gelificación la cual consiste en depositar gota a gota una mezcla de alginato, medio de cultivo y un embrión en una solución de CaCl_2 (Redenbaugh et. al., 1987).

Entre los factores más relevantes que influyen en la germinación de las semillas artificiales encontramos; la calidad del embrión, el cual debe poseer determinadas características como: formar adecuadamente raíces y vástagos, tener un rápido desarrollo dentro de la cápsula, no formar callos secundarios y mantener un genotipo y fenotipo uniforme. Así mismo, la germinación de la semilla artificial puede verse afectada por la dureza e insuficiente elasticidad del gel, representada en el tipo y concentración del alginato de sodio, la concentración del agente acomplejante y el tiempo de reacción de acomplejamiento (Jiménez et. al., 1998).

*Ghosh et al. (1994), en ensayos con embriones somáticos de *Asparagus cooperi* evaluó diferentes concentraciones de alginato de sodio (2-6% (p/vol)) y de CaCl_2 (25, 50, 75 y 100 mM) con el fin de optimizar la conversión de las cápsulas. Entre los resultados obtenidos, se concluye que la utilización de altas concentraciones de alginato formaban cápsulas rígidas las cuales, suprimían la capacidad de las regiones apicales para emerger. La mejor respuesta en la conversión la obtuvo usando 3.5%(p/v) de alginato de sodio y 50mM de CaCl_2 con un tiempo de acomplejamiento de 30 minutos con una frecuencia de conversión (32.2%).*

Otra variable importante en la encapsulación de tejidos la constituye la calidad del endospermo sintético, la cual contiene la mezcla de macro y micronutrientes, suplementados con compuestos orgánicos, carbohidratos y en algunos casos reguladores de crecimiento que proporcionan el soporte nutricional necesario para el desarrollo del explante. Ganapathi et al., (2001) en ensayos realizados con plantas de banano, evaluó la calidad del endospermo comparando el efecto del agua destilada sobre el agua no destilada en la frecuencia de germinación de la semilla artificial, obteniendo la mejor respuesta cuando utilizaba agua no destilada, con una frecuencia de germinación del 53% contra un 33% cuando utilizaba agua destilada. La adición de agua no destilada en la mezcla de encapsulación mostró una mejor respuesta, posiblemente porque la sales y minerales contenidas pudieron contribuir en el crecimiento del explante mejorando su frecuencia de germinación.

*Castillo et al., (1998). En ensayos con embriones somáticos de *Carica papaya* obtuvo resultados similares, determinando que una baja concentración de alginato (1.5 –2.0 %) daba origen a cápsulas débiles y poco consistentes, resultando en una baja conversión de los embriones. Cuando encapsularon embriones con 2.5% de alginato en 50 μM de CaCl_2 por 10 minutos lograron una frecuencia de regeneración del 77.5%, exhibiendo la misma frecuencia de germinación que aquellos embriones no encapsulados. Redenbaugh et al., (1987) determinó algunas variables importantes para el método de encapsulación por goteo en CaCl_2 las cuales, comprenden; tipo y concentración del alginato, medio de regeneración y método utilizado para producir la semilla artificial, estos parámetros aportaron en gran medida en la variación de los porcentajes de conversión para alfalfa, zanahoria y apio.*

De otro lado, la sacarosa y el almidón han sido los carbohidratos más usados en el desarrollo, maduración, germinación y conversión de los embriones por lo tanto, la adición de estos nutrientes al endospermo. Nieves et al., (1998) evaluó el comportamiento de los embriones de mandarina bajo diferentes carbohidratos, entre ellos sacarosa, manitol y almidón. El resultado menos favorable lo obtuvo, cuando el endospermo contenía almidón, probablemente porque no pudo ser hidrolizado limitando el desarrollo de los embriones. De igual manera, el manitol resulto inhibitorio para la germinación de estos embriones. Con los reguladores de crecimiento una rápida germinación se obtuvo cuando el ABA se encontraba en proporciones inferiores al GA₃, sin embargo no todos se convirtieron en plantas. Cuando no se incluyeron los reguladores de crecimiento los embriones tomaron más tiempo en germinar pero todos lograron convertirse en plantas.

Por otro lado, la calidad del sustrato es otro factor importante en la germinación de tejidos encapsulables. Mandal et al., (2000) encápsulo yemas apicales de 4 especies de Ocimum sp. para determinar el efecto de diferentes sustratos en la frecuencia de germinación de la semilla artificial, comparando agar, suelo y agua sin destilar. La máxima emergencia de las yemas se logro, cuando las cápsulas se cultivaron en sustrato de agar con una germinación en promedio del 97% para las especies seleccionadas. Por su parte, los niveles más bajos de emergencia fueron observados cuando las cápsulas se cultivaron en suelo con una germinación en promedio del 4% de emergencia.

Pattnaik et al.,(2000) también evaluo el efecto de diferentes sustrato en la germinación de las cápsulas de Morus sp. entre ellos suelo, vermiculita y agar, encontrando los mejores resultados con medios soportados con agar. Al parecer la difusión de sustancias entre el sustrato y el endospermo es un factor crítico en la disponibilidad de nutrientes para el tejido, afectando no solo la elongación del hipocótilo sino también la formación de las raíces.

Otra aplicación de la encapsulación ha sido como elemento de almacenamiento, ya que en combinación con las bajas temperaturas y/o omisión de algunos nutrientes esenciales para el normal crecimiento se han logrado aumentar los períodos de subcultivos. Mandal et.al. (2000) evaluaron el efecto del almacenamiento en la conversión de cápsulas de Ocimum sp. alcanzando un tiempo de almacenamiento máximo de 60 días con una frecuencia de conversión del 21% en promedio.

(Maruyama et. al., 1997) almaceno a bajas temperaturas ápices encapsulados de Cedrela odorata, Guazuma crinita y Jacaranda Mimosaeifolia por un periodo de 12 meses para Cedrela odorata, Guazuma crinita y 6 meses para Jacaranda Mimosaeifolia en un sustrato de agua con agar, obteniendo niveles de germinación de las cápsulas del 80% 90% y 70% respectivamente. El efecto de la cápsula de alginato en la inmovilización del crecimiento puede atribuirse a una reducción en los procesos de respiración de las células encapsuladas.

Ghosh et at. (1994), en embriones encapsulados de Asparagus cooperi demostró que la encapsulación permitía mantener viables por mucho más tiempo los embriones soportando temperaturas de almacenamiento de 2°C y 4°C frente a no encapsulados. Alcanzando a los 90 días de almacenamiento una frecuencia de conversión del 11.3% para los embriones encapsulados y 0% para los no encapsulados. Castillo et al., (1998) almaceno por 85 días sin afectar la germinación, embriones encapsulados de papaya mientras que los no encapsulados fallaron para germinar después del almacenamiento. De otro lado,

Germana et al.,(1999) almaceno por 30 días embriones encapsulados de Citrus reticulata a una temperatura de 4°C sin pérdida en la capacidad de conversión.

Soneji et al., (2002) evaluó el almacenamiento de cápsulas de Ananas comosus bajo diferentes temperaturas, estimando el efecto sobre la germinación de la semilla. Cuando utilizo temperaturas entre 10 y 15 °C la germinación ocurrió a los 10 días, y cuando disminuyo la temperatura a 4 °C el logro prolongar por 30 días el periodo de almacenamiento. Yemas de Morus sp. encapsuladas fueron almacenadas en refrigerador a 4 °C por 60 días en contraste con aquellas yemas no encapsuladas que perdieron su viabilidad después de 7 días de almacenamiento. (Pattnaik, 2000)

2.6 Criopreservación.

La criopreservación es una técnica mediante la cual un tejido, órgano o célula es llevado a temperaturas del nitrógeno líquido para detener o disminuir su metabolismo, con fines de preservarlo a largo plazo. La conservación de los recursos genéticos vegetales es un tema de interés global, principalmente porque es un recurso que rápidamente se esta deteriorando y porque la diversidad posee un enorme valor potencial poco explorado, por este motivo se vienen desarrollando nuevos sistemas de almacenamiento especialmente para la conservación a largo plazo de especies con semillas recalcitrantes y propagadas vegetativamente. El mantenimiento del germoplasma vegetal a bajas temperaturas es considerado un tema importante de investigación para resolver los problemas y dificultades asociadas con la conservación de las especies (Takagi, 2000).

La conservación in vitro ofrece algunas ventajas alternativas sobre las estrategias tradicionales como son: i) La recolección del material puede darse en cualquier época del año, independiente de los periodos de floración de cada especie; ii) Existe el potencial para la eliminación de virus de los materiales contaminados a través del cultivo de meristemos; iii) Rápida multiplicación del material almacenado mediante técnicas de micropropagación. Además, los requerimientos de espacio para el almacenamiento son reducidos comparados con el almacenamiento en campo y los cultivos no están sujetos a las perturbaciones ambientales tales como las fluctuaciones de temperatura, huracanes, insectos, pestes y/o patógenos (Ashmore, 1997).

El agua es uno de los más importantes componentes de los sistemas vivos, porque permite un orden estructural y regula todos los procesos vitales. El control del estado del agua, durante la criopreservación es un factor clave en el desarrollo exitoso de las estrategias crioprotectoras, para la limitación de los daños causados durante el proceso (Dumet et al., 2000).

Las células con altos contenidos de agua en los tejidos vegetales, no pueden sobrevivir cuando son expuestas a las bajas temperaturas del nitrógeno líquido y durante el calentamiento, porque pueden ser dañadas como resultado de: i) Exposición a una baja temperatura, ii) Formación de cristales de hielo, iii) Deshidratación severa y/o iv) formación de radicales libres. Por debajo de los -120°C las reacciones biofísicas y bioquímicas ocurren de una manera muy lenta para causar deterioro biológico, solo en el largo plazo puede haber pequeños riesgos de cambios genéticos asociados a la radiación ionica (Reinhou,2000).

El comportamiento del agua celular a temperaturas de congelamiento es clave para la supervivencia del individuo. El congelamiento es uno de los estados más severos a los que puede ser sometido un tejido celular, la formación de hielo, la deshidratación y la deformación celular son algunas de las graves consecuencias ocasionadas durante la criopreservación. Para soportar estos efectos algunas plantas han diseñado varios mecanismos para regular la formación de hielo. Sin embargo, La mayoría de los tejidos utilizados en la criopreservación son sensibles al congelamiento y carecen de mecanismos propios para regular los eventos del congelamiento (Masaya et al. 2000).

Las uniones de las membranas son uno de los principales daños ocurridos durante el congelamiento, los cambios celulares ocasionados durante la aclimatación en las especies tolerantes, están relacionadas en la prevención de las condiciones que causan estas uniones a través de la acumulación de carbohidratos solubles, que pueden prevenir los daños ocasionados durante el congelamiento (Fujikawa, 2000).

Varias formas de supervivencia se han observado en una amplia variedad de especies leñosas que tienen una alta tolerancia al congelamiento en condiciones naturales. Entre los mecanismos protectores se incluyen, un incremento en el número de fosfolípidos hidratados de los grupos polares de la membrana plasmática, la acumulación de carbohidratos solubles en el citoplasma, el endurecimiento de la pared celular, la acumulación de proteínas anticongelantes en los espacios apoplásticos y cambios secundarios en el retículo endoplasmático. La deshidratación resultante por el congelamiento extracelular, provoca una concentración de los solutos intracelulares y un estado de vitrificación (fase transicional de un estado líquido a una fase cristalina o amorfa) es inducido debido a las bajas temperaturas de congelamiento (-40°C) y las lentas tasas de enfriamiento (Fujikawa, 2000).

Mazur, (1970). Propuso la hipótesis del doble factor para explicar la formación del hielo intracelular y sus efectos dinámicos durante el congelamiento, argumenta que las rápidas tasas de enfriamiento son las responsables de la formación de largos cristales de hielo intracelular, ocasionando daños mecánicos en la célula. De otro lado, las lentas tasas de enfriamiento propician la cristalización inicialmente en los compartimentos extracelulares, induciendo una extrema deshidratación osmótica, la cual ocurre cuando el agua intracelular no congelada se desplaza del interior hacia el exterior celular para compensar el déficit de presión de vapor del medio extracelular.

(Dumet, 2000). Sugiere que el daño físico no es solo la causa del fracaso durante el congelamiento de los tejidos, sino que los daños también pueden ser expresados a nivel bioquímico, el congelamiento promueve muchos cambios letales causando desordenes metabólicos, los cuales pueden conducir a la producción de radicales libres, tales como el radical hidróxilo (OH), superóxidos (O₂), formas activas del oxígeno como peróxidos de Hidrogeno (H₂O₂) y oxígeno simple (O₂). Además sugiere que el estrés oxidativo causante de la liberación de radicales libres, también puede darse en las semillas sometidas a muy bajas temperaturas de almacenamiento.

Para evitar los daños causados durante el congelamiento, se han desarrollado dos estrategias de crioprotección para los tejidos vegetales, las cuales se basan en las propiedades físicas del agua. La primera estrategia involucra la adición de compuestos crioprotectores y la segunda la remoción de casi toda el agua congelable a través de la evaporación. Ambos métodos buscan reducir o inhibir la formación de cristales de hielo. Bajo esta situación, la solidificación de la solución intracelular se debe a una

elevación extrema de la viscosidad celular durante el enfriamiento, en estas condiciones el agua no puede cristalizarse y la dinámica molecular es detenida dando origen a un estado vítreo (Dumet, 2000).

Tres procedimientos básicos han sido usados para la criopreservación de células vegetales: i) Método de equilibrio de congelamiento, ii) Vitrificación y iii) Encapsulación/deshidratación. Estos procedimientos tienen en común una etapa de deshidratación del tejido antes del congelamiento para evitar la formación de cristales, esta deshidratación puede ser física o química por lo cual, las sustancias utilizadas son denominadas crioprotectantes (glicerol, dimetilsulfoxido, etilenglicol, azúcares) y su función es limitar el daño durante el congelamiento y el calentamiento del tejido. Algunos de estos crioprotectantes pueden entrar a la célula mientras que otros actúan fuera de ellas, ambos grupos alteran las propiedades físicas del agua disminuyendo el punto de congelamiento del agua, reduciendo la tasa de crecimiento de los cristales de hielo y/o cambiando la forma de los cristales de hielo. Los crioprotectantes resultan tóxicos para las células vegetales, especialmente cuando son usados en altas concentraciones o altas temperaturas. (Reinhoud,2000).

El éxito de los protocolos de criopreservación basados en los métodos de vitrificación, dependen en gran medida de la tolerancia a la deshidratación del tejido. La deshidratación es realizada antes del congelamiento y es un requisito para la adaptación de los materiales biológicos a las temperaturas de congelamiento, evitando todos los factores que propician la formación de hielo intracelular, para esto las muestras deben cargarse en crioprotectores antes de su deshidratación para luego sumergirlas en NL. El estado de vitrificación involucra la conversión del agua, tanto de las soluciones internas como externas a la célula para evitar estos efectos letales durante el congelamiento intracelular, así como de una excesiva deshidratación. La remoción de agua intracelular usando diferentes tratamientos de desecación es considerada una de las más simples y efectivas estrategias crioprotectoras (Dumet, 2000; Fujikawa,2000; Engelmann, 1997).

2.6.1 Criopreservación de embriones zigóticos.

La criopreservación de embriones zigóticos, ha sido ampliamente evaluada principalmente para las especies de las zonas templadas. Generalmente, la crioprotección se basa en la evaporación del agua interna de los tejidos a través de la desecación bajo sistemas de cámara de flujo laminar y/o sílica gel. Así mismo, Las respuestas encontradas han sido muy variadas, obteniéndose desde la pérdida total de la capacidad morfogénica del tejido hasta modificaciones del patrón de regeneración dando lugar a la formación de callos, embriones sin raíces y embriones sin tallos. En la mayoría de los casos el precultivo con sustancias crioprotectoras se obvia y comúnmente los embriones se extraen de la semillas previamente hidratadas y directamente son llevados para su desecación a sílica gel o cámara de flujo laminar. Para la crioprotección de los embriones se ha hecho poco uso de las sustancias crioprotectoras debido a los efectos tóxicos que ocasionado en los embriones. (Engelman et al, 1995; Dussert et al, 1998; Berjak y Dumet, 1996; Pence, 1990; Normah y Vengadasalam,1992; Normah et al, 1994).

Normah et al, (1994). En ensayos realizados con ejes embrionarios de Avellana (*Corylus avellana*), especie que exhibe un comportamiento ortodoxo, encontró que los ejes podían ser congelados a contenidos de humedad del 3% , obteniendo al final una viabilidad del 97% después del congelamiento.

Pence (1990). Evaluando la criopreservación para los ejes embrionarios de *Corylus avellana*, *Castanea mollissima*, *Castanea sativa*, *Fagus grandiflora*, *Quercus alba*, *Q. macrocarpa*, *Q. Marilandica*, *Q. Mahlenbergii*, *Aesculus hippocastanum*, *A. octandra*, *A. parviflora*, *Carya cordiformis*, *Carya illinoensis*, *C. laciniosa*, *C. tomentosa*, *Juglans cinerea* y *J. nigra* después de una etapa de deshidratación por dos horas en sílica gel, encontró evidencia en todos los géneros sobre la capacidad de sobrevivir a la desecación y criopreservación. En la mayoría de los ejes se observó crecimiento del tallo, sin embargo el crecimiento potencial de la raíz fue severamente limitado.

Normah y Vengadasalam (1992). Realizaron ensayos con embriones de *Coffea* y *Vigna* deshidratándolos en cámara de flujo laminar entre 0-90 minutos, obteniendo una supervivencia del 83 - 86% para *Coffea* y 90% para *Vigna* después del congelamiento, con un contenido de humedad entre 15 - 20% y 6.7 – 10.5% respectivamente. Estos autores resaltan la importancia de las condiciones post-congelamiento, para el proceso de recuperación, especialmente reflejadas en los medios específicos que deben elaborarse para cada especie.

Berjak et al, (1996). En embriones de neem (*Azadirachta indica*) deshidratados previamente con sílica gel durante una hora,, obtuvo un porcentaje de supervivencia del 100% a un contenido del 23% después del congelamiento.

Engelmann et al. (1995). Determino factores relevantes en la criopreservación de embriones zigóticos de Café, Palma de aceite y Coco que determinaron la viabilidad y supervivencia de los embriones. Entre los cuales destaca la madurez y estado fisiológico de la semilla para esto, utilizó embriones maduros e inmaduros de café encontrando tasas de supervivencia del 96% y 50% respectivamente, sin embargo cuando mejoraron los medios de recuperación para los embriones inmaduros aumentaron la recuperación de los inmaduros alcanzando un 83% de viabilidad. Los embriones son una buena fuente de material para la criopreservación solo cuando se encuentran en un óptimo estado fisiológico. Así mismo, embriones de palma de aceite sometidos a un precultivo por 7 días en sacarosa resultaron en 40% de supervivencia para embriones no deshidratados y 100% para embriones deshidratados.

La técnica utilizada en la criopreservación de embriones vegetales, se denomina desecación y consiste en cultivar el tejido en presencia de carbohidratos solubles (generalmente azúcares como sacarosa, tetralosa, glucosa etc.) para luego deshidratarlos a través de una cámara de flujo laminar o en presencia de sílica gel, antes de sumergirlos rápidamente en NL. para su almacenamiento. Bajo esta técnica, las tasas de supervivencia obtenidas después del congelamiento han sido altas y la recuperación rápida expresadas en diferentes tipo de crecimiento. Sin embargo, los niveles de supervivencia son extremadamente variables (Dumet, 2000).

Numerosas especies se han congelado con esta técnica (Tabla 3), la mayoría de comportamiento ortodoxo, las cuales son más fáciles de congelar que las del grupo de recalcitrantes, existen varias razones que podrían explicar el limitado desarrollo de la criopreservación para especies con semillas recalcitrantes: i) La mayoría son especies silvestres sobre las cuales se desconocen muchos aspectos de

su biología y particularmente del comportamiento de las semillas y ii) en algunos casos donde la información sobre almacenamiento esta disponible, la información relacionada con los protocolos de cultivo de tejidos, incluyendo inoculación in vitro , la germinación y crecimiento de plántulas, a menudo no existe o no es completamente operacional (Engelmann,1997).

Tabla 3. Ensayos de criopreservación realizados con embriones y ejes embrionarios de algunas especies con semillas recalcitrantes e intermedias.

Especie	Almacenamiento	Técnica de Congelamiento	Contenido de Humedad (%)	Supervivencia (%)	Tipo de regeneración
Aesculus hippocastanum	R	Ds	15	72	Plantas enteras
Aesculus glabra	R	Ds	31	80	Plantas enteras
Araucaria excelsa	R	Ds	13	30	Callo raíz
Artocarpus heterophyllus	R	CP	29-33	60	Crecimiento de tallo y raíz
		Ds	13	30	
Baccaurea motleyana	R	Ds	13-20	0	-
Baccaurea polyneura	R	Ds	11	25	Crecimiento in vitro
Calamus manan	R	Ds	7	27	Plántulas in vitro
Castanea sativa	R	Ds	25	30	Sin crecimiento
Cocos nucifera	R	PD	-	33-93	Plantas enteras
Corylus avellana	I	Ds	11-12	50-85	Plántulas in vitro
Hevea brasiliensis	R	Ds	14-20	20-69	plántulas in vitro
Lansium domesticum	R	Ds	10-15	0	-
Howea fosteriana	I	Ds	9-11	64	Plantas enteras
Livitonia chinensis	?	Ds	20	50	Crecimiento in vitro
Quercus falcata	R	Ds	25	60	Elongación + callo
Q. macrocarpa	R	Ds	36	?	Callo
Q. nigra	R	Ds	25	40	Elongación + callo
Q. palustris	R	Ds	25	10	Callo
Q. rubra	?	Ds	20	80	Elongación de la raíz+ Ensanchamiento del tallo
Teobroma cacao	R	CP	-	50	Callo + Embriones adventicios
Veitchia merrillii	I	Ds	9-10	63	Plantas enteras

R: Recalcitrante; I: intermedia; CP: congelamiento programado; PD: Precultivo/deshidratación;

Ds: Deshidratación.

Tomada de Engelmann,1997.

3. METODOS Y MATERIALES

3.1 Localización

La investigación se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos de la Unidad de Biotecnología Vegetal de la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB), ubicado en el municipio de Medellín, Antioquia, entre los 6°16' de latitud norte y 75°34' de longitud oeste. Con una precipitación anual de 1800 mm, humedad relativa de 60% y una temperatura media anual de 23°C

3.2 Material Vegetal.

Los embriones fueron extraídos de semillas maduras suministradas por el banco de germoplasma de la Corporación Autónoma Regional del Centro de Antioquia (Corantioquia), a través del programa de fuentes semilleras y recolectadas de árboles ubicados en las inmediaciones de los municipios de Jardín y Támesis.

El procesamiento de la semilla se inicia con la recolección en campo de los frutos, los cuales son llevados al laboratorio de semillas forestales de Corantioquia, donde se extrae la semilla y se limpian todas las impurezas; después de esto, las semillas son empacadas en bolsas plásticas, registradas y almacenadas en cuartos fríos a una temperatura de 4°C entre 4 y 6 meses.

Posteriormente, las semillas eran transportadas a la CIB, en donde fueron empacadas en cajas plásticas con aserrín y almacenadas en cuarto frío a una temperatura de 4°C hasta su utilización.

Para iniciar los ensayos, las semillas eran lavadas con jabón desinfectante (Extrán) por espacio de 20 minutos y enjuagadas con agua de chorro hasta eliminar todas las trazas de jabón, luego las semillas eran llevadas a frascos estériles para desinfectarlas con etanol al 70% durante 5 minutos, enjuagadas nuevamente con agua estéril 3 veces y posteriormente sumergidas en NaOCl a una concentración de 0.5% de su compuesto activo, por espacio de 25 minutos y enjuagadas con agua estéril. Las operaciones de desinfección eran realizadas en la cámara de flujo laminar.

Una vez desinfectada la semilla, se procedía a extraer el embrión con la ayuda de pinzas y bisturí, donde luego eran sembrados en medios de crecimiento para la evaluación de su respuesta.

En la presente investigación para la criopreservación de los embriones, se evaluaron las técnicas de Desecación; Encapsulación / Deshidratación, Vitrificación y Encapsulación/Vitrificación. Para evaluar la fase de criopreservación fue indispensable y básico implementar un protocolo de regeneración adecuado

para los embriones, de modo que, se garantizara que la ausencia de crecimiento estaba asociada a las etapas intermedias como la deshidratación y/o criopreservación y no por deficiencias en el medio de crecimiento. Para el pino colombiano no hay experiencias reportadas en la recuperación de embriones siendo necesario avanzar inicialmente en este aspecto. El trabajo abordo varias actividades de interés critico las cuales, eran esenciales para cumplir con los objetivos propuestos.

Las áreas de interés son :

- 1. Obtener un protocolo de regeneración de embriones de pino colombiano.*
- 2. Implementar un protocolo de encapsulación de embriones de pino colombiano.*
- 3. Evaluar el efecto de las sustancias crioprotectoras en la deshidratación y congelación.*

3.3 Regeneración de embriones de pino colombiano.

Para la recuperación de los embriones se realizaron ensayos que permitieran determinar condiciones y tendencias de desarrollo de los embriones bajo el cultivo in vitro, se evaluaron diferentes componentes del medio esenciales para el crecimiento del embrión como fueron: concentración de sales basales (solo se utilizaron sales Murashige & Skoog), concentración de sacarosa en el medio, presencia de reguladores de crecimiento, fases del medio y condiciones de incubación de los embriones.

Para todos los ensayos, los embriones fueron sembrados en cajas petri y subcultivados cada 4 semanas en medios frescos durante 12 semanas hasta la aparición de los cotiledones, en donde eran trasladados a un sustrato de turba estéril enriquecida con sales MS (Murashige & Skoog,1962) para su posterior desarrollo y endurecimiento de la planta.

Los medios fueron preparados con agua destilada, ajustados a pH 5.6 – 5.8 luego, autoclavados durante 20 minutos bajo una presión de 15 lb/pulg² a una temperatura de 121.5 °C. Los embriones aislados se incubaron en cuartos de crecimiento a una temperatura de 18 °C, humedad relativa de 80%, en oscuridad.

Cada tratamiento consistió en una muestra de 10 embriones, aquellos tratamientos que resultaron en un crecimiento favorable de los embriones fueron repetidos nuevamente. Un resultado favorable era aquel, en donde un embrión exhibía un tallo y una raíz claramente diferenciable.

3.4 Encapsulación de embriones de pino colombiano.

En la encapsulación de los embriones de pino colombiano, se evaluaron diferentes concentraciones de alginato de sodio y cloruro de calcio con un tiempo de integración de 20 minutos. Como criterio de evaluación para los tratamientos se tuvo en cuenta el numero de embriones que lograban emerger de la capsula, así como el tipo de crecimiento exhibido (callo y alargamiento del hipocótilo)

Los pasos para encapsular los embriones fueron los siguientes:

1. *Los embriones son extraídos de semillas maduras previamente desinfectadas, y sembrados en medios con sales y vitaminas MS libres de hormonas, suplementados con 5%(p/v) de sacarosa, 0.02%(p/v) de phytigel con pH entre 5.6 – 5.8 e incubados por 6 días a plena exposición para determinar la viabilidad de los embriones.*
2. *De otro lado, se preparan sales MS sin calcio, suplementados con alginato de sodio a diferentes concentraciones (2, 2.5, 3.0 y 3.5%(p/v) .*
3. *Así mismo, En otros recipientes se prepara una solución de cloruro de calcio a diferentes concentraciones (25, 50, 75 y 100 mM), diluidos en 400 ml de medio con sales MS diluidas a un cuarto (medio basal)sin phytigel .*
4. *Los embriones son sumergidos durante 20 minutos en la solución de alginato de sodio.*
5. *Los embriones son tomados con una pipeta modificada de punta ancha y depositados en el recipiente que contiene el cloruro de calcio, el cual es sometido a agitación durante 20 minutos a 80 r.p.m.*
6. *Posteriormente las cápsulas son retiradas de la solución de cloruro de calcio y lavadas con agua estéril por 10 minutos para eliminar trazas remanentes de cloruro de calcio.*
7. *Luego, las cápsulas son llevadas a cajas petri con papel filtro estéril para su secado superficial durante 15 minutos, enjuagadas con 0.1 M de KNO_3 durante tres minutos.*
8. *Las cápsulas son transferidas a medios de crecimiento con sales MS diluidas a un cuarto para evaluar la germinación de los embriones.*

Los germinación de los embriones encapsulados se evaluó 7 semanas después de la formación y siembra de la cápsula en los medios basales.

3.5 Criopreservación de los embriones de Pino colombiano.

3.5.1 Técnica de Encapsulación / Deshidratación.

3.5.1.1 Precultivo de los embriones encapsulados de pino colombiano.

Los embriones fueron incubados en medios basales durante 7 días para determinar su viabilidad, luego fueron encapsulados y sembrados en medios líquidos ajustados a pH 5.6 – 5.8 con concentraciones de sacarosa de 0.0; 0.3; 0.7 y 1 M, durante 1, 3 y 7 días y las secuencias 3 días en 0.3 M, 1 día en 0.7 M y 1 día en 1.0 M . Cada tratamiento consistió en una muestra de 10 cápsulas, los mejores tratamientos fueron repetidos nuevamente.

3.5.1.2 Deshidratación.

La deshidratación de las cápsulas se llevo a cabo de manera combinada con una exposición de 1 hora en cámara de flujo laminar y de 1 a 6 horas de deshidratación en caja petri con papel filtro sobre 30 g de sílica gel; se realizaron curvas de deshidratación de las cápsulas asociadas a cada tratamiento para determinar la tendencia de pérdida de humedad y supervivencia de los embriones.

El contenido de humedad se determino con base en peso fresco, cada hora una muestra de 10 cápsulas era pesada y luego, llevadas a medios basales para determinar el efecto de la deshidratación sobre la capacidad de regeneración del embrión, para la estimación del %HR se empleo la ecuación :

$$\% \text{ HR} = \frac{(\text{Pf} - \text{Ps})}{\text{Pf}} \times 100$$

Donde:

% HR : Porcentaje de humedad relativa de las cápsulas.

Pf : Peso fresco de las cápsulas antes de iniciar el proceso de deshidratación.

Ps : Peso seco de la cápsula después de 1 hora de exposición al agente deshidratante.

3.4.1.3 Congelación.

Las cápsulas fueron llevadas a crioviales de 5 ml, selladas con teflon y sumergidas rápidamente en nitrógeno líquido en donde permanecieron mínimo 1 hora.

3.4.1.4 Descongelación.

Para su descongelación los crioviales fueron sumergidos en agua a una temperatura de 40°C durante 3 minutos, posteriormente fueron sembradas en medios de crecimiento para su desarrollo e incubadas en oscuridad por 1 semana. Al cabo de las cuales se evaluó la condición del embrión.

3.5.2 Técnica de Encapsulación/Vitrificación

3.5.2.1 Precultivo de los embriones encapsulados de pino colombiano.

Embriones encapsulados fueron precultivados en medio basal suplementado con 2 M de glicerol más 0.4 M de sacarosa, con tiempos de exposición de 30 minutos, 1 hora, 2 horas , 3 horas y 1 día. Ajustados a pH 5.6-5.8, cada tratamiento consistió en una muestra de 10 embriones, los mejores tratamientos fueron repetidos nuevamente.

3.5.2.2 Deshidratación.

Para la deshidratación las cápsulas fueron expuestas a soluciones PSV2 (15%(w/v) DMSO, 15%(p/v) Etilenglicol, 30%(p/v) Glicerol y 0.4 Molar de Sacarosa) y PSV3 (50% (p/v) Glicerol y 50%(p/v) Sacarosa) en crioviales de 5.0 ml a una temperatura de 4 °C con tiempos de exposición de 10, 20 y 30 minutos para la solución PSV2 y 30, 60, 90, 120 y 180 minutos para la solución PSV3.

3.5.2.3 Congelamiento.

Las cápsulas contenidas en los crioviales de 5 ml con soluciones PSV2 Y PSV3 y sumergidos rápidamente en nitrógeno líquido para su congelamiento y almacenados mínimo 1 hora.

3.5.2.4 Descongelamiento.

Para su descongelación los crioviales fueron sumergidos en agua a una temperatura de 40°C durante 3 minutos, posteriormente fueron sembradas en medios basales para su desarrollo e incubadas en oscuridad por 1 semana. Al cabo de las cuales se evaluó la condición del embrión.

3.5.2.5 Recuperación.

Las cápsulas fueron cultivados en medios líquidos con una solución saturada de sacarosa (1.2 M) a una temperatura de 4 °C, durante 20 minutos y sembrados en medio basal sólido para su recuperación, mantenidos en cuarto oscuro con una temperatura de 18°C, durante una semana y subcultivados nuevamente en medio basal fresco bajo plena iluminación.

3.5.3 Técnica de Desección.

3.5.3.1 Precultivo de embriones de pino colombiano

Embriones aislados con 2 días de incubación fueron cultivados en medio basal líquido ajustado a pH 5.6 – 5.8 con concentraciones de sacarosa de 0.0; 0.3; 0.7 y 1 M, durante 1, 3 y 7 días y las secuencias 3 días en 0.3 M, 1 día en 0.7 M y 1 día en 1.0 M. Cada tratamiento consistió en una muestra de 10 embriones, los mejores tratamientos fueron repetidos nuevamente.

3.5.3.2 Deshidratación.

La deshidratación de los embriones se llevo a cabo de manera combinada con una exposición de 1 hora en cámara de flujo laminar y de 1 a 4 horas de deshidratación en caja petri con papel filtro sobre 30 g de sílica gel; se realizaron curvas de deshidratación asociadas a cada tratamiento para determinar la tendencia de pérdida de humedad y supervivencia de los embriones.

El contenido de humedad se determino con base en peso fresco, cada hora una muestra de 10 embriones era pesado y luego, llevados a medios basales para determinar el efecto de la deshidratación sobre la capacidad de regeneración del embrión, para la estimación del %HR se empleo la ecuación :

$$\% HR = \frac{(Pf - Ps) \times 100}{Pf}$$

Donde:

% HR : Porcentaje de humedad relativa de los embriones.

Pf : Peso fresco de los embriones antes de iniciar el proceso de deshidratación.

Ps : Peso seco del embrión después de 1 hora de exposición al agente deshidratante.

3.5.3.3 Congelación.

Los embriones fueron llevados a crioviales de 1.8 ml, sellados con teflon y sumergidos rápidamente en nitrógeno líquido en donde permanecieron mínimo 1 hora.

3.5.3.4 Descongelación.

Para su descongelación los crioviales fueron sumergidos en agua a una temperatura de 40°C durante 3 minutos, posteriormente fueron sembrados en medios de crecimiento para su desarrollo e incubados en oscuridad por 1 semana. Al cabo de las cuales se evaluó la condición del embrión.

3.5.4 Técnica de Vitrificación

3.5.4.1. Precultivo de los embriones de pino colombiano.

Embriones encapsulados fueron precultivados en medio basal suplementado con 2 M de glicerol más 0.4 M de sacarosa, con tiempos de exposición de 30 minutos, 1 hora, 2 horas , 3 horas y 1 día. Ajustados a pH 5.6-5.8, cada tratamiento consistió en una muestra de 10 embriones, los mejores tratamientos fueron repetidos nuevamente.

3.5.4.2 Deshidratación.

Para la deshidratación los embriones fueron expuestos a soluciones PSV2 (15%(p/v) DMSO, 15%(p/v) Etilenglicol, 30%(p/v) Glicerol y 0.4 M de Sacarosa) y PSV3 (50% (p/v) Glicerol y 50%(p/v) Sacarosa) en crioviales de 1.8 ml a una temperatura de 4 °C con tiempos de exposición de 10, 20 y 30 minutos para la solución PSV2 y 30, 60, 90, 120 y 180 minutos para la solución PSV3.

3.5.4.3. Congelamiento.

Los embriones contenidos en los crioviales con soluciones PSV2 Y PSV3, fueron sumergidos rápidamente en nitrógeno líquido para su congelamiento y almacenados mínimo 1 hora.

3.5.4.4 Descongelamiento.

Para su descongelación los crioviales fueron sumergidos en agua caliente a una temperatura de 40°C durante 3 minutos, posteriormente los embriones fueron sembrados en medios basales para su desarrollo e incubados en oscuridad por 1 semana. Al cabo de las cuales se evaluó la condición del embrión.

3.5.4.5 Recuperación.

Los embriones fueron cultivados en medios líquidos con una solución saturada de sacarosa (1.2 M) a una temperatura de 4 °C, durante 20 minutos y sembrados en medio basal sólido para su recuperación, mantenidos en cuarto oscuro con una temperatura de 18°C, durante una semana y subcultivados en medio basal fresco bajo plena iluminación.

3.6 Análisis de los datos

Para el análisis de los datos se estimaron los resultados promedios y se calculo la desviación estándar asociada al valor del tratamiento. En la etapa de regeneración de los embriones se realizaron pruebas de rangos múltiples entre los tratamientos. Para el procesamiento de los datos se utilizo el programa Staffgraphics Versión 4.0 y para la elaboración de las gráficas se utilizo el programa EXCEL versión 7.0.

4. RESULTADOS

4.1 Recuperación de embriones de Pino Colombiano.

4.1.1 Efecto de la sacarosa en la recuperación de los embriones de pino colombiano.

Los mejores resultados se obtuvieron cuando los embriones fueron cultivados con bajas concentraciones de sacarosa. En particular, los tratamientos 5 y 10 %(p/v) presentaron la mejor respuesta frente a niveles de concentración del 0%, 20 y 40% (p/v) de sacarosa.

Los embriones cultivados en medios con una concentración del 5%(p/v) experimentaron una rápida elongación de la región del hipocótilo y desarrollaron clorofila, exhibiendo un patrón de crecimiento similar al observado bajo condiciones de regeneración ex vitro. Por su parte, los embriones del tratamiento 10%(p/v) presentaron así mismo, un rápido elongamiento, pero la formación de clorofila fue mucha más lenta que el tratamiento 5%(p/v).

Los embriones de los tratamientos 20%(p/v) de sacarosa se caracterizaron por un rápido ensanchamiento del hipocótilo pero sin formación de clorofila, estos embriones aun después de llevarlos a condiciones de plena iluminación nunca desarrollaron tejido fotosintético.

Los tratamientos 0% y 40% (p/v) de sacarosa presentaron embriones sin clorofila, y poca o ninguna elongación del hipocótilo, resultando altamente inhibitorios para el desarrollo del embrión.

La tabla 4 resume los resultados obtenidos en los diferentes tratamientos con sacarosa.

Tabla 4 Efecto de la sacarosa en el cultivo in vitro de los embriones de pino colombiano

Tratamiento	Longitud Embrión (cms) §
Sacarosa 0% (p/v)	0.5 ^d
Sacarosa 5% (p/v)	1.2 +/- 0.48 ^{ab}
Sacarosa 10% (p/v)	1.2 +/- 0.52 ^{ab}
Sacarosa 20%(p/v)	1.04+/- 0.08 ^c
Sacarosa 40% (p/v)	0.5+/-0.01 ^d

Prueba de comparación múltiple de medias de Duncan 95% de confianza

§: La longitud del embrión fue medida con una escala graduada, el tamaño de la muestra fue de 10 embriones por cada tratamiento con dos repeticiones cada uno.

4.1.2 Efecto de la concentración de las sales en la regeneración de los embriones de pino colombiano.

Durante los ensayos de regeneración de embriones de pino colombiano, la formación de callo fue una constante tanto bajo condiciones de oscuridad como en condiciones de plena iluminación y en todas las diluciones evaluadas (Tabla 7). Los embriones cultivados en sales MS completas experimentaron rápidamente la formación de callo que se inició en la radícula y se extendió a todo lo largo del embrión.

Cuando se evaluaron las sales $\frac{1}{2}$ MS se logró que el callo radicular disminuyera y cubriera un 40% del tamaño del embrión. Por su parte, con las sales $\frac{1}{4}$ MS se obtuvo el mejor resultado en términos de disminución del callo formado, alcanzando un 30% del tamaño del embrión. Igualmente, con las sales diluidas a $\frac{1}{8}$ MS de su concentración se disminuyó la formación de callo y aunque se logró promover fuertemente la elongación del hipocótilo, el tamaño de la radícula estuvo muy poco desarrollada.

Los tratamientos con sales $\frac{1}{4}$ MS permitieron encontrar un balance entre el desarrollo del tallo y la región radicular. Cuando fueron incubados bajo condiciones de oscuridad la callogénesis no fue tan abundante como en los tratamientos de plena iluminación. Finalmente la concentración de las sales evaluada en los ensayos de encapsulación y criopreservación fue de $\frac{1}{4}$ MS.

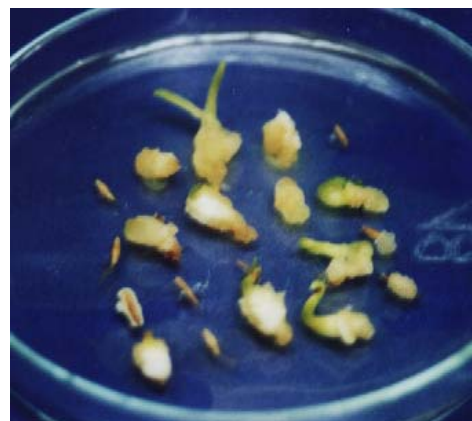
Tabla 5. Efecto de las sales MS en la recuperación de embriones de pino colombiano (*Retrophyllum rospigliosii*)

Tratamientos	Embriones Germinados	Longitud (cms)		Callo (%)
		Tallo	Raíz	
MS Completas	14/15*	-	-	90
$\frac{1}{2}$ MS	15/15	1.2 +/- 0.014	0.5 +/- 0.106	40
$\frac{1}{4}$ MS	15/15	1.2 +/- 0.210	0.5 +/- 0.09	30
$\frac{1}{8}$ MS	15/15	2.4 +/- 0.09	0.3 +/- 0.11	30

4.1.3 Efecto de las hormonas de crecimiento en la recuperación de embriones de pino colombiano.

El efecto de las hormonas fue diferencial, ya que dependió en gran medida de la hormona evaluada (Tabla 7). Para el grupo de las citoquininas (BAP y Kin,) se presentó un efecto inhibitorio en el desarrollo del embrión, bajo ningún tratamiento con estas hormonas se logró romper la latencia, por lo cual no sucedió la elongación del hipocótilo y murieron, sin embargo hubo formación de callo en la zona radicular.

El grupo de las auxinas evaluadas (AIA, ANA, IBA y 2,4-D) promovieron altamente la formación de callo tanto en la región radicular como en el hipocótilo, así como en condiciones de oscuridad y plena exposición.



*Figura 2.
Tratamiento con AIA*

El crecimiento desorganizado sin formación de estructuras definidas fue característico en todos los tratamientos realizados con este grupo de hormonas, también diferentes calidades de callo se obtuvieron dependiendo de la auxina evaluada. En presencia de AIA y ANA el callo obtenido presentó una consistencia seca, dura y opaca, por el contrario cuando se cultivaron en presencia de IBA o 2,4-D los callos obtenidos fueron brillantes, translúcidos y blandos, observándose la presencia de grupos de células en forma esférica. En ambos casos se encontró que el callo se oxidaba rápidamente cuando era cultivado a plena exposición.

El ácido giberélico por su parte, estimuló el crecimiento del embrión durante las primeras semanas del cultivo, estos se caracterizaron por presentar una tonalidad verde clara, síntoma de una baja formación de clorofila, además fue común encontrar que los embriones cultivados con esta hormona se retorcieron sobre su propio eje, impidiendo un desarrollo normal de la plántula. Es de resaltar, que el crecimiento de las primeras semanas no fue consistente en el tiempo y más bien se detuvo en las semanas subsiguientes durante el cultivo, manteniéndose latente. Bajo estos tratamientos no se obtuvieron plantas la final del periodo. Para las dos concentraciones evaluadas no se encontraron diferencias significativas (Tabla 6).

Cuando se utilizaron mezclas de hormonas en los medios de crecimiento la calogénesis fue una constante, aun con presencia de citoquininas. Igualmente, fue notable la formación de callo cuando dos tipos de auxinas se mezclaban en el medio. Bajo ninguno de estos tratamientos se obtuvo un desarrollo completo del embrión, limitando así las posibilidades de alcanzar el estado de plántula (Tabla 7).

Tabla 6. Efecto del ácido giberélico en la regeneración de los embriones de pino colombiano

Tratamiento	Longitud Embrión
Acido Giberélico 0.5 mg/l	1.4 +/- 0.22 ^a
Acido Giberélico 1.0 mg/l	1.3 +/- 0.19 ^a

Prueba de comparación múltiple de medias de Duncan 95% de confianza

Tabla 7. Efecto de las hormonas sobre la regeneración de embriones de pino colombiano

Tratamiento	Embriones Evaluados	Longitud cms.		Callo (%)
		Tallo	Raíz	
Acido Giberélico				
¼ MS + 0.5 mg/l de GA ₃	8/10	1.4 +/- 0.22	0.5 +/- 0.22	30
¼ MS + 1 mg/l de GA ₃	9/10	1.3 +/- 0.19	0.5 +/- 0.047	30
Auxinas				
¼ MS + 0.5 mg/l de AIA	10/10	1.1 +/- 0.13	-	50
¼ MS + 1 mg/l de AIA	8/10	0.7 +/- 0.20	-	40
Citoquininas				
¼ MS + 0.1 mg/l de Kin	8/10	0.8 +/- 0.162	-	30
¼ MS + 1 mg/l de Kin	8/10	0.6 +/- 0.74	-	40
Mezcla de Hormonas				
¼ MS + 0.1 mg/l de Kin + 1 mg/l de 2,4-D	10/10	0.6 +/- 0.125	-	60
¼ MS + 0.1 mg/l de Kin + 0.5 mg/l de 2,4-D	9/10	0.7 +/- 0.137	-	80
¼ MS + 0.1 mg/l GA ₃ + 0.5 mg/l AIA + 0.1 Kin	10/10	0.8 +/- 0.177	-	50
¼ MS + 0.1 mg/l GA ₃ + 0.25 mg/l BAP	10/10	1 +/- 0.231	-	90
¼ MS + 0.1 mg/l GA ₃ + 0.5 mg/l BAP	10/10	0.8 +/- 0.149	-	60
¼ MS + 0.1 mg/l GA ₃ + 1 mg/l BAP	10/10	0.8 +/- 0.156	-	60
¼ MS + 0.5 mg/l GA ₃ + 0.25 mg/l BAP	10/10	0.9 +/- 0.185	-	60
¼ MS + 0.5 mg/l GA ₃ + 0.5 mg/l BAP	10/10	0.9 +/- 0.197	-	50
¼ MS + 0.1 mg/l de GA ₃ + 0.1 mg/l de AIA	8/10	0.8 +/- 0.216	-	60
¼ MS + 0.1 mg/l de GA ₃ + 0.5 mg/l de AIA	8/10	0.9 +/- 0.233	-	40
¼ MS + 0.5 mg/l de GA ₃ + 0.1 mg/l de AIA	9/10	0.9 +/- 0.221	-	60
¼ MS + 0.5 mg/l de GA ₃ + 0.5 mg/l de AIA	8/10	0.8 +/- 0.142	-	60
¼ MS + 1 mg/l de GA ₃ + 1 mg/l de AIA	9/10	0.5 +/- 0.092	-	30
¼ MS + 0.1 mg/l de Kin + 0.5 mg/l de AIA.	7/10	0.7 +/- 0.11	-	70
¼ MS + 1 mg/l de Kin + 1 mg/l de AIA	8/10	0.7 +/- 0.163	-	50
¼ MS + 1 mg/l de Kin + 5 mg/l de AIA	8/10	0.6 +/- 0.082	-	40
¼ MS + 5 mg/l de Kin + 1 mg/l de AIA	8/10	-	-	-
¼ MS + 5 mg/l de Kin + 5 mg/l de AIA	9/10	-	-	30
¼ MS + 0.01 mg/l de IBA + 0.01 mg/l de ANA	10/10	-	-	100
¼ MS + 0.05 mg/l de IBA + 0.05 mg/l de ANA	10/10	-	-	100

4.1.4 Efecto de otras sustancias sobre la regeneración de embriones de pino colombiano.

Se adiciono Carbón Activado (CA) al medio de crecimiento a diferentes concentraciones, altos porcentajes (1 % (p/v)) afectaron el desarrollo de la raíz y originaron embriones sin clorofila. Por su parte, el CA en bajas concentraciones (0.05% (p/v)) favoreció la elongación del hipocótilo y estimulo el desarrollo radicular (Tabla 8). En ambos tratamientos la formación de callo disminuyo y se lograron diferenciar claramente la raíz y el tallo en los embriones. Así mismo, estos embriones presentaron una coloración parda oscura, característica de la especie cuando sucede la germinación en condiciones naturales. Con este tratamiento se lograron obtener plantas al final del proceso las cuales fueron llevadas a la etapa de endurecimiento.

También se realizaron ensayos con L-Glutamina resultando en una baja respuesta en la elongación del hipocótilo, además de una alta formación de callo en la zona radicular. Igualmente, los embriones se caracterizaron por presentar una tonalidad verde oscura. En la figura 3 se pueden observar los tratamientos con mejores resultados en la regeneración de los embriones de pino colombiano.

Tabla 8. Efecto de otras sustancias en la regeneración de embriones de pino colombiano

Tratamiento	Longitud Hipocótilo	Longitud Radícula
0.05% de CA	1.8+/-0.14a	0.4+/-0.20
2 mg/l de L- Glutamina	0.8 +/-0.152b	-

Prueba de comparación múltiple de medias de Duncan 95% de confianza



Figura 3.
Tratamientos de regeneración de embriones de pino colombiano.
De izquierda a derecha y de arriba hacia abajo:
1/2MS; 1/8MS; 1/4MS+0.05% CA; 1/5MS líquido; 1/4MS+1% CA; 0.05mg/l de GA₃; Agar agua + 2mg/l de L- Glutamina.

4.2 Encapsulación de embriones de pino colombiano.

Los ensayos de encapsulación se caracterizaron por presentar bajos porcentajes de emergencia de los embriones. La utilización de alginato de sodio en concentraciones de 2.0% (p/v) y cloruro de calcio entre 25mM y 50mM produjeron cápsulas con poca firmeza las cuales, eran fácilmente deformables dejando expuesto el embrión. De otro lado, concentraciones de alginato de sodio entre 3.0 y 3.5 % (p/v) y cloruro de calcio entre 75 mM y 100 mM produjeron cápsulas muy duras que impidieron la emergencia de los embriones. Bajo estas tratamientos de encapsulación los embriones se agrietaron y formaron callo (Tabla 9).

Los embriones se encapsularon una semana después de haber sido sembrados en medios basales (Ver Anexos), con el fin de eliminar aquellos que no eran viables. El encapsulamiento produjo una fuerte oxidación de la zona radicular, la cual fue controlada, enriqueciendo el endospermo artificial con 1g/l PVP-40, resolviendo finalmente el problema de oxidación (Figuras 4 y 5).

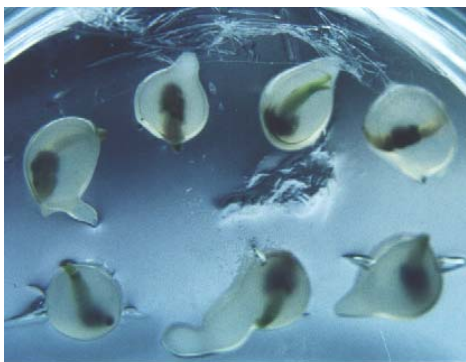


Figura 4.

Embriones encapsulados con raíces oxidadas



Figura 5.

Embriones encapsulados con raíces sanas

Así mismo, cuando se encapsularon embriones con pocos días de incubación (2-3 días), estos fueron incapaces de emerger de la cápsula y murieron. Al parecer los embriones necesitan romper su periodo de latencia, manifestado por la formación de tejido verde, para aumentar sus posibilidades de resistir el estrés generado por la encapsulación, posibilitando así, la emergencia y futuro desarrollo del embrión.

El mejor resultado se obtuvo cuando los embriones fueron encapsulados con 2.5% (p/v) de alginato de sodio y 50 mM de cloruro de calcio con un tiempo de acomplejamiento de 20 minutos, alcanzando un porcentaje de emergencia del 50%; sin embargo, los embriones no lograron desarrollar raíces una vez emergieron de la cápsula, por lo cual no fue posible obtener plantas. Del mismo modo, la morfología del hipocótilo siguió un patrón normal de crecimiento el cual no fue interferido por la encapsulación. La emergencia de los embriones ocurrió 4 semanas después de haber sido encapsulados.

Por su parte, las cápsulas formadas con 3.0% y 3.5% (p/v) de alginato de sodio sin importar la concentración de CaCl_2 resultaron demasiado fuertes para permitir la emergencia de los embriones (Tabla9). Así mismo, la utilización de concentraciones de 75mM y 100 mM, sin importar la concentración de alginato de sodio permitieron la formación de capsulas muy rigidaz que impidieron la salida de los embriones.

El medio de soporte de las cápsulas y endospermo artificial consistieron en sales MS diluidas a $\frac{1}{4}$ y enriquecidas con 10% (p/v) de sacarosa y 1g/l de PVP-40, las cuales fueron incubadas en la oscuridad hasta la emergencia de los embriones y llevadas luego a condiciones de plena iluminación a una temperatura de 20°C .



Figura 6
Germinación artificial de embrión de pino colombiano

4.3 Criopreservación de embriones de pino colombiano.

Los embriones de pino colombiano no lograron sobrevivir cuando fueron deshidratados, sin crioprotección. El precultivo con sustancias crioprotectoras fue entonces un paso obligatorio para conferirles tolerancia a la deshidratación.

Durante el proceso de deshidratación, los contenidos de humedad inicial de los embriones fueron altos en todos los tratamientos evaluados. Cuando comenzaron a desecarse, la pérdida de humedad fue rápida y la viabilidad del tejido drásticamente se redujo.

La deshidratación tuvo efectos en el tipo de crecimiento experimentado por el embrión, dando lugar a crecimientos desorganizados en forma de callo. La callogénesis fue el crecimiento observado después de la desecación de los embriones bajo cualquier tratamiento.

En los tratamientos con 0.3M de sacarosa se observaron las mejores respuestas después de la deshidratación en términos de viabilidad del tejido (crecimiento desorganizado). Así mismo, el tiempo de precultivo de los embriones tuvo influencia en la respuesta obtenidos después de la desecación (Tabla10).

En particular, el tratamiento 0.3M/7días fue el único que permitió deshidratar los embriones hasta 3 horas, obteniendo al final una viabilidad del 30%. En todos los casos, la raíz fue el primer tejido afectado.

Tabla 9 tratamientos de encapsulación.

Tratamiento		Emergencia***	Observación
2.0 %(p/v)	Al-Na*		
	CaCl ₂ **		
	25 mM	0/10	Poca consistencia de la cápsula
	50 mM	0/10	Poca consistencia de la cápsula
2.5 %(p/v)	CaCl ₂ **		
	25 mM	0/10	Poca consistencia de la cápsula
	50 mM	5/10	Emergencia del embrión + ausencia de radícula
	75 mM	2/10	Formación de callo + Deterioro del embrión
3.0 %(p/v)	CaCl ₂ **		
	25 mM	0/10	No hay emergencia
	50 mM	3/10	Deterioro del embrión
	75 mM	0/10	No hay emergencia
3.5 %(p/v)	CaCl ₂ **		
	25 mM	1/10	Emergencia de embrión
	50 mM	2/10	No hay emergencia
	75 mM	0/10	No hay emergencia
4.0 %(p/v)	CaCl ₂ **		
	25 mM	0/10	No hay emergencia
	50 mM	0/10	No hay emergencia
	75 mM	0/10	No hay emergencia

* En la preparación de la solución de Alginato de sodio se utilizó sales Murashige & Skoog, 10% de Sacarosa y 1g/l de PVP-40. El pH fue ajustado a 6.0

** Las concentraciones evaluadas de Cloruro de calcio fueron disueltas en 400 ml de Medio. El pH fue ajustado a 6.0

*** La evaluación se llevo a cabo 4 semanas después de encapsulados los embriones.

Después del congelamiento, solo se obtuvo crecimiento cuando el embrión fue precultivado con 0.3M de sacarosa durante 7 días y deshidratado en sílica gel durante dos horas, alcanzando un contenido de humedad del 24.64 +/- 1.37 (base de peso fresco) y una viabilidad del 50%. Para demás tratamientos no se obtuvo respuesta después de la criogénesis.

Los tratamientos con 0.7M de sacarosa afectaron el crecimiento de los embriones aun antes de comenzar el proceso de deshidratación, se observó que a medida que aumentaba el tiempo de precultivo el potencial de regeneración se reducía drásticamente comprometiendo la viabilidad del tejido.

Así mismo, el tratamiento con 1.0M de sacarosa resultó altamente tóxico para los embriones, independiente del tiempo de precultivo. Bajo estos tratamientos no se experimentó ningún tipo de crecimiento después de la crioprotección. Por otro lado, con el tratamiento incrementos sucesivos en la concentración de sacarosa los resultados fueron similares a los obtenidos con el tratamiento 1.0M de sacarosa.

4.3.1 Técnica de desecación.

El cultivo de los embriones de pino colombiano con sustancias crioprotectoras fue una etapa obligatoria para aumentar la tolerancia a la deshidratación. Durante el proceso de deshidratación, los contenidos de humedad inicial de los embriones fueron altos en todos los tratamientos evaluados. Sin embargo, cuando se inició la desecación la pérdida de humedad fue rápida y la viabilidad del tejido reducida drásticamente (Tabla 10).

En todos los tratamientos, la deshidratación afectó el potencial de regeneración del embrión, dando lugar a estructuras desorganizadas en forma de callo. En particular, la raíz fue la primera estructura en afectarse y perder su viabilidad.

En los tratamientos con 0.3M de sacarosa se observaron las mejores respuestas en términos de viabilidad del tejido, después de haber sometidos a la deshidratación (crecimiento desorganizado). Así mismo, el tiempo de precultivo tuvo influencia en la respuesta obtenida. Cuando los embriones se cultivaron durante 7 días, lograron deshidratarse a un contenido de humedad del 19.40% +/- 1.37 manteniendo el 100% de viabilidad, contrario a lo que sucede con los tratamientos 0.3M/1día y 0.3M/3días en donde su viabilidad se redujo drásticamente a contenidos de humedad de 28.65 +/- 0.34 y 30.9 +/- 2.53 respectivamente (Tabla 10).

En particular, el tratamiento 0.3M/7días fue el único que permitió deshidratar los embriones hasta 3 horas, obteniendo al final una viabilidad del 30%. En todos los casos, la raíz fue el primer tejido afectado

Tabla 10 Efecto de la concentración de sacarosa en el medio de precultivo y de la duración del periodo de deshidratación en la supervivencia(%) del control LN(-) y criopreservación LN(+) de embriones de pino colombiano.

Concentración (M) Sacarosa	Percultivo	Periodo de Desección (H)	Contenido de Humedad	Supervivencia (%)	
				LN(-)	LN(+)
0.0 M		0	76.15+/-1.56	100	-
		1	57.87+/-1.91	-	-
		2	21.11+/-1.55	-	-
		3	13.80+/-1.52	-	-
0.3 M	1 Día	0	80.8+/-1.02	100	-
		1	37.47+/-0.48	90	-
		2	26.75+/-0.78	70	-
		3	28.65+/-0.34	30	-
	3 Días	0	67.81+/-1.06	100	-
		1	30.90+/-2.53	46	-
		2	23.60+/-0.67	-	-
		3	27.17+/-0.83	-	-
	7 Días	0	86.47+/-2.03	100	-
		1	24.67+/-1.37	100	50
		2	19.40+/-3.43	100	-
		3	14.23+/-3.09	30	-
0.7 M	1 Día	0	79.47+/-2.03	80	-
		1	60.10+/-0.82	40	-
		2	22.29+/-3.7	-	-
		3	21.73+/-3.54	-	-
	3 Días	0	78.51+/-0.65	60	-
		1	63.24+/-3.41	-	-
		2	30.09+/-3.51	-	-
		3	10.79+/-2.37	-	-
	7 Días	0	65.08+/-1.03	-	-
		1	35.93+/-1.58	-	-
		2	25.53+/-3.95	-	-
		3	10.30+/-2.46	-	-
1.0 M	1 Día	0	65.15+/-3.56	-	-
		1	36.11+/-4.29	-	-
		2	23.59+/-2.098	-	-
		3	17.82+/-0.87	-	-
	3 Días	0	70.94+/-4.54	-	-
		1	47.20+/-2.46	-	-
		2	20.72+/-0.82	-	-
		3	22.83+/-1.44	-	-
	7 Días	0	67.79+/-2.34	-	-
		1	46.66+/-1.020	-	-
		2	32.55+/-2.84	-	-
		3	---	-	-
Incrementos		0	66.10+/-1.85	-	-
		1	36.28+/-2.68	-	-
		2	24.74+/-3.16	-	-
		3	14.55+/-1.01	-	-

El tratamiento 0.3M/7días de sacarosa y posterior deshidratación de los embriones a un contenido de humedad del 24.64 +/- 1.37 (base de peso fresco) resulto en una viabilidad del 50% después de haber sido sometido a un evento criogénico.

Los tratamientos con 0.7M de sacarosa afectaron el crecimiento de los embriones, aun antes de comenzar el proceso de deshidratación. Se observo que a medida que aumentaba el tiempo de precultivo el potencial de regeneración se reducía drásticamente, comprometiendo la viabilidad del tejido.

Así mismo, el tratamiento con 1.0M de sacarosa resulto altamente tóxico para los embriones, independiente del tiempo de precultivo. Bajo estos tratamientos no se experimento ningún tipo de crecimiento después de la crioprotección. Por otro lado, con el tratamiento incrementos sucesivos en la concentración de sacarosa los resultados fueron similares a los obtenidos con el tratamiento 1.0M de sacarosa.

4.3.2 Técnica de Encapsulación/Deshidratación.

En la implementación de la técnica de Encapsulación/Deshidratación el tratamiento 0.3M/7días fue el utilizado para la crioprotección de los embriones encapsulados, ya que se determino previamente en los ensayos de congelamiento, con embriones desnudos que fue el tratamiento con mejores resultados. Las cápsulas lograron ser deshidratadas hasta un contenido de humedad del 35%. Sin embargo, no fue suficiente para obtener alguna respuesta favorable después de la congelación. De otro lado, cuando las cápsulas alcanzaron contenidos de humedad inferiores a 59.24+/-1.57 expresaron crecimiento en forma de callo, aunque la viabilidad del tejido siempre se mantuvo alta.(Tabla11)

Tabla 11 . Efecto de la deshidratación y el contenido de humedad (% base de peso fresco) en la supervivencia (%) del control LN(-) y embriones encapsulados congelados LN (+) de pino colombiano. Los embriones encapsulados fueron precultivados con 0.3 M de Sacarosa por 7 días antes de la desecación.

	Duración de la Deshidratación			
	0	1	3	6
Contenido de humedad (%)	63.21+/- 2.6	59.24+/-1.57	50.83+/-2.10	35.007+/-0.91
Supervivencia (%)	LN (-) 100	100	100	100
	LN (+) 0	0	0	0



Figura 7

Tratamiento de Encapsulación/Deshidratación

Los embriones encapsulados no lograron sobrevivir, después de la criopreservación debido a una insuficiente deshidratación de la cápsula, la mayor limitante para la implementación de esta técnica en los embriones fue el tamaño del explante, ya que durante la desecación el embrión quedaba expuesto al exterior de la cápsula.

La técnica de encapsulación no fue aconsejable para la criopreservación de embriones de pino colombiano, ya que se necesitan largos periodos de tiempo en la etapa de desecación para congelar la cápsula con poco contenido de humedad.

4.3.3 Técnica de vitrificación

Los tratamientos de vitrificación en general, mostraron altos porcentajes de viabilidad después del proceso de crioprotección con las sustancias vitrificantes, siempre y cuando los embriones estuvieran desnudos y no recubiertos por la matriz de alginato de calcio (Tabla 12).

Igual que en las técnicas basadas en la deshidratación, los mejores resultados se obtuvieron cuando los embriones no se encapsularon, situación esta que evidencia un alto nivel de estrés del embrión cuando se encapsula. Los resultados más satisfactorios se obtuvieron con embriones desnudos, los cuales lograron soportar los tratamientos con las sustancias vitrificantes. En particular los tratamientos 1 día de precultivo en medios basal líquido con 2 M de glicerol más 0.4 M de sacarosa (LS) y 180 minutos de exposición a PSV3 y el tratamiento 3 horas de precultivo en medios basal líquido con 2 M de glicerol más 0.4 M de sacarosa y 30 minutos de exposición a PSV2, alcanzaron un porcentaje de supervivencia del 80% y 40% respectivamente. La tabla 12 resume los tratamientos de vitrificación realizados con embriones encapsulados y desnudos.

El patrón de crecimiento característico, al igual que los tratamientos de desecación se presentó en forma de callo, la raíz fue el primer área afectada expresado en forma de tejido necrotizado. Desde el punto de vista morfológico, la apariencia del tejido congelado y recuperado es la misma para los tres tratamientos en donde se obtuvo viabilidad. Se observa para los tres tejidos de la figura que la raíz es la estructura que pierde rápidamente su funcionalidad.

Tabla 12. Efecto de varios tratamientos en la supervivencia (%) de los embriones de pino colombiano. LS (0.4 M de Sacarosa + 2 M de Glicerol) aplicado a temperatura ambiental. PSV2: 15%DMSO, 15% Etilenglicol, 30% de glicerol y en medio basal + 0.4 M de Sacarosa, aplicado a 4° C. PSV3: 50% de glicerol +0.4 M de sacarosa disueltos en medio basal, aplicado a 4° C. todos los tratamientos fueron lavados con medio basal + 1.2 M de sacarosa a 4° C. después del congelamiento.

Tratamiento	Supervivencia (%)			
	Encapsulados		Desnudos	
	LN(-)	LN(+)	LN(-)	LN(+)
Medio Basal (7 días) + LS (1 día) + sílica gel (1 hora)	0	0	88.6 +/- 2.56	0
Medio Basal (7 días) + LS (1 día) + PSV2 (10 minutos)	0	0	72.3 +/- 3.00	0
Medio Basal (7 días) + LS (1 día) + PSV2 (20 minutos)	0	0	51.5 +/- 2.58	0
Medio Basal (7 días) + LS (1 día) + PSV2 (30 minutos)	0	0	44.6 +/- 3.28	0
Medio Basal (7 días) + LS (1 día) + PSV3 (30 minutos)	0	0	89.7 +/- 2.64	0
Medio Basal (7 días) + LS (1 día) + PSV3 (60 minutos)	0	0	63.3 +/- 1.80	0
Medio Basal (7 días) + LS (1 día) + PSV3 (90 minutos)	0	0	55.4 +/- 2.46	0
Medio Basal (7 días) + LS (1 día) + PSV3 (120 minutos)	0	0	54.8 +/- 1.86	0
Medio Basal (7 días) + LS (1 día) + PSV3 (180 minutos)	0	0	40.02 +/- 1.46	80
Medio Basal (7 días) + LS (1 día) + 0.5 %PSV2 (30 minutos)	0	0	91.56 +/- 1.97	0
Medio Basal (7 días) + LS (1 día) +0.5% PSV3 (60 minutos)	0	0	64.5 +/- 1.73	0
Medio Basal (7 días) + LS (30 Minutos) + PSV2 (20 minutos)	0	0	80.1 +/- 1.89	0
Medio Basal (7 días) + LS (30 minutos) + PSV3 (60 minutos)	0	0	78.2 +/- 1.16	0
Medio Basal (7 días) + LS (60 Minutos) + PSV2 (30 minutos)	0	0	72.3 +/- 2.34	0
Medio Basal (7 días) + LS (60 minutos) + PSV3 (60 minutos)	0	0	81.9 +/- 1.58	0
Medio Basal (7 días) + LS (120 Minutos) + PSV2 (30 minutos)	0	0	45.6 +/- 1.03	0
Medio Basal (7 días) + LS (180 minutos) + PSV3 (60 minutos)	0	0	63.8 +/- 1.68	0
Medio Basal (7 días) + LS (180 Minutos) + PSV2 (30 minutos)	0	0	52.8 +/- 2.31	40
Medio Basal (7 días) + LS (180 minutos) + PSV3 (60 minutos)	0	0	57.3 +/- 1.27	0



figura 8. Crecimiento de los embriones después de la criopreservación.

La técnica de vitrificación resultó más conveniente de implementar que la técnica de desecación, debido a los cortos periodos de tiempo entre las etapas previas para preparar el tejido para la criopreservación, Además el porcentaje de supervivencia obtenido con la técnica de vitrificación fue más alto que el obtenido con el tratamiento de desecación. En la figura de izquierda a derecha 0.3M/7días; PSV3 180 ; PSV2 30.

5. DISCUSIÓN

El tratamiento de desinfección superficial utilizado en las semillas de pino colombiano, permitió el cultivo in vitro de los embriones sin problemas graves de contaminación. Dadas las características de la cubierta externa, las semillas soportaron los prolongados tiempos de exposición a los desinfectantes sin comprometer la viabilidad del embrión. Las semillas utilizadas en esta investigación permanecieron durante varios meses almacenadas en cuartos fríos, presentándose en algunos casos la germinación de las semillas y en otras, procesos avanzados de maduración y deterioro, en estos casos las semillas eran descartadas para los tratamientos del cultivo in vitro, es de esperar que este proceso de maduración tenga efectos sobre la respuesta y sensibilidad de los embriones (Figura 9).

En los ensayos de regeneración de embriones de pino colombiano, se detectaron tendencias de desarrollo que generaron un mejor conocimiento sobre el comportamiento in vitro de la especie, las cuales servirán de base para ensayos futuros que busquen mejorar y/o establecer otros procesos in vitro.

Si bien, la literatura reporta que el cultivo in vitro de los embriones maduros es relativamente fácil, la formación de masas callosas de los embriones en la zona radicular fue una constante que limitó el desarrollo y formación de los individuos en plántulas, el cual fue fácilmente estimulado por la luz, la concentración de las sales minerales, así como la adición de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo.



Figura 9.
Emergencia de embrión y daños asociados

Otro aspecto importante en la recuperación de embriones de pino colombiano, fue la dificultad en la formación de las raíces, todos los tratamientos evaluados se caracterizaron por la presencia de callo en la zona radicular del embrión y poca o ninguna formación de raíces. Sin embargo, con la adición de CA al medio se logró mejorar la respuesta radicular disminuyendo notablemente la formación del callo, de modo que las plántulas obtenidas lograron sembrarse en sustratos de turba para la etapa de endurecimiento.

En general, el cultivo in vitro de embriones de pino colombiano estuvo caracterizado en todos los tratamientos por un mejor desarrollo del hipocótilo, particularmente la formación de las raíces fue muy baja en condiciones in vitro.

En el presente trabajo los embriones de pino colombiano no toleraron pérdidas de humedad y exhibieron una patrón de crecimiento típico de una semilla recalcitrante. De acuerdo con Esquivel et al, 2002, los embriones de algunas especies son extremadamente sensibles a la desecación y aun pocas reducciones en su contenido de humedad, conducen a daños irreversibles, afectando sus niveles de viabilidad. El cultivo de embriones de pino colombiano deshidratados durante periodos mayores a una hora, (alrededor del 35% de contenido de humedad) estuvo caracterizado por el crecimiento desorganizado de sus estructuras. Este patrón posiblemente se deba a los diferentes tipos celulares presentes en el embrión que manifiestan diferentes niveles de sensibilidad y tolerancia adquirida por los diferentes tratamientos a la deshidratación.

De acuerdo con Engelmann 1995, después de un proceso de deshidratación los niveles de supervivencia se reducen y se presentan modificaciones en el patrón de crecimiento por lo que es necesario, tener en cuenta durante la criopreservación criterios como la madurez de la semilla, el estado fisiológico y el medio de recuperación.

De otro lado, las semillas utilizadas en el presente estudio, permanecieron almacenadas durante varios meses en cuartos fríos, el deterioro de estas fue evidente a medida que el tiempo de almacenamiento se prolongaba, ocasionado una disminución en la respuesta del embrión frente a los estímulos externos, es de esperar, que mejores respuestas puedan obtenerse utilizando semillas más frescas.

Con respecto al estado fisiológico de la semilla, es difícil estimar el momento adecuado de su recolección para los diferentes ensayos, se desconocen muchos aspectos de la biología de la especie, siendo necesario conocer un poco más de su comportamiento fisiológico para poder resolver adecuadamente los problemas asociados a la criopreservación de los individuos.

La composición del medio utilizado para la recuperación del material congelado permitió el crecimiento y proliferación del callo obtenido. Sin embargo, es necesario encontrar una formulación más completa para obtener plantas a partir de dicho material. El medio utilizado para la recuperación del material congelado carece de reguladores de crecimiento, los cuales serán importantes para estimular adecuadamente la formación de una nueva planta, se desconoce el tipo de hormona y la concentración adecuada que deberá utilizarse para lograr inducir una respuesta positiva en los embriones criopreservados.

Walters et al, 2002, argumenta que en la criopreservación de embriones recalcitrantes, la aplicación exógena de crioprotectores es un requisito obligatorio para obtener algún nivel de viabilidad. En este caso, si bien, los crioprotectores utilizados (Sacarosa y Glycerol) aumentaron la tolerancia de los embriones a la deshidratación, también afectaron severamente el patrón de crecimiento de los embriones, evidenciando según los resultados obtenidos, una extrema sensibilidad frente a cambios en el gradiente osmótico de las soluciones crioprotectoras, lo cual sin lugar a dudas, genero una reducción drástica en la viabilidad del tejido. Es de esperar, que la supervivencia obtenida después de la exposición a sustancias vitrificantes, es el resultado de la combinación adecuada de los tiempos de exposición de las soluciones crioprotectoras y de las mismas soluciones vitrificantes.

Siendo normal que el desarrollo del embrión sea afectado por la disminución en el contenido de humedad, el resultados sugiere que no es necesario preacondicionar el tejido a temperaturas bajas para obtener

una alta viabilidad después del congelamiento, contrario a lo que sucede con Zhao et al, 1999, quien además del precultivo en sacarosa, necesito aclimatar tejido de *Malus domestica* a las bajas temperaturas para obtener respuestas después de la criopreservación.

Según Abaneh, la exposición de células poco tolerantes a las soluciones vitrificantes, han resultado en efectos nocivos debido al estrés osmótico y / o toxicidad química. El estrés puede ser mitigado por un adecuado preacondicionamiento en soluciones crioprotectoras recargantes como 2M de glicerol y 0.4M de sacarosa antes de la exposición en PSV2 resultando benéfica para gran numero de especies. Sin embargo, el preacondicionamiento con soluciones recargantes no implico un aumento en la tolerancia de los embriones hacia las sustancias vitrificantes. Por su parte, la utilización de la solución vitrificante PSV3 (50% sacarosa y 50% glicerol) resulto menos tóxica para los embriones, lo cual se reflejo en el porcentaje de viabilidad alcanzado (80% embriones viables) .

Con respecto a la encapsulación de los embriones, el recubrimiento no fue necesario para obtener porcentajes de viabilidad después de la criopreservación. Una de las razones por las cuales la viabilidad fue baja puede estar asociada en parte al comportamiento diferencial del agua del embrión y de la cápsula. En mediciones hechas en este trabajo se observo que la tasa de perdida de humedad de las cápsula era constante, mientras que la tasa de perdida de humedad de los embriones cambia a mediada que el tejido es deshidratado (figura 10). Tanto el contenido de humedad inicial del embrión como el contenido de humedad de la cápsula, son diferentes, así como su comportamiento durante la perdida de humedad por lo que el contenido de humedad promedio de la cápsula en un momento dado no refleja el contenido de humedad del embrión.

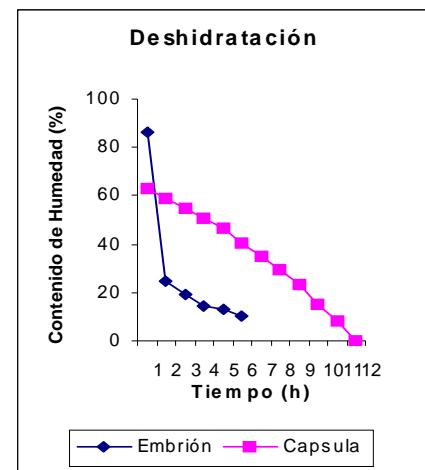


Figura 10.
Comportamiento del contenido de humedad del embrión y la cápsula durante la deshidratación

los tratamientos evaluados en este trabajo son susceptibles de mejorar, a continuación se ilustran los procesos necesarios para logra establecer la criopreservación del pino colombiano.

- **Figura 11.** Resumen del proceso de cultivo in vitro de embriones de pino colombiano.

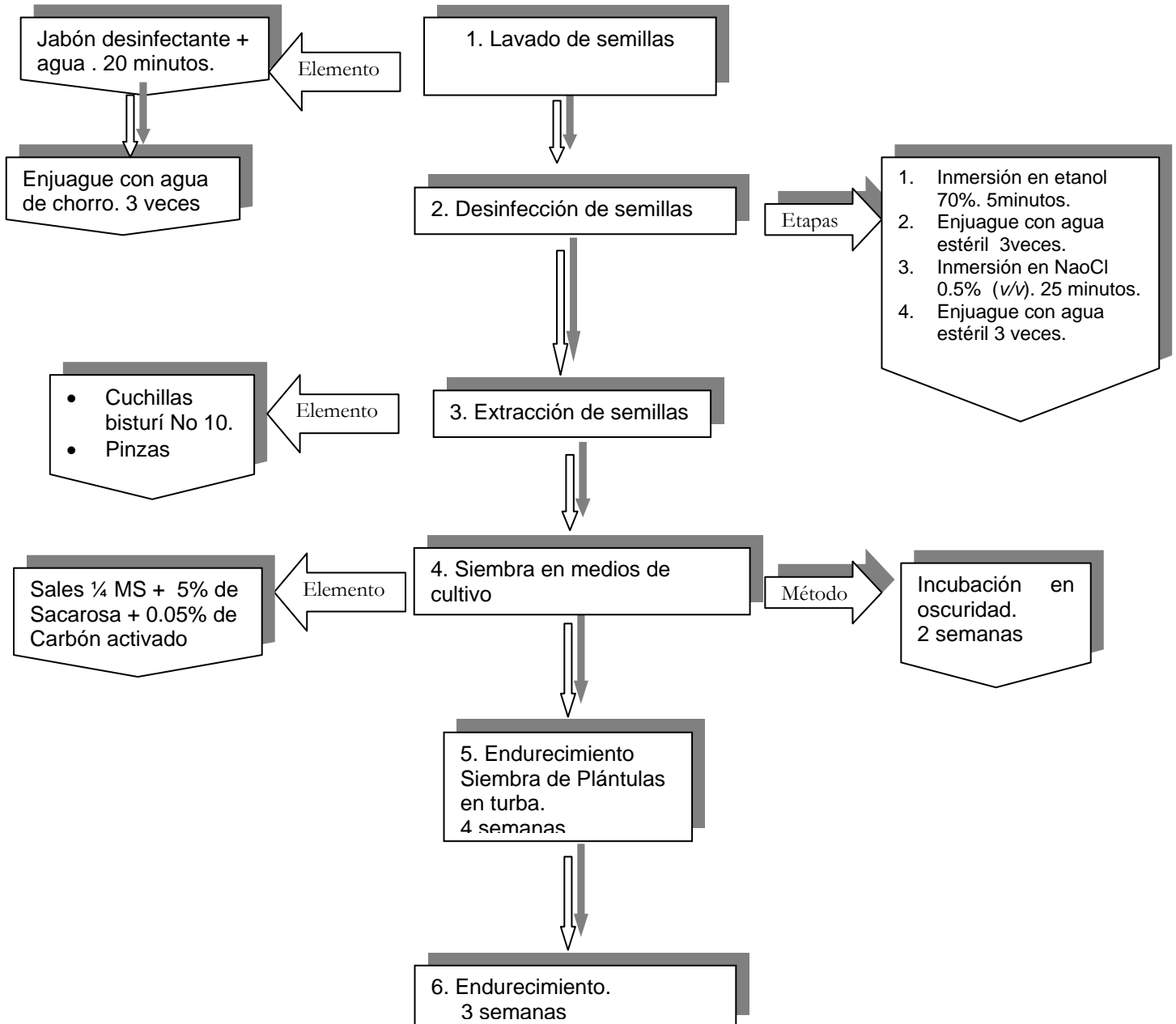


Figura 12. Protocolo de encapsulación de embriones de pino colombiano.

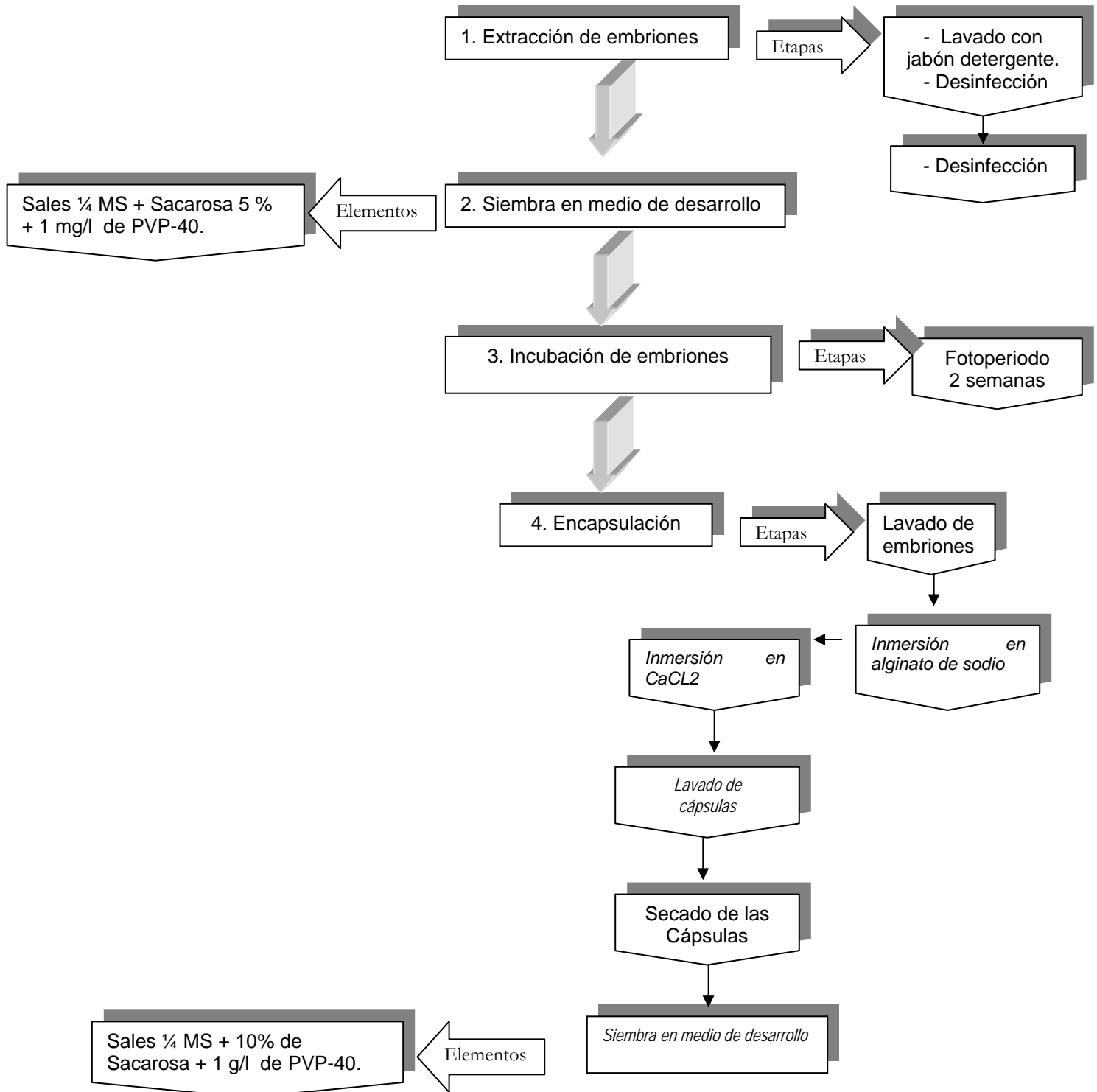
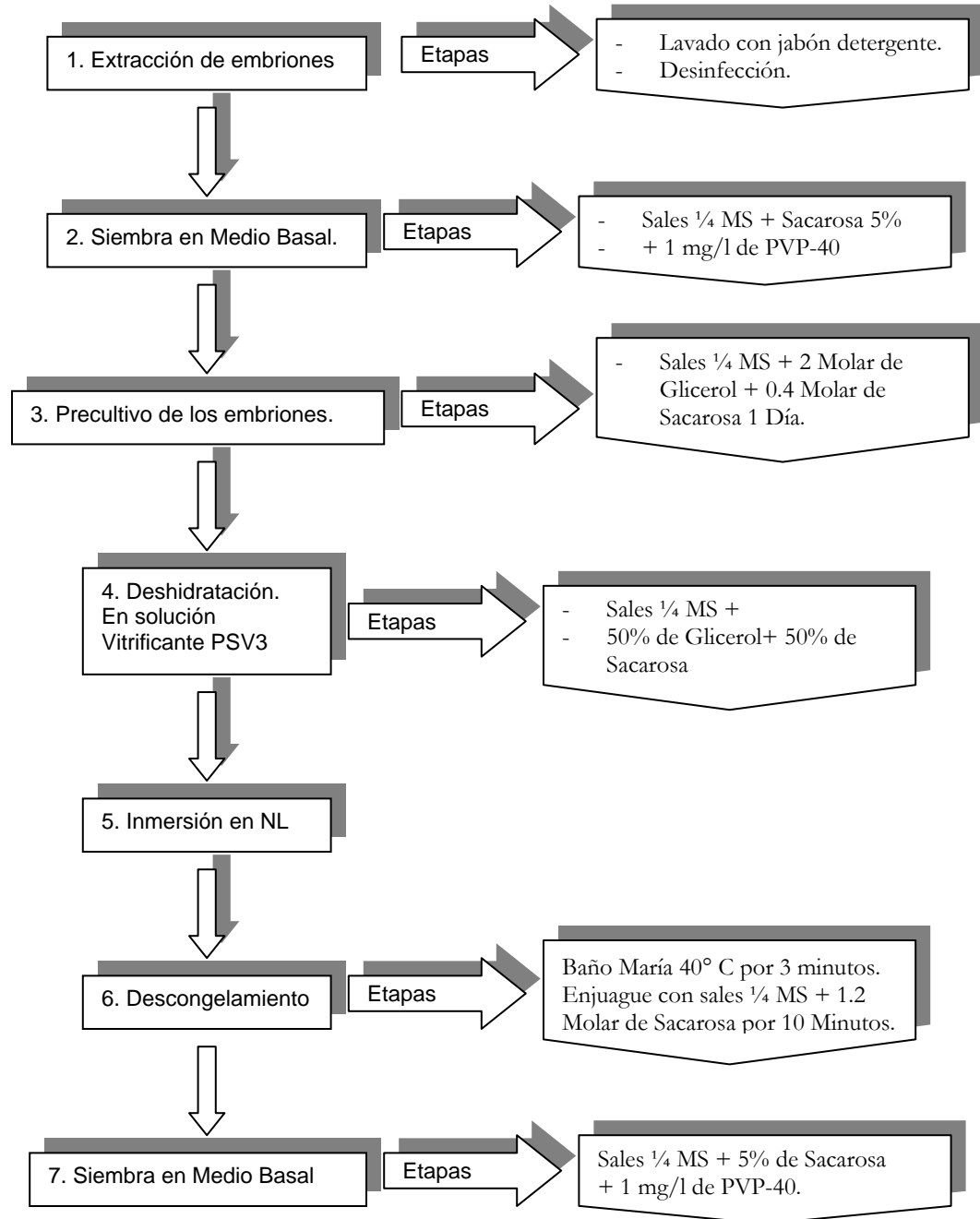


Figura 13 Protocolo de criopreservación para embriones de pino colombiano.



6. CONCLUSIONES

1. Se estableció un protocolo de regeneración *in vitro* para embriones extraídos de semillas maduras de pino colombiano con un porcentaje de germinación del 100%, el cual consiste en sales MS (Murashige & Skoog) diluidas a un cuarto de su concentración, sacarosa 5% (p/v) más 0.05% (p/v) de CA, por 12 semanas hasta la emergencia de los cotiledones, luego se transplantan a sustrato de turba canadiense por 4 semanas para su endurecimiento.
2. La luz y la concentración normal de las sales afectaron igualmente el desarrollo del embrión estimulando la formación de callo.
3. Se encapsularon embriones maduros de pino colombiano en una matriz de alginato de calcio con 2.5%(p/v) de alginato de sodio y 50mM de CaCl_2 con un tiempo de reacción de 20 minutos presentando una emergencia de los embriones del 50%.
4. Los embriones fueron poco tolerantes durante la deshidratación, lo cual afectó severamente su patrón de crecimiento.
5. La sacarosa y el glicerol permitieron aumentar la tolerancia de los embriones a la deshidratación por cortos períodos de tiempo y así poder resistir los tratamientos de criopreservación.
6. El cultivo de los embriones en 0.3 M de sacarosa durante 7 días fue el tratamiento mejor asimilado por los embriones permitiendo alcanzar después de la criopreservación crecimientos en forma de callo.
7. El crioprotección con 2 M de glicerol más 0.4 M de sacarosa por 1 día y la exposición a PSV2 durante 30 minutos permitieron un nivel de viabilidad del 40% de los embriones después de la congelación, expresado en forma de callo.
8. El crioprotección con 2 M de glicerol más 0.4 M de sacarosa por 3 horas y la exposición a soluciones PSV3 durante 180 minutos permitieron un nivel de viabilidad del 80% de los embriones después de la congelación, expresado en forma de callo.
9. Los tratamientos que involucraron la Encapsulación/Deshidratación no permitieron obtener supervivientes después de la congelación, debido a períodos de deshidratación insuficientes.
10. Es posible congelar embriones de pino colombiano.

7. RECOMENDACIONES

1. *Evaluar medios de crecimiento para lograr inducir la formación de plantas a partir del callo obtenido después de la criopreservación.*
2. *Evaluar el comportamiento de *Agrobacterium rhizogenes* en la formación de raíces de embriones de pino colombiano.*
3. *Aumentar los niveles de emergencia de los embriones encapsulados, evaluando nuevos medios para el endospermo y para el soporte de agar.*
4. *Realizar ensayos de criopreservación utilizando la técnica de Encapsulación/Deshidratación, aislando la sección media del hipocótilo del embrión, ya que esta es la zona que presenta mayor respuesta después de la congelación.*
5. *Implementar la embriogénesis somática para el pino colombiano como un paso previo para la producción de semilla sintética.*
6. *Evaluar otras sustancias crioprotectoras como PSV4 y PSV6 en el congelamiento de embriones de pino colombiano.*
7. *Implementar técnicas de criopreservación en otras especies silvestres con algún grado de amenaza a la extinción.*

8. ABREVIATURAS

ABA	ácido abscísico
AIA	Ácido indol acético
ANA	Ácido naftalenacético
BAP	6-Bencil amino purina
C	centígrados
CA	Carbón activado
CIB	Corporación para Investigaciones Biológicas.
cms	centímetros
CORANTIOQUIA	Corporación Autónoma regional del Centro de Antioquia
d	días
DMSO	dimetilsulfóxido
g	gramos
GA ₃	Ácido giberélico
HR	Humedad realtiva
IBA	3'ácido indol butirico
KIN	6- furfural amino purina
KNO ₃	Nitrato de potasio
Lb/Pulg ²	Libras sobre pulgadas cuadradas.
M	molar
Mg/l	miligramos por litro
ml/l	mililitros por litro
mM	milimolar
MS	Murashige & Skoog
m.s.n.m.	metros sobre el nivel del mar
p/v	Peso en volumen
r.p.m.	revoluciones por minuto
$\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	Micromol sobre metro cuadrado por segundo

9. BIBLIOGRAFÍA

- Abaneh, S., Karam, N., y Shibli, R. 2002.** Cryopreservation of sour orange (*Citrus Aurantium L.*) shoots tips. In *Vitro Cell Dev Biol-Plant* (38): Pgs. 602 –607.
- Ashmore, S.E. 1997.** Status report on the development and application of invitro techniques for the conservation and use of plant genetic resources. *International Plant Genetic Resources Institute, Roma. Italia.*
- Benson, E. 2000.** In vitro plant recalcitrance: An introduction . In *Vitro Cell Dev Biol-Plant* (36): Pgs. 141 –148.
- Berjak, P., Dumet, D. 1996.** Cryopreservation of seeds and isolated embryonic axes of neem (*Azadirachta indica*) *Cryoletters* 17: 99-104.
- Bernal, H. 2001.** Biodiversidad, medio ambiente y apropiación social del conocimiento para el desarrollo sostenible. En *Revista Tablero. No 63. Pgs. 61-77.*
- Castaño, C. 1990.** *Selva humedad de Colombia. Ed. Cristina Hurtado. Editorial Villegas.*
- Castillo, B., Smith, M.A.L., Yadava, U.L. 1998.** Plant regeneration from encapsulated somatic embryos of *Carica papaya L.* *Plant Cell Report.* 22: 217-223.
- CIAT(Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1991.** *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Roca, W.M. y Mroginski, L.A. (Eds.) Cali, Colombia.*
- Chapin F. S. 2003.** Effects of plant traits on ecosystem and regional process: a conceptual framework for predicting the consequences of global change. *Annals of Botany.* 91: 455 – 463.
- Damania, A. B. 1996.** Biodiversity conservation: a review of options complementary to standard ex situ methods. *Plant genetic resources Newsletter. No 107 1-18.*
- Dumet, D. y Benson, E. 2000.** The use of physical and biochemical studies to elucidate and reduce cryopreservation-induced damage in hydrated/desiccated plant germplasm. *Cryopreservation of tropical plant germplasm, Current research progress and application. Editores, Engelmann, Florent and Hiroko Takagi. Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Tsukuba, Japan / International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.*
- Dussert, S., Chabrilange N., Engelmann, F., Anthony, F., Louarn, J., Hamon, S. 1998.** Cryopreservation of seeds of four coffee species (*Coffea arabica*, *C. costatifructa*, *C. racemosa* and *C. sessiliflora*) : importance of water content and cooling rate. *Seed science research* 8: 9 – 15.
- Engelmann, F. 1991.** In vitro conservation of tropical plant germplasm –a review. *Euphytica* 57: 227-243.
- Engelmann, F. 1997.** Importance of desiccation for the cryopreservation of recalcitrant seed and vegetatively propagated species. *Plant genetic resources newsletter* 112: 9 – 18.

Engelmann, F., Dumet, D., Chambrillange, N., Abdelnour-Esquivel, A., Assy-Bah, B., Dereuddre J., and Duval, Y. 1995. Factors affecting the cryopreservation of coffee, cococnut and oil palm embryos. *Plant genetic resources newsletter*. 103: 27-31.

Esquivel, A. y Engelmann, F. 2002. Cryopreservation of chayote (*Sechium edule* JACQ.SW.) zygotic embryos and shoot tips in vitro plantlets. *Cryoletters* (23) 299-308

Fujikawa, S., Jitsuyama, Y. 2000. Ultrastructural aspects of freezing adaptation of cells by vitrification. En: *Cryopreservation of tropical plant germplasm, Current research progressand aplicacion*. Editores, Engelmann, Florent and Hiroko Takagi. Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Tsukuba, Japan / International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.

Ganapathi, T.R.,Srinivas, L., Suprasanna, P., Bapat. V.A. 2001. Regeneration of plants from alginated-encapsulated somatic embryos of Banana CV. Rasthali (*Musa spp. AAB Group*). *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* (37): Pgs. 178-181.

Germanà, A., Piccioni, E., Standardi, A. 1999. Effects of encapsulation on *Citrus reticulata* Blanco somatic embryo conversion *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 55: 235 – 237.

Ghosh, B., Sen, S. 1994. Plant regeneration from alginate encapsulated somatic embryos of *Asparagus cooperi* baker. *Plant Cell Reports* 13: 381-385.

Gómez, M. 2002. Informe resultados preliminares de los ensayos de germinación realizados con pino colombiano (*Rethrophyllum rospigliosii*) sin editar. *Corantioquia*.

Gupta, P., Kretinger,M. 1993. Synthectic seeds in forest trees. En: *Micropropagation of woody plants*. Ed. Kluwer Academic Publishers.

Ho. H. Rong. 1992. Embryo culture. En: *Cell and tissue Culture in forestry*. Vol 2. J.M. Bonga and Don Durszan Eds.

Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt 1997. Chaves, M. E., Arango, N. Editoras. Informe Nacional sobre el Estado de la Biodiversidad 1997-Colombia. Instituto de Investigación de recursos biológicos Alexander von Humboldt. Santa Fe de Bogotá. Ministerio del Medio Ambiente. PNUMA. Vol. II.

Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt 1997. Chaves, M. E., Arango, N. Editoras. Informe Nacional sobre el Estado de la Biodiversidad 1997-Colombia. Instituto de Investigación de recursos biológicos Alexander von Humboldt. Santa Fe de Bogotá. Ministerio del Medio Ambiente. PNUMA. Vol. II.

Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt 1998. Fandiño, M. C., Ferreira, P. N. Editoras. Colombia. Propuesta técnica para la formulación de un plan de acción nacional en biodiversidad. *Biodiversidad siglo XXI*. Instituto de Investigación de recursos biológicos Alexander von Humboldt. Santa Fe de Bogotá. Ministerio del Medio Ambiente.

Jiménez, E., Quiala, E. 1998. Semilla artificial. En: *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología*. Vol. 1. J.N. Ponce editor. Instituto de Biotecnología de Plantas.

Mandal, J. Pattnaik, S., Chand, P. 2000. Alginate encapsulation of axillary buds of *Ocimum americanum* L. (Hoary basil), *O. basilicum* L. (Sweet basil), *O. gratissimum* L. (Shrubby basil), and *O. sanctum* L. (Sacredbasil). *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* (36): Pgs. 287-292.

Marín, A. 1998. *Ecología y silvicultura de las Podocarpaceas andinas de Colombia. Smurfit Cartón de Colombia. Cali.*

Maruyama, E. Kinoshita, I., Ishii, K., Ohba, K. 1997. *Germplasm conservation of the tropical forest trees, Cedrela odorata L., Guazuma crinita Mart., and Jacaranda Mimosaeifolia D. Don., by shoot tip encapsulation in calcium-alginate and storage at 12-25 °C.*

Masaya, I., Hiroyuki, I., Price, W., Arata, Y. Y Kitashima, T. 2000. *Freezing behaviours in plant tissues as visualized by NMR microscopy and regulatory mechanisms. En: Cryopreservation of tropical plant germplasm, Current research progress and application. Editores, Engelmann, Florent and Hiroko Takagi. Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Tsukuba, Japan / International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.*

Mata. R.M., Chaves V.M., Bye. R. 2001. *In vitro regeneration of plantlets from immature zygotic embryos of Picea chihuahuana Martínez, an endemic mexican endangered species. In vitro cell Dev Biol-Plant (37): Pgs. 73-78*

Mathur, G., Nadgauda, R. 1999. *In vitro plantlet regeneration from mature zygotic embryos of Pinus wallichiana A.B. Jacks. Plant Cell Reports. (19): Pgs. 74-80.*

Mazur, P. 1970. *Cryobiology. The freezing of biological system. Science. 168: 939-949.*

Murashige, T. Y Skoog, F. 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiology Plant. 15: 473-479.*

Myers, N. Mittermeger, R.A., Mittermeger, C.G., Fonseca, G. A. y Kent, J. 2000. *Biodiversity hotspots for conservation priorities. Nature. Vol (403). 853-858.*

Nieves, N., Lorenzo, J.C., Blanco, M., González, J., Peralta, H., Hernández, M., Santos, R., Concepción, O., Borroto, C., Borroto, E., Tapia, R., Martínez M., Fundora, Z. Y González, A. 1998. *Artificial endosperm of Cleopatra tangerine zygotic embryos: a model for somatic embryo encapsulation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 54: 77- 83*

Normah, M.N., Reed, B.M, Yu, X. 1994. *Seed storage and cryoexposure behavior in Hazelnut (Corylus avellana L.CV. Barcelona). Cryoletters 15: 315-322.*

Normah, M.N. and Vengadasalam, M. 1992. *Effects of moisture content on cryopreservation of coffea and vigna seeds and embryos. Cryoletters 13: 199 –208.*

Pattnaik, S., Chand, P. 2000. *Morphogenic response of the alginate-encapsulated axillary buds from in vitro shoot cultures of six mulberries Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 60: 177 – 185.*

Pence, V.C. 1990. *Cryostorage of embryo axes of several large-seeded temperate trees species. Cryobiology 27: 212-218.*

Rajora, O. P., Mosseler, A. 2001. *Challenges and Opportunities for conservation of forest genetic resources. Euphytica (118): 197-212.*

Ramage, C. M., Williams, R. R. 2002. *Mineral nutrition and plant morphogenesis. In vitro cell Dev Biol-Plant (38): Pgs. 116 –124.*

Rao, R.V., Hodgkin, T. 2002. *Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. Plant cell tissue and organ culture. 68: 1-19.*

Reinhoud, P., Iren, F. y Kijne J.W. 2000 *Cryopreservation of undifferentiated plant cells. En: Cryopreservation of tropical plant germplasm, Current research progress and application. Editores, Engelmann, Florent and Hiroko Takagi. Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Tsukuba, Japan / International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.*

Redenbaugh, K., Slade, D., Viss, P., Fujii J. 1987. *Encapsulation of somatic embryos in synthetic seed coats. Horst Science 22: Pgs. 803- 807.*

Rinaldi, L.M.R., 1999. *Factors affecting shoot regeneration from zygotic embryo and seedling explants of Cycas revoluta. Thunb. In vitro cell Dev Biol-Plant (35): Pgs. 25-28.*

Sharma, D.R., Kaur, R., Kumar, K. 1996. *Embryo rescue in plants- a review. Euphytica (89): Pgs 325-337. Kluwer Academic Publishers.*

Soneji, J.R., Rao, P.S., Mhatre, M., 2002. *Germination of synthetic seeds of pineapple (Ananas comosus L. Merr.) Plant Cell Reports. (20): Pgs. 891- 894.*

Takagi, H. 2000. *Recent developments in cryopreservation of shoot apices of tropical species. En: Cryopreservation of tropical plant germplasm, Current research progress and application. Editores, Engelmann, Florent and Hiroko Takagi. Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Tsukuba, Japan / International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.*

Walters, C., Touchell, D., Power, P., Wesley-Smith, J., Antolin, M. 2002. *A cryopreservation protocol for embryo of the endangered species Zizania texana.. Cryoletters (23). 291-298.*

Zhao, Y., Wu, Y., Engelmann, F., Zhou, M. Zhang, D. y Chen, S. 1999. *Cryopreservation of apple shoot tips by encapsulation-dehydration: Effect of preculture, dehydration and freezing procedure on shoot regeneration. Cryoletters (20), 103-108.*

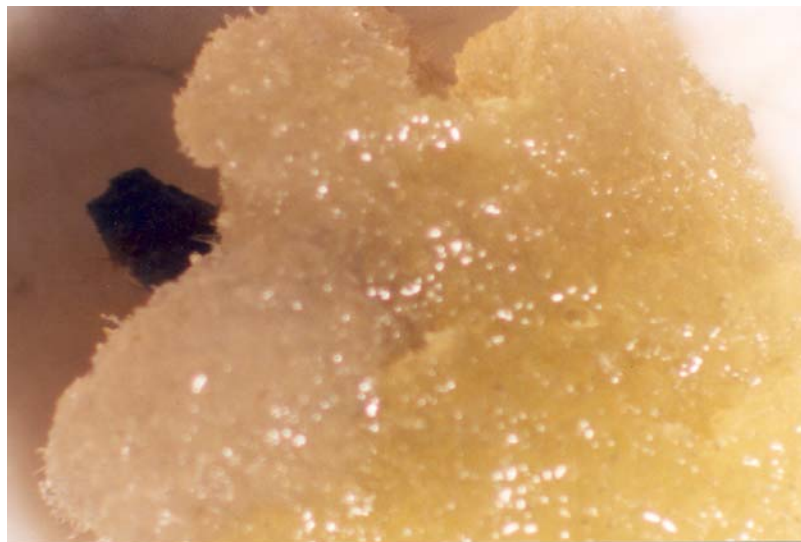
10. ANEXOS

Medios de crecimiento utilizados en para la criopreservación de embriones de pino colombiano.

	Basal	Encapsulación	CaCl₂	PSV2	PSV3	Sustrato	Endurecimiento
Sales Basales	¼ MS	¼ MS	¼ MS	¼ MS	¼ MS	¼ MS	¼ MS
Sacarosa (M)	0.15	0.3	0.3	0.4	1.45	0.15	-
Carbón activado (%)	0.05	-	-	-	-	-	-
Glicerol (%)	-	-	-	30	50	-	-
DMSO (%)	-	-	-	15	-	-	-
Etilenglicol (%)	-	-	-	15	-	-	-
PVP-40 (g)	0.8	1.6	1.6	-	-	-	-
Agar (p/v)	-	-	-	-	-	-	-
Alginato (%)	-	2.5	-	-	-	-	-
CaCl₂ (mM)	-	-	50	-	-	-	-
Turba Canadiense (g)	-	-	-	-	-	-	20



*Calogénesis en embriones congelados de pino colombiano
Tratamiento 0.3M/ 7 días + 0.2 M de Glycerol +0.4 M Sacarosa*



*Calogénesis en embriones congelados de pino colombiano
Tratamiento 0.3M/ 7 días + 0.2 M de Glycerol +0.4 M Sacarosa*



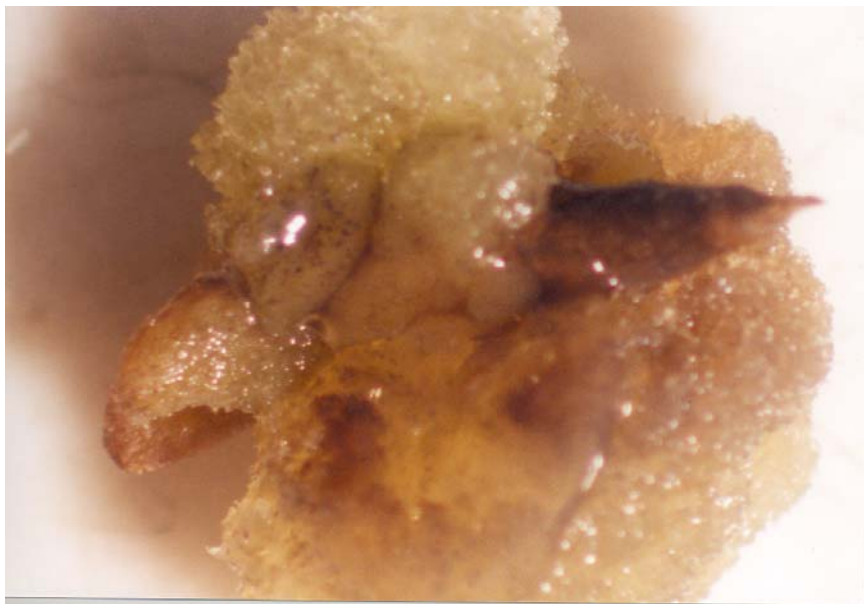
*Calogénesis en embrión de pino colombiano.
Tratamiento 0.2 M de Glycerol + 0.4 M de Sacarosa
PSV2 30 Minutos.*



*Calogénesis en embrión de pino colombiano.
Tratamiento 0.2 M de Glycerol + 0.4 M de Sacarosa
PSV2 30 Minutos*



*Raíces afectadas durante el congelamiento del embrión,
Tratamiento 0.3M/7 días, deshidratación en sílica gel.*



*Calogénesis en embriones congelados de pino colombiano
Tratamiento 0.3M/7 días*