

Crioconservación de Plantas en América Latina y el Caribe



Editores
María Teresa González-Arno
Florent Engelman

CRIOCONSERVACIÓN DE PLANTAS

Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura

CRIOCONSERVACIÓN DE PLANTAS EN AMÉRICA LATINA Y EL CARIBE

Editores:

María Teresa González-Arno
Facultad de Ciencias Químicas de Orizaba
Universidad Veracruzana, México

Florent Engelmann
Instituto de Investigación para el Desarrollo
(IRD-UMR DIADE), Francia

Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura
(IICA), 2013



Crioconservación de plantas en América Latina y el Caribe por IICA
se encuentra bajo una Licencia Creative Commons Atribución-
NoComercial-CompartirIgual 3.0 Unported.
Basada en una obra en www.iica.int.

El Instituto promueve el uso justo de este documento. Se solicita que sea citado apropiadamente cuando corresponda.

Las ideas y planteamientos expresados en este documento son propios de los autores y no representan necesariamente el criterio del IICA.

Esta publicación también está disponible en formato electrónico (PDF) en el sitio web institucional en <http://www.iica.int>.

Este documento contó con el apoyo editorial de Máximo Araya, María Elena Cedeño y Federico Sancho, todos del IICA.

Corrección de estilo: Máximo Araya

Diagramación: Carlos Umaña

Diseño de portada: Karla Cruz

Impresión: Imprenta del IICA

Crioconservación de plantas en América Latina y el Caribe / Editado
por María Teresa González-Arno y Florent Engelmann --
San José, C.R.: IICA, 2013.
XII, 204 p.; 15.24 x 22.86 cm.

ISBN 978-92-9248-446-0

1. Recursos genéticos vegetales 2. Biotecnología 3. Con-
servación biológica 4. Reserva genética. 5. Germoplasma
6. América Latina 7. Caribe I. IICA II. Título

AGRIS
F30

DEWEY
631.523.3

San José, Costa Rica
2013

Tabla de contenidos

Índice de cuadros y figuras	VIII
Prólogo	XI
1. Rol de la REDBIO/FAO en el desarrollo de la biotecnología agrícola en América Latina y el Caribe Juan Izquierdo Fernández, Alicia Diamante, María Susana McCarthy	1
2. Los recursos fitogenéticos y la importancia estratégica de su conservación en las Américas Marleni Ramírez, Jesús Salcedo	15
3. Introducción a la conservación <i>ex situ</i> de los recursos genéticos vegetales Florent Engelmann, María Teresa González-Armao	25
4. Consideraciones teóricas y prácticas para la crioconservación de germoplasma vegetal María Teresa González-Armao, Florent Engelmann	37
5. Estado actual de las investigaciones sobre crioconservación de germoplasma vegetal en la Argentina Luis Mroginski, Hebe Rey, Natalia Dolce, Adriana Scocchi, Andrea Clausen, Claudia Luna, Silvia Vila, Ariana Digilio, Eduardo Flachsland, Victoria Rivero, Leonardo Togno	53
6. Crioconservación de germoplasma vegetal en Bolivia Teresa Ávila, Gisell Mercado, Noemi Aguilar	65
7. Situación actual y perspectivas de la investigación en crioconservación de recursos fitogenéticos en Brasil Izulmé Rita Imaculada Santos, Antonieta Nassif Salomão, Daiane Peixoto Vargas, Diogo Pedrosa Corrêa Da Silva, Gabriela Ferreira Nogueira, Milene Alves De Figueiredo Carvalho, Renato Paiva	75
8. La crioconservación en Colombia: desarrollo de la investigación y análisis de casos Roosevelt H. Escobar Pérez, Norma Manrique, Luis G. Santos, Juan E. Montoya, Ericson Aranzales, Manuel Sánchez, Raúl Valbuena	93
9. Crioconservación de germoplasma vegetal en Costa Rica Ana Abdelnour-Esquivel, María Elena Aguilar Vega	113
10. Desarrollo de la crioconservación de las plantas en Cuba Marcos Edel Martínez Montero, María Teresa González-Armao, María de los Ángeles Torres Mederos, Leyanis García, Zoila Fundora	127



11. Avances en la crioconservación de plantas en Ecuador	
María de Lourdes Torres, Sofía Korneva, Román Maribona Kornev, Joffre A. Mendoza O., Fernando E. Piña T., Rodolfo Maribona H.(+), Pedro J. González P., Venancio Arahana	145
12. Estado actual de la crioconservación vegetal en México	
María Teresa González-Armao, Roberto Gámez Pastrana, Yolanda Martínez Ocampo, Silvia Valdés Rodríguez, José Óscar Mascorro, Antelmo Osorio Sáenz, Miriam Pastelín Solana, Marina Guevara Valencia, Carlos A. Cruz Cruz	161
13. Crioconservación de recursos genéticos de tubérculos y raíces andinos en el Perú	
Ana Panta, Brenda Zea, Dino Sánchez, David Tay, William Roca	175
14. Conclusiones	
Florent Engelmann, María Teresa González-Armao	197
Sobre los editores	202



Índice de cuadros y figuras

Cuadros

Cuadro 1.1.	Actividades y resultados de la REDBIO/FAO	9
Cuadro 1.2.	Encuentros Latinoamericanos y del Caribe sobre Biotecnología Agropecuaria (REDBIO/FAO)	11
Cuadro 1.3.	Áreas temáticas y cantidad de presentaciones en las áreas biotecnológicas relevantes realizadas en los encuentros REDBIO/FAO	12
Cuadro 4.1.	Recomendaciones para seleccionar un método adecuado (+) para la crioconservación de diferentes formas de cultivo in vitro de plantas	40
Cuadro 5.1.	Porcentaje de plantas obtenidas luego de la crioconservación de nueve especies usando el método de encapsulación-deshidratación (ED) o vitrificación (V) con enfriamiento lento (L) o rápido (R)	55
Cuadro 7.1.	Lista de especies autóctonas con protocolos estandarizados para la crioconservación de semillas	79
Cuadro 7.2.	Lista de especies con protocolos de crioconservación estandarizados o en desarrollo. En todos los casos se utilizó el régimen de congelación rápida y de descongelación rápida (baño María a temperatura de 38 ± 2 °C)	81
Cuadro 7.3.	Crioconservación de ejes embrionarios de especies de <i>Citrus</i> utilizando la técnica de encapsulación-deshidratación (ED)	82
Cuadro 7.4.	Crioconservación de semillas de <i>Coffea</i>	83
Cuadro 7.5.	Crioconservación de ápices caulinares de dos cultivares de <i>Manihot esculenta</i> spp.	85
Cuadro 7.6.	Crioconservación de semillas de <i>Genipa americana</i> con humedad diversa	86
Cuadro 13.1.	Recursos fitogenéticos conservados y estudiados en los bancos de germoplasma de los centros internacionales miembros del Grupo Consultivo para la Investigación Agrícola Internacional (CGIAR) presentes en Latinoamérica	177
Cuadro 13.2.	Métodos de crioconservación ensayados en camote por el CIP y otros investigadores	183
Cuadro 13.3.	Efecto de tratamientos PVS2 en la supervivencia y recuperación de ápices meristemáticos de camote crioconservados utilizando el método de vitrificación de la gota	185



Figuras

Figura 4.1.	Representación gráfica de un protocolo convencional	42
Figura 4.2.	Representación gráfica de un protocolo de encapsulación-deshidratación	44
Figura 4.3.	Representación gráfica de un protocolo de vitrificación	46
Figura 4.4.	Representación gráfica del procedimiento de precultivo-deseccación	48
Figura 5.1.	Crioconservación de ápices caulinares de <i>Arachis pintoi</i> ($2n=2x=20$), luego del descenso directo de temperatura a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ aplicando la técnica de encapsulación-deshidratación: A) ápice caulinar crioconservado a los siete días; B) vástago a los 60 días; C) plantas a los 90 días; D) plantas establecidas en tierra a los 60 días de haber sido transferidas a suelo (la barra vertical indica 5 mm en A, 1 cm en B-C y 5 cm en D)	56
Figura 5.2.	Crioconservación de semillas de <i>Oncidium bifolium</i> aplicando la técnica de encapsulación-deshidratación: A) semillas crioconservadas a los siete días; B) semillas crioconservadas con protocormos a los 45 días; C) múltiples protocormos y plantas, luego de la crioconservación a los 90 días, emergiendo de la cápsula de alginato; D) planta proveniente de crioconservación a los 120 días (la barra vertical indica 5 mm en A y B, 1 cm en C y D)	59
Figura 6.1.	Plantas desarrolladas a partir de semillas crioconservadas: A) <i>P. mollissima</i> , B) <i>P. tarminiana</i> , C) <i>P. pinnatistipula</i>	68
Figura 6.2.	Ápices caulinares crioconservados a los 30 días de cultivo: A) <i>P. mollissima</i> , B) <i>P. tarminiana</i>	70
Figura 6.3.	Ápices caulinares encapsulados de <i>P. mollissima</i> después de 30 días de cultivo: A) desecados durante dos horas y sin exposición al nitrógeno líquido; B) desecados durante dos horas y con exposición al nitrógeno líquido	70
Figura 7.1.	Semillas de <i>Coffea</i> spp. sometidas a crioconservación mediante la técnica de congelamiento rápido. A: semillas maduras utilizadas en los experimentos; B: recuperación a los 14 días de cultivo in vitro del eje embrionario aislado de una semilla crioconservada	83
Figura 7.2.	Semillas de <i>Genipa americana</i> sometidas a crioconservación mediante la técnica de congelamiento rápido. A: frutos maduros; B: ejes embrionarios aislados de semillas crioconservadas en nitrógeno líquido; C: plántula regenerada por cultivo in vitro de ejes embrionarios recuperados después de la crioconservación de las semillas	86
Figura 8.1.	Efecto del tipo de regulador aplicado al medio de regeneración en la etapa de poscongelación, según la metodología de Escobar <i>et al.</i> (1997). El medio C contiene 0.04 mg/l de BAP. En cada caso se diferencian, por su conformación, el callo y el brote	96
Figura 8.2.	Respuesta de ápices encapsulados de <i>Manihot esculenta</i> subespecies <i>flabellifolia</i> 444-002, después de la congelación en nitrógeno líquido	98



Figura 8.3.	Respuesta de un CEF congelado mediante la técnica de desecación-vitrificación: A) crecimiento en poscongelación de la línea MCol 2215-A; B) etapa de conversión de embrión a planta en una línea celular de MNig 11 previamente congelada	99
Figura 10.1.	Aditamentos utilizados para el desarrollo del procedimiento simple de congelación: a) baño de alcohol y termómetro digital con termopar acoplado de cobre-constantán sumergido en un criovial; b) congelador de laboratorio a -40 °C; c) tanque con nitrógeno líquido para la inmersión y almacenamiento de los crioviales	132
Figura 10.2.	Recuperación de embriones somáticos de cítricos crioconservados por encapsulación-deshidratación	138
Figura 10.3.	Crioconservación de ápices de bulbos de ajo: a) regeneración de brotes al mes de la crioconservación; b) plantas desarrolladas a los tres meses del tratamiento	139
Figura 11.1.	Regeneración de plantas después de la crioconservación de los meristemas de algunas variedades de <i>Musa</i> spp. pertenecientes a distintos grupos genómicos: a) y b) <i>Musa</i> ac; c) AA; d) AAA-h	150
Figura 11.2.	Diferentes tipos de scalps utilizados en la crioconservación de <i>Musa</i> spp.	151
Figura 11.3.	Diferentes etapas en la formación de plantas a partir de suspensiones celulares crioconservadas: a) evaluación de la vitalidad de las suspensiones celulares con FDA al 1 %; b) germinación de embrioides de la variedad Williams sometidos a crioconservación; c) primer brote obtenido de la suspensión celular crioconservada	152
Figura 11.4.	Desarrollo, enraizamiento y aclimatación de yemas apicales de naranjilla luego de la crioconservación: a) yemas extraídas utilizadas para la vitrificación; b) yemas alongadas durante tres semanas luego del descongelamiento; c) plantas alongadas y enraizadas luego de seis semanas desde el descongelamiento; d) plantas aclimatadas durante cuatro semanas luego del enraizamiento	155
Figura 11.5.	Plántula de <i>Oncidium stenotis</i> recuperada luego de un proceso de crioconservación vista con un estéreo microscopio	156
Figura 12.1.	Recuperación de meristemas apicales de crisantemo después de la crioconservación, a los 45 días de recultivo: A) control no transformado genéticamente, B) línea transgénica 1 (L1); C) línea transgénica 2 (L2) (Osorio <i>et al.</i> 2011)	166
Figura 12.2.	Recuperación y aclimatación de brotes de vainilla (<i>Vanilla planifolia</i>) regenerados a partir de ápices crioconservados mediante el protocolo de gota-vitrificación	169
Figura 13.1.	Meristemas apicales de camote evaluados a los 20 días de cultivo después del descongelamiento: A) genotipo Trujillano, B) genotipo CMR 1112; y meristemas apicales de ulluco (C) y oca (D) después de 15 días de cultivo luego del descongelamiento	185
Figura 13.2.	Respuesta de recuperación de ápices de ulluco crioconservados siguiendo tratamientos con PVS2	188
Figura 13.3.	Respuesta de recuperación de ápices de oca crioconservados siguiendo tratamientos con PVS2	188

Prólogo

A lo largo de la historia se han cultivado alrededor de 7000 especies de plantas para el consumo humano. La interacción entre el hombre y el ambiente ha resultado en el desarrollo de un inmenso número de variedades adaptadas a diferentes ecosistemas, las que han constituido la base de la alimentación humana. Hoy, cerca de 30 cultivos proveen el 95 % de la energía que se adquiere de los alimentos. La población mundial se nutre básicamente de arroz, trigo, maíz y papa, que dan cuenta del 60 % de la dieta alimentaria. Es de crucial importancia, por lo tanto, mantener una elevada diversidad genética de esos cultivos, para afrontar el creciente estrés ambiental y brindar a los agricultores e investigadores más oportunidades de mejorarlos y hacerlos tolerantes a condiciones desfavorables como la sequía, la salinidad, las inundaciones, el deterioro en la calidad de los suelos y las temperaturas extremas. En este contexto, también resulta de gran relevancia la conservación de especies silvestres afines, porque son una fuente importante de genes para incrementar la producción agrícola y mantener la sustentabilidad de los agroecosistemas.

Los recursos genéticos, que determinan las características de las plantas y, por ende, su capacidad para adaptarse y sobrevivir, no son únicamente la base biológica de la seguridad alimentaria del mundo, sino que también tienen un enorme potencial para contribuir a hacer frente a muchos de los problemas actuales y futuros. Asimismo, el ser humano ha utilizado esa riqueza natural para la alimentación animal, la generación de energía y la obtención de fibras con fines textiles. Por consiguiente, la conservación y el uso sustentable de los recursos genéticos constituyen imperiosas necesidades para asegurar la producción agroindustrial, enfrentar los retos ambientales y garantizar la propia existencia de la humanidad. Se considera que en 2010 ya había en el mundo 925 millones de personas que padecían de hambruna, y se estima que la población mundial seguirá aumentando hasta llegar a nueve billones de personas en el año 2050. La ausencia de un vínculo adecuado entre la conservación y el uso de los recursos también podría ser una grave amenaza para la seguridad alimentaria del planeta.

Por otra parte, la pérdida de los recursos genéticos vegetales hace que en las plantas se deterioren sus capacidades para adaptarse a las condiciones cambiantes y adversas, por lo que los mejoradores vegetales tendrán menos opciones para combatir el ataque de plagas y enfermedades y superar las afectaciones del cambio climático en las plantas. Se estima que a finales de este siglo podría haberse extinguido aproximadamente el 25 % de las especies vegetales conocidas. La erosión genética es otro problema que está ocurriendo a una velocidad alarmante a nivel mundial. Se ha reportado que de 1988 a 2000 se perdió del 25 % al 35 % de la diversidad genética de las plantas y, al parecer, actualmente todas las especies vegetales están sufriendo sensibles pérdidas de sus recursos genéticos.

Un hecho de particular importancia para América Latina y el Caribe (ALC) es que en esta región se localizan nueve de los 34 países identificados a nivel mundial como megadiversos. Además, es el centro de origen de numerosas especies cultivadas y posee altos índices de plantas endémicas —plantas que no se encuentran en otra parte del mundo—. Sin embargo, ALC es una de las regiones del planeta donde las especies están



más amenazadas, por lo que urge promover una cultura de conservación de la riqueza biológica vegetal y de asimilación de tecnologías que contribuyan a resguardar dicha riqueza de una manera segura.

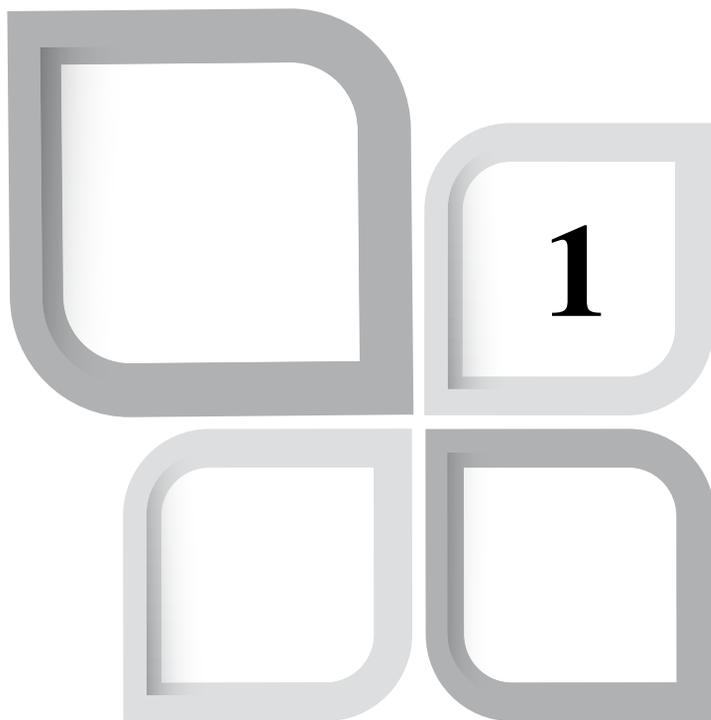
La conservación de los recursos genéticos de las plantas se apoya en el uso complementario de estrategias *in situ* y *ex situ*. Hoy en el mundo existen numerosos bancos de germoplasma y jardines botánicos en que 7.4 millones de accesiones se conservan *ex situ*, la mayoría de las cuales son de cultivos de uso alimentario, como cereales y leguminosas. Las plantas que producen semillas ortodoxas pueden ser almacenadas a largo plazo con bajos contenidos de humedad y a bajas temperaturas en los denominados “bancos de semillas”. Sin embargo, no todas las especies pueden ser conservadas de esa manera, dado que algunas son de propagación vegetativa y otras producen semillas con un comportamiento no ortodoxo, por lo que no toleran las condiciones de almacenamiento de los bancos. Esto ha resultado en la existencia de grandes brechas en la cobertura taxonómica y geográfica de muchas colecciones *ex situ*, fundamentalmente de especies silvestres y géneros afines de ALC, que pertenecen a la categoría de plantas con mayores complejidades.

El establecimiento de los bancos de germoplasma en el campo y el desarrollo de nuevas tecnologías de conservación *in vitro*, específicamente la criopreservación, han incentivado a la comunidad internacional a brindar mayor atención a la conservación de los recursos genéticos y a aportar nuevas soluciones. Las técnicas criogénicas, que se fundamentan en el almacenamiento de material biológico preferiblemente a la temperatura del nitrógeno líquido (-196 °C), permiten conservar ese material sin alteraciones a largo plazo y de una forma segura y efectiva en cuanto a costos. Hoy existen novedosos protocolos de criopreservación cuyo uso se ha extendido con éxito a una gran diversidad de especies vegetales y que contribuyen, cada vez más, al uso rutinario de esa técnica para la conservación de germoplasma en bancos de genes.

Este libro brinda información actualizada sobre el estado de la criopreservación vegetal en ALC. Los 14 capítulos que lo integran tienen la finalidad no solo de transmitir conocimientos sobre los avances logrados en ese campo por especialistas de nueve países de dicha región, sino también de fortalecer la comunicación entre científicos, agricultores y curadores, con el fin de que continúen avanzando, junto a los organismos internacionales que actúan en ALC, en la conservación a largo plazo de su patrimonio natural y cultural para el beneficio del presente y el futuro de la humanidad.

Víctor M. Villalobos Arámbula
Director General
Instituto Interamericano de Cooperación
para la Agricultura (IICA)





Rol de la REDBIO/FAO en el desarrollo de la biotecnología agrícola en América Latina y el Caribe

Juan Izquierdo Fernández¹, Alicia Diamante²,
María Susana McCarthy³

1. Ex Oficial Principal (jubilado) de Producción Vegetal, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO); Director, Magíster de Gestión Tecnológica con énfasis en Biotecnología, Universidad de Talca, Chile, jizquierdo@utalca.cl; Presidente de la Fundación REDBIO Internacional (FRI); Profesor investigador invitado, Doctorado de Bioética, Universidad del Museo Social Argentino, juanizquierdo813@gmail.com.

2. Fundación REDBIO Internacional (FRI), alicia.diamante@gmail.com.

3. Fundación REDBIO Internacional (FRI), mccarthy@agro.uba.ar.

Las redes de cooperación técnica y del conocimiento

En años muy recientes, se ha acelerado la generación de tecnologías de la información y la comunicación y el desarrollo de redes globales del conocimiento. Esos mecanismos se han convertido en elementos esenciales de la estructura de los nuevos tipos de relaciones, servicios y productos, en particular de las nuevas modalidades de cooperación horizontal en las áreas de la ciencia y la innovación tecnológica.

Esa nueva concepción de los servicios y productos ha generado cambios fundamentales en todos los sectores de la economía y causa impactos crecientes en cada área de la sociedad. En los últimos años, diversas instituciones han manifestado su interés en crear e integrarse a redes de comunicación. Hoy numerosas redes funcionan con éxito y han sido fundamentales para las diversas áreas del conocimiento y los programas de cooperación, en la medida en que la automatización de los datos permite a investigadores y profesionales tener una visión más amplia de la producción en los más variados sectores. Sin embargo, criterios de confiabilidad, calidad y accesibilidad son necesarios para que la información biotecnológica surja en apoyo de programas, proyectos y actividades de investigación, bioprospección, producción, servicios y educación en biotecnología agropecuaria. Por otra parte, cabe señalar que, a pesar de un desarrollo tecnológico acelerado, la práctica de la comunicación por redes se está incrementando en nuestros países y el intercambio por medios electrónicos está proliferando con la Internet.

El Sistema de Redes de Cooperación Técnica de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO 2012a), en particular para el caso de la REDBIO, ha permitido a los países de América Latina y el Caribe (ALC) unir esfuerzos y recursos humanos y técnicos para buscar soluciones a los problemas comunes que enfrentan para el desarrollo de sus sectores agropecuario, forestal y pesquero. El propósito de una red es implementar un mecanismo de carácter técnico constituido por instituciones públicas, privadas o autónomas de los países miembros, con la finalidad de aumentar progresivamente la capacidad tecnológica mediante el intercambio de experiencias y conocimientos entre países, utilizando básicamente sus propios recursos técnicos, humanos y financieros. Entre los objetivos de las redes de cooperación se encuentran: i) promover la cooperación entre países en desarrollo a través de la conjugación de esfuerzos y el intercambio de conocimientos y experiencias; ii) estimular la capacitación y el entrenamiento de los recursos humanos a todos los niveles; iii) fortalecer las capacidades técnicas de las instituciones nacionales, especialmente en la identificación de sus problemas y potencialidades y en la articulación de soluciones adecuadas; iv) fomentar la auto-confianza de los países en sus propios recursos, conocimientos y habilidades; y v) acelerar el desarrollo mediante una utilización más eficiente de los recursos humanos, físicos y financieros existentes en ALC.

Las redes de conocimiento temáticas de la FAO (2012b) son comunidades virtuales de personal profesional y centros colaboradores con intereses y objetivos comunes en agricultura sostenible y seguridad alimentaria, planificadas en torno a esferas prioritarias y dirigidas a: i) reforzar los enlaces entre comunidades y profesionales;



ii) permitir a particulares recoger y obtener acceso a la información técnica y política; iii) facilitar la distribución e intercambio de las fuentes de conocimiento complementarias; y iv) organizar y crear conocimiento de forma flexible.

Red de Cooperación Técnica en Biotecnología Vegetal (REDBIO/FAO)

La Red de Cooperación Técnica en Biotecnología Vegetal (REDBIO) de la FAO, iniciada en 1990 bajo los auspicios de la FAO, congregaba a junio de 2011 a 5427 investigadores de 741 laboratorios de biotecnología agropecuaria en 27 países de ALC. La red, que cumple ampliamente con los objetivos y las premisas de las redes de cooperación técnica y del conocimiento, se centra en la implementación de diversas actividades regionales y subregionales orientadas a promover el intercambio de conocimientos, tecnologías y materiales biológicos, a fomentar la enseñanza, el uso racional, la capacitación y la innovación biotecnológica y a impulsar la conservación de recursos fitogenéticos en la región, entre las instituciones y organizaciones públicas y privadas de los países de ALC.

Desde sus inicios en noviembre de 1990, la REDBIO ha promovido el desarrollo y la utilización responsable de la biotecnología como una herramienta clave para el desarrollo competitivo y sustentable de la producción agropecuaria y forestal de la región. Ello ha sido posible mediante la conducción y liderazgo de diversas actividades relacionadas con la investigación, la formación de recursos humanos y la provisión de asistencia técnica a los gobiernos en temas ligados a la biotecnología agropecuaria. Desde 2002, la REDBIO comprende a la Fundación REDBIO Internacional (FRI), una institución sin fines de lucro dedicada a la ejecución de las actividades prioritarias de la red.

En una región rica en recursos naturales como ALC, la aplicación de la biotecnología deberá responder a las crecientes demandas que emergen en las áreas de la seguridad alimentaria, el desarrollo socioeconómico y la conservación, diversificación y uso sostenible de los recursos genéticos como insumos básicos de la futura agricultura regional.

La producción agropecuaria de la región necesariamente deber ser más competitiva a lo interno y externo, lo que implica producir con eficiencia y trabajar en nichos de calidad e inocuidad alimentaria. En este sentido, las tecnologías convencionales no son suficientes, por lo que es necesario abrir un espacio estratégico para el uso de las nuevas biotecnologías y hacer que sus productos sean incorporados en sistemas productivos sostenibles.

En general, las actividades de la REDBIO en biotecnología agropecuaria se orientan a:

- Proveer información actualizada sobre las iniciativas de la REDBIO y de sus laboratorios e instituciones miembros en los países de la región.
- Brindar asistencia técnica y promover actividades para el establecimiento de normativas de bioseguridad, teniendo en consideración la soberanía de las normas de regulación de cada país miembro.
- Brindar información y promover actividades de aplicación de biotecnología agropecuaria al desarrollo de recursos genéticos para la conservación y utilización sostenible de los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura.



- Promover interacciones entre instituciones públicas y privadas de la región para contribuir al desarrollo de proyectos biotecnológicos en los campos de la agricultura y la agroindustria.

Origen de la REDBIO/FAO: un poco de historia

El Simposio Global sobre Biotecnología Vegetal para Países en Desarrollo, organizado por la FAO y el Centro Técnico para la Cooperación Agrícola (CTA) en junio de 1989 en Luxemburgo, recomendó aplicar la biotecnología en los países en desarrollo, a fin de solucionar problemas que no han podido ser resueltos satisfactoriamente con métodos convencionales, y donde existan bases para creer que una investigación emergente a nivel molecular y celular puede solucionar los problemas fundamentales relacionados con la producción de alimentos. La premisa básica adoptada fue que las herramientas y métodos biotecnológicos aplicados en forma segura y apropiada en los países en desarrollo deben ser parte de cualquier acercamiento multidisciplinario aplicado al mejoramiento genético de plantas útiles. Consecuentemente, la elaboración de estrategias y políticas de asistencia para programas nacionales de biotecnología en ALC debería considerar la definición oportuna de políticas de investigación y la creación de redes de información y de cooperación, como herramientas indispensables para definir las políticas de desarrollo biotecnológico.

En la Reunión de Planificación sobre Biotecnología Apropiada para la Producción de Cultivos, organizada por la Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe (FAO/RLC) en Campinas, Sao Paulo, Brasil del 20 al 24 de noviembre de 1989, se recomendó a la FAO el establecimiento de una red de cooperación técnica entre los laboratorios dedicados a la biotecnología vegetal. Se definió como objetivo de la red el de equilibrar las potencialidades de los países de ALC para desarrollar una biotecnología avanzada que pueda ser utilizada en la solución de problemas específicos relacionados con la producción vegetal. Se recomendó crear un programa horizontal de cooperación para el desarrollo de la biotecnología vegetal, que incluyera, entre otros aspectos, un directorio de recursos humanos, un inventario de laboratorios dedicados a la biotecnología vegetal y un análisis de actividades conjuntas y tendencias en cuanto a prioridades, especies y tecnologías que pudieran ayudar a la definición de los niveles de excelencia y servicios referenciales. El objetivo de tener un primer registro de laboratorios de biotecnología permitiría el establecimiento de puntos focales (coordinadores) que pudieran actuar como bases para los programas y proyectos de cooperación. La recomendación también incluyó la realización de actividades de información, tal como la publicación de protocolos de biotecnología vegetal, la interconexión y acceso a bancos de datos y la realización de talleres sobre materias prioritarias como la biotecnología vegetal aplicada.

En 1990 se llevó a cabo una encuesta regional sobre biotecnología, mediante la cual se recopilaron datos de 173 laboratorios (27 % del sector privado) de 17 países de ALC. Esa encuesta evidenció, en cuanto a recursos humanos, que había 1150 técnicos trabajando en 1500 proyectos operativos, quienes habían producido 560 publicaciones y supervisado 537 tesis de grado durante los últimos tres años. El estudio también reveló que el equipo y la infraestructura no constituían las principales limitaciones, sino que los factores que más afectaban el desarrollo y la aplicación de la biotecnología vegetal en la producción de alimentos y protección vegetal eran: i) la falta de capacitación en



biotecnología vegetal avanzada, biología molecular y cultivo de células y de tejidos aplicados al mejoramiento genético y metodologías para el diagnóstico de enfermedades que afectan la producción de alimentos; ii) un presupuesto operacional limitado (el estudio de la FAO reveló que el financiamiento internacional solo representaba el 27 % del presupuesto total de los laboratorios); y iii) la necesidad urgente de poner en marcha una red de cooperación técnica sobre información e investigación para desarrollar actividades de capacitación y proyectos de producción en biotecnología vegetal aplicada. Con base en los resultados del estudio, en 1990 la FAO preparó un catálogo (CATBIO) con información sobre 167 laboratorios.

La REDBIO fue oficialmente constituida en Santiago de Chile en noviembre de 1990, con el auspicio de la FAO y la cooperación de los centros internacionales del Grupo Consultivo en Investigación Agrícola Internacional (CGIAR) que trabajan activamente en la región. Sus operaciones se iniciaron durante la Mesa Redonda para la Creación de la Red de Cooperación Técnica entre los Laboratorios de Biotecnología Vegetal, realizada en la Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe, con la participación de mejoradores genéticos, fisiólogos y patólogos vegetales de Argentina, Brasil, Colombia, Costa Rica, Cuba, Chile, Ecuador, México, Panamá, Perú, Uruguay y Venezuela, así como de representantes del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), el Centro Internacional de la Papa (CIP), el Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI), el Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), la Corporación Andina de Fomento (CAF) y la Federación de Empresas en Biotecnología (FELAEB), en seguimiento a las peticiones oficiales hechas a la FAO por los gobiernos de Costa Rica, Colombia y Chile. A raíz de una resolución adoptada por la Conferencia Regional de la FAO realizada en Uruguay en 1992, se recomendó que la REDBIO también cubriera la biotecnología animal.

La información: premisa básica de la REDBIO/FAO

Dada la ausencia de un sistema integral que permitiera la interconexión multi-institucional y en atención a la necesidad de contar con un mecanismo ágil, coordinado en tiempo real y puesto en operación en los ámbitos nacional y regional, en 2001 surgió el proyecto *InfoREDBIO*, apoyado por la FAO y finalizado en 2008. *InfoREDBIO* comprendió una plataforma de información sobre preparación de productos y prestación de servicios en tres ámbitos: i) promoción de capacidades científicas y tecnológicas, ii) percepción pública y educación, y iii) desarrollo de marcos regulatorios nacionales y regionales para la aplicación y el desarrollo seguro de biotecnología. Adicionalmente, el banco de datos comprendía información sobre proyectos; fuentes de financiamiento; protocolos validados de micropropagación de plantas de importancia económica, alimentaria, ornamental y forestal; y estudios de caso de ámbito nacional sobre la situación y la oportunidad del desarrollo de la biotecnología en Argentina (Diamante e Izquierdo 2004), Bolivia (Ávila e Izquierdo 2006), Colombia (Schuler y Orozco 2006) y Ecuador (Wendt e Izquierdo 2003).

En 2003 se estableció una base de datos en línea para miembros profesionales y estudiantes denominada “profREDBIO”, la cual contiene información sobre profesionales y estudiantes con posgrados en áreas relacionadas con biotecnología en los países miembros de la REDBIO.



Este mecanismo busca facilitar el conocimiento y la comunicación entre los investigadores y profesionales que se desempeñan en biotecnología, con el fin de favorecer el intercambio de información y opiniones, la complementación de esfuerzos y el establecimiento de vinculaciones entre profesionales de las diferentes disciplinas que convergen en el desarrollo de la biotecnología. A partir de 2012 el banco de datos BIOLIST (www.fundacionREDBIO.org) comprende a los profesionales actualmente miembros de la REDBIO.

Objetivos

El objetivo general de la REDBIO es el de *acelerar el proceso de adaptación, generación, transferencia y aplicación de la biotecnología agropecuaria a los efectos de utilizarla como herramienta para la solución de los problemas que afectan la producción de alimentos y la conservación de recursos genéticos en los países de ALC*. Entre sus objetivos específicos se encuentran los siguientes: i) construir un foro técnico para apoyar la formulación de una política y estrategia nacional y regional en biotecnología agropecuaria aplicada al desarrollo; ii) promover y facilitar el intercambio de información y los resultados de investigación entre los miembros de la Red a través del manejo moderno de los sistemas de comunicación; iii) apoyar el intercambio de recursos genéticos y materiales biológicos y el acceso a nuevas tecnologías a través de actividades horizontales de cooperación entre los miembros de la Red, en conjunto con los laboratorios extranjeros de nivel avanzado; iv) organizar actividades de capacitación en los ámbitos nacional y regional, incluyendo la formación, la calificación y la actualización de recursos humanos mediante cursos, talleres, simposios y capacitación en servicio en temas como la biotecnología agropecuaria de punta y la genómica; v) impulsar y apoyar la actualización de conocimientos a través de la organización y participación de los miembros de la Red en foros internacionales y simposios; vi) promover la complementación entre los grupos de investigación y la facilitación de los mecanismos de asistencia (proyectos, actividades en conjunto, identificación de donantes) en biotecnología agropecuaria y otras áreas técnicas entre los miembros de la Red en conjunto con instituciones extranjeras de avanzada; y vii) impulsar la preparación y aplicación de un código de conducta de la FAO en biotecnología agropecuaria, el cual favorecerá, estandarizará y adaptará el uso de conceptos concertados en bioseguridad, marco regulatorio, ética e impacto socioeconómico que tiene la biotecnología en los países de ALC.

La REDBIO, como plataforma técnica científica neutra, otorga prioridad a aquellas biotecnologías seguras y que representan ventajas comparativas para solucionar problemas específicos de cultivos y especies en estudio, tal como la micropropagación, la conservación, la caracterización molecular de germoplasma, el cultivo de células y de tejidos, el diagnóstico molecular de patógenos, la transformación genética y el estudio del genoma molecular de especies. La Red fija sus prioridades en forma periódica, para lo cual considera la importancia y el impacto, en los ámbitos local, nacional y regional, de los estreses bióticos y abióticos, así como la necesidad de desarrollar métodos efectivos para aumentar la producción sostenible, incrementar la calidad de los alimentos, mejorar los índices de salud y conservar el ambiente a través del uso apropiado de la biotecnología como una herramienta para la agricultura sustentable. Las actividades de la REDBIO se orientan, entre otros propósitos, a mejorar la comunicación entre sus miembros, de manera que ello les permita establecer lazos y coordinar esfuerzos que generen oportunidades de capacitación e integración.



Desarrollo de un mecanismo operativo: la Fundación REDBIO Internacional (FRI)

Lanzada como idea en 1998 y creada en 2002 como una organización no gubernamental sin fines de lucro, la Fundación REDBIO Internacional (FRI), con sede en Montevideo, Uruguay, actúa como brazo ejecutor de la REDBIO, con el objetivo principal de facilitar y promover la cooperación, la investigación conjunta y la transferencia de biotecnología agropecuaria.

La FRI centra su atención en asuntos relativos a información, educación, percepción pública y asistencia en temas técnico-científicos y normativos relacionados con la biotecnología vegetal, la bioseguridad y los derechos de propiedad intelectual. Entre las áreas temáticas específicas de interés para el trabajo de la FRI están las siguientes:

- a) Desarrollo de variedades de plantas resistentes a estreses abióticos y bióticos.
- b) Generación de alimentos seguros, nutritivos y en cantidades suficientes, incluidas modificaciones en la composición de sus componentes.
- c) Optimización del uso de los bosques y el manejo eficiente del agua.
- d) Conservación de la productividad del suelo.
- e) Conservación (incluida la crioconservación) de la diversidad genética.
- f) Diagnóstico temprano y preciso de enfermedades y producción de plantas libres de patógenos.
- g) Manejo de los riesgos para el ambiente y la salud del uso indiscriminado de insumos (bioseguridad).
- h) Aumento de la ganancia de peso en animales mediante forrajes y otros alimentos más nutritivos.
- i) Aumento de la producción de proteínas de interés farmacológico e industrial (vacunas).
- j) Mejoramiento genético animal y vegetal mediante la aplicación de las técnicas de la genómica, el mapeo de genes, los marcadores moleculares y la modificación genética.

En 2011 la FRI puso en operación cuatro secretarías técnicas (investigación, bioseguridad, propiedad intelectual y bioética, comunicación social y educación), con la finalidad de atender demandas específicas de las redes nacionales y formular proyectos ad hoc sobre la base de recursos nacionales e internacionales.

Educación de la biotecnología

En 2006, en respuesta a una convocatoria del Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED), la FRI logró financiamiento durante cuatro años para la Red Iberoamericana de Educación en Biotecnología Agroalimentaria (BioEDUCAR), cuyo objetivo es coordinar las fortalezas en educación en biotecnología agroalimentaria disponibles en nueve países de Iberoamérica, para fomentar y facilitar la comunicación entre investigadores de las ciencias de la vida. Entre los resultados se destacan la realización de numerosos eventos de intercambio de experiencias; la definición de temas de investigación de relevancia social y/o económica; el desarrollo de programas de educación en biotecnología agroalimentaria dirigidos a estudiantes de primaria y secundaria, profesionales de la salud y la educación, comunicadores sociales, gestores de política y público en general; y la realización de 10 cursos de capacitación en biotecnología en los países que integran la Red.



Otros resultados logrados fueron el diseño y puesta en operación de una página web que ofrece productos didácticos para diferentes niveles de educación; la elaboración de un libro virtual de las biotecnologías, desarrollado con apoyo de los nueve países integrantes de la Red; el desarrollo de una “valija itinerante” de productos didácticos que fueron entregados a esos nueve países mediante los coordinadores nacionales; y la puesta a disposición de un canal permanente de intercambio y análisis de iniciativas en el ámbito educativo.

Si bien la provisión de financiamiento por parte del CYTED finalizó en 2010, la FRI mantiene una actividad permanente y continúa poniendo a disposición una página web, la que posibilita el intercambio de información con los países.

Regulación de la bioseguridad

La REDBIO y la FRI promueven las prácticas seguras en la aplicación de la biotecnología, para lo cual difunden información sobre bioseguridad, realizan cursos de capacitación en esa área, impulsan el desarrollo de proyectos que fortalezcan los marcos regulatorios de los países de la región y brindan apoyo a la investigación en bioseguridad. En particular, la red ha brindado apoyo al desarrollo de capacidades nacionales en regulación, al diseño de marcos normativos, a la puesta en marcha de laboratorios de diagnóstico de organismos genéticamente modificados y al fortalecimiento de las comisiones nacionales de bioseguridad, a través de proyectos de la FAO ejecutados en Bolivia, Paraguay, Nicaragua, República Dominicana y países del Caribe anglófono. Asimismo, en el marco del Proyecto *InfoREDBIO* y en coordinación con el Instituto Dominicano de Investigaciones Agrícolas y Forestales (IDIAF), la Red generó el módulo “Marco regulatorio regional”, que constituye un recurso consultivo, informativo y educativo en materia de bioseguridad, propiedad intelectual, inocuidad de los alimentos y regulaciones en los países miembros de la Red.

A partir de 2008, la FRI desempeñó un activo papel en la formulación, operación y ejecución del proyecto regional de la FAO “Desarrollo de herramientas técnicas para la gestión de la bioseguridad en los países integrantes del MERCOSUR Ampliado”, cuyo objetivo principal fue establecer una base común de herramientas técnicas eficaces para la gestión de la bioseguridad relacionada con la agrobiotecnología. En este contexto, la FRI implementó un sistema de información y comunicación para la toma de decisiones a través del desarrollo de un portal web sobre bioseguridad de organismos vegetales genéticamente modificados, el cual brinda bases de datos sobre bioseguridad y biotecnología (bibliografía específica, recursos humanos, laboratorios de detección, eventos aprobados).

En este mismo orden de actividades, la FRI fue seleccionada para concretar un proyecto dentro del 7.º Programa Marco de la UE: Elaboración de Propuestas para Armonizar Regulaciones de Biotecnología en el MERCOSUR (referencia BIOTECH-ALA-2005-017-350 c3). Con la participación de expertos en bioseguridad y análisis de riesgo de los países del MERCOSUR, el proyecto permitió actualizar las reglamentaciones vigentes en materia de bioseguridad en los países involucrados y formular propuestas de actividades específicas enfocadas en las necesidades de los países.



REDBIO: Actividades, resultados e impacto

Las agencias y las redes de cooperación que realizan o apoyan actividades en agrobiotecnología, tales como la FAO, el IICA, el IPGRI, el CIAT, el CIP, la Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO), la Organización de los Estados Americanos (OEA), el Banco Interamericano de Desarrollo (BID), la Red Latinoamericana de Botánica (RLB), el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT), el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) y la Red Internacional para el Mejoramiento del Banano y el Plátano (INIBAP) consideran a la REDBIO como el foro de agrobiotecnología de mayor cobertura en ALC. A esas agencias y redes se suman instituciones como el CYTED (España), el Servicio de Inspección Sanitaria de Animales y Plantas (APHIS) del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), el Centro de Investigaciones para el Desarrollo Internacional (CIID) de Canadá, la Agencia de Cooperación Internacional de Japón (JICA) y la Dirección General de los Países Bajos para la Cooperación Internacional (DGIS).

En el cuadro 1.1 se indican las principales actividades realizadas y resultados obtenidos por la REDBIO desde su creación en 1990.

Cuadro 1.1. Actividades y resultados de la REDBIO/FAO.

Líneas de acción	Actividades	Resultados
Coordinación	<ul style="list-style-type: none"> - Puesta en marcha de un mecanismo de coordinación integrado por coordinadores nacionales y puntos focales institucionales. 	<ul style="list-style-type: none"> - Creación de las subredes nacionales de la REDBIO en Argentina, Bolivia, Brasil, Colombia, Cuba, Costa Rica, República Dominicana, El Salvador, Chile, Ecuador, Honduras, Panamá, Paraguay, Perú, Nicaragua, México, Uruguay y Venezuela. - Provisión de apoyo a la formulación de una política nacional sobre biotecnología agrícola y fortalecimiento de las comisiones nacionales de bioseguridad de Bolivia, Paraguay, Nicaragua y República Dominicana.
	<ul style="list-style-type: none"> - Organización de siete Encuentros Latinoamericanos y del Caribe sobre Agrobiotecnología (REDBIO-LAC). - Realización de simposios, talleres y seminarios nacionales y regionales sobre conservación y uso sostenible de recursos filogenéticos, mejoramiento de la producción de los cultivos y desarrollo de políticas. - Celebración de cursos y seminarios para acceder a nuevas tecnologías para la conservación/uso sostenible de recursos genéticos. 	<ul style="list-style-type: none"> - Formulación de tres declaraciones de política regional en biotecnología: Goiania, Brasil (2001), Boca Chica, República Dominicana (2004) y Viña del Mar, Chile (2007). - Celebración de seis eventos regionales (anuales y bianuales) en los países miembros de la REDBIO. - Realización de 14 cursos sobre cultivo de tejidos y órganos, micropropagación y multiplicación clonal de frutos, árboles forestales y plantas medicinales, conservación y evaluación de germoplasma, diagnóstico molecular de patógenos, marcadores moleculares y cultivo de plantas, prospección de genomas y biodiversidad, bioseguridad, ingeniería genética de las plantas, virología molecular, bioinformática y estadística, agrobiotecnología y percepción pública.



Intercambio de información	<ul style="list-style-type: none"> - Puesta en marcha de un portal web sobre agrobiotecnología. - Mantenimiento de un sistema de noticias sobre cursos, cargos, eventos, publicaciones y desarrollo de políticas. 	<ul style="list-style-type: none"> - Puesta en marcha del portal web www.redbio.org activo hasta 2011 y en proceso de rediseño, que ha recibido más de 18 000 visitas al mes y publicado 390 noticias desde 2003 (dos veces al mes).
	<ul style="list-style-type: none"> - Organización de bases de datos en línea sobre laboratorios, profesionales, investigadores, estudiantes, proyectos, protocolos de micropropagación y estudios de caso nacionales sobre investigación y desarrollo. 	<ul style="list-style-type: none"> - 738 archivos de investigadores, académicos y miembros de laboratorios privados de la REDBIO en 27 países, con información sobre áreas prioritarias de investigación y especies de cultivo, currículos, infraestructura, proyectos, tesis y publicaciones. - 5467 archivos de profesionales miembros de la REDBIO, con datos sobre actividades de investigación e innovación, marco regulatorio (bioseguridad y derechos de propiedad intelectual), educación y percepción pública. - 1327 archivos de datos sobre proyectos de agrobiotecnología.
	<ul style="list-style-type: none"> - Intercambio de germoplasma <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> entre miembros de la REDBIO, de conformidad con normas de bioseguridad. 	<ul style="list-style-type: none"> - 33 protocolos para la micropropagación de alimentos de campo, hortalizas, frutas, especies forestales y plantas ornamentales. - Cinco estudios de caso sobre investigación y desarrollo de agrobiotecnología en Argentina, Bolivia, Colombia, Ecuador y Perú. - Tres intercambios de cultivares seleccionados de <i>Allium sativum</i> (ajo), <i>Colocasia</i> sp. (cocoyam), <i>Dioscorea</i> sp. (yam) e <i>Ipomoea batata</i> (camote o boniato).
	<ul style="list-style-type: none"> - Realización de encuestas sobre percepción pública. 	<ul style="list-style-type: none"> - Provisión de apoyo a instituciones y realización de encuestas sobre percepción pública en Bolivia y Chile.
Proyectos	<ul style="list-style-type: none"> - Formulación y ejecución de proyectos de cooperación técnica en los ámbitos nacional y regional. 	<ul style="list-style-type: none"> - Proyecto Regional sobre Percepción Pública y Educación (perciREDBIO), financiado por CropLife y ejecutado en 2001-2003. - Proyecto Regional FAO TCP/RLA/2901: Sistema de Información sobre Agrobiotecnología para los Países de ALC (InfoREDBIO), ejecutado en 2003-2005. - Proyecto Regional sobre Educación en Agrobiotecnología (bioEDUCAR) para nueve países de Iberoamérica, financiado por el CYTED y ejecutado en 2007-2011. - Proyecto Regional FAO TCP/RLA/3109: Desarrollo de Herramientas Técnicas para la Gestión de la Bioseguridad en los Países Integrantes del MERCOSUR Ampliado, ejecutado en 2008-2010.
	<ul style="list-style-type: none"> - Realización de talleres de planeación para fijar prioridades e identificar fuentes de financiamiento. 	<ul style="list-style-type: none"> - Realización de un taller de planeación (Buenos Aires 2005) para la formulación de una propuesta de un consorcio para identificar genes, germoplasma y técnicas para mejorar la tolerancia de cultivos alimentarios prioritarios a la sequía y salinidad.

Fuente: REDBIO/FAO 2010.



Eventos regionales

Una de las acciones relevantes de la REDBIO es celebrar cada tres años un encuentro latinoamericano sobre biotecnología agropecuaria, lo que permite mantener vivo el espíritu de la Red. Dichos encuentros (cuadro 1.2), que se organizan en conjunto con instituciones nacionales y programas de biotecnología de los países huéspedes, representan la plataforma regional para el intercambio de información, la preparación de proyectos y la capacitación en biotecnología agropecuaria.

Cuadro 1.2. Encuentros Latinoamericanos y del Caribe sobre Biotecnología Agropecuaria (REDBIO/FAO).

	Caracas, Venezuela 1992 ^a	Iguazú, Argentina 1995	La Habana, Cuba 1998	Goiania, Brasil 2001	Boca Chica, República Dominicana 2004	Viña del Mar, Chile 2007	Guadalajara, México 2010
Participantes (países)	320 (-)	537 (28)	742 (36)	726 (32)	401 (34)	590 (22)	628 (23)
Becas	91	32	33	84	76	53	110
Carteles	-	320	575	356	413	465	321
Sesiones ^b	24	37	57	76	46	26	36
Presentaciones orales ^c	39	108	106	143	207	93	209
Total de trabajos presentados ^d	39	428	681	499	620	465	530

a Simposio "Biotecnología para el Mejoramiento de las Cosechas en América Latina y el Caribe (BIOCILA)", considerado como el Primer Encuentro Latinoamericano y del Caribe en Agrobiotecnología.

b Cantidad de conferencias plenarias, simposios técnicos, seminarios, talleres, mesas redondas, cursos y reuniones de coordinación realizadas en cada evento.

c Cantidad de presentaciones realizadas durante las conferencias plenarias, los simposios técnicos, los seminarios, los talleres, las mesas redondas, los cursos y las reuniones de coordinación.

d Cantidad de carteles y presentaciones orales.

Fuente: REDBIO/FAO 2010.

En seguimiento a los encuentros latinoamericanos, los países organizan encuentros nacionales enfocados en las capacidades y las prioridades nacionales, con el objetivo de fortalecer a la Red en cada país. Dichos encuentros brindan a los investigadores y los estudiantes de grado y posgrado la oportunidad de presentar sus trabajos en un espacio propicio para la discusión científica. También permiten evaluar la evolución del país en la aplicación de herramientas biotecnológicas para el mejoramiento vegetal y animal. Algunos de los encuentros que realizan los países tienen un matiz internacional, pues participan dos o más países vecinos. Encuentros nacionales se han realizado en Argentina (6), Cuba (5), Brasil (2), Bolivia (2), Ecuador (1), Paraguay (2), Uruguay (1) y Venezuela (1).

Los encuentros de la REDBIO han llegado a ser eventos de alta calidad técnica muchas veces equiparables con eventos similares de ámbito mundial. Los encuentros han posibilitado, a través de talleres de planificación y coordinación, tomar decisiones y/o preparar propuestas



sobre biofortificación, bioprospección, biotecnología para condiciones adversas, “granjas” moleculares, bioseguridad, propiedad intelectual, oportunidades en biocultivos, biotecnología animal y educación a distancia. Las actividades grupales han permitido brindar atención a diversos objetivos, tales como: i) crear y promover un escenario apropiado para la aplicación de biotecnología segura y sostenible en el país anfitrión (generación de un marco regulatorio de bioseguridad); ii) plantear los avances recientes de la biotecnología moderna; iii) aumentar la difusión y el conocimiento de la biotecnología y de la REDBIO en la región y fuera de ella; y iv) convocar y preparar propuestas de seguimiento en torno a ideas prioritarias para la aplicación segura de la biotecnología en la solución de problemas comunes de la producción y conservación de recursos fitogenéticos (declaraciones de intención política mencionadas en el cuadro 1.1). En los encuentros, se han abordado diversas áreas temáticas de relevancia en la biotecnología moderna (cuadro 1.3).

Cuadro 1.3. Áreas temáticas y cantidad de presentaciones en las áreas biotecnológicas relevantes realizadas en los encuentros REDBIO/FAO.

Áreas temáticas	1992	1995	1998	2001	2004	2007	2010 ^a
Investigación en biotecnología							
1. Micropropagación y cultivo de tejidos	2	3	14	6	6	10	88
2. Mejoramiento genético vegetal asistido por biotecnología (estrés abiótico y biótico, otros)	14	13	10	22	22	15	44
3. Transformación genética de plantas	6	17	18	6	17	7	13
4. Marcadores moleculares	1	6	22	4	20	6	32
5. Biodiversidad (incluye crioconservación), mapeo de genes, genómica y bioinformática	1	6	6	9	12	15	29
6. Control biológico (bioinoculantes)	4	-	14	-	3	2	24
7. Alimentos funcionales, biofortificación	1	6	-	-	4	7	19
8. Mejoramiento animal y animales transgénicos (granjas moleculares, acuicultura)	-	-	-	-	6	12	38
Desarrollo de marcos regulatorios							
9. Regulación de la bioseguridad (flujo génico, análisis de riesgo, marcos, normas)	-	-	-	3	9	7	18
10. Propiedad intelectual y patentes	-	-	3	3	2	3	4
11. Bioética	-	2	-	1	2	4	4
Educación en biotecnología							
12. Educación, percepción pública, información, formación de recursos humanos	-	-	-	6	9	10	12
Otro temas							
13. Biocombustibles	-	-	-	-	2	3	24
14. Bionegocios	-	13	-	2	4	7	4
15. Cooperación internacional (biotecnología, seguridad alimentaria)	6	20	-	3	1	9	18
16. Biotecnología forestal							33
Ciencias ómicas							
17. Genómica							13
18. Metabolómica							7
19. Metagenómica							2
20. Transcriptómica							4

^a Incluye los “carteles”.

Fuente: REDBIO/FAO 2010.



Digna de destacar es la fructífera relación establecida entre la REDBIO y tres *e-journals* (*Electronic Journal of Biotechnology*; *Journal of Plant Cell Tissue and Organ Culture*; y *Biotecnología Aplicada/Cuba*), que han fungido como canales de salida de nuevas publicaciones por medios electrónicos abiertos a los miembros de la Red. Asimismo, la acción conjunta de las instituciones miembros de la REDBIO potenció un buen relacionamiento de agencias (UNESCO), redes de cooperación (Latinoamericana de Botánica, Interamericana de Cítricos, de Biotecnología de la Yuca y CAMBIOTEC/Canadá), centros del CGIAR (CIAT, IPGRI e IRRI) e instituciones internacionales/regionales de investigación (CATIE, INIBAP, IRD, CIRAD, *John Innes Institute*, *Michigan State University*, *University of California-Davis*, *University of Gent*, INIA-España, Universidad de Valencia y Universidad Politécnica de Madrid, entre otros) con los grupos nacionales, lo que favoreció la investigación y/o transferencia de tecnología en temas prioritarios (complejo mosca blanca-geminivirus, certificación de materiales de propagación en cítricos, uso de marcadores en mejora genética forestal, etc.).

La REDBIO ha demostrado reiteradamente, dado su dinamismo, virtualidad y alta convocatoria, ser un modelo útil que se puede replicar en otras regiones. Existe interés de instituciones africanas (*African Biotechnology Network*) y de Europa del Este (propuesta de una red de la FAO en biotecnología/bioseguridad que integre a programas nacionales e instituciones de las ex Repúblicas Soviéticas) en reproducir el modelo de la Red como mecanismo de integración y cooperación técnica en agrobiotecnología, función que la FAO ha promovido hasta el presente mediante sus Divisiones de Producción de Cultivos, Forestales y Desarrollo Sostenible e Investigación.

La REDBIO ha realizado en forma directa gran cantidad de acciones concretas de capacitación, desarrollo de marcos normativos nacionales, acceso a becas, desarrollo de protocolos, estudios de caso y elaboración de proyectos y programas. Asimismo, de manera indirecta pero sostenida, la Red ha promovido el establecimiento de contactos entre estudiantes, investigadores, conferencistas, reguladores, empresarios y funcionarios gubernamentales, los cuales han resultado en innumerables becas, pasantías, viajes de estudio, intercambios de información, publicaciones conjuntas y acciones de intercambio y caracterización de germoplasma, genes y materiales biológicos, entre otras. Gracias a todo ello, la REDBIO, una red horizontal de conocimiento, sigue vigente luego de 22 años de actividad.

Referencias

- Ávila, T; Izquierdo, J. 2006. Management of the appropriate agricultural biotechnology for small producers: Bolivia case study. *Electronic Journal of Biotechnology* 9(1).
- Diamante, A; Izquierdo, J. 2004. Manejo y gestión de la biotecnología agrícola apropiada para pequeños productores: estudio de caso Argentina (en línea). Buenos Aires, AR. Disponible en http://www.argenbio.org/adc/uploads/pdf/manejo_y_gestion.doc.



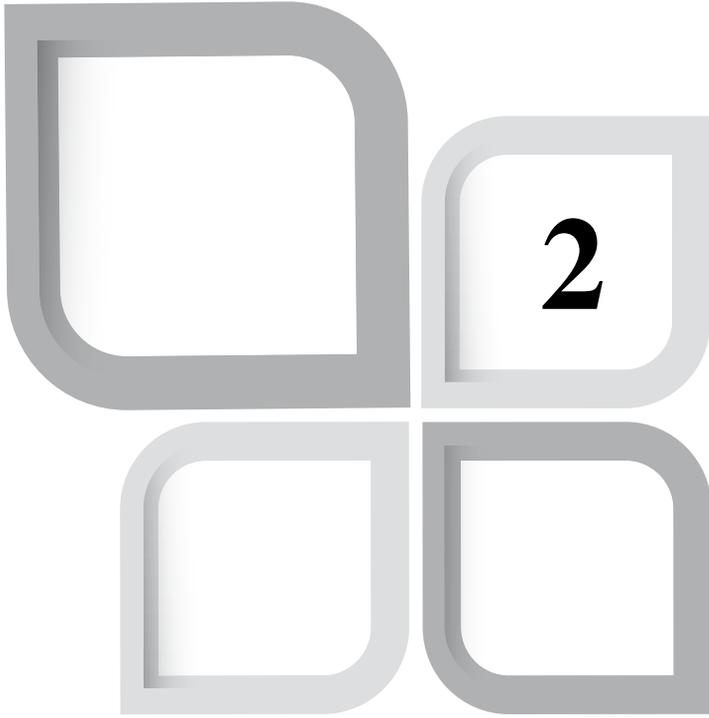
FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, IT). 2012a. Biotecnologías agrícolas en la agricultura, la silvicultura, la ganadería, la pesca y la agroindustria: asistencia técnica (en línea). Roma, IT. Disponible en <http://www.fao.org/biotech/fao-activities/technical-assistance/es/>.

_____. 2012b. Comunidad de las redes de conocimiento de la FAO (en línea). Roma, IT. Disponible en <http://www.fao.org/knowledge/networksandcommunities/es/>.

Schuler, I; Orozco, LA. 2006. Manejo y gestión de la biotecnología agrícola apropiada para pequeños productores: estudio de caso Colombia (en línea). Bogotá, CO. Disponible en <http://www.umoar.edu.sv/biblio/agricultura/biotecnologia/biotecnologia%20y%20peque%C3%B1os%20productores.pdf>.

Wendt, J; Izquierdo, J. 2003. Management of appropriate agricultural biotechnology for small producers: case study – Ecuador. *Electronic Journal of Biotechnology* 6(1).





Los recursos fitogenéticos y la importancia estratégica de su conservación en las Américas

Marleni Ramírez¹, Jesús Salcedo²

1. Bioversity International, Oficina Regional para las Américas, Cali, Colombia, m.ramirez@cgiar.org.

2. Bioversity International, Oficina Regional para las Américas, Cali, Colombia, jesusmariasalcedo@gmail.com.

Geografía, clima y culturas

La región de las Américas se caracteriza por una enorme variabilidad de geografía, climas, plantas y culturas indígenas, cuya combinación ha propiciado el desarrollo de una diversidad agrícola de gran importancia para la humanidad. Se considera que la domesticación de cultivos en las Américas ocurrió independientemente en cuatro áreas: el este norteamericano, Mesoamérica, la región andina y las llanuras tropicales de Sudamérica (Pickersgill 2007, Clement *et al.* 2010). Estudios recientes continúan mostrando evidencias del desarrollo de cultígenos muy tempranamente, tales como calabaza antes del año 9200 AP, maní antes del año 8000 AP y algodón antes del año 5500 AP (Dillehay *et al.* 2007). Con la diseminación de la agricultura en todo el hemisferio, las especies de cultivos también se dispersaron, evolucionando y adaptándose a las necesidades de las diferentes culturas y a las condiciones de los distintos climas. La agrobiodiversidad resultante, que incluye cultivares tradicionales, sus parientes silvestres y especies progenitoras, representa un vasto depósito de recursos genéticos. A pesar de la gran riqueza de la diversidad de los cultivos nativos, muchas especies exóticas como la caña de azúcar, el banano, el arroz, la soya, el sorgo, el café, el trigo, los cítricos y las gramíneas forrajeras hoy tienen gran importancia económica en las Américas y constituyen la base agrícola de muchos países de la región.

Conservación a largo plazo

Esa gran diversidad y riqueza de especies vegetales, cultivares tradicionales, especies forestales y frutales promisorios representa un gran potencial de servicios y bienes para la región y sus habitantes. Sin embargo, el cultivo y la conservación de muchas de esas especies se dificultan debido a problemas asociados con la producción o manipulación de la semilla y su almacenamiento. Por ejemplo, las semillas de una gran proporción de especies de árboles tropicales pierden viabilidad muy rápidamente y mueren poco después de haber sido recogidas del árbol (Theilade *et al.* 2004). Es esencial, por lo tanto, implementar prácticas efectivas y eficientes dirigidas a la conservación de esas especies, las que beneficiarán a las poblaciones de la región y, en general, a la humanidad.

Durante la última década, varias instituciones de carácter nacional e internacional han iniciado importantes esfuerzos dirigidos al rescate y uso de esa gran biodiversidad, principalmente mediante la aplicación de nuevas técnicas que representen una solución viable y segura para la conservación a largo plazo de los recursos fitogenéticos tropicales (Engelmann y Takagi 2000). En 1998, el Centro Internacional de Investigación para las Ciencias Agrícolas del Japón (JIRCAS) y el Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI) realizaron el Taller Internacional sobre Crioconservación en Especies Tropicales, que fue atendido por una gran cantidad de participantes, incluidos varios representantes de Argentina, Chile, Colombia, Costa Rica y Perú. En 1999, Bioersity International (antes IPGRI) y el Centro de Semillas Forestales (CFSD) de la Agencia Danesa para el Desarrollo Internacional (DANIDA), en conjunto con institutos nacionales, iniciaron un proyecto sobre la manipulación y el almacenamiento de semillas de 30 especies forestales tropicales de interés económico, en el cual participaron más de 20 socios nacionales que trabajaron juntos para clasificar la tolerancia a la desecación y el comportamiento en almacenamiento de esas especies. Los resultados demostraron que



muchas de las especies son menos difíciles de conservar que lo esperado y que ligeras modificaciones de los procedimientos pueden llevar a períodos más prolongados de almacenamiento seguro (Theilade *et al.* 2004). Aunque los resultados obtenidos brindaron soluciones para el uso a mediano plazo de estas especies, el vacío en la conservación a largo plazo continúa siendo una gran interrogante.

Crioconservación

Dentro de las técnicas de conservación a largo plazo, la crioconservación es una técnica que, mediante la utilización de temperaturas ultra bajas producidas generalmente a través del uso de nitrógeno líquido (-196° C), provoca el cese de la división celular y de la mayoría de los procesos metabólicos y físicos. Esta técnica, desarrollada a partir de la década de los setenta, y el cultivo *in vitro* representan con frecuencia las únicas opciones seguras para la conservación a largo plazo de los recursos fitogenéticos de aquellas especies que tienen semillas recalcitrantes o que se propagan vegetativamente (Panis y Lombardi 2005, Khoury *et al.* 2010).

Muchos han sido los protocolos que se han desarrollado para la crioconservación de dichos recursos, lo que se puede realizar mediante la utilización de semillas, embriones cigóticos, muestras de tejidos, yemas apicales, meristemos, etc. (Engelmann 2003, Reed 2008). Sin embargo, todos esos materiales contienen, en estado fresco, altas cantidades de agua en sus células; además, la gran mayoría de ellos son extremadamente sensibles a la congelación o incluso no pueden tolerarla. Para evitar los daños que causa la cristalización del agua intracelular, las células de los tejidos deben ser deshidratadas o protegidas de alguna manera (Meryman y Williams 1985). Por esta razón, en las últimas décadas esta técnica ha evolucionado, lo que ha resultado en diversos métodos que se aplican según la especie y la parte que se desee conservar, tales como la inmersión directa en nitrógeno líquido, la deshidratación, la encapsulación-deshidratación, la vitrificación, la encapsulación-vitrificación, el precrecimiento, etc. (Engelmann y Takagi 2000, Sakai 1995, Panis 1995, Engelmann 1997 y 2004, Gonzalez-Arnao *et al.* 2008).

Comparada con otras técnicas, la crioconservación presenta ventajas muy favorables en cuanto a la optimización de costos y procesos. Desde que el material se almacena en tanques, el espacio para mantener la colección resulta ser mucho menor, el costo para labores y mantenimiento es mínimo (solamente el llenado continuo del tanque) y, una vez almacenadas las muestras, estas no se manipulan, lo que disminuye significativamente los costos de regeneración (Villalobos y Engelmann 1995). Muchos de los bancos de germoplasma que existen en los trópicos carecen de suficiente capacidad para albergar un gran número de muestras, debido a lo cual dejan por fuera gran parte de la biodiversidad de esas regiones. Ese hecho, sumado a la difícil manipulación del germoplasma de algunas especies tropicales, hace que la crioconservación se profile como una solución a los desafíos de la conservación a largo plazo de especies en países en vía de desarrollo (Abdelnour 1999).

Desde 1990, el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) ha avanzado, con el apoyo de otras instituciones, en el desarrollo de técnicas y protocolos exitosos para crioconservar especies como bananos y plátanos (*Musa* spp.),



café (*Coffea* spp.), chontaduro (*Bactris gasipaes*), cacao (*Theobroma cacao*) y chayote (*Sechium edule*) (Abdelnour 1999, Abdelnour y Engelman 2002, Frison *et al.* 2006, Dussert *et al.* 2007). Al igual que ese Centro, otras instituciones se han dedicado al desarrollo de proyectos pilotos de investigación enfocados en crear protocolos para crioconservar especies cultivadas y silvestres propias de las Américas. Por ejemplo, el banco de germoplasma del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) de Argentina, en el que se conservan importantes variedades de papas andinas del Noreste de ese país, ha empezado a utilizar técnicas de vitrificación como método para conservar esas variedades de papa, a fin de establecer a mediano plazo un criobanco. Ese método, que ha sido empleado con éxito en el género *Solanum*, pareciera ser el más adecuado en el momento de crioconservar (Digilio 2007).

Recientemente se han evaluado otras técnicas, como la inmersión directa de semillas en nitrógeno líquido, para la crioconservación de otras especies de ese género, como es el caso de *Solanum betaceum* (tomate de árbol), un frutal promisorio de la región andina de alto impacto económico (Montoya 2000, Salcedo 2003). En Colombia, la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA) mantiene aproximadamente 60 accesiones de esta especie conservadas en el campo, con un respaldo en un banco de semillas a -20 °C (Knudsen 2000). Pese a que las semillas de esta especie presentan un comportamiento ortodoxo, el mantenimiento de la colección podría tener dificultades de manejo en el futuro, teniendo en cuenta el gran auge de esta especie en los últimos años; por otra parte, el comportamiento de las semillas frente al almacenamiento de sus parientes silvestres aún es incierto. Dado lo anterior, la crioconservación podría constituir una alternativa viable para el mantenimiento de esa colección.

En Bolivia, el Centro de Investigaciones Fitogenéticas de Pairumani (CIFP) cuenta con una importante colección de Pasifloras andinas (tanto especies cultivadas como parientes silvestres). Esta colección inicialmente se mantenía en el campo y en el caso de algunas especies en forma de semillas. Debido a problemas de pérdida de diversidad y exposición a enfermedades, en los últimos años el CIFP ha enfocado esfuerzos en el establecimiento de una colección *in vitro*, a la que han migrado la gran mayoría de materiales y ha representado una excelente solución a mediano plazo (Ávila *et al.* 2007). Esta iniciativa podría ser el paso previo de una colección crioconservada, teniendo en cuenta que ya se han reportado algunos avances en el desarrollo de técnicas de crioconservación para especies de Pasifloras, como los reportados por Ospina *et al.* (2000).

Por otra parte, más de 40 géneros y 60 especies de plantas leñosas tropicales han sido objeto de estudio para lograr protocolos viables de crioconservación (Abdelnour-Esquivel *et al.* 2007; Toribio *et al.* 2000, citado por Martínez-Ruiz *et al.* 2003). En esta área, el Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR) ha estudiado la conservación de especies forestales maderables y no maderables con resultados exitosos mediante el uso del método de desecación y congelamiento rápido en nitrógeno líquido para frutos y semillas de especies de alta importancia, como melina (*Gmelina arborea*), teca (*Tectona grandis*), pilón (*Hyeronima alchorneoides*), saman (*Pithecellobium saman*) y madero negro (*Gliricidia sepium*). Los resultados obtenidos mostraron el gran potencial de esa técnica para continuar las investigaciones en especies cercanas y para el establecimiento de colecciones (Aguilar y Abdelnour-Esquivel 2010).



Los avances logrados en el Centro Internacional de la Papa (CIP) y el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), que forman parte del sistema del Grupo Consultivo sobre Investigación Agrícola Internacional (CGIAR), se presentan en detalle en artículos subsecuentes de la presente publicación.

Aunque se observa gran interés en el tema de la conservación a largo plazo y, en particular, de la crioconservación, muchas de las investigaciones que se adelantan en América Latina, como por ejemplo el desarrollo y perfeccionamiento de protocolos, obedecen a necesidades e intereses particulares de las colecciones e instituciones que las albergan. El reciente desarrollo de estrategias para la conservación de recursos fitogenéticos, tanto de ámbito regional como para cultivos específicos, se presenta como una oportunidad para desarrollar un plan común de acción para la crioconservación de especies de interés regional. Dichas estrategias están actualmente disponibles en el sitio web del Fondo Mundial para la Diversidad de los Cultivos (GCDT 2008).

Estrategia Hemisférica de Conservación de Recursos Fitogenéticos en las Américas

Indudablemente uno de los avances más importantes a nivel regional de los últimos años lo constituye la elaboración de la Estrategia Hemisférica de Conservación de Recursos Fitogenéticos en las Américas, mediante la cual se busca preservar dichos recursos de manera integrada, realista y práctica para la alimentación y la agricultura en esa región. Dicha estrategia es vital para identificar las metas del desarrollo de la conservación de los recursos genéticos en la región, en especial de los cultivos incluidos en el Tratado Internacional sobre los Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura, aunque también considera otros cultivos. Más de 100 participantes afiliados a las seis redes de recursos fitogenéticos —Red Norteamericana de Recursos Fitogenéticos (NORGEN), Red de Recursos Fitogenéticos del Caribe (CAPGERNET), Red Mesoamericana de Recursos Fitogenéticos (REMERFI), Red Andina de Recursos Fitogenéticos (REDARFIT), Red Amazónica de Recursos Fitogenéticos (TROIPIGEN) y Red de Recursos Genéticos del Cono Sur (REGENSUR)— e instituciones regionales participaron en el proceso de desarrollo de la Estrategia, que servirá de guía para el uso y conservación de los recursos fitogenéticos en años venideros (Ramírez 2008).

Cultivos importantes a nivel regional identificados por la Estrategia

Los representantes de las seis redes subregionales de recursos fitogenéticos mencionadas evaluaron la importancia relativa de los cultivos en sus respectivas áreas geográficas, para lo cual utilizaron criterios acordados mutuamente. Aunque la evaluación no fue un proceso científico muy riguroso, sí constituye una primera aproximación a una priorización de los cultivos y un hito de referencia para la toma de futuras decisiones. Los 20 cultivos más importantes de las Américas (de un total de 85) fueron los siguientes: *Phaseolus*, *Capsicum*, *Zea*, *Manihot esculenta*, *Arachis*, *Glycine*, *Lycopersicon*, *Theobroma*, *Musa*, *Citrus*, *Solanum*, *Oryza*, *Ipomoea*, *Coffea*, *Vigna*, *Triticum*, *Passiflora*, *Hordeum*, *Sorghum* y *Bactris*. Asimismo, los miembros de las redes enumeraron no menos de 193 colecciones de cultivos específicos, entre los que se encuentran *Arachis*, *Avena*, *Capsicum*, *Cucurbita*, *Glycine*, *Hordeum*, *Ipomoea*, *Linum*, *Lycopersicon*, *Malus*,



Manihot esculenta, *Musa*, *Oryza*, *Phaseolus*, *Solanum*, *Triticum* y *Zea*. Uno de los objetivos de la estrategia es desarrollar métodos apropiados de crioconservación.

Representantes de las redes sobre cultivos específicos, como la Red de Investigación y Desarrollo de Banano y Plátano para América Latina y el Caribe (MUSALAC), el Programa Regional Cooperativo de Papa (PRECODEPA), la Red Centroamericana de Cultivos Hortícolas (REDCAHOR) y el Programa Cooperativo Regional para el Desarrollo Tecnológico de la Caficultura en Centroamérica, Panamá, República Dominicana y Jamaica (PROMECAFE) ejecutan actividades de conservación de recursos fitogenéticos y han participado en el desarrollo de las estrategias por cultivo. En las estrategias de planificación de algunas redes, como es el caso de MUSALAC, se menciona la crioconservación como una metodología de gran importancia (INIBAP 2006).

Para aprovechar el gran potencial de la crioconservación para conservar recursos genéticos a largo plazo en las Américas, es necesario aunar esfuerzos de una manera coordinada e integral, pues las valiosas acciones que a la fecha se han realizado para desarrollar metodologías de crioconservación de determinadas especies han sido el resultado de situaciones coyunturales o del interés de un laboratorio en ciertas especies.

Las agendas de trabajo de las redes de recursos fitogenéticos ya incluyen, entre sus actividades prioritarias, el desarrollo de mecanismos de conservación a largo plazo (Henríquez y Hernández 2004, Ferreira *et al.* 2005); además, las estrategias de conservación han identificado a la crioconservación como un método prioritario. Quedaría por tomar el siguiente paso: desarrollar nuevos protocolos con los socios de las redes y/o modificar los existentes, para luego aplicarlos a especies de importancia priorizadas a nivel regional.

Referencias

- Abdelnour, A. 1999. Crioconservación de plantas, estado actual de la investigación en Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 23(2):205-214.
- _____; Engelmann, F. 2002. Cryopreservation of chayote (*Sechium edule* Jacq. Sw.) zygotic embryos and shoot tips from *in vitro* plantlets. *CryoLetters* 23:299-308.
- _____; Rojas, G; Alfaro, U. 2007. Estudios preliminares para la crioconservación de especies forestales arbóreas. *Tecnología en Marcha* 20(1):98-103.
- Aguilar, ME; Abdelnour Esquivel, A. 2010. Desarrollo de modelos para la crioconservación de semillas y material clonal de especies forestales de Costa Rica en peligro de extinción y seleccionadas en los programas de mejoramiento genético (en línea). *Boletín de Ciencia y Tecnología (CONICIT)* No. 99. Disponible en <http://www.conicit.go.cr/boletin/boletin99/PalabrasMariaElenaAguilar.html>. Consultado 17 feb. 2011.
- Ávila, T; Barra, S de la; Coca, N; Guevara, N; Céspedes, J; Guzmán, L. 2007. Multiplicación y conservación *in vitro* de pasifloras andinas. *In Avances de investigación en recursos*



- genéticos en el Cono SurII/PROCISUR, IICA. Montevideo, UY, PROCISUR, IICA. p. 129-137.
- Clement, CR; Cristo-Araujo, M de; Coppens d'Eeckenbrugge, G; Alves Pereira, A; Picanco-Rodriguez, D. 2010. Origin and domestication of native Amazonian crops. *Diversity* 2:72-106.
- Digilio, A. 2007. Crioconservación de variedades nativas de papa. *In* Avances de investigación en recursos genéticos en el Cono SurII/PROCISUR, IICA. Montevideo, UY, PROCISUR, IICA. p. 163-167.
- Dillehay, TD; Rossen, J; Andres, T; Williams, D. 2007. Pre-ceramic adoption of peanut, squash, and cotton in Northern Peru. *Science* 316:1890-1893.
- Dussert, S; Vasquez, N; Salazar, K; Anthony, F; Engelmann, F. 2007. Cryopreservation of coffee genetic resources. *In* Engelmann, F; Dulloo, ME; Astorga, C; Dussert, S; Anthony, F. eds. Complementary strategies for ex situ conservation of coffee (*Coffea arabica* L.) genetic resources: a case study in CATIE, Costa Rica (Topical reviews in Agricultural Biodiversity. Roma, IT, Bioversity International. p. 49-58.
- Engelmann, F. 1997. Importance of desiccation for the cryopreservation of recalcitrant seed and vegetative propagated species. *Plant Genetic Resources Newsletters* 112:9-18.
- _____. 2003. Plant cryopreservation: current status, prospects and limitations. *In* Mandal, BB; Chaudhury, F; Engelmann, F; Bahag Mal Tao, KL; Dhillon, BS. eds. Conservation biotechnology of plant germplasm. Nueva Delhi, IN, NBPGR; Roma, IT, IPGRI; Roma, IT; FAO. p. 223-228.
- _____. 2004. Plant cryopreservation: progress and prospect. *In Vitro Cellular and Developmental Biology* 40:427-433.
- _____; Takagai, H. eds. 2000. Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application. Tsukuba, JP, Japan International Research Center for Agricultural Sciences; Roma, IT, IPGRI.
- Ferreira, MAJ; Wetzel, MVS; Valois, ACC; Macedo, J. 2005. El estado del arte de los recursos fitogenéticos en las Américas: conservación, caracterización y utilización. Brasilia, BR, EMBRAPA, Recursos Genéticos y Biotecnología. 100 p.
- Frison, E; Dulloo, E; Engelmann, F; Planchenault, D; Snook, L. 2006. Contributions to overcoming challenges to the conservation of plant and animal genetic resources. *In* Rocchi, D. ed. France and the CGIAR: delivering scientific results for the agricultural development. Washington, D.C., CIAGR. p. 18-23.
- GCDT (Global Crop Diversity Trust, IT). 2008. Global Crop Diversity Trust. A Foundation for Food Security (en línea). Disponible en <http://www.croptrust.org> Consultado 17 feb. 2011.

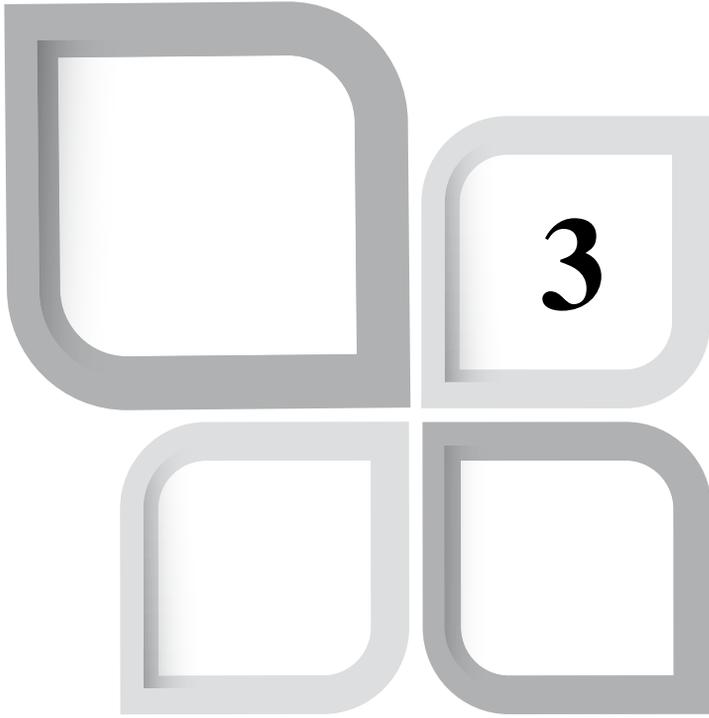


- Gonzalez-Arnao, MT; Panta, A; Roca, WM; Escobar, RH; Engelmann, F. 2008. Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. *Plan Cell Tissue and Organ Culture* 92:1-13.
- Henríquez, P; Hernández, JM. 2004. Organización regional para la conservación y el uso de los recursos fitogenéticos nativos de Mesoamérica. ISNAR Briefing Paper 70:1-8.
- INIBAP (Red Internacional para el Mejoramiento del Banano y el Plátano, FR) 2006. Global conservation strategy for *Musa* (banana and plantain) (en línea). Disponible en www.croptrust.org/documents/web/Musa-Strategy-FINAL-30Jan07.pdf. Consultado 17 feb. 2011.
- Khoury, C; Laliberte, B; Guarino, L. 2010. Trends in *ex situ* conservation of plant genetic resources: a review of global crop and regional conservation strategies. *Genetic Resources and Crop Evolution* 57:625-639.
- Knudsen, H. 2000. Directorio de colecciones de germoplasma en América Latina y el Caribe. Roma, IT, IPGRI.
- Martínez-Ruiz, R; Azpiroz, HS; Rodríguez, JL; Cetina, V; Gutiérrez, MA. 2003. Aplicación de biotecnología en los recursos genéticos forestales. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 9(1):17-34.
- Meryman, HT; Williams, RJ. 1985. Basic principles of freezing injury to plant cells: natural tolerance and approaches to cryopreservation. In Kartha, KK. ed. *Cryopreservation of plant cells and organs*. Boca Raton, US, CRC Press. p. 13-14.
- Montoya JE; Escobar, R; Debouck, D. 2000. Development of a freezing methodology in liquid nitrogen of tree tomato (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt) seeds (en línea). Disponible en <http://www.ciat.cgiar.org/ourprograms/Agrobiodiversity/Documents/biotechnology/texto.pdf>. Consultado 17 feb. 2011.
- Ospina, JA; Guevara, C; Caicedo, LE; Barney, V. 2000. Effects of moisture content on *Passiflora* seed viability after immersion in liquid nitrogen. In Engelmann, F; Hiroko, T. eds. *Cryopreservation of tropical plant germplasm: current research progress and application*. Tsukuba, JP, Japan International Research Center for Agricultural Sciences; Roma, IT, IPGRI. p. 378-381.
- Panis, B. 1995. Cryopreservation of banana (*Musa* spp.) germplasm. *Disertationes de Agricultura*. Lovaina, BE, Katholieke Universiteit Leuven.
- _____; Lombardi, M. 2005. Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees) (en línea). In International workshop "The Role of Biotechnology for the Characterisation and Conservation of Crop, Forestry, Animal and Fishery Genetic Resources" (2005, Turín, IT, FAO). Disponible en <http://www.fao.org/biotech/docs/panis.pdf>. Consultado 17 feb. 2011.



- Pickersgill, B. 2007. Domestication of plants in the Americas: insights from Mendelian and molecular genetics. *Annals of Botany* 100:925-940.
- Ramírez, M. 2008. Redes de recursos fitogenéticos en las Américas. *Recursos Naturales y Ambiente* 53:85-92.
- Reed, BM. ed. 2008. *Plant cryopreservation: a practical guide*. Springer Science. 513 p.
- Sakai, A. 1995. Cryopresevation for germplasm collection in woody plants. *In* Jain, S; Gupta, P; Newton, R. eds. *Somatic embryogenesis in woody plants vol. 1*. Dordrecht, NL, Kluwer Academics Publishers. p. 293-315.
- Salcedo, JM. 2003. Comparación de protocolos de conservación de semillas de *Solanum betaceum* y *Urochoa humidicola*. Trabajo de grado. Cali, CO, Universidad del Valle.
- Theilade, I; Port, L; Engels, J. 2004. *Ex situ* conservation through storage and use. *In* FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, IT), FLD (Forest & Landscape Denmark), IPGRI (Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, IT). *Forest genetic resources conservation and management*. Vol. 3: *In plantations and genebanks (ex situ)*. Roma, IT, IPGRI. p. 47-60.
- Villalobos, VM; Engelmann, F. 1995. *Ex situ* conservation of plant germoplasm using biotechnology. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 11:375-380.





Introducción a la conservación *ex situ* de los recursos genéticos vegetales

Florent Engelmann¹,
María Teresa González-Arno²

1. Instituto de Investigación para el Desarrollo (IRD), Montpellier, Francia, florent.engelmann@ird.fr.

2. Facultad de Ciencias Químicas de Orizaba, Universidad Veracruzana, Veracruz, México, mtgarnao1@hotmail.com, teregonzalez@uv.mx.

La conservación de la biodiversidad vegetal depende del uso de dos estrategias básicas de conservación, la *in situ* y la *ex situ*. De acuerdo con la Convención sobre la Diversidad Biológica (ONU 1992), la conservación *in situ* se refiere a la conservación de los ecosistemas y hábitats naturales y al mantenimiento y recuperación de poblaciones viables de especies, tanto cultivadas o domesticadas, en los alrededores en donde hayan desarrollado sus propiedades distintivas. La conservación *ex situ* se entiende como la conservación de los componentes de la diversidad biológica fuera de su hábitat natural. Este tipo de conservación es particularmente apropiada para especies cultivadas y sus parientes silvestres, mientras que la conservación *in situ* es especialmente apropiada para las especies silvestres y variedades locales de una granja, parcela agrícola o terreno.

Hasta hace poco tiempo, la mayoría de los esfuerzos dedicados a la conservación, aparte de los trabajos realizados en recursos genéticos forestales, se habían centrado en los métodos *ex situ*, particularmente en bancos de semillas. Entre 1950 y 1960, los avances logrados en el mejoramiento vegetal trajeron consigo la revolución verde, la cual resultó en la adopción a gran escala de variedades de alto rendimiento y cultivares genéticamente uniformes de cultivos básicos, particularmente trigo y arroz. En consecuencia, la preocupación mundial por la pérdida de la diversidad genética de estos cultivos aumentó, ya que los agricultores abandonaron el cultivo de sus variedades adaptadas localmente y variedades tradicionales, sustituyéndolas por otras mejoradas, modernas y genéticamente uniformes. En respuesta a esta preocupación, los centros de investigación agrícola internacional del Grupo Consultivo para la Investigación Agrícola Internacional (CGIAR) comenzaron a reunir colecciones de germoplasma de las especies cultivadas más importantes consideradas en sus respectivos mandatos. En ese contexto, en 1974 se estableció el Consejo Internacional para los Recursos Genéticos Vegetales (IBPGR, por sus siglas en inglés) para coordinar el esfuerzo conjunto de coleccionar sistemáticamente y conservar la diversidad genética vegetal amenazada a nivel mundial (Engelmann y Engels 2002).

Actualmente, como resultado de esa acción global, existen más de 1750 bancos de germoplasma a nivel internacional. Aproximadamente 130 de ellos mantienen más de 10 000 accesiones cada uno, lo que hace que se conserven aproximadamente 7.4 millones de accesiones (FAO 2009). Adicionalmente, en el mundo existen más de 2500 jardines botánicos, que mantienen importantes colecciones *ex situ* con cerca de 4 millones de accesiones de más de 80 000 especies. Los jardines botánicos y los bancos de germoplasma agrícolas deben jugar un rol complementario en el marco de la conservación *ex situ* de la biodiversidad vegetal (Engels y Engelmann 1998). Sin embargo, es importante resaltar que estas actividades de colecta y conservación se centraron en gran medida en algunos de los principales cultivos alimentarios, incluidos cereales y ciertas leguminosas; es decir, especies que se pueden conservar fácilmente como semilla. Esto ha dado lugar a una representación excesiva de estas especies en los bancos más importantes del mundo, así como al hecho de que las estrategias de conservación tiendan a favorecer a dichos materiales. Tan solo recientemente, con el establecimiento de bancos genéticos en el campo, se ha logrado conservar especies para las cuales el almacenamiento de semillas no es apropiado o es simplemente imposible. De igual manera, no fue sino hasta hace poco que la comunidad internacional ha prestado atención al desarrollo de nuevas tecnologías de almacenamiento, incluidas la conservación *in vitro* y la crioconservación (Engelmann y Engels 2002).



Materiales problemáticos para la conservación *ex situ* de la biodiversidad vegetal

Muchos de los alimentos que se consumen en el mundo provienen de plantas que producen semillas tolerantes a la desecación intensa y que pueden ser almacenadas, durante períodos muy prolongados, deshidratadas a bajas temperatura. Las semillas de ese tipo se denominan ortodoxas (Roberts 1973). Su almacenamiento es el método más practicado para la conservación *ex situ* de los recursos genéticos vegetales: alrededor del 90 % de los 7.4 millones de accesiones almacenadas *ex situ* se mantienen como semilla.

Sin embargo, un número considerable de plantas, predominantemente de origen tropical o subtropical, tales como el coco, el cacao y muchas especies forestales y árboles frutales, producen semillas que son incapaces de resistir la desecación y que a menudo también son muy sensibles al frío (Chin 1988). Por consiguiente, no pueden ser mantenidas bajo las condiciones de almacenamiento de semillas convencionales anteriormente descritas, o sea, almacenadas con un contenido bajo de humedad y a una baja temperatura. A las semillas de ese tipo se les llama recalcitrantes y deben mantenerse en condiciones relativamente cálidas y de altas humedades para que conserven su viabilidad (Roberts 1973, Chin y Roberts 1980). Además, aunque las semillas recalcitrantes sean almacenadas de una manera óptima, su vida útil se limita a semanas y ocasionalmente a meses.

Investigaciones más recientes también han identificado especies cuyas semillas exhiben un comportamiento intermedio frente al almacenamiento. Estas son semillas que pueden tolerar la desecación a un contenido considerablemente bajo de humedad, pero una vez secas se vuelven particularmente susceptibles al daño causado por la baja temperatura (Ellis *et al.* 1990, 1991). Dentro de la categoría de semillas con comportamiento intermedio, existe a su vez un grado muy variable de sensibilidad a la desecación, por lo que pueden encontrarse desde algunas muy sensibles hasta otras relativamente tolerantes (Berjak y Pammenter 1994). Por consiguiente, esto constituye un impedimento y se hace igualmente imposible lograr su conservación a largo plazo bajo el régimen de los bancos de semillas ortodoxas.

Hay otras especies vegetales para las cuales la conservación como semilla resulta problemática. En primer lugar, están aquellas que no producen semillas en absoluto y, por consiguiente, se propagan vegetativamente, como el banano y el plátano (*Musa* spp.). En segundo lugar, existen cultivos como la papa (*Solanum tuberosum*), otras raíces y tubérculos —como el ñame (*Dioscorea* spp.), la yuca (*Manihot esculenta*) y el camote (*Ipomoea batatas*)— y la caña de azúcar (*Saccharum* spp.) que tienen genotipos estériles y/o algunos que producen semillas ortodoxas. Sin embargo, estas semillas son altamente heterocigóticas y, por tanto, de una utilidad limitada para la conservación de genotipos específicos. Estos cultivos generalmente se propagan vegetativamente para mantenerse como clones.

Otras categorías de materiales problemáticos, en cuanto a las posibilidades de garantizar su almacenamiento, incluyen las especies amenazadas y raras, así como los productos biotecnológicos que resultan de los programas de hibridación somática e ingeniería genética (González-Arno *et al.* 2009, Engelmann 2010a).



Tradicionalmente, el banco de germoplasma en el campo ha sido el método de almacenamiento *ex situ* de elección para los materiales problemáticos antes mencionados. De acuerdo con el primer Reporte sobre el Estado Mundial de los Recursos Genéticos Vegetales para la Agricultura y la Alimentación (FAO 1996), alrededor de 527 000 accesiones han sido mantenidas en bancos de germoplasma en el campo hasta el momento, y aunque este número ha aumentado desde 1996, no se precisan los datos presentados en el segundo reporte de la FAO (FAO 2009). En cierto modo, este método ofrece un enfoque satisfactorio bajo este marco de conservación. Los recursos genéticos son accesibles y pueden ser fácilmente observados, lo que permite una evaluación sistemática y detallada de ellos.

Sin embargo, existen ciertos inconvenientes que limitan su eficacia y ponen en peligro su seguridad (Withers y Engels 1990, Engelmann 1997). Los recursos genéticos están expuestos a plagas, enfermedades y otros peligros naturales como la sequía, los daños climatológicos, los errores humanos y el vandalismo. Adicionalmente, no se encuentran en una condición que sea fácilmente propicia para el intercambio de germoplasma, debido a los grandes riesgos de transmisión de enfermedades a través del intercambio de material vegetativo. Por otra parte, los bancos de germoplasma en el campo son costosos de mantener, lo que los hace propensos a decisiones económicas que pueden limitar la replicación de las accesiones, incidir en la calidad del mantenimiento e incluso amenazar la propia supervivencia en tiempos de restricción económica. Bajo las mejores circunstancias, los bancos de germoplasma en el campo requieren el uso de grandes extensiones de tierra (a menudo necesitan varios sitios que se puedan utilizar en forma rotatoria), son muy laboriosos e implican muchas acciones de gestión, administración y adquisición de materiales. Además, su capacidad para garantizar el mantenimiento de tanta diversidad es limitada.

A la luz de los problemas descritos para las diferentes categorías de especies de plantas, no es de extrañar que se hayan hecho grandes esfuerzos por mejorar la calidad y la seguridad de la conservación que ofrecen los bancos de germoplasma en el campo, así como también por tratar de comprender y superar la recalcitrancia de las semillas para hacer más factible la opción del almacenamiento de semillas. Sin embargo, está claro que son necesarios diferentes enfoques alternativos para garantizar la conservación genética de estos materiales problemáticos. A partir de principios de los años setenta, la atención se centró en las posibilidades que ofrece la biotecnología y, específicamente, el cultivo de tejidos o cultivo *in vitro*.

Nuevos enfoques para la conservación

Durante los últimos 40 años, las técnicas de cultivo *in vitro* han sido ampliamente desarrolladas y aplicadas a más de 1000 especies diferentes (George 1996). Las técnicas de cultivo de tejidos son de gran interés para la recolección, multiplicación y almacenamiento del germoplasma vegetal (Engelmann 1991). Los sistemas de cultivo de tejidos permiten la propagación del material con altas tasas de multiplicación en un ambiente aséptico y la obtención de plantas libres de virus a través del cultivo de meristemas en combinación con la termoterapia, lo que a su vez garantiza la producción de reservas libres de enfermedades y simplifica los procedimientos de cuarentena para el



intercambio internacional de germoplasma. La “miniaturización” de los explantes *in vitro* permite reducir los requerimientos de espacio y, consecuentemente, los costos en mano de obra para el mantenimiento de grandes colecciones de germoplasma.

Sin embargo, las tasas de multiplicación que pueden alcanzarse mediante los procedimientos *in vitro* son elevadas y conducen regularmente a la producción abundante de material a corto plazo, lo que a su vez crea problemas para el manejo de extensas colecciones *in vitro*. Adicionalmente, en cada subcultivo existe el riesgo potencial de que se dé una pérdida por contaminación o un error humano y, más importante aún, de que se pierda la integridad genética del material debido a la variación somaclonal que se induce cuando se practica el cultivo de tejidos por periodos prolongados (Scowcroft 1984). Por consiguiente, la implementación de procedimientos *in vitro* para reducir esos inconvenientes y garantizar, de esa manera, el mantenimiento de la estabilidad genética se convirtió en un reto de imperiosa necesidad.

Diferentes métodos de conservación *in vitro* se han desarrollado y empleado dependiendo de la duración del almacenamiento requerida (Engelmann 1991). Para la conservación a corto y mediano plazos, el objetivo es reducir el crecimiento e incrementar los intervalos entre los subcultivos. Para el almacenamiento a largo plazo, la criopreservación —es decir, el almacenamiento de material a una temperatura ultra baja, por lo general inmerso totalmente en nitrógeno líquido (-196 °C)— es el único método utilizado actualmente. A esa temperatura, la división celular y todos los procesos metabólicos se detienen. El material vegetal puede así ser almacenado sin alteración o modificación por periodos de tiempos muy prolongados. Además, los cultivos se almacenan en una cantidad pequeña y protegidos de la contaminación, por lo que se requiere un mantenimiento muy limitado. Para atender una colección criopreservada, no se necesita mucho personal especializado ni una extensa superficie para crear un banco. La condición indispensable, una vez establecido el procedimiento criogénico, es simplemente mantener el nivel adecuado del nitrógeno líquido en los termos de almacenamiento. Para ello generalmente se acoplan alarmas a los contenedores que indican el momento en que deben ser rellenados (González-Arno *et al.* 2009). Es importante darse cuenta de que la criopreservación representa en la actualidad la única opción segura y rentable para la conservación a largo plazo de todas las categorías de especies problemáticas.

Criopreservación

Técnicas disponibles de criopreservación

La criopreservación vegetal es una disciplina científica relativamente nueva. De hecho, hace tan solo cincuenta años de que el profesor Akira Sakai demostró que ciertas yemas latentes podrían resistir la inmersión directa en el nitrógeno líquido (1960), y fue en 1968 cuando se publicó el primer reporte sobre criopreservación de material vegetal *in vitro* (Quatrano 1968). Las actividades de investigación en esta área fueron aumentando progresivamente, pero no fue sino hasta los años noventa cuando la criopreservación cobró mayor fuerza, gracias al desarrollo de nuevos protocolos de técnicas basadas en la vitrificación. Esos protocolos tienen la característica común de que el paso crítico para lograr la supervivencia del material criopreservado es la



etapa de la deshidratación, y no la etapa de congelación, como ocurre en los protocolos clásicos. Estos nuevos procedimientos reemplazan la deshidratación celular inducida por un régimen de congelación lento a temperaturas muy por debajo de 0 °C por la remoción a temperaturas positivas de la mayor parte o de toda el agua congelable de las células, a través de la deshidratación osmótica mediante el uso de soluciones altamente concentradas, en combinación o no con la deshidratación física. Después de esta extensa deshidratación, las muestras son directamente inmersas en nitrógeno líquido, lo que resulta en la vitrificación de los solutos internos, es decir, su transición directa del estado líquido a un estado de sólido amorfo, evitando al mismo tiempo la formación de cristales de hielo intracelular perjudiciales.

Los procedimientos basados en la vitrificación son apropiados para los órganos complejos como los meristemos apicales y los embriones, que contienen una gran variedad de tipos de células que presentan requerimientos específicos. Al excluir el uso de un régimen de enfriamiento lento, los procedimientos basados en la vitrificación son operativamente menos complejos que los clásicos (por ejemplo, no requieren el uso de congeladores programables) y tienen, por consiguiente, un mayor potencial para una aplicabilidad más amplia, pues solo requieren pequeñas modificaciones para los diferentes tipos de células (Engelmann 1997).

Se pueden identificar siete procedimientos diferentes basados en la vitrificación: (i) encapsulación-deshidratación, (ii) un procedimiento actualmente denominado vitrificación, (iii) encapsulación-vitrificación, (iv) deshidratación, (v) precrecimiento, (vi) precrecimiento-vitrificación y (vii) gota-vitrificación.

Gracias al desarrollo de esos nuevos protocolos, la cantidad de especies para las cuales los procedimientos de crioconservación ya se han publicado se ha incrementado notablemente en los últimos 10 años (Engelmann y Takagi 2000, Engelmann *et al.* 2008, Gonzalez-Arno y Engelmann 2006, Gonzalez-Arno *et al.* 2008, Reed 2008, Sakai y Engelmann 2007).

Desarrollo actual y uso de la crioconservación

El desarrollo actual de la crioconservación varía dependiendo de la categoría de las especies estudiadas. La crioconservación ha sido aplicada con éxito a una amplia gama de especies propagadas vegetativamente, tanto de climas templados como de origen tropical, y los protocolos desarrollados suelen ser muy eficientes (Engelmann 2010a). Tales resultados positivos pueden ser explicados por varias razones. En primer lugar, los ápices empleados para la crioconservación contienen células pequeñas, poco vacuoladas y en plena división celular, por lo que pueden resultar más tolerantes a la desecación. Además, mediante la crioconservación generalmente se preserva toda la estructura de los meristemos, lo que permite una regeneración directa después del descongelamiento. Por otra parte, los protocolos de cultivo de tejidos suelen ser funcionales para muchas especies de propagación vegetativa y el material cultivado *in vitro* es altamente homogéneo en términos de tamaño, composición celular, estado fisiológico y respuesta de crecimiento. De esta forma, aumentan las posibilidades de respuesta positiva y de uniformidad en el efecto de los tratamientos.



En comparación con las especies propagadas vegetativamente, las investigaciones para las especies con semillas recalcitrantes se encuentran todavía en una fase muy preliminar (Engelmann 2009b). La supervivencia es extremadamente variable, la regeneración frecuentemente está restringida a callos o al desarrollo incompleto de plántulas y generalmente el número de accesiones evaluadas por especie es muy bajo. Existen varias razones que explican el desarrollo limitado de la crioconservación en especies con semillas recalcitrantes (Engelmann 2000). Una de ellas es la carencia de información sobre la biología y aún más sobre el comportamiento de las semillas de muchas de estas especies frente al almacenamiento, las cuales en la mayoría de los casos suelen ser especies silvestres. A lo anterior se suman la heterogeneidad de las semillas en términos de la etapa de desarrollo y contenido de agua, su complejidad histológica y gran tamaño y la falta de protocolos adecuados de cultivo *in vitro*.

A pesar de que el uso rutinario de la crioconservación es todavía limitado, existe un número creciente de instalaciones, como los bancos de germoplasma, los jardines botánicos y los institutos de investigación públicos y privados, en que esta técnica se emplea a gran escala para los diferentes tipos de materiales que son tolerantes a la deshidratación o no lo son (Engelmann 2010a). Las categorías de material vegetal almacenado en dichas colecciones crioconservadas incluyen semillas ortodoxas con una longevidad limitada o de especies raras y en peligro de extinción; semillas intermedias; yemas latentes de especies de árboles frutales y forestales; polen de las especies hortícolas y ornamentales; y productos biotecnológicos, incluidos metabolitos secundarios de líneas celulares de cultivos embriogénicos empleadas para la producción masiva de material élite y de cultivos *in vitro* propagados vegetativamente por meristemas apicales.

La crioconservación impone una serie de condiciones de estrés en el material vegetal, que podrían inducir modificaciones en los cultivos crioconservados y en las nuevas plantas regeneradas. Por lo tanto, antes de utilizar esa técnica de forma rutinaria para la conservación a largo plazo de los recursos fitogenéticos, es necesario verificar que no se altere la estabilidad genética del material crioconservado. Sin embargo, hasta el presente, no hay ningún reporte que refleje la existencia de modificaciones en las características fenotípicas, a nivel bioquímico, cromosómico o molecular, que hayan sido atribuidas a la crioconservación (Engelmann 2010a).

En cuanto a la valoración económica de la introducción de esta tecnología, los pocos análisis preliminares realizados confirman un interés en la técnica de la crioconservación desde una perspectiva financiera (Engelmann 2010a). Un estudio detallado realizado recientemente en el que se compararon los costos del establecimiento y mantenimiento de una de las colecciones de café más grandes del mundo en el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Costa Rica, como colección en el campo y por crioconservación (Dulloo *et al.* 2009) demostró claramente que la crioconservación cuesta menos (en perpetuidad por accesión) que la conservación en bancos de germoplasma de campo. Un análisis comparativo de los costos de ambos métodos mostró que cuantas más accesiones estén almacenadas en crioconservación, menor será el costo por accesión.

Recientemente fue descubierta una utilidad adicional de la crioconservación para la eliminación de virus de plantas infectadas. Este procedimiento, denominado “crioterapia”,



ha servido de sustituto o de complemento a las técnicas clásicas de erradicación de virus mediante el cultivo de meristemos y la termoterapia. Mediante la crioterapia, ciertos patógenos vegetales, como los virus, los fitoplasmas y las bacterias, pueden ser erradicados de los meristemos apicales exponiéndolos brevemente al nitrógeno líquido (Wang *et al.* 2009).

Crioconservación: progreso mundial y las perspectivas regionales para América Latina y el Caribe

A pesar de que la crioconservación se emplea rutinariamente en solo un número limitado de casos, gracias al desarrollo de las nuevas técnicas basadas en la vitrificación ha sido posible ampliar su aplicación a un mayor número de especies. La ventaja más importante de estas nuevas técnicas es su simplicidad operacional, lo que ha facilitado su introducción y adaptación en varios países tropicales en vías de desarrollo, que es donde se encuentra la mayor parte de los recursos genéticos de las especies problemáticas.

En los últimos 10 años, la actividad de investigación sobre la crioconservación se ha incrementado significativamente a nivel mundial. Es importante destacar que se ha brindado apoyo financiero a cada vez más proyectos nacionales, regionales e internacionales, con el fin de avanzar en la investigación básica y aplicada de la crioconservación y lograr una mejor coordinación con los investigadores y usuarios mediante la creación y el funcionamiento de redes científicas y técnicas. Algunos ejemplos incluyen el proyecto CRYOVEG, dirigido a la crioconservación de colecciones de recursos genéticos vegetales franceses (Engelmann 2010b); la acción COST 871, financiada por la Unión Europea y dirigida a la crioconservación de especies de cultivos de Europa (Engelmann *et al.* 2009); y el proyecto titulado “Desarrollo y perfeccionamiento de protocolos de crioconservación para la conservación a largo plazo de cultivos de propagación vegetativa”, financiado por el Fondo Mundial para la Diversidad de Cultivos, con sede en Roma, Italia (Engelmann 2009a).

La investigación en crioconservación vegetal ha ido progresando paulatinamente en varios países de América Latina y el Caribe (ALC) desde hace aproximadamente 20 años. Sin embargo, se requiere aumentar en esta región el ritmo de desarrollo de esa actividad, con el fin de hacer frente a los desafíos planteados de conservar una gran cantidad de especies vegetales para las que la crioconservación es una opción relevante. A nivel regional también se necesita contar con un esquema de coordinación que refuerce la labor de los mecanismos de intercambio científico creados, lo que será de gran utilidad para apoyar y fortalecer los trabajos en el área de la crioconservación.

Es nuestra esperanza que esta publicación, la primera producida en español sobre la crioconservación, cumpla con el objetivo de brindar un panorama actualizado de esa disciplina científica y, en especial, de evidenciar la necesidad de conservar a largo plazo los recursos naturales vegetales.



Referencias

- Berjak, P; Pammenter, NW. 1994. Recalcitrance is not an all-or-nothing situation. *Seed Science Research* 4:263-264.
- Chin, HF. 1988. Recalcitrant seeds: a status report. Roma, IT, IPGRI.
- _____; Roberts, EH. 1980. Recalcitrant crop seeds. Kuala Lumpur, MY, Tropical Press Sdn. Bhd.
- Dulloo, ME; Ebert, AW; Dussert, S; Gotor, E; Astorga, C; Vásquez, N; Rakotomalala, JJ; Rabemiarafara, A; Eira, M; Bellachew, B; Omondi, C; Engelmann F; Anthony, F; Watts, J; Qamar, Z; Snook, L. 2009. Cost efficiency of cryopreservation as a long term conservation method for coffee genetic resources. *Crop Science* 49:2123-2138.
- Ellis, RH; Hong, T; Roberts, EH. 1990. An intermediate category of seed storage behaviour? I. coffee. *Journal of Experimental Botany* 41:1167-74.
- _____; Hong, T; Roberts, EH; Soetisna, U. 1991. Seed storage behaviour in *Elaeis guineensis*. *Seed Science Research* 1:99-104.
- Engelmann, F. 1991. *In vitro* conservation of tropical plant germplasm: a review. *Euphytica* 57: 227-243.
- _____. 1997. *In vitro* conservation methods. *In* Biotechnology and plant genetic resources: conservation and use. Ford-Lloyd, BV; Newbury, JH; Callow, JA. eds. Wallingford, UK, CABI. p. 119-162.
- _____. 2000. Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources. *In* Cryopreservation of tropical plant germplasm - current research progress and applications. Engelmann, F; Takagi, H. eds. Tsukuba, JP, JIRCAS; Roma, IT, IPGRI. p. 8-20.
- _____. 2009a. Plant germplasm cryopreservation: progress and prospects. *Cryobiology* 59:370-371.
- _____. 2009b. Use of biotechnologies for conserving plant biodiversity. *Acta Horticulturae* 812:63-82.
- _____. 2010a. Integration of cryopreservation in plant genetic resource conservation strategies in France. *CryoLetters* 31:82.
- _____. 2010b. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In* *In vitro* cellular and developmental biology – plant. DOI: 10.1007/s11627-010-9327-2.



- _____; Engels, JMM. 2002. Technologies and strategies for *ex situ* conservation. *In* Managing plant genetic diversity. Engels, JMM; Rao, VR; Brown, AHD; Jackson, MT. eds. Wallingford, UK, CABI; Roma, IT, IPGRI. p. 89-104.
- _____; Gonzalez-Arno, MT; Wu, YJ; Escobar, RE. 2008. Development of encapsulation-dehydration. *In* Plant cryopreservation: a practical guide. Reed, BM. ed. Berlín, DE, Springer Verlag. p. 59-76.
- _____; Keller, J; Lynch, P; Panis, B; Pukacki, P; Revilla Bahillo, MA; Uosukainen, M. 2009. COST Action 871: Cryopreservation of crop species in Europe (CRYOPLANET). *Cryobiology* 59: 413.
- _____; Takagi, H. eds. 2000. Cryopreservation of tropical plant germplasm - current research progress and applications, Tsukuba, JP, JIRCAS; Roma, IT, IPGRI.
- Engels, JMM; Engelmann, F. 1998. Botanic gardens and agricultural genebanks: building on complementary strengths for more effective global conservation of plant genetic resources. *In* Fifth International Botanic Gardens Conservation Congress (1998, Kirstenbosch, ZA). Proceedings.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, IT). 1996. First Report on the World's Plant Genetic Resources for Food and Agriculture. Roma, IT.
- _____. 2009. Draft Second Report on the World's Plant Genetic Resources for Food and Agriculture. Roma, IT.
- George, EF. 1996. Plant propagation by tissue culture. Part 2 - In practice. 2 ed. Edington, UK, Exegetics.
- Gonzalez-Arno, MT; Engelmann, F. 2006. Cryopreservation of plant germplasm using the encapsulation-dehydration technique: review and case study on sugarcane. *CryoLetters* 27:155-168.
- _____; Martínez-Ocampo, Y; Molina Torres, J. 2009. Para conservar la biodiversidad genética vegetal. *Revista Ciencia* 60(2):78-86.
- _____; Panta, A; Roca, WM; Escobar, RH; Engelmann, RH. 2008. Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 92:1-13.
- ONU (Organización de las Naciones Unidas, US). 1992. Convención sobre la Diversidad Biológica (en línea). *In* Conferencia de las Naciones Unidas sobre el Medio Ambiente y el Desarrollo (1992, Río de Janeiro, BR). Consultado 15 mar. 2012. Disponible en <http://www.cbd.int/doc/legal/cbd-es.pdf>.

- Quatrano, RS. 1968. Freeze-preservation of cultured flax cells utilizing DMSO. *Plant Physiology* 43:2057-2061.
- Reed, BM. 2008. *Plant cryopreservation: a practical guide*. Berlín, DE, Springer Verlag.
- Roberts, HF. 1973. Predicting the viability of seeds. *Seed Science and Technology* 1:499-514.
- Sakai, A. 1960. Survival of the twigs of woody plants at -196°C. *Nature* 185:392-394.
- _____; Engelmann, F. 2007. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review. *CryoLetters* 28:151-172.
- Scowcroft, WR. 1984. *Genetic variability in tissue culture: impact on germplasm conservation and utilization*. Roma, IT, IBPGR.
- Wang, Q; Panis, B; Engelmann, F; Lambardi, M; Valkonen, JPT. 2009. Cryotherapy of shoot tips: A technique for pathogen eradication to produce healthy planting materials and prepare healthy plant genetic resources for cryopreservation. *Annals of Applied Biology* 154:351-363.
- Withers, LA; Engels, JMM. 1990. The test tube genebank - a safe alternative to field conservation. *IBPGR Newsletter for Asia and the Pacific* 3:1-2.





Consideraciones teóricas y prácticas para la crioconservación de germoplasma vegetal

María Teresa González-Arno¹,
Florent Engelmann²

1. Facultad de Ciencias Químicas de Orizaba, Universidad Veracruzana, Veracruz, México, mtgarnao1@hotmail.com, teregonzalez@uv.mx.

2. Instituto de Investigación para el Desarrollo (IRD), Montpellier, Francia, florent.engelmann@ird.fr.

El frío tiene el gran poder de conservar, pero también el de destruir, y esto se debe fundamentalmente a la cristalización del agua presente a nivel intracelular. La cristalización (formación de hielo) es el paso de un estado líquido desorganizado a uno ordenado. En cambio, las soluciones muy concentradas inhiben la nucleación e iniciación del hielo, por lo que a temperaturas muy bajas se convierten en un sólido amorfo que contribuye a mantener la viabilidad de las células y los tejidos en general. Este proceso, denominado “vitrificación” (Fahy *et al.* 1984), constituye la base del éxito de la crioconservación y caracteriza a los métodos criogénicos más modernos que resultan los más adecuados para estructuras vegetales organizadas (Engelmann 1997).

En términos criobiológicos, el agua libre o congelable es la fracción que es necesario remover o inducir a formar un sólido amorfo. El agua libre, que se caracteriza por ser osmóticamente activa, constituye alrededor del 90 % del contenido total de un organismo (Crowe *et al.* 1990). Ella es la fracción efectiva disponible para varios procesos fisiológicos y, por lo tanto, su presencia a temperaturas positivas es sumamente importante para mantener la supervivencia de las plantas (Sun 2002). El agua libre o congelable no sale espontáneamente de las células, sino únicamente por daños o mecanismos bioquímicos específicos (Dumet y Benson 2000). Por lo tanto, si la base del éxito de la crioconservación de un material biológico radica en extraer la mayor fracción posible del agua congelable antes de realizar la inmersión en nitrógeno líquido, durante un proceso criogénico dicho material estará irremediablemente expuesto a severas condiciones de estrés, primero el hídrico, inducido por la deshidratación, y luego el térmico, provocado por el enfriamiento.

Muchas plantas y microorganismos acumulan osmolitos orgánicos en respuesta a condiciones ambientales de estrés como la sequía, la congelación y el choque osmótico. Se ha evidenciado que existe una estrecha interrelación entre los mecanismos de protección/tolerancia y la acumulación endógena de altos niveles de estos osmolitos denominados solutos compatibles (Buitink *et al.* 2002). Por consiguiente, las metodologías de crioconservación contemplan, como un modo de abatir el estrés, inducir el incremento de estos compuestos a nivel intracelular.

La utilización exógena de estas sustancias clasificadas como crioprotectoras puede tener lugar mediante su adición a los medios de cultivo *in vitro*, o realizando tratamientos con soluciones que las contengan, con lo cual se propicia la penetración de algunos de ellos a las células y, a su vez, se contribuye a regular el equilibrio osmótico, a incrementar la viscosidad y a remplazar las moléculas de agua eliminadas por la deshidratación. De esta forma, se ejerce un efecto coligativo protector que aumenta la osmolalidad celular, que disminuye el punto de congelación y que puede inducir la ocurrencia de la vitrificación (Benson 2008). Sin embargo, el ajuste osmótico a través de la biosíntesis y/o acumulación de osmolitos es muy disímil y no se puede definir por una concentración efectiva absoluta para todos los casos (Hare *et al.* 1998). Este es un aspecto que requiere ser ajustado para el establecimiento de un protocolo criogénico eficiente, en especial para aquellas especies tropicales y de interés en América Latina y el Caribe, las cuales presentan un comportamiento de menor tolerancia.

Por consiguiente, cuando se revisan todos los factores que intervienen en los daños letales que produce un proceso de crioconservación, se aprecia que los más significativos



pueden estar vinculados a la toxicidad química de los agentes crioprotectores que se adicionan, a la presión osmótica que se genera, a la pérdida de agua que se induce y, en especial, a la formación de cristales de hielo en el medio intracelular. Como se ha mencionado anteriormente, el evento físico capaz de inhibir la nucleación del agua a las bajas temperaturas es el fenómeno conocido como vitrificación. La transición vítrea es el paso directo de la fase líquida muy viscosa a la de un sólido amorfo (Fahy *et al.* 1984), pero el estado vítreo depende de tres factores importantes: el contenido de agua, la temperatura y la composición química (Buitink *et al.* 2008).

Se han formulado diferentes mezclas vitrificadoras para plantas (conocidas como PVS, que es la sigla para su denominación en inglés: *plant vitrification solutions*). Esas mezclas se aplican de forma exógena y combinan la capacidad penetrante y no penetrante de sus componentes al medio intracelular. Entre las sustancias que conforman las PVS destacan el glicerol, el dimetilsulfóxido (DMSO), el etilenglicol y la sacarosa (Sakai 2004).

El estudio del comportamiento del agua es igualmente crítico para comprender los eventos que involucra el proceso de crioconservación. Las propiedades fisicoquímicas de la fase acuosa son determinantes en los cambios de estado, en la transferencia de masa y calor, en la deshidratación y en la congelación. De igual manera, sus propiedades coligativas influyen en la presión de vapor, el punto de congelación, la viscosidad y la formación de gradientes osmóticos a través de membranas semipermeables. La calorimetría diferencial de barrido (DSC) ha sido la técnica más utilizada hasta el momento para identificar y cuantificar los eventos de cristalización y transición vítrea (Vertucci 1989). Los análisis por DSC constituyen una herramienta invaluable para optimizar las condiciones de congelación y desarrollar estrategias de protección a las bajas temperaturas (Dumet y Benson 2000).

La investigación en el campo de la tolerancia a factores ambientales adversos también está contribuyendo a lograr una mayor comprensión de las bases bioquímicas y moleculares asociadas a los mecanismos de respuesta frente a diversas condiciones de estrés. Se han identificado genes y proteínas con un rol asociado a la resistencia al frío, la sequía y la salinidad. Se ha avanzado en el conocimiento de genes inducidos bajo estrés, que codifican proteínas con funciones de señalización, transducción de señales y protección celular (Dure *et al.* 1989).

Gracias a todo lo anterior, hoy se dispone de más conocimientos criobiológicos para aplicar en la conservación de plantas y de un buen número de procedimientos que están plenamente clasificados y definidos. Adicionalmente, la combinación de algunos de esos procedimientos ha generado una mayor diversidad de protocolos criogénicos que en ocasiones pueden resultar más efectivos para especies ya crioconservadas por otros métodos, o incluso pueden garantizar la supervivencia de otras que no se habían logrado crioconservar. Sin embargo, como se ha explicado antes, no es posible diseñar un protocolo criogénico único que funcione satisfactoriamente para todos los sistemas biológicos, como tampoco se puede considerar que un mismo método necesariamente será exitoso para una misma forma de cultivo *in vitro* (células, ápices, embriones, etc).

No obstante lo anterior, para iniciar una investigación criogénica es muy importante conocer más en detalle los procedimientos “claves” y sus buenas prácticas. En este



contexto, se pueden considerar varios protocolos como básicos: a) los métodos convencionales o clásicos, que son por elección los más adecuados para crioconservar células y callos, y que también se han utilizado para congelar meristemos apicales, pero aislados, de especies de climas templados. Los resultados positivos obtenidos con sistemas diferenciados de especies tropicales son casi excepcionales (González-Arno *et al.* 2009); y b) la técnica de encapsulación-deshidratación y el método de vitrificación, los cuales han demostrado ser de gran utilidad para crioconservar estructuras organizadas como los ápices y los embriones.

Asimismo, esos métodos han contribuido a la crioconservación exitosa de diversos tejidos provenientes de especies tropicales y han sido el punto de partida para generar nuevas variantes de protocolos criogénicos, como la encapsulación-vitrificación, la gota-vitrificación y la crio-lámina, los que han permitido avanzar en la optimización de los tratamientos crioprotectores (Gámez-Pastrana *et al.* 2004), en la simplificación del procedimiento cuando se trata del manejo de grandes volúmenes de muestras (Yamamoto *et al.* 2012) y, más recientemente, en una mayor aplicación a nivel de banco de germoplasma (Panis *et al.* 2011). Igualmente importante es el método de la desecación, que es sencillo y resulta muy apropiado para crioconservar semillas, además de que, combinado con un precultivo anterior en medio suplementado con azúcares, deriva en el protocolo denominado precultivo-desecación y puede funcionar para crioconservar satisfactoriamente embriones cigóticos y somáticos (Pence 1995). En el cuadro 4.1 se presentan algunas premisas tecnológicas que se deben considerar para el inicio de una investigación criogénica.

Cuadro 4.1. Recomendaciones para seleccionar un método adecuado (+) para la crioconservación de diferentes formas de cultivo *in vitro* de plantas.

Método	Susp. celulares y callos	Ápices	Embriones somáticos/cigóticos	Semillas
1. Protocolos convencionales	+++	+	-	-
2. Encapsulación-deshidratación	-	+++	++	-
3. Vitrificación y protocolos derivados: gota-vitrificación, encapsulación/vitrificación y crio-lámina	-	+++	++	-
4. Precultivo-desecación	-	-	++	-
5. Desecación	-	-	-	++

Fuente: González-Arno 2012.

A continuación se describen los pasos que se deben seguir para aplicar los procedimientos criogénicos anteriormente indicados.

Métodos convencionales

Cuando un material biológico se somete a una temperatura de congelación, mientras menor sea su contenido de agua, menor será la probabilidad de que ocurran daños letales

por la cristalización de la fase acuosa en el medio intracelular. Esto demuestra, que para cualquier proceso criogénico, el primer paso clave estará asociado a la reducción máxima posible de ese contenido de agua que puede congelar. Con los métodos convencionales (figura 4.1), la deshidratación de las muestras se alcanza fundamentalmente durante el proceso de descenso de la temperatura. Para ello, el enfriamiento se realiza de forma lenta hasta un nivel intermedio, usualmente -40°C , antes de proceder a efectuar la inmersión rápida en el nitrógeno líquido. Para disminuir gradualmente la temperatura, se utilizan por lo regular equipos de congelación programable y se ajusta la tasa de enfriamiento al régimen deseado, más frecuentemente a $0.5^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

Para lograr el éxito de este proceso se requiere también del uso de soluciones que contengan sustancias con propiedades crioprotectoras. Entre ellas se destacan el dimetilsulfóxido (DMSO), la sacarosa y el glicerol. Los crioprotectores pueden actuar desde el interior o el exterior de las células, pero entre sus funciones más importantes está la disminución del punto de congelación, la protección de la integridad de la membrana y el incremento de la viscosidad de la solución celular (González-Arno *et al.* 2008).

El material biológico inmerso en la solución crioprotectora se somete al enfriamiento y en un inicio, la muestra tiende a subenfriarse, o sea, puede permanecer sin congelar a una temperatura inferior a su punto de congelación. Para evitar el subenfriamiento se induce la formación de los primeros cristales de hielo mediante la nucleación heterogénea, y esto a su vez promueve el proceso fundamental de deshidratación. Como la membrana plasmática retarda la congelación del medio interno, y la presión de vapor de agua de las células subenfriadas es mayor a la de la solución externa que parcialmente ha comenzado a congelar, la continua disminución de la temperatura provoca que el equilibrio osmótico sólo se restablezca con la salida del agua intracelular. Bajo condiciones óptimas de congelación, se estima que la mayor parte del agua congelable ha logrado escapar de las células cuando las muestras son finalmente inmersas al nitrógeno líquido. En dependencia del agua intracelular remanente al momento de la inmersión, podrán ocurrir tres tipos de eventos físicos: la formación de grandes cristales si el contenido es alto, la formación de pequeños cristales no dañinos, si el contenido no es lo suficientemente alto, o la formación de un sólido amorfo, si la viscosidad celular es tan alta que el agua remanente experimenta entonces una transición vítrea (Benson *et al.* 2006; González-Arno *et al.* 2008). De esto se desprende, que un paso clave de los métodos convencionales, lo constituye la etapa de deshidratación por congelación.

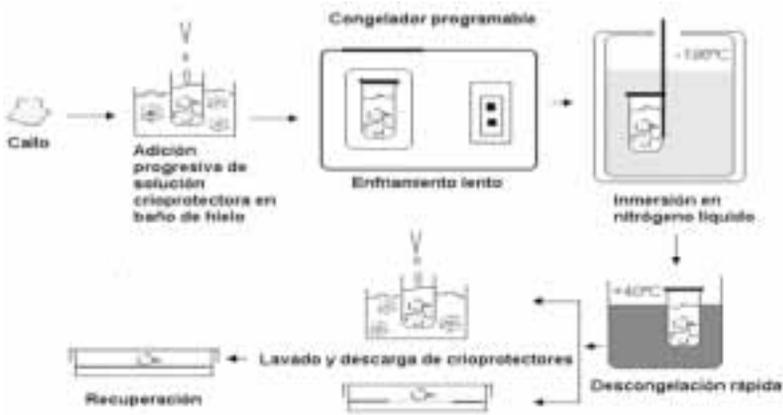
Sin embargo, el retorno a la temperatura ambiente después del almacenamiento a -196°C , es también de vital importancia. Un régimen lento de enfriamiento, genera la necesidad de un método de calentamiento rápido. De esta forma se evitaría la recristalización del agua remanente en las células o la formación de grandes cristales de hielo a expensas de otros más pequeños, cuando se atraviesa por una zona crítica de temperaturas durante el retorno a las condiciones establecidas para el cultivo normal. Por consiguiente, la optimización del proceso de cristalización extracelular durante el enfriamiento lento y la implementación de un régimen de calentamiento rápido, son aspectos críticos para prevenir daños letales cuando se aplica un protocolo convencional (González-Arno *et al.* 2008).



Procedimiento

1. Colocar el material vegetal (células y/o callos) en crioviales de 2 ml, en baño de hielo aproximadamente a 0 °C.
2. Adicionar la solución crioprotectora fría a los crioviales con las muestras y mantenerlos durante una hora a 0 °C.
3. Colocar los crioviales con las muestras en el congelador programable (temperatura inicial de 0 °C).
4. Disminuir la temperatura para inducir la siembra de cristales o nucleación heterogénea (2 °C-3 °C inferiores al “punto de congelación” de la solución crioprotectora).
5. Mantener a la temperatura de inducción de la nucleación (ejemplo: a -10 °C, 10 minutos) o continuar con el programa de enfriamiento de disminución gradual de la temperatura hasta la pre congelación a -40 °C.
6. Realizar una inmersión rápida de las muestras en N₂L.
7. Mantener las muestras almacenadas durante una hora a -196 °C.
8. Llevar a cabo una descongelación rápida (+37 °C-+40 °C).
9. Eliminar los crioprotectores colocando las muestras sobre papel filtro en placas de Petri.
10. Cultivo de recuperación en la oscuridad, si son células y callos. Cultivo al menos la primera semana en la oscuridad, si son estructuras organizadas.

Figura 4.1. Representación gráfica de un protocolo convencional.



Fuente: González-Arno 2012.

Encapsulación-deshidratación

La técnica de encapsulación-deshidratación (figura 4.2) se utilizó por primera vez en 1990 con el objetivo de crioconservar ápices de pera (Dereuddre *et al.* 1990) y papa (Fabre y Dereuddre 1990). Más tarde probó también su utilidad en ápices de cultivos tropicales como yuca (*Manihot esculenta*) (Benson *et al.* 1992), café (Mari *et al.* 1995) y caña de azúcar (González-Arno *et al.* 1993, Paulet *et al.* 1993). A la fecha, diversos

protocolos de encapsulación-deshidratación se han adaptado para más de 20 especies vegetales, mediante los cuales se han obtenido resultados repetitivos y generalmente altos índices de recuperación después del almacenamiento en nitrógeno líquido (González-Arno y Engelmann 2006).

La encapsulación-deshidratación tiene la ventaja de ser relativamente simple, ya que facilita manipular al unísono una gran cantidad de tejidos atrapados en cápsulas de alginato de calcio y utiliza solamente la sacarosa como agente osmótico, además de que reemplaza el uso de equipos de congelación programable por la inmersión rápida al nitrógeno líquido. Acorde a este método, para el enfriamiento se colocan solamente en los crioviales las muestras encapsuladas, sin necesidad de adicionar la solución crioprotectora como en los métodos convencionales (González-Arno y Engelmann 2006). Otra ventaja de tipo práctico es que, después de la crioconservación, el retorno a la temperatura de cultivo normal se realiza generalmente de forma lenta, para lo cual se expone el material encapsulado al aire corriente en una campana de flujo laminar en lugar de utilizar un baño María a +40 °C. La selección del método de calentamiento rápido o lento dependerá del nivel de deshidratación que se logre alcanzar en las muestras, pues si no están lo suficientemente deshidratadas, puede ocurrir el fenómeno de la recrystalización, al elevarse la temperatura y provocar un efecto letal en esta etapa del procedimiento.

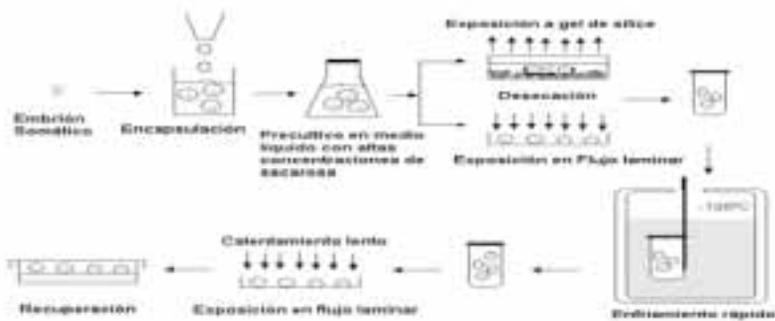
Procedimiento

1. Disección del tejido (ápices o embriones) en condiciones asépticas: Utilizar un estereomicroscopio en una campana de flujo laminar.
2. Recuperación del tejido: Colocar el material explantado por 16-24 horas sobre el medio de cultivo sólido estándar o el medio suplementado con sacarosa (por ejemplo, con 0.3 M de sacarosa).
 1. Preparación para la encapsulación:
 - a) Preparar la solución de alginato de sodio (baja viscosidad) al 3 %, en el medio de cultivo que contiene los macros y micronutrientes, pero desprovisto de calcio; luego ajustar el pH de la solución y esterilizarla bajo las mismas condiciones del medio de cultivo.
 - b) Preparar una solución de cloruro de calcio a 0.1 M, ajustar el pH de la solución y esterilizarla bajo las mismas condiciones del medio de cultivo.
 - c) Preparar puntas de micropipetas estériles con el extremo inferior cortado a un diámetro aproximado de 4-5 mm.
 2. Encapsulamiento:
 - a) Colocar los tejidos en la solución de alginato de sodio.
 - b) Succionar los tejidos embebidos en el alginato y gotearlos progresivamente sobre abundante solución de cloruro de calcio.
 - c) Mantener las gotas en la solución de calcio por 20 minutos después de la última gota, para lograr un buen grado de gelificación durante la formación de las cápsulas de alginato de calcio.
 - d) Decantar la solución de calcio y transferir las cápsulas a una caja de Petri sobre papel filtro para la siguiente manipulación.



3. Precultivo: Transferir el tejido encapsulado a un erlenmeyer que contiene medio de cultivo líquido suplementado con sacarosa (por ejemplo, 0.5, 0.75 ó 1 M de concentración de sacarosa por 24 h).
4. Deseccación: Decantar el medio líquido de precultivo y secar superficialmente las cápsulas colocándolas en cajas de Petri sobre papel filtro. Seguidamente exponerlas en cajas destapadas a la corriente de aire de la campana del flujo laminar o en desecadores que contienen gel de sílice. Determinar con antelación el tiempo de desecación requerido, para garantizar la reducción del contenido de humedad en las cápsulas hasta alrededor de 20-25 %.
5. Enfriamiento: Transferir las muestras encapsuladas a crioviales (hasta 10 cápsulas por criovial), y realizar la inmersión rápida al nitrógeno líquido.
6. Calentamiento: El calentamiento puede ser rápido, para lo cual se sumergen los crioviales con las muestras en un baño María a +40 °C, o lento (más usual), para lo cual se extraen las muestras del criovial y se exponen a la corriente de aire del flujo laminar por dos a tres minutos.
7. Recultivo: Transferir el material encapsulado a los frascos de cultivo, colocando las cápsulas sobre el medio sólido y manteniendo las muestras la primera semana a la oscuridad con el posterior pase a las condiciones de fotoperíodo establecidas.

Figura 4.2. Representación gráfica de un protocolo de encapsulación-deshidratación.



Fuente: González-Arno 2012.

Método de vitrificación

El método de vitrificación (figura 4.3) se caracteriza por inducir una intensa deshidratación osmótica mediante la exposición del material biológico a mezclas crioprotectoras muy concentradas conocidas como formulaciones PVS. El tratamiento con las PVS facilita la ocurrencia de la transición vítrea durante el enfriamiento rápido de las muestras por la inmersión directa al nitrógeno líquido (Sakai y Engelmann 2007). Para que los tejidos adquieran mayor tolerancia frente a la deshidratación con la PVS y a la crioconservación, antes de estos dos procesos se realiza un tratamiento breve, el cual se denomina “tratamiento de carga” y en que se utiliza una mezcla de sacarosa-

glicerol, usualmente de 0.4 M de sacarosa+ 2 M de glicerol. El proceso de calentamiento y retorno a la temperatura normal de cultivo se realiza siempre de forma rápida, como se indicó para los protocolos convencionales, con la finalidad de evitar que ocurra una recristalización. El lavado de los crioprotectores se lleva a cabo con una solución que contiene las sales minerales del medio de cultivo y suplementada con 1.2 M de sacarosa (Sakai y Engelmann 2007).

Procedimiento

1. Disección del tejido (ápices o embriones) en condiciones asépticas: Utilizar un estereomicroscopio en una campana de flujo laminar.
2. Recuperación del tejido: Colocar el material explantado por 16-24 horas sobre el medio de cultivo sólido estándar o el medio suplementado con sacarosa (por ejemplo, con 0.3 M de sacarosa).
3. Tratamiento de carga: Colocar los tejidos sobre papel filtro en una caja de Petri que contiene la solución de carga a temperatura ambiente y durante 20-30 minutos (por ejemplo, 0.4 M de sacarosa + 2 M de glicerol).
4. Exposición a la solución vitrificadora (PVS) posterior al tratamiento de carga: Transferir los tejidos a una caja de Petri que contiene la solución vitrificadora para estudiar diferentes tiempos de exposición o colocar los tejidos directamente en crioviales que contienen 1 ó 2 mL de la PVS (por ejemplo, PVS3: 50 % de glicerol + 50 % de sacarosa; PVS2: 30 % de glicerol + 15 % de etilenglicol + 15 % DMSO en medio de cultivo con 0.4 M de sacarosa). Los tratamientos pueden realizarse a temperatura ambiente o a 0 °C por períodos generalmente breves (hasta una hora).
5. Enfriamiento: Realizar la inmersión rápida de los crioviales con las muestras al nitrógeno líquido.
6. Calentamiento: Extraer los crioviales del nitrógeno líquido y sumergirlos en un baño María a +40 °C por dos a tres minutos.
7. Lavado de crioprotectores: Extraer la solución vitrificadora y adicionar la solución de lavado por 20 minutos (medio de cultivo líquido suplementado con 1.2 M de sacarosa).
8. Recultivo: Secar superficialmente los tejidos lavados sobre papel filtro en una caja de Petri y luego transferirlos al medio de cultivo sólido. Mantener las muestras durante la primera semana a la oscuridad y transferirlas posteriormente a las condiciones de fotoperíodo establecidas.



Figura 4.3. Representación gráfica de un protocolo de vitrificación.



Fuente: González-Arno 2012.

Gota-vitrificación

Este protocolo ha derivado del método de vitrificación y se diferencia del procedimiento que le dio origen, en que se logra una ultra rápida velocidad de enfriamiento y de calentamiento de las muestras, dado que en lugar de usar crioviales, los tejidos se transfieren a una gota o a un volumen muy reducido de la solución vitrificadora colocada sobre una pequeña lámina de papel aluminio, en la que son inmersas directamente al nitrógeno líquido (Panis *et al.* 2005). Para el calentamiento, la lámina con las muestras se sumerge directamente en abundante medio de cultivo líquido suplementado con 1.2 M de sacarosa y a temperatura ambiente. La magnífica conductividad térmica de la lámina de aluminio, aunada al poco volumen de solución crioprotectora en contacto con los tejidos, propicia que tanto el enfriamiento como el calentamiento transcurran a una velocidad muy elevada (Sakai y Engelmann 2007).

Procedimiento

1. Disección del tejido (ápices o embriones) en condiciones asépticas: Utilizar un estereomicroscopio en una campana de flujo laminar.
2. Recuperación del tejido: Colocar el material explantado por 16-24 horas sobre el medio de cultivo sólido estándar o el medio suplementado con sacarosa (por ejemplo, con 0.3 M de sacarosa).
3. Tratamiento de carga: Colocar los tejidos durante 20-30 minutos sobre papel filtro en una caja de Petri que contiene la solución de carga (por ejemplo, 0.4 M de sacarosa + 2 M de glicerol).
4. Exposición a la solución vitrificadora (PVS) posterior al tratamiento de carga: Transferir los tejidos a una caja de Petri que contiene la solución vitrificadora para estudiar diferentes tiempos de exposición o colocar los tejidos directamente sobre gotas de PVS (por ejemplo, PVS3: 50 % de glicerol + 50 % de sacarosa; PVS2: 30 % de glicerol + 15 % de etilenglicol + 15 % DMSO en medio de cultivo con 0.4 M sacarosa). Los tratamientos se realizan generalmente a temperatura ambiente.

5. Preparación de las láminas con las gotas:
 - a) Recortar láminas de papel de aluminio de aproximadamente 20 x 7 mm.
 - b) Colocar gotas de la PVS de aproximadamente 15 µl por cada lámina.
 - c) Colocar los tejidos en las gotas.
6. Enfriamiento: Realizar la inmersión rápida de las láminas de papel de aluminio con las muestras directamente al nitrógeno líquido.
7. Calentamiento: Extraer las láminas del nitrógeno líquido y sumergirlas directamente en abundante medio de cultivo líquido suplementado con 1.2 M de sacarosa a temperatura ambiente durante 15-30 minutos.
8. Recultivo: Secar superficialmente los tejidos lavados sobre papel filtro en una caja de Petri y luego transferirlos al medio de cultivo sólido. Mantener las muestras durante la primera semana a la oscuridad y transferirlas posteriormente a las condiciones de fotoperíodo establecidas.

Encapsulación-vitrificación y método de crio-lámina

Estos dos protocolos criogénicos involucran primeramente la encapsulación de los tejidos en alginato de calcio, pero en la encapsulación-vitrificación las cápsulas sintéticas tienen forma redondeada, al igual que las obtenidas con la técnica de encapsulación-deshidratación. En cambio, en el método de crio-lámina, la encapsulación se refiere a una capa fina de alginato de calcio que gelifica en la superficie de una lámina de papel aluminio e inmoviliza los tejidos sobre ella (Yamamoto *et al.* 2011). Los tratamientos de carga y de deshidratación con la solución PVS se realizan acorde a lo descrito para el método de vitrificación, pero el enfriamiento y el calentamiento con el protocolo de crio-lámina se llevan a cabo como lo contempla el método de gota-vitrificación (inmersión directa de las láminas al nitrógeno líquido para el enfriamiento y transferencia a la solución con 1.2 M de sacarosa a temperatura ambiente, para el calentamiento y descarga de los crioprotectores, respectivamente). Una característica común de las dos metodologías es que se benefician de las facilidades que proporciona la manipulación de abundante material inmovilizado en alginato de calcio, a diferencia del método de vitrificación, que implica el manejo directo de cada tejido. Otro beneficio es que se logra acortar la duración del protocolo criogénico completo, en comparación con el requerido para la encapsulación-deshidratación (Yamamoto *et al.* 2012).

Precultivo-desección

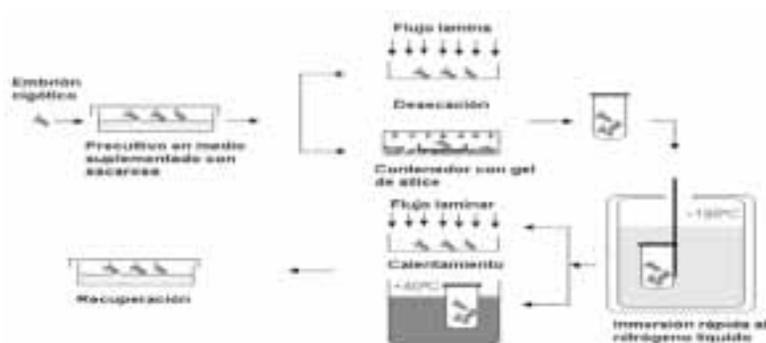
El método de precultivo-desección (figura 4.4) es un protocolo poco laborioso y de fácil transferencia a cualquier laboratorio de biotecnología; sin embargo, la etapa de precultivo anterior a la desección y al enfriamiento puede prolongarse por varios días o semanas, lo que incrementa considerablemente la duración del procedimiento completo. Para la crioconservación de semillas la fase de precultivo se omite y, por lo tanto, implicará el uso de un protocolo más simplificado y corto.



Procedimiento

1. Realizar el precultivo de los embriones en medio sólido suplementado generalmente con azúcares como agente crioprotector.
2. Efectuar la desecación mediante la exposición de los embriones al aire corriente en una campana de flujo laminar o a cantidades definidas de gel de sílice en contenedores herméticamente cerrados o logrando atmósferas controladas con soluciones salinas sobresaturadas.
3. Realizar el enfriamiento rápido de las muestras contenidas en crioviales mediante la inmersión al nitrógeno líquido.
4. Llevar a cabo el calentamiento rápido, para lo cual los crioviales se sumergen en un baño María a +37 °C-+40 °C, o lento, mediante la exposición de los embriones al aire corriente en una campana de flujo laminar.
5. Realizar la recuperación en el medio de cultivo normal, la primera semana a la oscuridad, y luego realizar la transferencia a las condiciones de fotoperiodo establecidas.

Figura 4.4. Representación gráfica del procedimiento de precultivo-dsecación.



Nota: Para crioconservar semillas de pequeñas dimensiones, el protocolo excluye el paso correspondiente al precultivo en el medio con el agente crioprotector. El protocolo se realiza a partir del proceso de desecación aplicando cualquiera de los métodos de desecación indicados.

Fuente: González-Arnao 2012.

Algunas recomendaciones adicionales para la crioconservación de germoplasma vegetal

Selección del material

- Para la congelación de suspensiones celulares, las células deben tomarse cuando se encuentran en la fase exponencial de crecimiento.
- Para la congelación de callos y estructuras organizadas, el material generalmente se toma 15 días posteriores al último subcultivo en medio fresco. En el caso de

las especies de crecimiento lento (por ejemplo, algunas especies de orquídeas), lo importante es que el material de partida refleje un estado vigoroso.

- Los embriones cigóticos inmaduros y los somáticos (globular-torpedo-corazón) son más tolerantes a la congelación que a otras fases de desarrollo.
- El material proveniente de cultivos *in vitro* (por ejemplo, ápices aislados de vitroplántulas) es más homogéneo y permite estandarizar mejor las condiciones de crioconservación que el material obtenido de plantas *in vivo*.

Protección y crioconservación de germoplasma

- Los tratamientos con soluciones crioprotectoras muy concentradas son menos nocivos si se realizan a 0 °C.
- En la utilización de protocolos convencionales de crioconservación es muy importante inducir la nucleación heterogénea en una etapa temprana del enfriamiento dependiendo del punto de congelación de la solución crioprotectora.
- La descongelación rápida generalmente resulta más apropiada, sobre todo si el material no está suficientemente deshidratado.
- La crioconservación de ápices de especies de propagación vegetativa asegura el mantenimiento de la estabilidad genética y la manipulación del material libre de virus; además, puede ser una estrategia apropiada para el saneamiento por crioterapia.
- Para la crioconservación de ápices, después de la disección los tejidos deben recuperarse en un medio de cultivo al menos de un día para otro, a fin de que superen el estrés del corte.
- Temperaturas muy superiores (por ejemplo, de entre -20 °C y -70 °C) a la temperatura del nitrógeno líquido (-196 °C) con el transcurso del tiempo provocan el deterioro del material biológico almacenado.
- Luego de la crioconservación, el material debe recuperarse en la oscuridad por al menos una semana, con el fin de evitar la fotooxidación.
- Las pruebas colorimétricas de supervivencia pueden falsear los resultados. La verdadera forma de medir la supervivencia y recuperación del material crioconservado es mediante la regeneración de nuevos brotes y/o de plantas.

A continuación se presentan los avances logrados en la investigación y la aplicación de la crioconservación vegetal en diferentes países de América Latina y el Caribe. Se muestra cómo se iniciaron en esta importante región los trabajos en ese campo. También se brinda información sobre las actividades que grupos de especialistas han llevado a cabo en diferentes instituciones de diversos países, las especies vegetales en que han trabajado, las técnicas criogénicas desarrolladas o adaptadas y su aplicación en ciertos bancos de germoplasma.

Referencias

Benson, EE. 2008. Cryopreservation theory. *In* Plant cryopreservation. A practical guide. Reed, B. ed. Springer. p. 23-29.

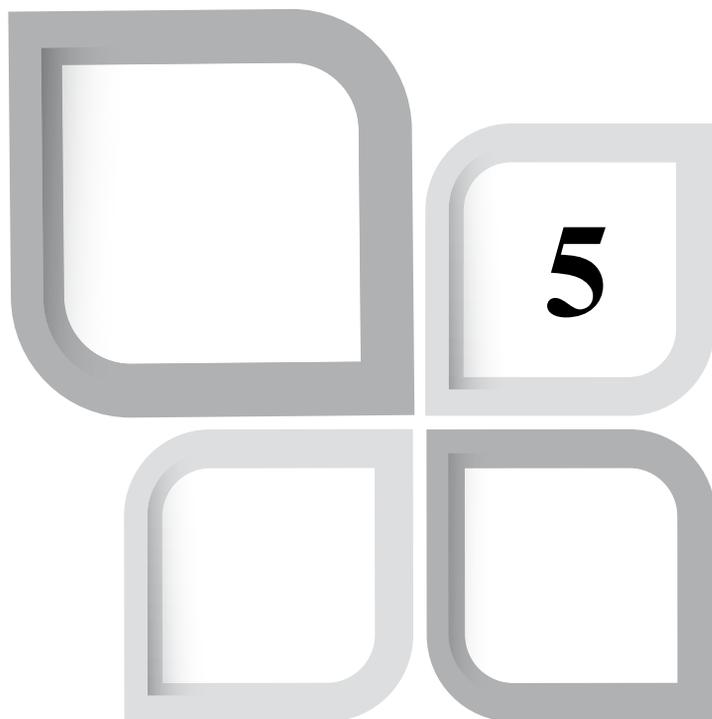
_____; Chabrillange, N; Engelmann, F. 1992. A comparison of cryopreservation methods for the long-term *in vitro* conservation of cassava. *In* The Society for Low Temperature Biology Autumn Meeting (1992, Stirling, UK). Proceedings.



- _____; Johnston, J; Muthusamy, J; Harding, K. 2006. Physical and engineering perspectives of *in vitro* plant cryopreservation. *In* Plant tissue culture engineering. Gupta, S; Ibaraki, Y. eds. Springer Verlag. Vol. 6, parte 5. p. 441–476.
- Buitink, J; Hoekstra, FA; Leprince, O. 2002. Biochemistry and biophysics of tolerance systems. *In* Desiccation and survival in plants. Drying without dying. Black, M; Pritchard, HW. eds. Oxford, UK, CABI Publishing. p. 293-318.
- Crowe, HJ; Carpenter, JF; Crowe, LM; Anchordoguy, TY. 1990. Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules. *Cyobiology* 27: 213-219.
- Dereuddre, J; Scottez, C; Arnaud, Y; Duron, M. 1990. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Paris, t. 310, Série III, 317-323.
- Dumet, D; Benson, E. 2000. The use of physical and biochemical studies to elucidate and reduced cryopreservation-induced damage in hydrated/desiccated plant germplasm. *In* Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application. Tsukuba, JP, JIRCAS-IPGRI. p. 43-56.
- Dure, L; Crouch, M; Harada, J; Ho, T-HD; Mundy, J; Quatrano, R; Thomas, T; Sung, ZR. 1989. Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Molecular Biology* 12:475-486.
- Engelmann, F. 1997. *In vitro* conservation methods. *In* Biotechnology and plant genetic resources: conservation and use. Ford-Lloyd, BV; Newbury, JH; Callow, JA. eds. Wellingford, UK, CABI. p.119-162.
- Fabre, J; Dereuddre, J. 1990. Encapsulation-dehydration: A new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot-tips. *CryoLetters* 11:413-426.
- Fahy, GM; MacFarlane, DM; Meryman, HT. 1984. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* 21:407-426.
- Gámez-Pastrana, R; Martínez-Ocampo, Y; Beristain, CI; González-Arno, MT. 2004. An improved cryopreservation protocol for pineapple apices using encapsulation-vitrification *CryoLetters* 25(6):405-414.
- González-Arno, MT; Engelmann, F. 2006. Cryopreservation of plant germplasm using the encapsulation-dehydration technique: Review and case study on sugarcane. *CryoLetters* 27:155-168.
- _____; Engelmann, F; Huet, C; Urrea, C. 1993. Cryopreservation of encapsulated apices of sugarcane: effect of freezing procedure and histology. *CryoLetters* 14:303-308.
- _____; Martínez-Ocampo, Y; Molina Torres, J. 2009. Para conservar la biodiversidad genética vegetal. *Revista Ciencia* 60(2):78-86.

- _____; Panta, A; Roca, WM; Escobar, RH; Engelmann, F. 2008. Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 92:1-13.
- Hare, PD; Cress, WA; Staden, J van. 1998. Dissecting the role of osmolyte accumulation during stress. *Plant, Cell and Environment* 21: 535-553.
- Mari, S; Engelmann, F; Chabrilange, N; Huet, C; Michaux-Ferrière, N. 1995. Histocytological study of apices of coffee (*Coffea racemosa* and *C. sessiliflora*) *in vitro* plantlets during their cryopreservation using the encapsulation-dehydration technique. *CryoLetters* 16:289-298.
- Panis, B; Piette, B; André, E; Houwe, I van den; Swennen, R. 2011. Droplet vitrification: the first generic cryopreservation protocol for organized plant tissues? *Acta Horticulturae (ISHS)* 908:157-162.
- _____; Piette, B; Swennen, R. 2005. Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all *Musaceae*. *Plant Science* 168:45-55.
- Paulet, F; Engelmann, F; Glaszmann, JC. 1993. Cryopreservation of apices of *in vitro* plantlets of sugarcane (*Saccharum* sp. hybrids) using encapsulation/dehydration. *Plant Cell Reports* 12:525-529.
- Pence, VC. 1995. Cryopreservation of recalcitrant seeds. *In* *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 32, Cryopreservation of plant germplasm I. Bajaj, YPS. ed. Berlín, DE, Springer Verlag. p. 29-52.
- Sakai, A. 2004. Plant cryopreservation. *In* *Life in the frozen state*. Fuller, BJ; Lane, N; Benson, EE. Eds. Boca Raton, US, CRC Press. p. 329-345.
- _____; Engelmann, F. 2007. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review. *CryoLetters* 28:151-172.
- Sun, WQ. 2002. Methods for the study of water relations under desiccation stress. *In* *Drying without dying*. Black, M; Pritchard, HW. eds. Oxford, UK, CABI Publishing. 2:47-83.
- Vertucci, CB. 1989. Effects of cooling rates on seeds exposed to liquid nitrogen temperatures. *Plant Physiology* 90:1478-1485.
- Yamamoto, S; Rafique, T; Fukui, K; Sekizawa, K; Niino, T. 2012. V-cryo-plate procedure as an effective protocol for cryobanks: case study of mint cryopreservation. *CryoLetters* 33(1):12-23.
- _____; Rafique, T; Priyantha, WS; Fukui, K; Matsumoto, T; Niino, T. 2011. Development of a cryopreservation procedure using aluminium cryo-plates. *Cryo Letters* 32(3):256-65.





Estado actual de las investigaciones sobre crioconservación de germoplasma vegetal en la Argentina

Luis Mroginski¹, Hebe Rey², Natalia Dolce³, Adriana Scocchi⁴,
Andrea Clausen⁵, Claudia Luna⁶, Silvia Vila⁷, Ariana Digilio⁸,
Eduardo Flachsland⁹, Victoria Rivero¹⁰, Leonardo Togno¹¹

1. Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE), Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Nordeste (UNNE), Corrientes, Argentina, luis@agr.unne.edu.ar.

2. Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE), Corrientes, Argentina, hebe@agr.unne.edu.ar.

3. Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE), Corrientes, Argentina, ndolce@agr.unne.edu.ar.

4. Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE), actualmente en la empresa Paul Forestal S.R.L., Entre Ríos, Argentina, ascocchi@yahoo.es.

5. Estación Experimental Agropecuaria (EEA) del INTA en Balcarce, Balcarce, Buenos Aires, Argentina, aclausen@balcarce.inta.gov.ar.

6. Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE), Corrientes, Argentina, cluna@agr.unne.edu.ar.

7. Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE), actualmente en Estación Experimental Agropecuaria (EEA) del INTA en Mercedes, Corrientes, Argentina, skvila@yahoo.com.ar.

8. Estación Experimental Agropecuaria (EEA) del INTA en Balcarce, Balcarce, Buenos Aires, Argentina, adigilio@balcarce.inta.gov.ar.

9. Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE), Corrientes, Argentina, bifoliumar@yahoo.es.

10. Instituto de Recursos Biológicos (IRB) del INTA en Castelar, Castelar, Buenos Aires, Argentina, vrivero@cnia.inta.gov.ar.

11. Estación Experimental Agropecuaria (EEA) del INTA en La Consulta, La Consulta, Buenos Aires, Argentina, ltogno@laconsulta.inta.gov.ar.

Introducción

Argentina, un país con una variedad de climas, alberga una gran biodiversidad. Hay más de 9000 especies de plantas vasculares, siendo alrededor del 20 % endémicas (Zuloaga *et al.* 1999). La conservación *in situ* de los recursos fitogenéticos se lleva a cabo en 360 áreas protegidas que comprenden el 6.8 % del territorio nacional (Brown *et al.* 2006). La conservación *ex situ* se realiza en bancos de germoplasma y colecciones de plantas vivas. En este sentido, es muy importante la labor del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), que mantiene un banco base, nueve bancos activos y 10 colecciones en diferentes lugares del país, que albergan más de 66 000 accesiones. Más de 5000 accesiones son conservadas en universidades e institutos del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Hay relativamente pocas especies que se conservan *in vitro* (Clausen *et al.* 2008).

Muchas de las especies económicamente importantes para el país (por ejemplo trigo, maíz, porotos y zapallos) tienen —desde el punto de vista de conservación de germoplasma— semillas “ortodoxas” y son mantenidas en los denominados bancos de semillas. Sin embargo, otras especies, como yerba mate, té y cítricos, tienen semillas “recalcitrantes” o de comportamiento “intermedio”, que son muy sensibles a la desecación y no pueden ser almacenadas a bajas temperaturas, por lo que su germoplasma debe ser conservado mediante colecciones vivas, al igual que muchas importantes especies que obligatoriamente son propagadas en forma vegetativa (por ejemplo frutilla, papa, mandioca, batata y ajo). Estas colecciones de plantas vivas mantenidas en condiciones de campo están expuestas a estreses bióticos y abióticos que provocan pérdidas de accesiones. Asimismo, el mantenimiento de estas colecciones generalmente es muy oneroso. La criopreservación se presenta como una estrategia alternativa eficiente y económica para la conservación a largo plazo de este tipo de material vegetal (Scocchi y Rey 2004).

Investigaciones sobre criopreservación de germoplasma vegetal

Las investigaciones relacionadas con el desarrollo de protocolos de criopreservación de germoplasma vegetal se iniciaron en la Argentina en 2001 y se desarrollaron varios protocolos (cuadro 5.1), pero hasta el momento no se han implementado en forma práctica para ninguna especie (Mroginski y Rey 2007).

Allium sativum (Aliaceae)

El ajo es una especie nativa de Asia Central, que ha sido utilizada por milenios con fines condimenticios y para la conservación de alimentos. El cultivo de ajo es muy importante en Argentina, siendo el segundo productor mundial. Se han implementado varias técnicas de criopreservación para diferentes tipos de explantos: ápices de dientes, de bulbillos aéreos, plántulas *in vitro* y primordios de bulbillos aéreos (Keller 2002, Kim *et al.* 2006), y diferentes técnicas.



Cuadro 5.1. Porcentaje de plantas obtenidas luego de la crioconservación de nueve especies usando el método de encapsulación-deshidratación (ED) o vitrificación (V) con enfriamiento lento (L) o rápido (R).

Especies	Material crioconservado	Método	Porcentaje de plantas	Referencias	
<i>Allium sativum</i>	Ápices de dientes	V-R	90	Togno 2011	
		ED-L	95	"	
		ED-R	90	"	
	Bulbillos aéreos	V-R	30	"	
		ED-L	0	"	
		ED-R	0	"	
<i>Arachis pintoi</i> (2n=2x=20)	Semillas	V-R	90	Rey y Mroginski 2009	
	Meristemos caulinares	ED-R	17	Rey 2004, Rey <i>et al.</i> 2009	
	Ápices caulinares	ED-R	57	" , "	
	Segmentos uninodales	ED-R	0	" , "	
	Embriones somáticos	ED-R	27	"	
	(2n=2x=30)	Meristemos caulinares	ED-R	20	Rey 2004, Rey <i>et al.</i> 2009
		Ápices caulinares	ED-R	60	" , "
		Segmentos uninodales	ED-R	0	" , "
Embriones somáticos		ED-R	30	"	
<i>Citrus sinensis</i>	Ápices caulinares	ED-L	65	Dolce <i>et al.</i> 2004	
<i>Ilex paraguariensis</i>	Frutos	V-L	10	Mroginski <i>et al.</i> 2006	
	Embriones cigóticos	ED-R	57	Mroginski <i>et al.</i> 2008	
<i>Ilex dumosa</i>	Semillas	ED-R	40	Dolce <i>et al.</i> 2011	
	Embriones cigóticos	ED-R	42		
<i>Ipomoea batatas</i>	Ápices caulinares	V-R	0	Rivero 2011	
		ED-R	12.5		
<i>Melia azedarach</i>	Meristemos caulinares	ED-R	43	Scocchi 2005, Scocchi <i>et al.</i> 2004b	
		ED-L	60	"	
	Segmentos uninodales	ED-R	23	"	
		ED-L	57	"	
		ED-R	45	"	
	Yemas despiertas	ED-L	70	"	
		ED-R	40	"	
	Yemas dormidas	ED-L	52	"	
		ED-R	0	"	
	Semillas o frutos	ED-L	0	"	
		ED-R	0	"	
Embriones somáticos	ED-L	36	" , Scocchi <i>et al.</i> 2007		
<i>Oncidium bifolium</i>	Semillas	ED-R	5	Flachsland <i>et al.</i> 2006	
	Protocormos	ED-R	11		
<i>Cyrtopodium hatschbachii</i>	Semillas	ED-R	--	Surenciski <i>et al.</i> 2007	
<i>Solanum tuberosum</i>	Ápices caulinares	V-R	4.5-27.3	Digilio 2004	
<i>Toona ciliata</i>	Semillas	V-R	35	Scocchi <i>et al.</i> 2004a	

Fuente: Mroginski 2011.



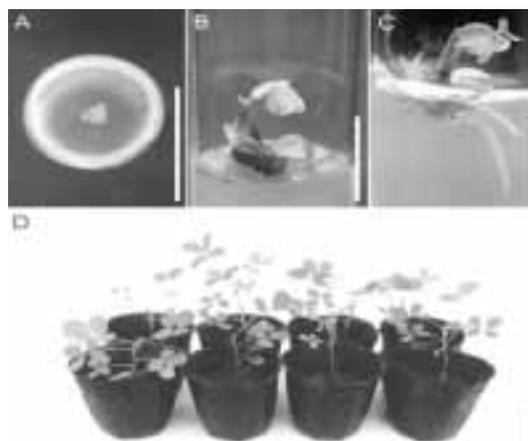
En el IBONE se desarrollaron tres protocolos para bulbillos aéreos y ápices de dientes, utilizando los métodos de la gota congelada y encapsulamiento-deshidratación con descenso térmico rápido y lento. En la técnica de encapsulamiento-deshidratación, los ápices fueron encapsulados con 3 % de alginato de calcio. Las cápsulas fueron precultivadas en tres soluciones de concentraciones crecientes de sacarosa (0.5, 0.75, 1 M) en agitación permanente a 80 rpm. La deshidratación se realizó con gel de sílice durante cinco horas. Posteriormente los ápices fueron colocados en el equipo de descenso programado de temperatura e introducidos en nitrógeno líquido (24 horas). Luego fueron descongelados a 30 °C durante dos minutos, rehidratados en medios líquidos con concentración decreciente de sacarosa (0.75 y 0.5 M) y recultivados en medio Murashige y Skoog (1962) modificado por Conci (Conci *et al.* 1986). Esta metodología permitió obtener aproximadamente 95 % de regeneración para ápices de dientes de tres clones; sin embargo, los bulbillos aéreos no sobrevivieron a los tratamientos previos.

En la técnica de la gota congelada los ápices fueron deshidratados con PVS3 durante 150 minutos, obteniendo porcentajes de regeneración cercanos al 95 % para la ápices de dientes y del 30 % para ápices de bulbillos aéreos (Togno 2004).

Arachis pintoi (Leguminosae)

Esta especie es considerada como una muy buena forrajera para áreas tropicales y subtropicales. Presenta dos citotipos, uno diploide ($2n=2x=20$) y otro triploide ($2n=3x=30$). El primero produce relativamente pocas semillas, las que pierden rápidamente su viabilidad. El triploide, por su parte, no produce semillas y su propagación debe hacerse obligatoriamente en forma vegetativa. En consecuencia, la conservación de germoplasma de esta especie se hace a través de colecciones de plantas en el campo.

Figura 5.1. Crioconservación de ápices caulinares de *Arachis pintoi* ($2n=2x=20$), luego del descenso directo de temperatura a -196 °C aplicando la técnica de encapsulación-deshidratación: A) ápice caulinar crioconservado a los siete días; B) vástago a los 60 días; C) plantas a los 90 días; D) plantas establecidas en tierra a los 60 días de haber sido transferidas a suelo (la barra vertical indica 5 mm en A, 1 cm en B-C y 5 cm en D).



Fuente: Rey 2004.

Recientemente en el Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE) se logró que el 83 % de ápices caulinares mantenidos *in vitro* regeneren plantas luego de un año de cultivo (Rey y Mroginski 2005). Asimismo se han desarrollado procedimientos que permiten la crioconservación de diferentes materiales de *Arachis pintoi* (cuadro 5.1). Las semillas del citotipo diploide pueden ser eficientemente conservadas a -196 °C utilizando el método de la vitrificación, lográndose, luego de su descongelado, que germine el 90 % de ellas (Rey y Mroginski 2009). Asimismo, mediante la utilización del método de encapsulación-deshidratación, se consiguió crioconservar meristemos, ápices caulinares y embriones somáticos (Rey 2004), de los cuales, dependiendo del explante, entre el 17 % y el 60 % regeneraron plantas (cuadro 5.1). El empleo de técnicas isoenzimáticas y moleculares permitieron comprobar que estas plantas son idénticas a las plantas dadoras de explantes (Rey *et al.* 2009).

***Citrus sinensis* (Rutaceae)**

Los ápices caulinares de plantas de naranjo dulce obtenidos por cultivo *in vitro* de nucelas fueron exitosamente crioconservados aplicando la técnica de la encapsulación-deshidratación (cuadro 5.1). Los mejores porcentajes de supervivencia (65 %) se obtuvieron cuando los explantes encapsulados (técnica del alginato de calcio) fueron pretratados con sacarosa (0.5 M durante tres días), deshidratados con gel de sílice (cinco horas) y finalmente sometidos a un descenso programado de temperatura hasta -30 °C (1 °C/min) seguido de inmersión en nitrógeno líquido (Dolce *et al.* 2004).

***Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae)**

La “yerba mate” es un cultivo importante en algunas regiones de Argentina, Brasil y Paraguay. Sus hojas son utilizadas en una popular infusión denominada “mate”. Sus semillas poseen embriones rudimentarios que permanecen en estado inmaduro (forma globular o corazón) durante mucho tiempo después de que los frutos alcanzan su madurez. Desde el punto de vista de su conservación, sus semillas presentan un problema adicional, dado que son muy sensibles a la desecación y no pueden ser almacenadas a bajas temperaturas. Es decir, son semillas recalcitrantes y no es posible conservarlas por largo tiempo utilizando los métodos convencionales y, en consecuencia, el germoplasma de la yerba mate debe ser mantenido en el campo en forma de colecciones de plantas.

En el IBONE se desarrollaron dos estrategias para la crioconservación de *Ilex paraguariensis*:

- 1) Crioconservación de frutos inmaduros. Los frutos fueron crioconservados en nitrógeno líquido en una solución crioprotectora que contenía 50 % de glicerol y 50 % de sacarosa y usando el método de la vitrificación y un congelamiento lento (1 °C/min hasta 40 °C). Los embriones de estos frutos fueron aislados y cultivados *in vitro* en el medio de Murashige y Skoog (1962), diluido cuatro veces, con 3 % de sacarosa y 0.1 mg/l de zeatina. El porcentaje de regeneración de plantas fue relativamente bajo (10 %). Este método también fue ensayado en otras especies del género *Ilex*, tales como *I. brasiliensis*, *I. dumosa*, *I. intergerrima* e *I. pseudoboxus* (Mroginski *et al.* 2006).



2) Crioconservación de embriones cigóticos. Los embriones inmaduros en estado de corazón fueron asépticamente removidos de las semillas y precultivados (siete días) en la oscuridad a 27 ± 2 °C en el medio semisólido (0.8 % de agar) de Murashige y Skoog (1962) diluido cuatro veces, 3 % de sacarosa y 0.1 mg/l de zeatina. Luego los embriones fueron encapsulados (en 3 % de alginato de calcio) y pretratados con intervalos de 24 horas en medios líquidos suplementados con concentraciones de sacarosa progresivamente aumentadas (0.5, 0.75 y 1 M). Posteriormente los embriones fueron deshidratados durante cinco horas con gel de sílice hasta un contenido de agua del 25 %. Finalmente los embriones fueron congelados directamente en nitrógeno líquido. Después del descongelamiento, el 57 % de ellos regeneraron plantas. Este protocolo fue ensayado con otras especies de *Ilex*, obteniéndose valores de regeneración de plantas de 71 % con *I. brasiliensis*, 40 % con *I. intergerrima*, 30 % con *I. dumosa*, 33 % con *I. pseudoboxus*, 10 % con *I. taubertiana*, 39 % con *I. theezans* (Mroginski *et al.* 2008) y 42 % con *Ilex dumosa* (Dolce *et al.* 2011). Además, con esta especie este protocolo posibilitó que el 40 % de las semillas crioconservadas germinaran exitosamente (Dolce *et al.* 2011).

***Ipomoea batatas* (L.) Lam.**

El germoplasma de batata es valioso como fuente de vitaminas, fibras y minerales. Además la presencia de antocianinas y carotenos le confiere excelentes propiedades funcionales en la prevención de enfermedades (Martí 2008).

En el Banco Base de Germoplasma del INTA en Castelar se han aplicado procedimientos que permiten la crioconservación de ápices caulinares de plántulas de batata *in vitro* empleando las metodologías de la gota congelada y de encapsulación-deshidratación. Con la metodología de la gota congelada se observó una baja supervivencia de los ápices sin formación de plántulas. Por el contrario, para la metodología de encapsulación-deshidratación, los precultivos con soluciones de sacarosa durante 48 horas (0.3 M 24 h + 0.5 M 24 h y 0.5 M 24 h + 0.75 M 24 h) permitieron una regeneración promedio de 12.5 % luego de 6 y 4 horas de deshidratación con sílica gel respectivamente (Rivero 2011).

Actualmente se están incorporando variantes en las distintas etapas de la metodología de la gota congelada y aplicando la metodología a distintos genotipos de la colección de batata *in vitro*.

***Melia azedarach* (Meliaceae)**

Esta especie nativa del Este de Asia, conocida como “árbol del paraíso”, es un importante árbol forestal en la Argentina, por la calidad de su madera y su excelente adaptabilidad a un amplio rango de condiciones de suelo y clima. Asimismo, de sus hojas se extraen productos insecticidas (Breuer y Schmidt 1995, Chen *et al.* 1996, Andreu *et al.* 2000, Ursi Ventura e Ito 2000, Carpinella *et al.* 2003) y está presente un factor antiviral que inhibe la replicación de varios virus (Coto y Torres 1999, Andrei *et al.* 1986).

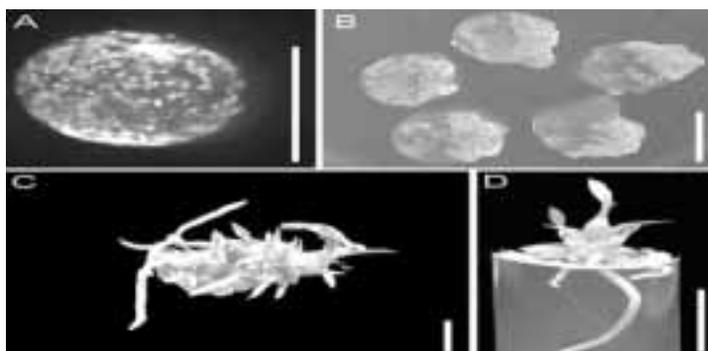
Varios explantes (meristemos apicales, segmentos uninodales, embriones somáticos, yemas dormidas y despiertas) fueron exitosamente crioconservados mediante el empleo de la técnica del encapsulamiento (alginato de calcio), seguida de la deshidratación con gel de sílice a 21-26 % de humedad y el congelamiento lento (1 °C/min hasta -40 °C y

luego sumergidos en nitrógeno líquido). Los valores de regeneración de plantas obtenidos oscilaron, dependiendo del explante, entre 23 % y 70 % (cuadro 5.1). Sin embargo, la crioconservación de frutos o de semillas no permitió la ulterior obtención de plantas (Scocchi 2005, Scocchi *et al.* 2004b y 2007).

Oncidium bifolium y *Cyrtopodium hatschbachii* (Orchidaceae)

Como parte de un proyecto de conservación de orquídeas nativas que se está llevando a cabo en el IBONE, se desarrollaron protocolos para la crioconservación de semillas y de protocormos cultivados *in vitro* de *Oncidium bifolium* y de semillas de *Cyrtopodium hatschbachii* (cuadro 5.1). Para el género *Oncidium* se empleó el encapsulamiento de las semillas en Murashige y Skoog (1962) diluido a la mitad y 3 % de alginato de calcio y para el género *Cyrtopodium* las semillas fueron encapsuladas solo en 3 % de alginato de calcio. Las semillas fueron pretratadas en un medio líquido (mantenido en agitación permanente a 80 rpm) suplementado, a intervalos de 24 horas, con dosis crecientes de sacarosa (0.15, 0.25, 0.5 y 0.75 M). La deshidratación se llevó a cabo con gel de sílice, durante cinco horas, hasta 19.2 % de humedad. Posteriormente las semillas fueron sumergidas en nitrógeno líquido (una hora), descongeladas a 30 °C durante dos minutos, post-tratadas usando la misma serie de medios líquidos con dosis decrecientes de sacarosa (0.75, 0.5, 0.25 y 0.15 M) y recultivadas sobre el medio de Murashige y Skoog (1962) con 0.1 M de sacarosa y 0.7 % de agar. En estas condiciones, el 4.8 % de las semillas crioconservadas de *O. bifolium* produjeron plantas completas. Siguiendo el mismo procedimiento el 11.3 % de los protocormos crioconservados regeneraron plantas (Flachsland *et al.* 2006). El germoplasma crioconservado de *C. hatschbachii* demostró ser estable cromosómicamente (Surenciski *et al.* 2007).

Figura 5.2. Crioconservación de semillas de *Oncidium bifolium* aplicando la técnica de encapsulación-deshidratación: A) semillas crioconservadas a los siete días; B) semillas crioconservadas con protocormos a los 45 días; C) múltiples protocormos y plantas, luego de la crioconservación a los 90 días, emergiendo de la cápsula de alginato; D) planta proveniente de crioconservación a los 120 días (la barra vertical indica 5 mm en A y B, 1 cm en C y D).



Fuente: Flachsland *et al.* 2005.



***Solanum tuberosum* (Solanaceae)**

La papa por su alto valor nutritivo se constituye como el producto no cerealero número uno del mundo y el cuarto cultivo en producción (t) después del maíz, el trigo y el arroz (FAO 2012). Se han desarrollado diversos procedimientos que permiten la crioconservación de especies silvestres y cultivadas de papa (Kaczmarczyk *et al.* 2011).

Con el objetivo de implementar la conservación a largo plazo de germoplasma de variedades andinas de papa, se inició en el Banco de Germoplasma de la EEA en Balcarce, la puesta a punto de la técnica de vitrificación de Steponkus *et al.* (1992), desarrollada conjuntamente con el Centro Internacional de la Papa en 1995. Los ápices caulinares de plántulas *in vitro* luego de 24 y 5 horas de precultivo con dosis crecientes de sacarosa (0.09 y 0.6 M) fueron deshidratados por diferentes tiempos en una solución compuesta por glicol de etileno 50 %, sorbitol 15 % y albúmina de suero bovino 6 % (p/p). Esto permitió obtener porcentajes de brotación de 4.5 % a 27.3 % poscrioconservación para diferentes tiempos de deshidratación y genotipos de papa andina (Digilio 2004).

Asimismo, se inició la puesta a punto del método de la gota sobre folios de aluminio (Kartha *et al.* 1982). Los ápices caulinares de plántulas *in vitro* luego de 24 horas en precultivo en una solución 0.09 M de sacarosa y 20 minutos en una solución de 2 M de glicerol y 0.4 M de sacarosa, fueron deshidratados por diferentes tiempos en PVS2 (Sakai *et al.* 1990). Esto permitió obtener a los 50 minutos de deshidratación 50 % de ápices brotados poscrioconservación para la variedad ‘Chaqueña’ y 25 % para la variedad ‘Waicha’ (datos no publicados).

***Toona ciliata* (Meliaceae)**

El “cedro australiano” o “toona” es una especie nativa de Australia (Keenan *et al.* 1997, Herwitz *et al.* 1998). En la Argentina es una valiosa especie forestal (Rey 1987), que normalmente se propaga mediante semillas caracterizadas por la rápida pérdida de su poder germinativo cuando se conservan a temperatura ambiente o en refrigerador (Scocchi *et al.* 2004a). En el IBONE se desarrolló un protocolo mediante el cual, utilizando el método de vitrificación y congelado rápido, es factible la conservación de las semillas en nitrógeno líquido (Scocchi *et al.* 2004a).

Otras iniciativas

Recientemente se iniciaron actividades que incluyen el cultivo de anteras de arroz, una de cuyas limitaciones es el breve periodo durante el cual los explantes están disponibles (Marassi *et al.* 2006). También se iniciaron investigaciones para establecer un protocolo para la crioconservación de yemas en dormición de manzana y pera.

Se ha efectuado un análisis económico para el establecimiento de un criobanco de germoplasma de papa y ajo. Se estimó el costo (USD/entrada.año) de conservar una

entrada considerando la puesta a punto de la metodología de la gota y el mantenimiento en nitrógeno líquido a lo largo de un año (Digilio *et al.* 2008).

Conclusiones

En la Argentina, la crioconservación ha sido considerada como una alternativa ideal para la conservación de germoplasma vegetal, tanto de especies de interés económico como de especies nativas en peligro de extinción, tal como lo evidencian las actividades que se han iniciado en distintas especies. Sin embargo, todos los proyectos se caracterizan por contar con escaso financiamiento, lo que atenta contra la aplicación de esa técnica en los distintos laboratorios. Otro problema que conspira contra esa aplicación es el relativamente bajo número de personal entrenado, el cual se ha intentado mitigar mediante la celebración de cursos de posgrado y pasantías. Asimismo, en algunas universidades se están desarrollando tesis doctorales y de maestría sobre esta temática.

Referencias

- Andrei, GM; Lampuri, JS; Coto, CE; Torres, RA de. 1986. An antiviral factor from *Melia azedarach* L. prevents Tacaribe virus encephalitis in mice. *Experientia* 42:843–845.
- Andreu, J; Sans, A; Riba, M. 2000. Antifeedant activity of fruit and seed extract of *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* on larvae of *Sesamia nonagrioides*. *Phytoparasitica* 28:311–319.
- Breuer, M; Schmidt, GH. 1995. Influence of a short period treatment with *Melia azedarach* extract on food intake and growth of the larvae of *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lep., *Noctuidae*). *Journal of Plant Diseases and Protection* 102:633-654.
- Brown, A; Martínez Ortiz, U; Acerbi, M; Corcuera, J. 2006. La situación ambiental argentina. Buenos Aires, AR, Fundación Vida Silvestre. 440 p.
- Carpinella, MC; Giorda, LM; Ferrayoli, CG; Palacios, SM. 2003. Antifungal effects of different organic extracts from *Melia azedarach* L. on phytopathogenic fungi and their isolated active components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51:2506-2511.
- Chen, C; Chang, S; Cheng, L; Hou, R. 1996. Deterrent effect of the chinaberry extract on oviposition of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lep., *Yponomeutidae*). *Journal of Applied Entomology* 120(1-5):165-169.
- Clausen, AM; Ferrer, ME; Formica, MB. 2008. eds. Situación de los recursos fitogenéticos en la Argentina. Buenos Aires, AR, Ediciones INTA. 57 p.
- Conci, VC; Moriconi, DN; Nome, SF. 1986. Cultivo de meristemas de 6 tipos clonales de ajo (*Allium sativum* L.). *γyton*, *Revista Internacional de Botánica Experimental* 46:187-194.

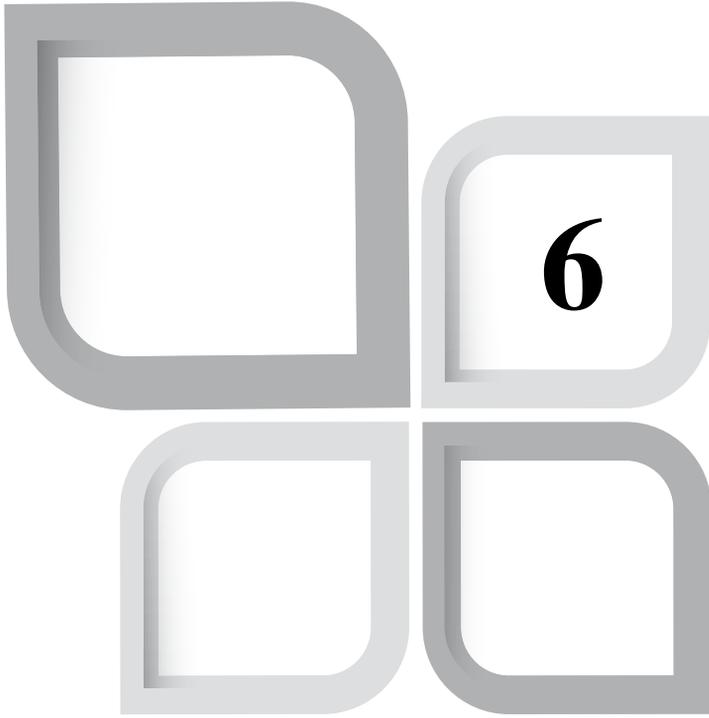


- Coto, CE; Torres, RA de. 1999. El paraíso (*Melia azedarach* L.): fuente de productos bioactivos. *Dominguezia* 15:5-15.
- Digilio, A. 2004. Crioconservación de variedades nativas de *Solanum tuberosum* spp. *andigenum* Juz. & Bukasov. Tesis M.Sc. Buenos Aires, AR, Universidad Nacional de Mar del Plata.
- _____; Rivero, MV; Togno, LS; Clausen, AM. 2008. Estimación de los costos de conservación en bancos de germoplasma del INTA. In III Congreso Nacional de Conservación de la Biodiversidad (2008, Buenos Aires, AR). Resúmenes. Buenos Aires, AR, UBA. p. 144.
- Dolce, NR; Mroginski, LA; Rey, HY. 2011 Cryopreservation of *Ilex dumosa* (Aquifoliaceae) germplasm. *Acta Horticulturae*. En prensa.
- _____; Scocchi, AM; Mroginski, LA. 2004. Crioconservación de ápices de *Citrus sinensis*. *FACENA* 20:37-45.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, IT). 2012. FAOSTAT- producción agrícola de cultivos (en línea). Roma, IT, Dirección de Estadística. Disponible en <http://www.fao.org/corp/statistics/es/> [06 junio 2010].
- Flachsland, E; Terada, G; Scocchi, AM; Rey, HY; Mroginski, LA; Engelmann, F. 2006. Cryopreservation of seeds and in vitro-cultured protocorms of *Oncidium bifolium* Sims. (Orchidaceae) by encapsulation-dehydration. *CryoLetters* 27:235-242.
- Herwitz, SR; Slye, RE; Turton, SM. 1998. Redefining the ecological niche of a tropical rain forest canopy tree species using airborne imagery: long term grown dynamics of *Toona ciliata*. *Journal of Tropical Ecology* 4:683-703.
- Kaczmarczyk, A; Rokka, VM; Keller, ERJ. 2011. Potato shoot tip cryopreservation. A review. *Potato Research* 54 (1):45-79.
- Kartha, KK; Leung, NL; Mroginski, LA. 1982. In vitro growth responses and plant regeneration from cryopreserved meristems of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie*. 107:133-140.
- Keenan, R; Lamb, D; Woldring, O; Jensen, R. 1997. Restoration of plant diversity beneath tropical tree plantation in Northern Australia. *Forest Ecology and Management* 99:117-131.
- Keller, E. 2002. II.1 Cryopreservation of *Allium sativum* L. (Garlic). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. In *Cryopreservation of Plant Germplasm II*. Berlin, DE, Springer-Verlag. 50: 37-47.

- Kim, HH; Lee, JK; Yoon, JW; Ji, JJ; Nam, SS; Hwang, HS; Cho, EG; Engelmann, F. 2006. Cryopreservation of garlic bulbils primordia by the droplet-vitrification procedure. *CryoLetters* 27(3):143-153.
- Marassi, MA; Scocchi, AS; Gonzalez, AM. 2006. Plant regeneration from rice anthers cryopreserved by an encapsulation/dehydration technique. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 42:31-36.
- Martí, H. 2008. Todo batata 01. Boletín del proyecto de batata del INTA 1(1).
- Mroginski, LA; Rey, HY. 2007. Cryopreservation of plant germplasm in Argentina. *Advances in Horticultural Science* 21:270-273.
- _____; Sansberro, PA; Scocchi, AM; Luna, C; Rey, HY. 2006. Effect of fruit cryopreservation on in vitro germination of zygotic embryos of several species of *Ilex*. *Acta Horticulturae* 725:417-420.
- _____; Sansberro, PA; Scocchi, AM; Luna, C; Rey, HY. 2008. A cryopreservation protocol for immature zygotic embryos of species of *Ilex* (Aquifoliaceae). *Biocell* 32:33-39.
- Murashige, T; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- Rey, LA. 1987. Primeras evaluaciones del comportamiento del cedro australiano (*Toona ciliata*) en la zona Alto Paraná, Misiones Argentina. *In* Simposio sobre silvicultura y mejoramiento genético de especies forestales (1987, Buenos Aires, AR, CIEF). *Actas*. p. 38-44.
- Rey, HY. 2004. Conservación *in vitro* de germoplasma de *Arachis pintoi* (Leguminosae). Tesis doctoral. Corrientes, AR, Universidad Nacional del Nordeste.
- _____; Faloci, MM; Medina, R; Mroginski, LA. 2009. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips and apical meristems of the forage legume *Arachis pintoi*. *CryoLetters* 30(5):347-358.
- _____; Mroginski, LA. 2005. Conservación *in vitro* de germoplasma de *Arachis pintoi* (Leguminosae). *Phyton-International Journal of Experimental Botany* 181-186.
- _____; Mroginski, LA. 2009. Cryopreservation of *Arachis pintoi* (Leguminosae) seeds by vitrification. *Seed Science & Technology* 37:202-205.
- Rivero, MV. 2011. Crioconservación de germoplasma de batata (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). Tesis M.Sc., Buenos Aires, AR, Universidad Nacional de Mar del Plata.



- Sakai, A; Kobayashi, S; Oiyama, I. 1990. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. Var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. Plant Cell Reports 9(1):30-33.
- Schäfer-Menuhr, A; Schumacher, HM; Mix-Wagner, G. 1997. Long-term storage of old potato varieties by cryopreservation of shoot-tips in liquid nitrogen. Plant Genetic Resources Newsletter 111:19-24.
- Scocchi, AM. 2005. Conservación *in vitro* de germoplasma de paraíso (*Melia azedarach*). Tesis doctoral. Universidad Nacional del Nordeste, Argentina.
- _____; Dieringer, E; Mroginski, E; Mroginski, LA. 2004a. Conservación de semillas de cedro australiano (*Toona ciliata*). Plant Genetic Resources Newsletter 137:1-4.
- _____; Faloci, M; Medina, R; Olmos, S; Mroginski, LA. 2004b. Plant recovery of cryopreserved apical meristem-tips of *Melia azedarach* L. using encapsulation/dehydration and assessment of their genetic stability. Euphytica 135:29-38.
- _____; Rey, HY. 2004. Conservación de germoplasma *in vitro*. In Biotecnología y mejoramiento vegetal. Echenique, V; Rubinstein, C; Mroginski, L. eds. Buenos Aires, AR, Ediciones INTA. p. 179-185.
- _____; Vila, SK; Mroginski, LA; Engelmann, F. 2007. Cryopreservation of somatic embryos of paradise tree (*Melia azedarach*). CryoLetters 28:281-290.
- Steponkus PL; Langis, R; Fujikama, S. 1992. Cryopreservation of plant tissues by vitrification. In Steponkus, PL. ed. Advances in low-temperature biology. Vol.1. Hampton Mill, UK, JAI Press Ltd. p. 1-61.
- Surenciski, MR; Dematteis, M; Flachslan, EA. 2007. Chromosome stability in cryopreserved germplasm of *Cyrtopodium hatschbachii* (Orchidaceae). Annales Botanici Fennici 44:287-292.
- Togno, L. 2011. Crioconservación de germoplasma de ajo (*Allium sativum* L.) Tesis M.Sc. Buenos Aires, AR, Universidad Nacional de Mar del Plata.
- Ursi Ventura, M; Ito, M. 2000. Antifeedant activity of *Melia azedarach* (L.) extracts to *Diabrotica speciosa* (Genn.) (Coleoptera: Chrysomelidae) beetles. Brazilian Archives of Biology and Technology 2:215-219.
- Zuloaga, FO; Morrone, O; Rodríguez, D. 1999. Análisis de la biodiversidad en plantas vasculares de la Argentina. Kurtziana 27:17-167.



Crioconservación de germoplasma vegetal en Bolivia

Teresa Ávila¹, Gisell Mercado²,
Noemi Aguilar³

1. Centro de Investigaciones Fitoecogenéticas de Pairumani (CIFP), Cochabamba, Bolivia, t.avila@fundacionpatino.org.
2. Fundación para la Promoción e Investigación de Productos Andinos (PROINPA), Cochabamba, Bolivia, g.mercadozubieta@gmail.com.
3. Centro de Investigaciones Fitoecogenéticas de Pairumani (CIFP), Cochabamba, Bolivia, Noe_6000@yahoo.com.es.

Introducción

Bolivia es un importante centro de diversificación genética vegetal, debido a sus particulares condiciones topográficas y climáticas. La cordillera de los Andes, que atraviesa el país, da lugar a valles aislados por altas cadenas de montañas, con muchos microclimas, los cuales brindan las condiciones apropiadas para favorecer procesos de radiación adaptativa, con ciclos de convergencia por el traslado de germoplasma por parte de las poblaciones humanas.

La diversidad genética existente, tanto de especies domesticadas como de parientes silvestres de plantas cultivadas, está expuesta al riesgo de la erosión, debido a diferentes factores, tales como cambios ambientales de origen natural y antropogénico, explotación, introducción de nuevas especies y variedades mejoradas y cambios en las costumbres alimenticias. Por este motivo, la conservación de los recursos genéticos es una actividad muy importante para garantizar la persistencia de estos recursos.

En Bolivia se están realizando diferentes esfuerzos para la conservación de los recursos genéticos de plantas cultivadas y sus parientes silvestres. La primera recolección sistemática de germoplasma en el país se realizó a principios de los años cincuenta en maíz. A partir de entonces en todo el territorio nacional se han realizado recolecciones de diferentes especies nativas y de especies introducidas hace bastante tiempo. Durante muchos años, esas recolecciones fueron resguardadas bajo condiciones controladas en bancos de germoplasma pertenecientes a fundaciones privadas de investigación y universidades. En diciembre de 2010, estas colecciones fueron traspasadas al Instituto Nacional de Innovación Agropecuaria y Forestal para su conservación.

De igual manera, se han desarrollado metodologías para apoyar la conservación *in situ* realizada en microcentros de diversidad o zonas geográficas específicas que se caracterizan por poseer una gran agrobiodiversidad, cuyo manejo se halla estrechamente vinculado a expresiones socioculturales ancestrales.

Los bancos de germoplasma están utilizando cultivo de tejidos para apoyar las estrategias de conservación y manejo de las colecciones en especies de reproducción asexual y de semilla recalcitrante. Se han desarrollado protocolos para la conservación *in vitro* de tubérculos y raíces andinas, pasifloras, banano, yuca y algunas familias ornamentales como orquídeas y bromelias.

De igual manera, técnicas moleculares están apoyando los estudios de diversidad genética y de evaluación de genes de interés.

Desde 2007, se han optimizado en el país los protocolos para la criopreservación de diferentes especies de interés nacional, como pasifloras y tubérculos andinos.



Crioconservación de pasifloras

En el continente americano existen más de 400 especies del género *Passiflora*, de las cuales en Bolivia se han encontrado alrededor de 60 especies (Vásquez 1998). A pesar de que muchas de estas especies son permanentemente utilizadas en el ámbito local, ninguna ha sido sometida a mejoramiento. La diversidad genética de estas plantas es única. También presentan características de rusticidad, como la resistencia o tolerancia a condiciones adversas de clima, suelo, enfermedades y plagas. Sus frutos se consumen localmente en forma natural y también se utilizan en bebidas y postres (Guzmán 1999).

El Centro de Investigaciones Fitoecogenéticas de Pairumani (CIFP) posee una colección de pasifloras de frutos comestibles de las especies *Passiflora mollissima*, *P. tarminiana* (ambas tumbo) y *P. ligularis* (granadilla), además de material silvestre de las especies *P. pinnatistipula*, *P. umbilicata*, *P. amethystina*, *P. naviculata*, *P. mandonii*, *P. morifolia* y *P. tricuspis*. Las semillas de la mayoría de las especies de esta familia botánica no toleran la desecación (Guzzo *et al.* 2003) y tienen problemas para germinar luego de conservarlas en frío; por ese motivo se propuso la conservación *in vitro* como una alternativa para mantener la colección de germoplasma. Esta colección se preserva mediante conservación *in vivo* en jardines y conservación *in vitro* (Ávila *et al.* 2004).

Con el objetivo de conservar las colecciones a largo plazo, evitando las manipulaciones anuales que involucra la conservación *in vitro*, se han establecido protocolos para crioconservar semillas y ápices de plantas *in vitro* de *P. pinnatistipula*, *P. tarminiana* y *P. mollissima*. La primera es una especie silvestre y las otras dos son especies cultivadas.

Crioconservación de semillas

Metodología

Las semillas fueron extraídas de frutos maduros e inmediatamente fueron preparadas para someterlas a los tratamientos de desecación y crioconservación. Fueron desecadas en el interior de recipientes de plástico con cierre hermético, en los cuales se colocaron cajas de Petri abiertas con gel de sílice (una cantidad de al menos cuatro veces el peso de la semilla).

Las semillas se introdujeron al nitrógeno líquido en crioviales durante 24 horas. Posteriormente a su inmersión al nitrógeno líquido, los crioviales se dejaron a temperatura ambiente durante aproximadamente tres horas. Luego se retiraron las semillas y se colocaron en el interior de envases de plástico con cierre hermético, con una atmósfera saturada de vapor de agua durante 24 horas. Posteriormente fueron sumergidas en 500 ppm de ácido giberélico (GA_3) durante 48 horas y se procedió a desinfectarlas y a extraer los embriones para ser cultivados.



Los ensayos se realizaron utilizando semillas desecadas durante diferentes tiempos (0, 6, 12, 24, 36 y 48 horas) y semillas sin desecar.

Resultados obtenidos

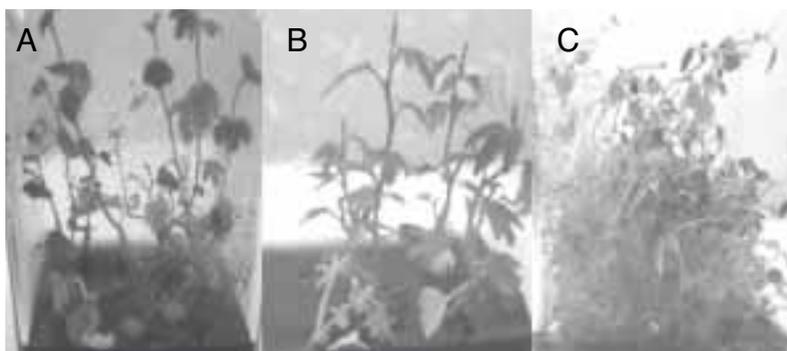
El contenido inicial de humedad de las semillas de *P. pinnatistipula* fue más bajo que el de las especies *P. tarminiana* y *P. mollissima* (12 % frente a 17-18 %, respectivamente). Sin embargo, después de 12 horas de desecación en gel de sílice, el contenido de humedad fue similar en las tres especies (alrededor de 5 %).

El alto contenido de humedad inicial de las semillas de las especies *P. tarminiana* y *P. mollissima* se reflejó en su respuesta a la exposición al nitrógeno líquido, cuando no fueron desecadas. Las semillas no desecadas de *P. pinnatistipula* presentaron 75 % de germinación después de la inmersión en nitrógeno líquido, mientras que en las otras dos especies ninguna semilla germinó, haciendo suponer que el contenido alto de humedad hizo que se produjeran daños por congelamiento.

Se observó una influencia del tiempo de desecación sobre la germinación de las semillas que fueron crioconservadas. En *P. pinnatistipula* y *P. mollissima*, se observó el mayor porcentaje de germinación (84 % y 73 %, respectivamente) cuando las semillas fueron desecadas por 12 horas (4.5 % y 4.8 %, respectivamente de contenido de humedad). Las semillas de *P. tarminiana* solamente germinaron luego de ser desecadas durante seis horas (9 % de contenido de humedad), mostrando un 63 % de germinación (Gonzalez-Benito *et al.* 2009).

Todas las plantas desarrolladas a partir de las semillas crioconservadas mostraron morfología y crecimiento normal (figura 6.1).

Figura 6.1. Plantas desarrolladas a partir de semillas crioconservadas:
A) *P. mollissima*, B) *P. tarminiana*, C) *P. pinnatistipula*.



Fuente: Teresa Ávila (CIFP).

Crioconservación de ápices caulinares por vitrificación

Se utilizaron plantas multiplicadas *in vitro*, en un medio que contenía sales minerales MS (Murashige y Skoog 1962), vitaminas de Gamborg, 2 g/l de carbón activo, 200 mg/l de hidrolizado de caseína, 0.5 mg/l de GA₃ y 20 g/l de sacarosa.

Precultivo

A partir de las yemas apicales de plantas *in vitro*, se extrajeron ápices caulinares, con una longitud de 1-1.5 mm. Los ápices caulinares se precultivaron durante tres días en un medio de multiplicación adicionado con 0.3 M de sacarosa.

Pretratamiento

En cada criovial se añadió 1 ml de solución de carga (2 M de glicerol y 0.4 M de sacarosa, en un medio líquido con sales MS y vitaminas Gamborg). Se introdujeron cinco ápices en cada criovial, permaneciendo en la solución por 20 minutos. Después de este tiempo, se retiró la solución de carga de los crioviales, los cuales fueron colocados sobre hielo picado e inmediatamente se añadió 1 ml de solución PVS2 (“Plant Vitrification Solution 2”) fría, que consistía en 24 % v/v de glicerol, 13.5 % v/v de etilenglicol, 13.6 % de dimetilsulfóxido (DMSO) en un medio líquido con sales MS, vitaminas Gamborg y 0.4 M de sacarosa. Los ápices estuvieron sumergidos en PVS2 durante diferentes períodos (0, 30, 60, 90, 120, 150, 180 y 210 minutos).

A continuación se introdujeron los crioviales en nitrógeno líquido durante 24 horas.

Recalentamiento

Después de la crioconservación, se procedió al descongelamiento sumergiendo los crioviales en agua destilada estéril a 40 °C durante dos a tres minutos. Posteriormente se retiró la solución de PVS2 dentro la cámara de flujo laminar y se añadió inmediatamente 1 ml de solución de lavado (medio líquido con sales MS, vitaminas Gamborg y 1.2 M de sacarosa), la cual fue retirada después de 20 minutos.

Los ápices fueron entonces cultivados en un medio de recuperación, que incluyó sales minerales MS^{1/2}, vitaminas Gamborg, 2 g/l de carbón activo, 200 mg/l de caseína hidrolizada y 1.5 mg/l de GA₃, 20 g/l de sacarosa. La incubación tuvo lugar a 25 °C, los primeros 10 días en oscuridad y posteriormente a 600-700 lux, con un fotoperiodo de 16 horas luz.

Resultados obtenidos

El tratamiento con PVS2 mostró una influencia en la respuesta a la crioconservación. En *P. pinnatistipula* y *P. mollissima* se presentó una mayor germinación (52 % y 56 %, respectivamente).



respectivamente) cuando fueron tratadas durante 150 minutos en solución PVS2. En *P. tarminiana* la mayor germinación de las yemas (64 %) se observó tras exponerlas durante 90 minutos a la solución vitrificante. Los ápices de las tres especies germinaron y desarrollaron plantas normales (figura 6.2).

Figura 6.2. Ápices caulinares crioconservados a los 30 días de cultivo:
A) *P. mollissima*, B) *P. tarminiana*.

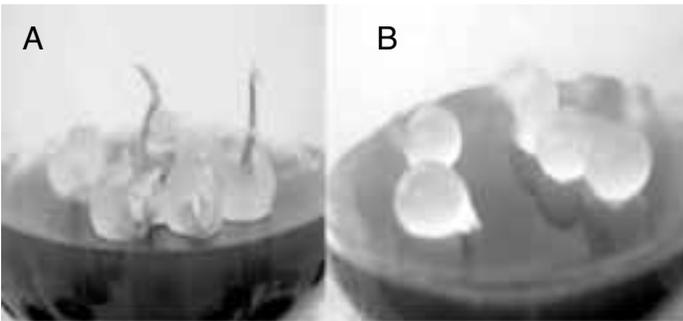


Fuente: Teresa Ávila (CIFP).

Crioconservación de ápices caulinares por encapsulación-desecación

Los ápices encapsulados en cuentas de alginato al 3 % y desecados en el flujo laminar, luego de su exposición al nitrógeno líquido no presentaron germinación; sin embargo, se mantuvieron vivos y mostrando color verde hasta los 30 días de cultivo. Los ápices control que no fueron expuestos al nitrógeno líquido germinaron y dieron lugar a plantas normales (figura 6.3).

Figura 6.3. Ápices caulinares encapsulados de *P. mollissima* después de 30 días de cultivo: A) desecados durante dos horas y sin exposición al nitrógeno líquido; B) desecados durante dos horas y con exposición al nitrógeno líquido.



Fuente: Teresa Ávila (CIFP).

Crioconservación de papa

La papa representa un importante componente de la estrategia de supervivencia (seguridad alimentaria) de la población boliviana, debido a la adaptación de este cultivo a diferentes pisos agroecológicos, a su tolerancia a condiciones muchas veces extremas y a la calidad diferenciada según sus variados usos (Ugarte e Iriarte 2002).

La estrategia de manejo y conservación de recursos genéticos que aplica la Fundación PROINPA está basada en la aplicación de metodologías *in situ* y *ex situ*. En el caso de tubérculos y raíces andinas, por tratarse de especies de propagación vegetativa, el manejo *ex situ* se realiza mediante la aplicación de cuatro metodologías: 1) en el campo, cultivando el material genético en cada gestión agrícola, 2) en almacén o silo, guardando el tubérculo-semilla después de la época de cultivo, 3) en invernadero, cuando la semilla no fue suficiente para la siembra en campo, y 4) en condiciones *in vitro*, metodología que permite recuperar la sanidad vegetal y guardar las plántulas en condiciones asépticas artificiales (Cadima *et al.* 2003).

La conservación *in vitro* es una metodología de conservación de mediano plazo y sirve como un respaldo de seguridad de las colecciones en campo. Es un proceso que permite limpiar las accesiones de sus enfermedades y renovar la semilla para llevarla nuevamente a campo (PROINPA 2004). Sin embargo, la conservación *in vitro* implica una serie de procesos que pueden provocar la muerte de las plántulas o causar una variación en su estabilidad genética; también exige la realización de un refrescamiento periódico de las accesiones conservadas, lo que implica mayores requerimientos de tiempo, recursos financieros y mano de obra especializada.

Como una alternativa, se plantea utilizar la crioconservación, inicialmente para la colección núcleo de papa, la cual, como técnica de conservación a largo plazo, implicará la reducción de los costos y los requerimientos de mano de obra para conservar las más de mil accesiones de dicha colección.

El 25 de junio de 2008, en Bolivia se creó por Decreto Supremo 29611 el Instituto Nacional de Innovación Agropecuaria y Forestal (INIAF), con el objetivo de concentrar el manejo de los bancos de germoplasma que hasta ese momento eran custodiados por diferentes instituciones y fundaciones. La creación del INIAF dio pie a un proceso de cambio en la administración de los recursos genéticos que duró algo más de dos años, al final de los cuales todos los bancos de germoplasma fueron transferidos al INIAF y actualmente se guardan en la Estación Experimental de Toralapa.

Antes de ese proceso, el Banco Nacional de Tubérculos y Raíces Andinas estuvo en custodia de la Fundación PROINPA, que hizo los primeros ensayos de crioconservación en papa, que a la fecha han sido los únicos realizados para tubérculos en el país.

La iniciativa de implementar la crioconservación nació como un proyecto de transferencia financiado por la *Internationale Weiterbildung und Entwicklung*



gGmbH (InWEnt) de Alemania, con el asesoramiento técnico del *Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung* (IPK-Gatersleben). La implementación del proyecto ha tropezado con innumerables contratiempos. Actualmente se está a la espera de nuevos recursos que permitan darle continuación.

Solanum tuberosum* spp. Andigena y *S. stenotomum

Con estas especies se han realizado ensayos mediante la utilización de dos métodos: vitrificación y goteo con DMSO (Schäfer-Menuhr *et al.* 1994, Keller *et al.* 2006).

Vitrificación

En este caso los segmentos nodales de las plantas fueron precultivados en medio de multiplicación MS (Murashige y Skoog 1962) durante una semana previa al inicio de la experimentación.

Posteriormente, se aislaron los ápices y se incubaron de 20 a 24 horas en 0.3 M de sacarosa. Luego se transfirieron a una placa de Petri que contenía la solución deshidratante (14 % de sacarosa y 18 % de glicerol) y se incubaron por 20 minutos. Seguidamente las muestras fueron transferidas a una segunda placa de Petri con la solución PVS2+DMSO e incubadas durante 30 minutos. Aproximadamente 10 minutos antes de finalizar el tiempo de incubación, se comenzó a preparar las tiras de aluminio con cinco gotas de la solución PVS2+DMSO en cada tira. Una vez terminado el tiempo de incubación, se colocaron los ápices, uno a uno, en cada gota de solución sobre la tira de aluminio.

Finalmente, se introdujeron dos tiras en cada criovial y se los cerró casi herméticamente antes de sumergirlos en nitrógeno líquido por 30 segundos sujetándolos en el fondo y se los dejó reposar por una hora.

Pasada esa hora de reposo en nitrógeno líquido, se procedió a recalentar las muestras, sumergiendo por 30 segundos los crioviales en baño termostático con agua destilada precalentada a 40 °C. Luego, se incubaron por 20 minutos en la solución de recuperación (1.2 M de sacarosa), y finalmente se colocaron en placas de Petri con medio de cultivo sólido. Las placas de Petri fueron llevadas a la cámara de crecimiento para su posterior evaluación a las tres y cinco semanas. A partir de la segunda evaluación se comenzó a notar la regeneración de nuevas plántulas de los ápices crioconservados.

El método de goteo con DMSO

Este método también fue ensayado con ambas especies, siguiendo el protocolo desarrollado por el IVC-Group del IPK-Gatersleben (Keller *et al.* 2006).

Los segmentos nodales de las plantas fueron precultivados en medio de multiplicación MS durante cuatro semanas previas al inicio del tratamiento de crioconservación.



Se aislaron los ápices y se incubaron de 20 a 24 horas en medio líquido MS con 3 % de sacarosa. Al día siguiente se transfirieron a una placa de Petri que contenía aproximadamente 3 ml de solución +10 % de DMSO y se incubaron durante dos horas. Aproximadamente cinco minutos antes de finalizar el tiempo de incubación, se comenzaron a preparar las tiras de aluminio con cinco gotas de la solución MS3 % +10 % de DMSO en cada tira. Luego se colocaron los ápices, uno a uno, en cada gota de solución sobre la tira de aluminio.

Finalmente, se introdujo una tira por vez en cada criovial previamente inmerso y lleno de nitrógeno líquido (con un solo movimiento). Se cerraron los tubos (no herméticamente) y se dejaron reposar por una hora en nitrógeno líquido.

Para el recalentamiento, se dosificó aproximadamente 50 ml de MS3 % a temperatura ambiente, y con unas pinzas se retiraron las tiras de aluminio sumergiéndolas rápidamente en la solución y dejándolas reposar por unos minutos. Finalmente se transfirieron los ápices a una placa de Petri con medio de crecimiento sólido. Las evaluaciones de viabilidad del material sometido a este protocolo se realizaron a los 21, 42 y 56 días.

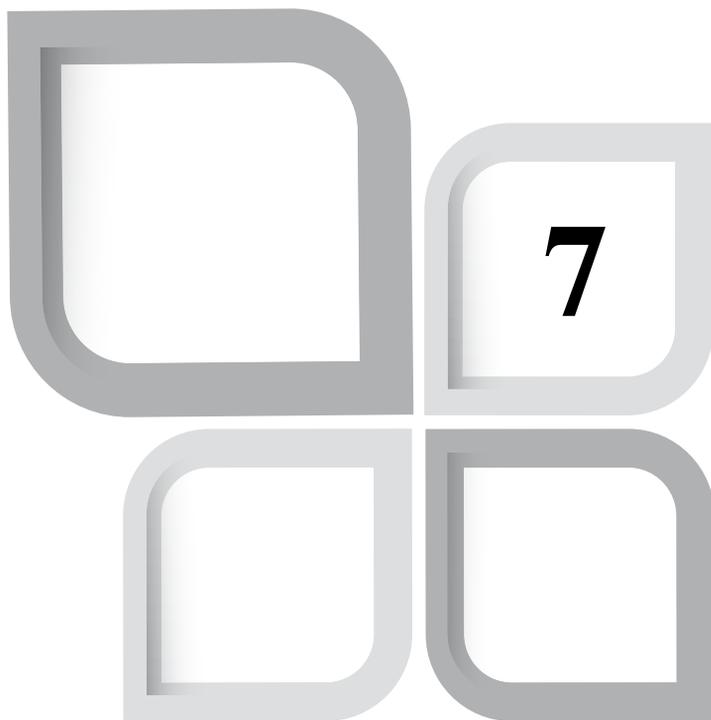
Referencias

- Ávila, T; Guzmán, L; Barra, S de la. 2004. Establecimiento y multiplicación *in vitro* de la colección de pasifloras de altura. In XI Congreso Internacional de Cultivos Andinos (2004, Cochabamba, BO). Memorias.
- Cadima, X; García, W; Ramos, J. 2003. Conservación y producción del cultivo de la papalisa (*Ullucus tuberosus*). Cochabamba, BO, Área Temática de Recursos Genéticos (RRGG)- Fundación PROINPA.
- Gonzalez-Benito, ME; Aguilar, N; Avila, T. 2009. Germination and embryo rescue from *Passiflora* species seeds post cryopreservation. *CryoLetters* 30(2):142-147.
- Guzmán, L. 1999. Colecta de passifloras en Bolivia. In Segunda Reunión Boliviana sobre Recursos Fitogenéticos de Cultivos Nativos (1999, Cochabamba, BO). Memorias. Cochabamba, BO, Fundación PROINPA.
- Guzzo, F; Ceoldo, S; Andretta, F; Marconi, AM; Levi, M. 2003. Strategies for the identification of bioactive molecules in *Pasiflora* ssp. In XLVII Italian Society of Agricultural Genetics - SIGA Annual Congress (2003, Verona, IT). Proceedings.
- Keller, ERJ; Senula, A; Leunufna, S; Grube, M. 2006. Slow growth storage and cryopreservation - tools to facilitate germplasm maintenance of vegetatively propagated crops in living plant collections. *International Journal of Refrigeration* 29(3):411-417.



- Murashige, T; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- PROINPA (Fundación para la Promoción e Investigación de Productos Andinos, BO). 2004. Informe Anual 2003-2004. Cochabamba, BO, Unidad de Comunicación.
- Schäfer-Menuhr, A; Schumacher, HM; Mix-Wagner, G. 1994. Langzeitlagerung alter Kartoffelsorten durch Kryokonservierung der Meristeme in flüssigem Stickstoff. *Landbauforschung Völkenrode* 44:301-313.
- Ugarte, ML; Iriarte, V. 2002. Papas bolivianas: catálogo de cien variedades nativas. Cochabamba, BO, PROINPA. 110 p.
- Vásquez, R. 1998. Las especies de *Passiflora* subgénero *Granadilla* serie *Laurifoliae* (*Passifloraceae*) en Bolivia. *Revista de la Sociedad Boliviana de Botánica* 2(1):36-45.





Situación actual y perspectivas de la investigación en crioconservación de recursos fitogenéticos en Brasil

Izulmé Rita Imaculada Santos¹, Antonieta Nassif Salomão²,
Daiane Peixoto Vargas³, Diogo Pedrosa Corrêa Da Silva⁴,
Gabriela Ferreira Nogueira⁵, Milene Alves De Figueiredo
Carvalho⁶, Renato Paiva⁷

-
1. Empresa Brasileira de Investigación Agropecuaria (Embrapa), Centro de Investigación de la Embrapa en Recursos Genéticos y Biotecnología (Cenargen), Brasília, DF, Brasil, izulme.santos@embrapa.br.
 2. Empresa Brasileira de Investigación Agropecuaria (Embrapa), Centro de Investigación de la Embrapa en Recursos Genéticos y Biotecnología (Cenargen), Brasília, DF, Brasil, antoniet@cenargen.embrapa.br.
 3. Universidad Federal de Lavras (UFLA), Brasil, dvbio@hotmail.com.
 4. Universidad Federal de Lavras (UFLA), Brasil, pedrosacorrea@yahoo.com.br.
 5. Universidad Federal de Lavras (UFLA), Brasil, gabi_bioufla@hotmail.com.
 6. Universidad Federal de Lavras (UFLA), Brasil, milene@cnpaf.embrapa.br.
 7. Universidad Federal de Lavras (UFLA), Brasil, renpaiva@dbi.ufla.br.

Introducción

Brasil posee cerca de 55 000 especies de plantas superiores, por lo que constituye el país que contiene la mayor diversidad vegetal mundial. Varias de estas especies autóctonas son utilizadas para la alimentación humana en forma de jugos, licores y helados. Otras son utilizadas por su valor medicinal, ornamental, paisajístico o para la producción de madera, a nivel regional o local. Desafortunadamente, estas especies no se cultivan, sino se colectan de las poblaciones nativas para atender la demanda comercial y, por consiguiente, enfrentan un gran riesgo de extinción.

El crecimiento y el desarrollo económicos de Brasil en las últimas tres décadas han sido significativos, debido a lo cual se ha dado una expansión acelerada de las zonas urbanas y de las fronteras agrícolas. Ese desarrollo es muy positivo para el país, pero es necesario tomar rápidamente medidas eficientes que eviten la destrucción de los espacios naturales y la pérdida de los recursos genéticos valiosos para la nación. Por lo tanto, urge incluir las especies de interés actual o potencial para el agronegocio en los programas de conservación de recursos genéticos, lo que constituye una de las prioridades del gobierno brasileño.

La conservación de los recursos fitogenéticos abarca un conjunto de actividades y políticas desarrolladas para garantizar la existencia y la disponibilidad de germoplasma con diversos fines de investigación. La conservación *ex situ* es una de las estrategias recomendadas para mantener a largo plazo y con la mayor integridad biológica y genética los genotipos de las especies cultivadas y sus parientes silvestres, las razas locales y las especies no domesticadas, fuera de su entorno natural (FAO 1989). La conservación *ex situ* incluye la preservación de colecciones de semillas, de material vegetal *in vitro*, de ADN, de muestras de polen, de colecciones en el campo y en invernaderos y de jardines botánicos. La elección del mejor método para la conservación *ex situ* dependerá de las características biológicas de las especies de interés, de la disponibilidad de la infraestructura física y de la disponibilidad de personal capacitado.

Cada una de las modalidades de la conservación *ex situ* tiene sus ventajas y desventajas. En las colecciones en el campo la integridad física y biológica de las accesiones está sujeta a los desastres climáticos y ambientales, así como a las condiciones de estrés bióticos y abióticos (Stushnoff 1991). El establecimiento de bancos de semillas mediante la metodología convencional de deshidratar hasta el 5-7 % de la humedad inicial y reducir la temperatura a -18 ± 2 °C, se emplea mundialmente para lograr la conservación a largo plazo de germoplasma de interés. Sin embargo, este procedimiento solo puede ser aplicado para las especies que producen semillas ortodoxas. Por otra parte, la técnica de mantener colecciones de germoplasma *in vitro* solo permite la conservación por períodos cortos de tiempo (9-12 meses) y requiere subcultivos periódicos (Santos y Salomão 2007).

Muchas de las especies vegetales autóctonas de importancia agrícola y económica en Brasil presentan semillas ortodoxas y pueden ser conservadas por largos períodos en bancos de semillas, pero muchas otras presentan semillas de comportamiento recalcitrante



o intermedio que son intolerantes a la deshidratación o el congelamiento y que, por tanto, pierden su viabilidad cuando son almacenadas en las condiciones establecidas para los bancos de semillas. Las semillas recalcitrantes son sensibles a la deshidratación, incluso hasta contenidos elevados de humedad en los que ocurre la congelación del agua intracelular a las temperaturas utilizadas para el almacenamiento. En este grupo se incluye un gran número de especies frutales y forestales subtropicales o tropicales (*Araucaria angustifolia*, *Bertholetia excelsa*, *Hancornia speciosa*, *Lecythis pisonis* y *Talisia esculenta*). Entre las semillas con comportamiento intermedio se identifican *Citrus* spp., *Coffea* spp., *Genipa americana* y *Diospyrus* spp., las cuales toleran la disminución del contenido de agua hasta valores relativamente bajos, pero el proceso de congelación les causa daños irreversibles. Así, estas especies que poseen semillas recalcitrantes o clasificadas como intermedias solo pueden ser almacenadas a corto plazo y su conservación a largo plazo es todavía un gran desafío.

Hay también especies que presentan genotipos estériles o que producen semillas heterocigóticas, por lo que para conservar su integridad clonal o combinaciones génicas de interés son propagadas vegetativamente (*Dioscorea* spp., *Ipomea batatas* y *Manihot esculenta*). Debido a lo anterior, tienen que ser mantenidas en colecciones de campo o *in vitro* y, aunque ambas metodologías son muy eficientes, no garantizan la conservación del germoplasma con la máxima seguridad e integridad biológica por largos períodos.

Actualmente, la crioconservación es la única técnica disponible con potencial para garantizar la conservación del germoplasma de tales especies a largo plazo (Santos 2000). Esta técnica de conservación también puede ser utilizada ventajosamente para las especies que son mantenidas en colecciones *in vitro* (Santos 2001).

Crioconservación de recursos genéticos vegetales con potencial económico en el CENARGEN

La Empresa Brasileña de Investigación Agropecuaria (EMBRAPA), en línea con la preocupación mundial sobre la gradual erosión y la pérdida de los recursos genéticos en Brasil, creó en 1974 el Centro de Investigación de la Embrapa en Recursos Genéticos y Biotecnología (CENARGEN), cuyos objetivos son coordinar en el ámbito nacional y realizar de manera organizada y programada las actividades de colecta, intercambio, evaluación, caracterización, conservación, documentación e información de los recursos genéticos vegetales autóctonos y exóticos, de razas animales naturalizadas amenazadas de desaparición y de microorganismos.

Respecto a los recursos fitogenéticos, la meta del CENARGEN ha sido ampliar la disponibilidad de germoplasma necesario para los programas de mejoramiento genético para el desarrollo de nuevas variedades de plantas. La utilización de estos recursos como fuente de genes para la creación de nuevas variedades es fundamental para incrementar la productividad mundial de alimentos. De esta forma, es de gran relevancia iniciar o fortalecer las iniciativas de conservación de especies vegetales autóctonas y exóticas de uso actual y/o potencial.



La conservación de germoplasma vegetal a largo plazo se inició en el CENARGEN en los años ochenta, después de la construcción de instalaciones adecuadas para el almacenamiento de semillas ortodoxas bajo las condiciones clásicas de banco de germoplasma de semillas, o sea, semillas deshidratadas al 5-7 % del contenido inicial de humedad y mantenidas en cámaras frías a una temperatura de -18 °C. En la actualidad la colección base de semillas (COLBASE) del CENARGEN mantiene más de 120 000 accesiones de aproximadamente 700 especies de plantas de interés para el agronegocio brasileño.

En los años ochenta también se iniciaron las actividades de conservación *in vitro* de los recursos fitogenéticos en el CENARGEN. La colección *in vitro* se mantiene a una temperatura de 20 °C y un fotoperiodo de 12 horas de luz, excepto la colección de papa (*Solanum tuberosum*), que se mantiene en una cámara de crecimiento a una temperatura de 10 °C. Actualmente la colección de germoplasma *in vitro* está compuesta por 1400 accesiones de 20 especies diferentes.

A finales de los años noventa se iniciaron las actividades de investigación en crioconservación vegetal como una herramienta biotecnológica para conservar aquellas especies cultivadas y/o autóctonas no preservadas en los bancos de germoplasma de semillas. Desde entonces, se han ido estableciendo protocolos de crioconservación para un gran número de especies de plantas nativas de interés (cuadro 7.1).

Crioconservación de semillas ortodoxas de especies autóctonas

La mayoría de las accesiones de la COLBASE del CENARGEN pertenecen a especies cultivadas, pero desde principios de los años noventa se han hecho esfuerzos para incluir también germoplasma de especies representativas de los diversos ecosistemas brasileños (Silva *et al.* 2007). Sin embargo, se ha observado que para la mayoría de las especies nativas el almacenamiento en condiciones convencionales de bancos de semillas no es adecuado, siendo necesario utilizar otras metodologías de conservación *ex situ*.

La investigación sobre semillas de especies nativas en el CENARGEN se ha llevado a cabo con el fin de estandarizar las pruebas de germinación, el contenido de humedad adecuado al almacenamiento y la sanidad y, en especial, para determinar la tolerancia a la desecación y la congelación a temperaturas bajo cero (-18 °C y -196 °C). Se han establecido protocolos para conservar a -18 °C algunas especies con semillas ortodoxas, y cerca de 800 accesiones de estas especies ya se encuentran en la COLBASE.

Con respecto a los protocolos de crioconservación de esas semillas, se ha utilizado el régimen de congelación rápida (≥ 200 °C/min) y de descongelación lenta a la temperatura ambiente (25 ± 2 °C por ≥ 4 h), seguido por pruebas de germinación o cultivo *in vitro* de semillas enteras o ejes embrionarios (cuadro 7.1).



Cuadro 7.1. Lista de especies autóctonas con protocolos estandarizados para la crioconservación de semillas.

<i>Especie</i>	Estructura utilizada	Regeneración	Uso de la especie
<i>Acacia</i> spp.	S	G	madera, paisajismo
<i>Acca</i> sp.	S	G	alimentación
<i>Acosmium</i> sp.	S	G	medicinal
<i>Aegiphila</i> sp.	S	G	madera
<i>Albizia</i> spp.	S	G	madera
<i>Amburana</i> sp.	S	G/EE	madera, medicinal
<i>Anadenanthera</i> spp.	S	G	madera, medicinal, paisajismo
<i>Anemopaegma</i> sp.	S	G	medicinal
<i>Adenanthera</i> sp.	S	G	artesanía, madera, paisajismo
<i>Annona</i> spp.	S	G	alimentación
<i>Apeiba</i> sp.	S	G	madera
<i>Apuleia</i> sp.	S	G	madera
<i>Aspidosperma</i> spp.	S	G	artesanía, madera, paisajismo
<i>Astronium</i> sp.	S	G	madera, paisajismo
<i>Bauhinia</i> spp.	S	G	madera, paisajismo
<i>Bowdichia</i> sp.	S	G	madera, medicinal, paisajismo
<i>Bromelia</i> spp.	S	G	alimentación, medicinal
<i>Bromera</i> sp.	S	G	ornamental
<i>Buchenavia</i> spp.	S	G	madera, melífera
<i>Butia</i> spp.	S	EE	alimentación
<i>Byrsonima</i> sp.	S	G	alimentación, medicinal
<i>Callisthene</i> sp.	S	G	madera
<i>Calophyllum</i> sp.	S	G	madera, medicinal, paisajismo
<i>Canavalia</i> sp.	S	G	forraje
<i>Cardiopetalum</i> sp.	S	G	madera, paisajismo
<i>Cariniana</i> spp.	S	G	madera, paisajismo
<i>Cedrela</i> spp.	S	G	madera, paisajismo
<i>Cenostigma</i> sp.	S	G	madera, medicinal, paisajismo
<i>Chamaecrista</i> sp.	S	G	paisajismo
<i>Ceiba</i> spp.	S	G	madera, paisajismo
<i>Clethra</i> sp.	S	G/CV	paisajismo
<i>Coccoloba</i> sp.	S	G	madera
<i>Combretum</i> spp.	S	G	madera
<i>Commiphora</i> sp.	S	G	madera
<i>Copaifera</i> sp.	S	G	madera, medicinal, paisajismo
<i>Cordia</i> spp.	S	G	madera, medicinal
<i>Crotalaria</i> spp.	S	G	forraje
<i>Cybistax</i> sp.	S	G	madera, medicinal
<i>Cyclolobium</i> sp.	S	G	madera, medicinal
<i>Dalbergia</i> spp.	S	G	madera, paisajismo
<i>Didymopanax</i> sp.	S	G	madera
<i>Dimorphandra</i> spp.	S	G	madera, medicinal, paisajismo
<i>Diplusodon</i> sp.	S	G	madera, paisajismo
<i>Dipteryx</i> spp.	S	G/EE	alimentación, madera, paisajismo
<i>Dorstenia</i> sp.	S	G/CV	medicinal
<i>Enterolobium</i> spp.	S	G	madera, paisajismo
<i>Eriotheca</i> spp.	S	G	madera, paisajismo
<i>Ficus</i> sp.	S	G	madera, paisajismo
<i>Guazuma</i> sp.	S	G	madera, medicinal, paisajismo
<i>Guettarda</i> sp.	S	G	madera, paisajismo
<i>Handroanthus</i> spp.	S	G	madera, medicinal, paisajismo
<i>Helicteres</i> sp.	S	G	madera, paisajismo



<i>Hippeastrum</i> sp.	S	G	ornamental
<i>Hymenaea</i> spp.	S	G	alimentación, madera, paisajismo
<i>Jacaranda</i> spp.	S	G	artesanía, madera, paisajismo
<i>Kielmeyera</i> sp.	S	G	artesanía, medicinal
<i>Lafoensia</i> sp.	S	G	artesanía, madera, medicinal
<i>Lychnophora</i> spp.	S	G	medicinal
<i>Lonchocarpus</i> sp.	S	G	madera, paisajismo
<i>Luetzelburgia</i> sp.	S	G	madera
<i>Mabea</i> sp.	S	G	látex
<i>Machaerium</i> spp.	S	G	madera, paisajismo
<i>Magonia</i> spp.	S	G	artesanía, madera, paisajismo
<i>Manihot</i> spp.	S	G/EE	forraje, látex
<i>Matayba</i> sp.	S	G	madera
<i>Maytenus</i> sp.	S	G/CV	medicinal
<i>Melloa</i> sp.	S	G	artesanía
<i>Mucuna</i> spp.	S	G	forraje, medicinal
<i>Myracrodruon</i> sp.	S	G	madera, medicinal, melífera, paisajismo
<i>Myrocarpus</i> sp.	S	G	madera, medicinal, paisajismo
<i>Ormosia</i> spp.	S	G	artesanía, madera, paisajismo
<i>Parapiptadenia</i> sp.	S	G	madera, paisajismo
<i>Parkia</i> spp.	S	G	madera, paisajismo
<i>Peltogyne</i> sp.	S	G	madera, paisajismo
<i>Physocalymma</i> sp.	S	G	paisajismo
<i>Plathymenia</i> sp.	S	G	madera, paisajismo
<i>Platypodium</i> sp.	S	G	madera, paisajismo
<i>Pseudananas</i>	S	G	ornamental
<i>Pseudobombax</i> spp.	S	G	madera, paisajismo
<i>Psidium</i> spp.	S	G	alimentación
<i>Pterocarpus</i> sp.	S	G	paisajismo
<i>Pterodon</i> spp.	S	G	madera, medicinal, paisajismo
<i>Qualea</i> spp.	S	G	madera, paisajismo
<i>Renealmia</i> sp.	S	G	ornamental, paisajismo
<i>Samanea</i> spp.	S	G	madera, paisajismo
<i>Sapindus</i> sp.	S	G	madera, paisajismo
<i>Schinopsis</i> sp.	S	G	madera, paisajismo
<i>Sclerolobium</i> sp.	S	G	madera, paisajismo
<i>Senna</i> spp.	S	G	medicinal, paisajismo
<i>Sesbania</i> sp.	S	G	paisajismo
<i>Simira</i> sp.	S	G	madera, paisajismo
<i>Sinningia</i> sp.	S	CV	ornamental
<i>Siparuna</i> sp.	S	G	medicinal, paisajismo
<i>Sparattanthelium</i> sp.	S	G	madera
<i>Spondias</i> spp.	S	G	alimentación, paisajismo
<i>Sterculia</i> spp.	S	G	alimentación, paisajismo
<i>Stryphnodendron</i> spp.	S	G	madera, medicinal
<i>Stylosanthes</i> spp.	S	G	forraje
<i>Styrax</i> sp.	S	G	madera, medicinal
<i>Syngonanthus</i> sp.	S	CV	artesanía
<i>Tabebuia</i> spp.	S	G	madera, medicinal, paisajismo
<i>Terminalia</i> spp.	S	G	madera, paisajismo
<i>Tocoyena</i> sp.	S	G	forraje, paisajismo
<i>Triplaris</i> sp.	S	G	madera, paisajismo
<i>Vatairea</i> sp.	S	G	forraje, madera, paisajismo
<i>Vitex</i> sp.	S	G	madera, paisajismo
<i>Vochisia</i> spp.	S	G	madera, paisajismo
<i>Zeyheria</i> spp.	S	G/EE	medicinal
<i>Zizyphus</i> sp.	S	G	alimentación, medicinal, paisajismo

Legendas: CV= cultivo *in vitro*; EE = ejes embrionarios; G= germinación; S = semillas enteras.

Fuente: Santos 2012.



Crioconservación de germoplasma de especies de propagación vegetativa y de especies con semillas recalcitrantes o intermedias

Un gran número de especies cultivadas que se propagan vegetativamente, como la papa, la papa dulce, el plátano y la yuca, tienen un elevado valor comercial en Brasil y se cultivan a gran escala. Otras especies cultivadas (*Citrus* spp., *Coffea* spp.), cuyas semillas son intermedias o recalcitrantes, también son de relevancia comercial o son plantas nativas (*Genipa americana* y *Hancornia speciosa*), por lo que tienen importancia actual o potencial. Debido a ello, estas especies se estudian en diversas áreas de las ciencias biológicas, principalmente para su uso en los programas de mejoramiento genético y, por consiguiente, se han establecido en bancos de germoplasma de distintas instituciones de investigación.

Otra línea del CENARGEN fue desarrollar metodologías para la crioconservación de especies de importancia económica (cultivadas o nativas) propagadas vegetativamente y para aquellas con semillas recalcitrantes, intermedias, estériles o con un alto grado de heterocigosis. En el cuadro 7.2 se presentan ejemplos de algunas de las especies con que se ha trabajado. Se han realizado estudios con el fin de conocer el contenido de humedad de los diversos tipos de estructuras vegetales (semillas, ejes embrionarios, meristemas, ápices caulinares, yemas laterales), su tolerancia a la desecación y a la congelación a la temperatura del nitrógeno líquido (-196 °C). Se ha utilizado el régimen de congelación rápida y descongelación rápida en un baño con agua a la temperatura de 38±2 °C, por 2-3 minutos, así como también los protocolos de regeneración *in vitro* requeridos para la recuperación de meristemas, ápices caulinares y ejes embrionarios.

Cuadro 7.2. Lista de especies con protocolos de crioconservación estandarizados o en desarrollo. En todos los casos se utilizó el régimen de congelación rápida y de descongelación rápida (baño María a temperatura de 38±2 °C).

Especies	Tipo de explante	Metodología de crioconservación
Propagación vegetativa		
<i>Dioscorea</i> spp.	M/A	V
<i>Mentha</i> spp.	M/A	V
<i>Manihot esculenta</i>	M/A	V
Semillas intermedias		
<i>Citrus</i> spp.		
<i>Coffea arabica</i> , <i>C. canephora</i>	S/EE	D/CR
<i>Genipa americana</i>	S/EE	
Semillas recalcitrantes		
<i>Hancornia speciosa</i>	S/EE	D/CR
<i>Salacia</i> spp.	M/A	V
<i>Talisia esculenta</i>	M/A	V

Leyendas: A = ápices caulinares; CR = congelamiento rápido por inmersión directa en nitrógeno líquido; D = desecación; ED = encapsulación y deshidratación (Deureudre *et al.* 1990); EE = ejes embrionarios; M = meristemas; S = semillas enteras; V = vitrificación con PVS2.

Fuente: Santos 2012.



Entre las especies cultivadas y de importancia para el agronegocio brasileño destacan los cítricos, el café y la yuca (*Manihot esculenta*). Por lo tanto, la conservación de germoplasma de sus variedades comerciales y parientes silvestres es de gran trascendencia. Las semillas de cítricos y de café se clasifican como semillas con un comportamiento intermedio; la yuca es una planta de propagación vegetativa. En los trabajos con cítricos, se estudió la crioconservación de ejes embrionarios de tres especies, para lo cual se utilizó la metodología de encapsulación y deshidratación (Deureudre *et al.* 1990). Los ejes embrionarios de *Citrus* fueron aislados, encapsulados, precultivados en medio líquido suplementado con sacarosa, deshidratados por diferentes periodos de tiempo e inmersos de forma rápida en nitrógeno líquido (Santos y Stushnoff 2002 y 2003). Posteriormente a la crioconservación, se ha logrado un promedio de 70 % de germinación de los ejes embrionarios de *Citrus sinensis*, que encapsulados fueron precultivados en medio líquido que contenía entre 0.5 a 0.75 M de sacarosa y deshidratados hasta aproximadamente 15 % de humedad en las cápsulas antes de la congelación (cuadro 7.3). Promedios de germinación igualmente elevados se observaron para los ejes de *Citrus reticulata* y de *Citrus limon* tratados bajo las mismas condiciones descritas (cuadro 7.3).

Cuadro 7.3. Crioconservación de ejes embrionarios de especies de *Citrus* utilizando la técnica de encapsulación-deshidratación (ED).

Especie	Metodología de crioconservación	Supervivencia (%)
<i>Citrus sinensis</i>	ED	65-100 ^{1,2}
<i>Citrus reticulata</i>	ED	80-86 ²
<i>Citrus limon</i>	ED	56-66 ²

Leyendas: ED = encapsulación y deshidratación (Deureudre *et al.* 1990).

Fuente: ¹ Santos y Stushnoff 2003; ²Santos y Stushnoff 2002.

La preservación de semillas de café por largos períodos en bancos de semillas se complica, porque presentan una resistencia parcial, clasificada como comportamiento intermedio, frente a las condiciones de temperatura y deshidratación requeridas para que se logre el almacenamiento prolongado en las cámaras. Sin embargo, estudios recientes han reportado que la combinación de un grado crítico de humedad de la semilla para cada temperatura de almacenamiento puede extender la vida útil. Con el fin de establecer un banco de germoplasma de *Coffea* spp. usando técnicas de crioconservación, se han realizado investigaciones en el CENARGEN, en Brasilia, DF. El protocolo desarrollado consiste en la deshidratación parcial de las semillas sobre gel de sílice durante diferentes periodos de tiempo hasta aproximadamente 12 % de contenido de humedad y el congelamiento rápido (CR) por la inmersión en nitrógeno líquido (Santos *et al.* 2002). Tras la crioconservación, las semillas se descongelan rápidamente en un baño de agua a 40 °C bajo agitación constante y posteriormente se aíslan los ejes embrionarios que son cultivados *in vitro* para reactivar su desarrollo (figura 7.1). Hasta el momento, los resultados obtenidos con cerca de 30 accesiones de diferentes cultivares de *Coffea arabica* y de *Coffea canephora* son muy prometedores, lo que indica la supervivencia de



las semillas, incluso después de períodos de dos años de almacenamiento en nitrógeno líquido. Otro enfoque incluyó el desarrollo de protocolos para la crioconservación de ápices caulinares de *Coffea canephora*, una especie con posibilidad de propagación vegetativa para plantíos comerciales. Para esto se utilizaron ápices aislados de plantas de cultivo *in vitro*.

Figura 7.1. Semillas de *Coffea* spp. sometidas a crioconservación mediante la técnica de congelamiento rápido. A: semillas maduras utilizadas en los experimentos; B: recuperación a los 14 días de cultivo *in vitro* del eje embrionario aislado de una semilla crioconservada.



Fuente: Santos *et al.* 2002.

Cuadro 7.4. Crioconservación de semillas de *Coffea*.

Especie	Metodología de crioconservación	Supervivencia (%)
<i>Coffea arabica</i>		
Catuai Vermelho IAC 15	CR	100.00
Catuai Vermelho IAC 99	CR	100.00
EPAMIG Rubi MG 1192	CR	95.80
IAPAR 59	CR	85.00
Icatu Amarelo IAC 2944	CR	100.00
Mundo Novo IAC 376-4	CR	100.00
Tupi IAC 1669-33	CR	85.70
<i>Coffea racemosa</i>		
Muestra CR-1	CR	90.00
<i>Coffea canephora</i>		
Bokubensis IAC Col2	CR	100.00
Obatã IAC 1669-20	CR	100.00

Leyenda: CR = congelamiento rápido por inmersión directa en nitrógeno líquido.

Fuente: Santos 2012.



Brasil es el centro de origen y diversidad de la yuca (*Manihot esculenta*). Sus raíces acumulan almidón y constituyen una fuente esencial de calorías para millones de personas. Los productos obtenidos a partir de las raíces de yuca se utilizan como fuente de carbono en los alimentos para animales y como fuente de almidón para diversos fines industriales. El interés en esta especie se ha intensificado con énfasis en el desarrollo de cultivares mejorados para aumentar la productividad, la calidad nutricional, la resistencia a los herbicidas y su tolerancia a condiciones de estrés de carácter biótico y abiótico, entre otros. Estos estudios son limitados debido a que las semillas tienen varios problemas, como la baja viabilidad y tasa de germinación, latencia, alta heterocigosis y embriones malformados o estériles. Ello hace que la multiplicación clonal sea la mejor forma de propagar la especie y que, por las características de sus semillas, sea imposible conservar germoplasma de la yuca en bancos de semillas convencionales. Por tanto, la única manera de mantener combinaciones genéticas específicas que sean el resultado de siglos de selección clonal es la conservación de material vegetativo. En la actualidad, el germoplasma de yuca se conserva en colecciones en campo, *in vitro* y mediante crioconservación.

La EMBRAPA ha priorizado la formación y el mantenimiento de cinco bancos de germoplasma de yuca en el campo, los cuales están ubicados en diferentes ecorregiones del país. Materiales de las colecciones en el campo fueron seleccionados para integrar una colección *in vitro* bajo crecimiento lento con cerca de 500 accesiones que se mantienen en el CENARGEN. Como la conservación *in vitro* por crecimiento lento es una metodología de conservación a corto-mediano plazo, la propuesta es que a futuro esa colección sea transferida a un banco criogénico. Los primeros experimentos realizados con este propósito resultaron muy promisorios.

Se utilizaron ápices de plántulas bajo crecimiento activo *in vitro* y se evaluaron tres metodologías de crioconservación con ápices (2.0 mm) de dos accesiones (BGM 603 y CG 1429-1423, cuadro 7.5). Se aislaron en condiciones asépticas los tejidos y se sometieron a los siguientes procedimientos: a) vitrificación usando el tratamiento con la solución vitrificadora PVS2 (15 % de DMSO, 15 % de etilenglicol, 30 % de glicerol y 0.4 M de sacarosa) (Sakai *et al.* 1990), b) encapsulación/deshidratación (Deureudre *et al.* 1990), en la que ápices encapsulados en alginato de calcio fueron sub-cultivados en medio MS-62 líquido con altas concentraciones de sacarosa y deshidratados con gel de sílice; c) encapsulación/vitrificación (Deureudre *et al.* 1990), en donde los ápices encapsulados se precultivaron en la solución PVS2 (Sakai *et al.* 1990). Después de cada procedimiento los ápices se congelaron mediante inmersión directa en nitrógeno líquido por aproximadamente 18 horas y se descongelaron en un baño de agua a 402°C con agitación constante. Luego de la descongelación, los ápices se transfirieron a placas Petri que contenían el medio de cultivo MS-62 (Murashige y Skoog 1962) para la regeneración.

Con los ápices de la accesión denominada BGM 603 se obtuvo una viabilidad de 72 % con el método de vitrificación y de 33 % con el de encapsulación/vitrificación (cuadro 7.5). A su vez, el 80 % de los ápices de la accesión CG 1489-23 permanecieron viables después de la vitrificación

y 73 % después de la encapsulación/vitrificación (cuadro 7.5). Estos resultados preliminares indican que las metodologías probadas son muy prometedoras para buscar el establecimiento de un protocolo de crioconservación efectivo aplicable a ápices caulinares de yuca.

Cuadro 7.5. Crioconservación de ápices caulinares de dos cultivares de *Manihot esculenta* spp.

Material	Metodología de crioconservación	Supervivencia (%)
BGM 603	V	72
	ED/V	33
BGM 1429-23	V	80
	ED/V	73

Leyendas: ED = encapsulación/ deshidratación; V = vitrificación con PVS2.

Fuente: Santos 2012.

El Cerrado es una región de gran diversidad biológica que cubre el 25 % del territorio brasileño y que es hogar de muchas especies. El 40 % de estas son endémicas, comestibles, medicinales, forrajeras, ornamentales, textiles, madereras, taniníferas, melíferas, oleíferas y fuentes de materiales para trabajos manuales (Almeida *et al.* 1990). Entre las especies nativas del Cerrado destacan las de frutas, tanto por su diversidad como por sus propiedades nutricionales (fuentes de calorías, vitaminas, proteínas, calcio, fósforo, hierro) o su potencial alimentario e industrial (Almeida *et al.* 1990). El consumo de frutas nativas del Cerrado en forma natural o procesada es parte de la cultura alimentaria de la población de la región, mediante dulces, vitaminas, pasteles, panes, galletas, mermeladas y licores (Almeida *et al.* 1990). Entre ellos se encuentran *Dipteryx alata*, *Genipa americana*, *Salacia* spp. y *Talisia esculenta*. Estas especies de árboles frutales no son domesticadas y no se cultivan, por lo que se encuentran bajo una fuerte erosión genética debido a los años de explotación y a la expansión de las fronteras agrícolas y urbanas en la región. Por consiguiente, se hace necesario adoptar medidas para la conservación de esas y otras especies del Cerrado. El objetivo es mantener su variabilidad genética, así como que esté disponible como reservorio potencial de los programas de mejoramiento genético.

Conservar esas especies utilizando la metodología convencional no es posible, porque pierden la integridad durante su almacenamiento. Se requieren, por lo tanto, métodos alternativos de conservación. Una de las especies con las que se está trabajando actualmente es la *Genipa americana* y los estudios en curso están relacionados con la crioconservación de semillas y ejes embrionarios. Semillas de *G. americana* fueron aisladas de frutos maduros y su contenido de humedad fue ajustado por desecación utilizando gel de sílice hasta diferentes niveles de deshidratación (cuadro 7.6). Seguidamente las semillas fueron congeladas rápidamente (CR) en nitrógeno líquido durante aproximadamente 18 horas y luego descongeladas rápidamente en un baño de agua a 40 °C bajo agitación constante. De las semillas crioconservadas se aislaron los ejes embrionarios, los cuales fueron cultivados *in vitro* para reactivar su crecimiento (figura 7.2).



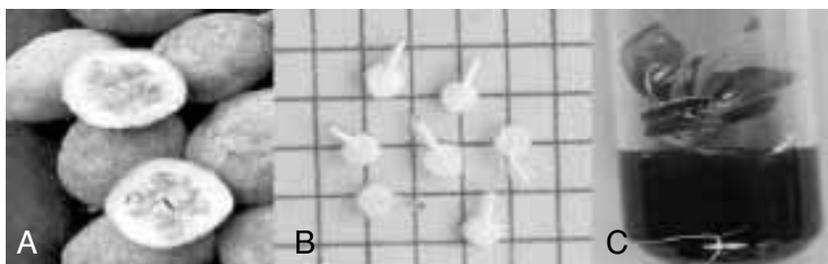
Cuadro 7.6. Crioconservación de semillas de *Genipa americana* con humedad diversa.

Humedad (%)	Técnica	Supervivencia (%)
8	CR	95
12	CR	100
22	CR	100
55	CR	25

Leyenda: CR = congelamiento rápido por inmersión directa en nitrógeno líquido.

Fuente: Santos 2012.

Figura 7.2. Semillas de *Genipa americana* sometidas a crioconservación mediante la técnica de congelamiento rápido. A: frutos maduros; B: ejes embrionarios aislados de semillas crioconservadas en nitrógeno líquido; C: plántula regenerada por cultivo *in vitro* de ejes embrionarios recuperados después de la crioconservación de las semillas.



Fuente: Izulmé Santos.

Crioconservación de especies con potencial económico y medicinal en la Universidad Federal de Lavras

La Universidad Federal de Lavras (UFLA) está considerada la segunda mejor universidad del Brasil, la mejor de Minas Gerais y la mejor del país en ciencias agrarias. La UFLA se destaca por sus actividades de investigación en plantas leñosas nativas de El Cerrado, las cuales se iniciaron a partir de la creación del Programa de Posgrado en Fisiología Vegetal, implantado hace 20 años bajo la coordinación del profesor Renato Paiva.

El desarrollo de protocolos de micropropagación, aunado al avance de los análisis fitoquímicos y citológicos en diferentes especies, incentivó el interés por conservar esos recursos genéticos y aplicar las técnicas *in vitro* con este propósito. En este contexto, la aplicación de métodos criogénicos ocupó un lugar destacado entre los objetivos de la UFLA, porque son una estrategia que permite la conservación a largo plazo de estructuras organizadas con alta estabilidad genética y biológica.

Protocolos desarrollados en la UFLA

Café (*Coffea arabica* L. cv. Catuaí vermelho IAC 144)

El café, cultivo de gran importancia económica y cultural en diversos países, fue introducido en Brasil a partir del café arábigo (*Coffea arabica* L.), que se destaca por el sabor pronunciado y refinado de sus granos. La criopreservación de embriones cigóticos de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí vermelho IAC 144 se logró con éxito después de realizar la deshidratación utilizando gel de sílice por 117 minutos, lo que reportó un contenido de humedad de aproximadamente 20 % y permitió que se alcanzara el máximo de germinación (98 %) de los embriones después de la criopreservación. Estos resultados se lograron con la inmersión directa de los embriones deshidratados en nitrógeno líquido, en el que permanecieron por 24 horas. La descongelación se realizó en un baño con agua a 40 °C ± 2 °C durante 3 minutos bajo agitación constante. Seguidamente, los embriones se rehidrataron en medio líquido MS (Murashige y Skoog 1962) suplementado con 1 M de sacarosa. Pasados 30 min, 0.5 mL del medio de cultivo fue reemplazado por 0.5 mL de medio con 0.1 M de sacarosa por 10 min. Este procedimiento se repitió tres veces, tal y como lo describe Steinmacher *et al.* (2007). Los embriones rehidratados luego fueron transferidos al medio MS suplementado con 30 g L⁻¹ de sacarosa y solidificado con 7 g L⁻¹ de agar. Las plántulas provenientes del material criopreservado se aclimataron, lográndose hasta un 100 % de sobrevivencia (Pinto 2012).

Angico-vermelho (*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan)

El “angico-vermelho”, especie encontrada en varios países de América del Sur, es una planta ampliamente utilizada como ornamental y por sus propiedades medicinales. Esta especie se encuentra en peligro de extinción, por lo que la estrategia de la criopreservación es una alternativa muy importante para preservar su germoplasma. Los ejes embrionarios tratados con diferentes concentraciones (5, 10 y 15 %) de DMSO y glicerol fueron mantenidos a varios tiempos (15, 30 y 150 días) en nitrógeno líquido (Nery *et al.* 2011a). Transcurridos los diferentes períodos de criopreservación, los ejes embrionarios se descongelaron en un baño de agua a 37 °C durante 5 minutos e inocularon sobre el medio de cultivo WPM (Lloyd y McCown 1980) suplementado con 30.0 g L⁻¹ de sacarosa y solidificado con 4.0 g L⁻¹ de agar.

Los ejes embrionarios tratados con las soluciones crioprotectoras (contenido de humedad superior al 65 %) e inmersos y mantenidos a -196 °C no germinaron bajo ninguna de las condiciones. Sin embargo, se obtuvo aproximadamente un 100 % de regeneración de los ejes embrionarios que fueron criopreservados sin la utilización de los crioprotectores químicos, independientemente del período de almacenamiento (Nery *et al.* 2011a). La integridad y el contenido de DNA del núcleo de los ejes embrionarios de *Anadenanthera colubrina* no fueron afectados por el proceso criogénico (Nery *et al.* 2011b).



Yuca (*Manihot esculenta* Crantz)

La yuca es una planta nativa de la región del Amazonas. Se estima que cerca de 2/3 de la diversidad genética de la yuca existe y se mantiene por medio de colecciones *in situ* (hábitat natural) y que solo 1/3 se está conservando de manera segura mediante colecciones *ex situ* (fuera de su hábitat natural). Debido a ello se han desarrollado otros métodos complementarios a las estrategias dirigidas a la preservación de su germoplasma, como el de la crioconservación.

En el caso de la yuca, se llevaron a cabo experimentos para evaluar el procedimiento criogénico descrito por Charoensub *et al.* (1999, 2003). Ápices caulinares de 1 mm se trataron con una solución de carga modificada (Charoensub *et al.* 1999) por 20 minutos y a temperatura ambiente. La adición de Tween-20 a 0.5 % en la solución de pretratamiento permitió aumentar la exposición de los tejidos a las soluciones crioprotectoras utilizadas. Seguido al tratamiento de carga y antes de ser inmersos en nitrógeno líquido, los explantes fueron expuestos a la solución vitrificadora PVS2 durante otros 20 minutos igualmente a temperatura ambiente. El calentamiento tuvo lugar a 45 °C durante un minuto y luego los tejidos fueron tratados con 1.2 M de sacarosa durante 20 minutos para el lavado de los crioprotectores. Transcurrido este periodo, los ápices caulinares fueron cultivados en medio MS suplementado con 0.02 mg L⁻¹ de BAP, 0.1 mg L⁻¹ de GA₃ y 0.01 mg L⁻¹ de ANA. La viabilidad del material crioconservado fue superior al 50 %, lo cual se manifestó mediante el desarrollo de la parte aérea y la formación de nuevas plantas (Rodrigues 2012).

Murici-pequeño (*Byrsonima intermedia* A. Juss.)

Entre las especies que destacan de El Cerrado por su gran potencial medicinal está la *Byrsonima intermedia*. Sin embargo, es una planta de difícil germinación. Para la crioconservación de los ápices caulinares de *Byrsonima intermedia*, se utilizó la técnica de gota-vitrificación (Panis y Swennen 2005). Primeramente se determinó el medio de cultivo apropiado para garantizar el crecimiento apical, lo que se logró utilizando el medio WPM con 2.22 mM 6-benzilaminopurina (BAP). Los ápices aislados fueron sometidos a tratamientos de precultivo en medio MS suplementado con 0.3 M de sacarosa durante 24 horas, antes de ser expuestos a la solución de carga por 20 minutos, seguido de la deshidratación con la solución vitrificadora PVS2 a 0 °C por 15, 30 o 45 minutos y la inmersión en nitrógeno líquido.

Después de la crioconservación, los ápices se sometieron primeramente a un precultivo de 24 horas en medio MS suplementado con 0.3 M de sacarosa. Por otra parte y de manera adicional, se estudió el efecto del precultivo por 15 días en medio de cultivo MS con un alto potencial osmótico (0.3 M de sacarosa ó 0.09 M de sacarosa + 0.21 M de sorbitol) de los brotes caulinares de las plantas madre. Se explantaron los tejidos, se precultivaron o no (control negativo) en medio MS suplementado con 0.3 M de sacarosa y 100 ppm de ácido ascórbico durante 24 horas y luego se realizó el tratamiento de carga (20 minutos) y la exposición a

la PVS2 durante 30 minutos. Los ápices tratados fueron inmersos o no (control positivo) en nitrógeno líquido por 30 minutos y retornados luego a la temperatura de 25 °C durante 15 minutos. El cultivo de recuperación de los ápices que fueron sometidos al protocolo de criopreservación descrito, se realizó en el medio MS suplementado con 0.3 M de sacarosa y 100 ppm de ácido ascórbico por 24 horas en la oscuridad, seguido de la transferencia al medio WPM, que contenía 2.22 µM de BAP y 100 ppm de ácido ascórbico. El precultivo en 0.3 M de sacarosa por 24 horas antes de la criopreservación permitió obtener un índice de regeneración del material criopreservado del 90 %. Los ápices caulinares aislados de plantas precultivadas en medio MS con 0.09 M de sacarosa + 0.21 M de sorbitol por 15 días presentaron una regeneración también satisfactoria aunque menor (66.7 %). Por consiguiente, el protocolo de criopreservación más exitoso contempló el precultivo de los ápices por 24 horas en el medio MS con 0.3 M de sacarosa antes del tratamiento de carga (20 minutos), la deshidratación en PVS2 (30 minutos) y la inmersión en nitrógeno líquido (Silva 2012).

Mamona (*Ricinus communis* L.)

La mamona es una planta que se destaca en Brasil por sus propiedades medicinales y su gran potencial para la producción de biodiésel. Su diversidad genética y alto valor económico justifican la necesidad de desarrollar metodologías para la conservación del germoplasma de esta especie a largo plazo. Las semillas de la mamona están consideradas como ortodoxas, pero toleran un corto periodo de almacenamiento, debido principalmente a su alto contenido de lípidos. Los embriones cigóticos se aislaron y desecaron en una campana de flujo laminar hasta un contenido de humedad de aproximadamente 10 %. Posteriormente, los ejes embrionarios se criopreservaron siguiendo la metodología de vitrificación y utilizando la solución vitrificadora PVS2 y una formulación modificada de la PVS2 (40 % de glicerol + 10 % de etilenglicol + 10 % de DMSO + 1.2 M de sacarosa), ambas por 20 minutos a 0 °C.

Para realizar la criopreservación, los ejes embrionarios fueron transferidos a crioviales de 2.0 mL e inmersos rápidamente en el nitrógeno líquido, en el que permanecieron durante 60 minutos. La recuperación posterior al enfriamiento se realizó en un medio MS suplementado con 30.0 g L⁻¹ de sacarosa, 6.0 g L⁻¹ de agar y un pH ajustado a 5.8. Inmediatamente después de la transferencia al medio de recultivo de recuperación, los explantes se mantuvieron en la cámara de crecimiento a 25 °C ± 2 °C durante un fotoperiodo de 16 horas luz. La germinación de los embriones no se afectó por la exposición a la temperatura del nitrógeno líquido (-196 °C), obteniéndose un 100 % de viabilidad en todos los tratamientos probados (Nogueira *et al.* 2011).

Para la conservación a largo plazo de la variabilidad genética de la especie, además de los ejes embrionarios, se estudió el almacenamiento de granos de polen en nitrógeno líquido. Primeramente se determinó el contenido de humedad de los granos en una estufa a 105 °C ± 3 °C. El tratamiento crioprotector se realizó utilizando glicerol, DMSO y polietilén glicol (PEG) a diferentes concentraciones y combinaciones (sin crioprotector, glicerol 5 % + DMSO 5 %; glicerol 10 % + DMSO



10 %; glicerol 5 % + DMSO 5 % + PEG 5 %; glicerol 10 % + DMSO 10 % + PEG 10 %; glicerol 100 %; DMSO 100 %; glicerol 5 %; glicerol 10 %; glicerol 15 %; DMSO 5 %; DMSO 10 % y DMSO 15 %). Para la criopreservación, los granos de polen fueron colocados en criotubos e inmersos en el nitrógeno líquido durante diferentes periodos de conservación (1 hora, 15 días, 30 días, 6 meses y 1 año). La integridad del núcleo de los granos de polen se analizó mediante citometría de flujo y la viabilidad celular se evaluó a través de coloraciones citológicas con carmín acético y reactivo de Alexander. La alta viabilidad (85 %) de los granos de polen después de la criopreservación se obtuvo cuando los granos fueron tratados con 5 % de glicerol antes de la inmersión en nitrógeno líquido. Bajo estas condiciones de conservación, se mantuvieron en almacenamiento criogénico por hasta un año (Vargas *et al.* 2011).

Trabajos en perspectiva de la UFLA

Desde que inició los trabajos de investigación en criopreservación de germoplasma vegetal hace aproximadamente cinco años, la UFLA ha venido demostrando un gran potencial para la creación de criobancos en la búsqueda de soluciones estratégicas para garantizar la conservación de los recursos genéticos vegetales en Brasil. Los protocolos de criopreservación desarrollados en la UFLA se refieren a diversas especies nativas de El Cerrado brasileño con características ornamentales y de gran importancia agrícola. La UFLA, en convenio de colaboración con el Laboratorio de Mejoramiento de Cultivos Tropicales de la Katholieke Universiteit Leuven (KULeuven) de Bélgica, ha optimizado y compartido nuevas técnicas para desarrollar la criopreservación de especies vegetales. Los resultados de esa colaboración, que se han reflejado en la realización de dos tesis de doctorado, han sido fundamentales para fortalecer la adquisición de mayores conocimientos básicos y tecnológicos en beneficio de ambas instituciones y de los dos países.

Referencias

- Allem, AC. 2002. The origins and taxonomy of *Cassava*. In Hillocks, RJ; Thresh, JM; Bellotti, AC. eds. *Cassava: biology, production and utilization*. CABI Publishing, UK, p. 1-16.
- Almeida, SP; Silva, JÁ; Ribeiro, JF. 1990. Aproveitamento alimentar de espécies nativas dos Cerrados: araticum, baru, cagaita e jatobá. Planaltina, DF, BR, Embrapa-CPAC, 83 p. EMBRAPA-CPAC Documentos 26.
- Charoensub, R; Phansiri, SS; Sakai, M; Yongmanit, W. 1999. Cryopreservation of cassava *in vitro* grown shoot tips cooled to -196 °C by vitrification. *CryoLetters* 20:89-94.
- _____; Phansiri, SS; Yongmanit, W; Sakai, A. 2003. Routine cryopreservation of *in vitro*-grown axillary apices of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) by vitrification: importance of a simple mononodal culture. *Scientia Horticulturae* 98:485-492.

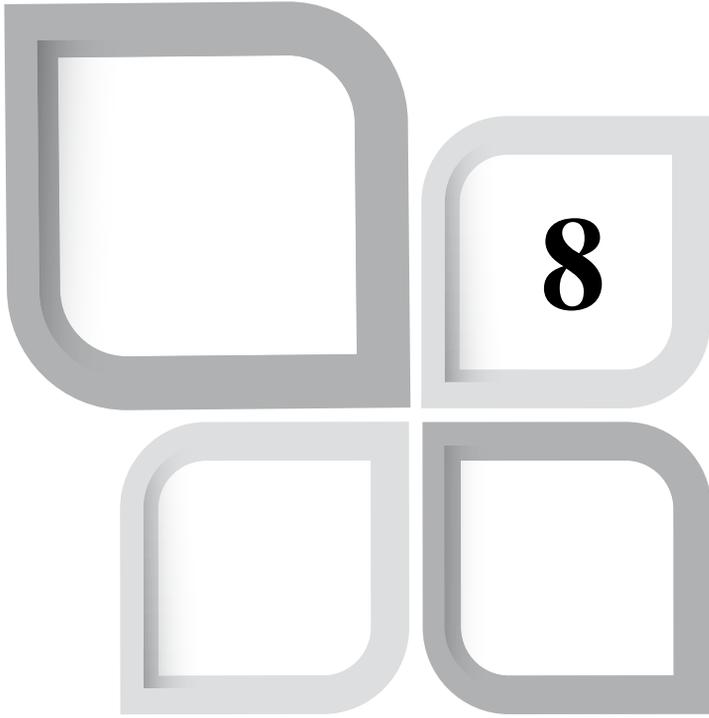


- Deureudde, J; Scottez, C; Arnaud, C; Duron, M. 1990. Resistance d'apex caulinares de vitro-plants de Poirier (*Pyrus communis* L. cv. Beurre Hardy), enrobes dans l'alginat, a une deshydratation puis a une congelation dans l'azote liquide: Effet d'un durcissement prealable au froid. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris, 310:317-323.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, IT). 1989. Recursos fitogenéticos: su conservación in situ para el uso humano. Roma, IT. 38 p.
- Hirai, D. 2011. Gelled droplet vitrification improves recovery of cryopreserved potato germplasm. *Cryoletters* 32:287-296.
- Lloyd, G; McCown, BMC. 1980. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* spp. *HortScience* 3:416.
- Murashige, T; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology* 15:473-497.
- Nery, FC; Paiva, R; Campos, ACAL; Nogueira, GF; Stein, VC; Alvarenga, AA. 2011a. Cryopreservation of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan embryonic axes. *Acta Horticulturae* 908:227-232.
- _____; Paiva, R; Silva, DPC; Campos, ACAL; Chalfun-Júnior, A; Campos, JMS. 2011b. Nuclear DNA integrity of cryopreserved embryonic axes of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. *Acta Horticulturae* 908:139-142.
- Nogueira, GF; Paiva, R; Campos, ACAL; Nery, FC; Vargas, DP; Paiva, PDO. 2011. Cryopreservation of embryonic axes of castor bean cultivar 'AL-Guarany 2002'. *Acta Horticulturae* 908:233-238.
- Panis, B; Swennen, BP. 2005. Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all Musaceae. *Plant Science* 168:45-55.
- Pinto, MS. 2012. Embriogênese somática direta e criopreservação de embriões de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí vermelho. Tesis de Maestría. Lavras, MG, BR, Universidad Federal de Lavras.
- Rodrigues, LAZ. 2012. Cryopreservation of *Cassava* genotypes. Tesis de Doctorado. Lavras, MG, BR, Universidad Federal de Lavras.
- Sakai, A; Kobayashi, S; Oiyama, I. 1990. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Reports* 9:30-33.



- Santos, IRI. 2000. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 12: 70-84.
- _____. 2001. Criopreservação: a alternativa para a conservação de germoplasma vegetal. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento* n.º 19.
- _____. 2012. Criopreservación de germoplasma vegetal en Brasil: el papel de la EMBRAPA. *In Primer Simposio Internacional de Conservación in vitro y Criopreservación de Especies Vegetales (2012, Tepatitlán de Morelos, MX)*. Tepatitlán de Morelos, MX, Centro Nacional de Recursos Genéticos, INIFAP.
- _____; Salomão, AN. 2007. Criopreservação de germoplasma vegetal *In Nass, LL. org. Recursos genéticos vegetais*. Brasília, BR, Embrapa, p. 545-573.
- _____; Salomão, AN; Mundim, RC; Ribeiro, FNS; Mundim, IP. 2002. Criopreservação de eixos embrionários zigóticos de café (*Coffea arabica* L.). Brasília, BR, Embrapa. Comunicado Técnico n.º 69, 4 p. ISSN 0102-0099.
- _____; Stushnoff, C. 2002. Cryopreservation of embryonic axes of *Citrus* species by encapsulation-dehydration. *Plant Genetic Resources Newsletter* 131: 36-41.
- _____; Stushnoff, C. 2003. Desiccation and freezing tolerance of embryonic axes from *Citrus sinensis* [L.] Osb. pretreated with sucrose. *Cryoletters* 24:281-292.
- Silva, DB; Wetzel, MMVS; Salomão, AN; Faiad, MGR. 2007. Conservação de germoplasma semente em longo prazo. *In Nass, LL. org. Recursos genéticos vegetais*. Brasília, BR, Embrapa. p. 441-471.
- Silva, LC. 2012. *Byrsonima intermedia* A Juss: *in vitro* culture and cryopreservation of seeds and shoots. Tesis de Doctorado. Lavras, MG, BR, Universidad Federal de Lavras.
- Steinmacher, DA; Saldanha, CW; Clement, CR; Guerra, MP. 2007. Cryopreservation of peach palm zygotic embryos. *Cryo Letters* 28:13-22.
- Stushnoff, C. 1991. Cryopreservation of fruit crop genetic resources – implications for maintenance and diversity during conservation. *Hortscience* 26:518-522.
- Vargas, DP; Paiva, R; Nogueira, GF; Carvalho, MAF; Silva, DPC; Nery, FC; Porto, JMP; Silva, GA. 2011. Effect of glycerol as a cryoprotectant for castor bean pollen for different storage periods. *Acta Horticulturae* 908:97-100.





La crioconservación en Colombia: desarrollo de la investigación y análisis de casos

Roosevelt H. Escobar Pérez¹, Norma Manrique²,
Luis G. Santos³, Juan E. Montoya⁴, Ericson Aranzales⁵,
Manuel Sánchez⁶, Raúl Valbuena⁷

-
- 1 Área de Investigación para la Agrobiodiversidad, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia, r.escobar@cgiar.org.
 - 2 Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia, normacmanrique@gmail.com.
 - 3 Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia, lg.santos@cgiar.org.
 - 4 Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia, juanesmn@hotmail.com.
 - 5 Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia, e.aranzales@cgiar.org.
 - 6 Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira, Colombia, mssanchezo@palmira.unal.edu.co.
 - 7 Programa de Recursos Genéticos Vegetales, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA), C.I. Tibaitatá, Mosquera, Colombia, ivalbueba@corpoica.org.co.

Introducción

Los factores bióticos y abióticos del medio agrícola ejercen, sobre la variedad o el clon que constituye un cultivo, una presión que reduce considerablemente el tiempo de permanencia del cultivo en el medio, la calidad de su producto agrícola, su nivel de producción y su respuesta a los estímulos del entorno. Esta situación obliga al investigador o al gestor agrícola a mantener un programa proactivo de mejoramiento que genere continuamente materiales de comportamiento superior para reemplazar a los ya existentes. Una respuesta a esta necesidad, tanto en el presente como hacia el futuro, es conservar la mayor cantidad posible de variabilidad genética de las especies –que se encuentra principalmente en los centros primarios y secundarios de diversidad– y hacer siempre posible el acceso a esa diversidad.

Un recurso genético puede conservarse empleando dos estrategias de manejo: una *in situ* y otra *ex situ*. La primera se orienta a mantener el potencial evolutivo de una especie en estado de competencia natural; la segunda, como su nombre lo indica, maneja la especie fuera de su espacio o lugar natural, es decir, en un ambiente artificial que permite desarrollar las siguientes actividades con los individuos o las muestras de la especie:

- trabajos de evaluación, caracterización y mejoramiento (en bancos de campo);
- distribución de germoplasma de la especie, de características conocidas y en forma segura (un banco *in vitro*);
- conservación de la diversidad genética de la especie (un banco de semillas);
- conservación a largo plazo y creación de copias de seguridad denominadas “back up” (un banco de crioconservación).

El presente documento muestra los avances logrados en la crioconservación de germoplasma, para lo cual se toma como ejemplo algunos trabajos desarrollados por entidades nacionales e internacionales en Colombia. El Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) ha jugado un papel importante en la ejecución de esos trabajos, ya sea por la generación directa de información de sus investigaciones o a través de proyectos colaborativos, capacitaciones y entrenamientos a otras instituciones, lo cual ha permitido elaborar criterios de análisis y de investigación aplicables tanto a la actividad propia como a las acciones de conjunto. Del mismo modo, diversos trabajos de tesis, realizados tanto a nivel de pregrado como de posgrado, han permitido crear un grupo de investigadores expertos en crioconservación de germoplasma en el país.

La crioconservación: investigaciones desarrolladas en Colombia

A lo largo de los años, diversos cultivos y tipos de tejidos han sido utilizados para la realización de investigaciones en crioconservación. La información al respecto se presenta a continuación agrupada en estudios de caso en cinco áreas temáticas:



1. Crioconservación de cultivos de propagación vegetativa

- Yuca cultivada (*Manihot esculenta* Crantz)
- Especies silvestres afines a la yuca (*Manihot* spp.)
- Tejido embriogénico de la yuca cultivada
- Papas (*Solanum tuberosum* Grupo *phureja* y *Solanum tuberosum* spp. *andigena*)

2. Crioconservación de semillas botánicas

- Especies silvestres afines a la yuca (*Manihot* spp.)
- Café (*Coffea arabica*)
- Palma de chontaruro (*Bactris gasipaes* Kunth) y “güérregue” (*Astrocaryum standleyanum* Bailey)
- Palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.)
- Cratylia (*Cratylia argentea* (Desvaux) O. Kuntze)

3. Crioconservación de la flora amenazada

- Chambimbe (*Sapindus saponaria* var. *Drummondii* (Hook. & Arn.) L. Benson)

4. Crioconservación de especies frutales

- Tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt)
- Maracuyá y granadilla (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* y *Passiflora ligularis*)

5. Nuevas iniciativas en crioconservación

- Microorganismos (caso de *Phytophthora* spp.)
- Bancos de tejidos y de ADN
- Otros casos

Crioconservación de cultivos de propagación vegetativa

Estudio de caso de la yuca cultivada (*Manihot esculenta* Crantz)

El trabajo de crioconservación en el CIAT se inició con el apoyo del antiguo Consejo Internacional de Recursos Fitogenéticos (IBPGR), que luego se incorporó al Grupo Consultivo sobre Investigación Agrícola Internacional (CGIAR) como el Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI), hoy conocido como Bioversity International. En los primeros años la investigación se centró en comprender el comportamiento de la yuca frente a los diferentes agentes osmóticos de protección adicionados al medio de cultivo.

En la investigación en yuca se ha ido evolucionando en cuanto a las técnicas implementadas. Los primeros trabajos reportaron éxitos parciales en el uso de técnicas clásicas (Escobar *et al.* 1997) y últimamente se están aplicando técnicas modernas basadas en la vitrificación, especialmente la encapsulación-deshidratación y la vitrificación-microgota.



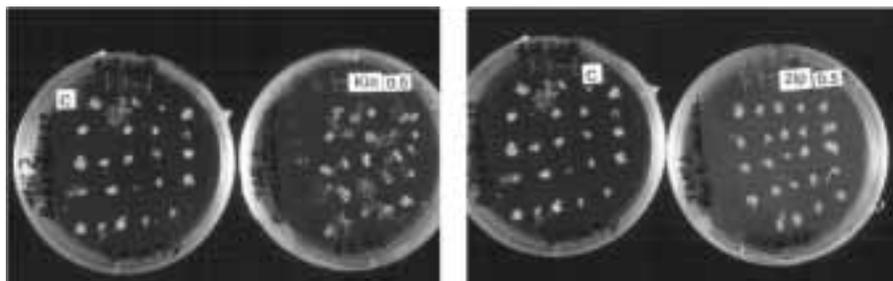
Uso de las técnicas clásicas de criopreservación: Estudios preliminares indicaron que los ápices de yuca responden de modo diferente al agente osmótico (DMSO, sorbitol o sacarosa) usado en el medio de cultivo. Así pues el sorbitol (>1 M) favorece la formación de callo, y el DMSO resulta tóxico en concentraciones mayores que 0.1 M; mientras que la suplementación del medio con sorbitol 1 M disminuye el efecto negativo de los dos agentes anteriores en el tejido. En ese estudio también se observó la posible existencia de una correlación entre la zona edafoclimática de donde provenía la variedad y la respuesta de esta a la congelación; en efecto, los materiales de mejor respuesta a la congelación son aquellos con tolerancia a la sequía y a condiciones climáticas subtropicales. Este hallazgo ayudó a establecer un patrón de respuesta de la yuca: los materiales cuya tolerancia de la sequía es baja pueden tratarse previamente con sustancias crioprotectantes en concentraciones bajas durante un periodo largo y viceversa (alta concentración por corto tiempo).

Los materiales recalcitrantes al protocolo básico (Escobar *et al.* 1997) mejoraron hasta en un 20 % su respuesta en regeneración de plantas después de la congelación, cuando fueron pretratados durante cinco días en medios suplementados con sorbitol 0.25-0.5M, DMSO 1×10^{-3} - 1×10^{-4} M, y sacarosa 0.11-0.25M (Escobar *et al.* 2000).

Asimismo, se ha observado que la regeneración de plantas después de la congelación está mediada por la consistencia del medio, el tipo y la combinación de los gelificantes, y del tipo y concentración de la citoquinina agregada al medio de regeneración (Escobar *et al.* 2000) (figura 8.1).

Este protocolo fue probado con éxito en 16 clones de yuca; no obstante, no se considera un esquema de trabajo práctico a usarse con la colección completa de yuca, ya que tiene muchos pasos y medios previos a la congelación. Apreciaciones similares fueron expuestas por Choroensub *et al.* (1999).

Figura 8.1. Efecto del tipo de regulador aplicado al medio de regeneración en la etapa de poscongelación, según la metodología de Escobar *et al.* (1997). El medio C contiene 0.04 mg/l de BAP. En cada caso se diferencian, por su conformación, el callo y el brote.



Fuente: Escobar *et al.* 2000.

Uso de las técnicas modernas de criopreservación: Escobar y Roca (1997) habían ajustado con anterioridad las condiciones para la congelación rápida de ápices descubiertos de yuca sin que se mostraran diferencias estadísticas respecto a la congelación programada. Esta técnica de congelación abría la posibilidad de establecer un sistema práctico para el manejo del banco, ya que evitaba el uso del programador y agilizaba el proceso.

La técnica de la encapsulación-deshidratación fue adaptada a yuca, para lo cual ápices caulinares provenientes de plantas jóvenes (2.5-3 meses de edad) propagadas en medio 4E (Roca 1984) fueron encapsulados en alginato de sodio suplementado con reguladores hormonales.

Durante el periodo 2002-2003, esta metodología se probó en forma exploratoria en un 50 % de la colección núcleo conformada por 640 clones. Estas pruebas sirvieron para definir tres grupos de respuesta respecto a la recuperación de plantas: alta (>70 %), intermedia (de 30 % a 70 %) y baja (<30 %). Del total de materiales evaluados, 82 % cumplieron con un valor mínimo de respuesta del 30 % de formación de planta poscongelación (Escobar *et al.* 2001).

Análisis de estabilidad genética realizados en un grupo de materiales recuperados después de la fase de congelación mediante el uso de técnicas moleculares, isoenzimáticas y con descriptores morfológicos no mostraron diferencias con respecto al grupo control sin congelación y que habían permanecido bajo condiciones *in vitro* (Escobar 2005).

En 2008 culminó el análisis de toda la colección núcleo, y sus datos indicaron que, aproximadamente, un 70 % de esa colección daba una respuesta de grado intermedio a alto después de la congelación, y un 30 % de dicha colección se hallaba en la categoría de respuesta baja. En la actualidad, el CGIAR, a través de la “Acción Colectiva para la Rehabilitación de los Bienes Públicos Mundiales en el Sistema de Recursos Genéticos CGIAR”, ha financiado una investigación del CIAT que tiene dos objetivos: resolver el carácter recalcitrante a la criopreservación del grupo de baja respuesta y consolidar la reproducibilidad de los protocolos generados con otros centros del CGIAR; si se obtienen estos resultados, el CIAT podrá entregar un protocolo robusto a los programas de manejo de recursos genéticos de yuca en muchas entidades nacionales e internacionales.

En especies silvestres afines a la yuca (*Manihot* spp.)

El CIAT mantiene una pequeña colección de especies silvestres del género *Manihot* como semilla botánica, en el campo e *in vitro*. En la condición *in vitro* se conserva un total de 300 genotipos de 29 especies de *Manihot*, que deben ser subcultivados por períodos de 6-12 meses; esta actividad incrementa la labor de manejo del banco (Mafla G., comunicación personal) a favor de un reducido número de materiales (5.3 % del banco). Esta estrategia de conservación se considera temporal por su alto costo, el espacio que exige y la mano de obra que se requiere; se decidió, por tanto, probar la metodología de criopreservación existente en el Centro para especies cultivadas.



Previamente, Marín *et al.* (1990) había logrado crioconservar con éxito semillas de *M. carthagenensis*. Posteriormente, en la Unidad de Biotecnología (hoy Área de Investigación para la Agrobiodiversidad), se probó y ajustó dicha metodología en ocho genotipos conservados *in vitro*. Ajustes al medio de precultivo y a las condiciones de regeneración fueron necesarias para lograr recuperar plántulas después del paso por nitrógeno líquido (Escobar *et al.* 2001b).

Tiempos de deshidratación usando gel de sílice durante 16 y 24 horas fueron probados. Los resultados mostraron recuperación de plantas (7.7 %) en tejidos tratados de la accesión *M. carthagenensis* 17F-417-001 durante 16 horas y un 16.6 % en *M. esculenta* subs. *peruviana* 417-005 deshidratada durante 24 horas. En *M. esculenta* subsp. *flabellifolia* se logró de 10 % a 60 % con 16 horas de deshidratación, y de 0 % a 100 % con 24 horas, dependiendo de la accesión (figura 8.2). Los datos preliminares sugieren que es necesario ajustar las condiciones del medio de cultivo antes y después de la congelación (como se indicó antes) para garantizar la recuperación de las plantas de *M. carthagenensis*.

Figura 8.2. Respuesta de ápices encapsulados de *Manihot esculenta* subespecies *flabellifolia* 444-002, después de la congelación en nitrógeno líquido.



Fuente: Escobar *et al.* 2001b.

En tejido embriogénico de yuca cultivada

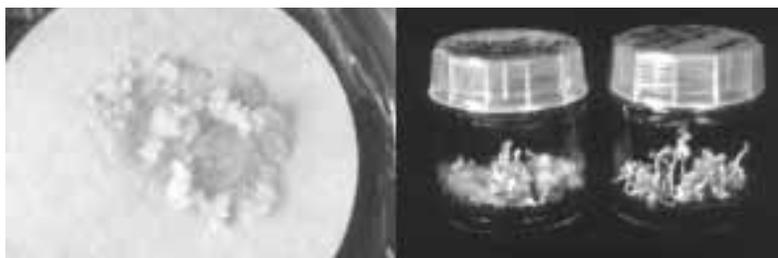
Un requisito fundamental para acceder a la transformación genética es contar con protocolos eficaces de regeneración de plantas, ya sea mediante la embriogénesis somática o la organogénesis. Taylor *et al.* (1996) propusieron otro tipo de tejido embriogénico que permitía la regeneración de plantas, al que denominaron “callo embriogénico friable” (CEF); este tejido está conformado por agregados celulares proembriogénicos inmersos en una matriz líquida de células. Esta técnica presenta varias limitaciones:

- obtener CEF de buena calidad, cualquiera sea el genotipo de yuca;
- establecer una suspensión celular de trabajo óptima a costa de una labor dispendiosa en tiempo (de 8 a 12 meses) y en mano de obra;

- asumir la probabilidad de variación del tejido y el costo considerable del mantenimiento de las suspensiones;
- incluir el riesgo de pérdida del callo por contaminación durante los subcultivos y la posible ocurrencia de errores humanos y técnicos (siempre presentes).

Se propuso, por tanto, establecer un sistema seguro y práctico de conservación que apoyara eficazmente los trabajos de transformación genética. Para ello se implementó y ajustó la metodología de desecación y de desecación-vitrificación (Santos 2002; Escobar *et al.* 2001) a la crioconservación del tejido embriogénico de yuca. Esta metodología consiste en deshidratar parcialmente y gradualmente (en el tiempo) el CEF y congelarlo luego rápidamente mediante inmersión directa en nitrógeno líquido. La desecación se logra dejando crecer el tejido en un medio de alta concentración de agar, para obtener un callo de consistencia granulosa, dura y seca, de color oscuro, el cual resulta óptimo para el proceso de congelación. Luego se congelan viales que contienen CEF desecado en un recipiente Nalgene™ Cryo 1 °C (Cat. No. 5100-0001). Este trabajo se considera como el primer reporte de conservación en nitrógeno líquido de líneas celulares de yuca, lo que abre la posibilidad de establecer a futuro un banco de líneas celulares-CEF crioconservados para apoyar los programas de transformación genética (figura 8.3).

Figura 8.3. Respuesta de un CEF congelado mediante la técnica de la desecación-vitrificación: A) crecimiento en poscongelación de la línea MCol 2215-A; B) etapa de conversión de embrión a planta en una línea celular de MNig 11 previamente congelada.



A

B

Fuente: Escobar *et al.* 2001a, Santos 2002.

Crioconservación de papas

Solanum tuberosum Grupo *phureja*. La CORPOICA tiene a su cargo (entre otras actividades) el mantenimiento y la salvaguarda de las colecciones de germoplasma de especies de interés nacional. Respecto a la papa, el Programa Nacional de Recursos Genéticos y Biotecnología Vegetal, que es manejado por esa Corporación en la estación experimental de Tibaitatá, en Mosquera, Cundinamarca, tiene la responsabilidad de administrar la Colección Central Colombiana (CCC) de papa, que mantiene cerca de 1098 accesiones de las subespecies *S. andígena*, *S. tuberosum* y *S. phureja*. Esta



colección, que cuenta con tres sistemas complementarios de conservación: uno *in vitro*, otro en el campo y un tercero en cava fría a 0 °C, ha sido considerada por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) (1996), dada la representación de la variabilidad genética allí almacenada (13 %), como la segunda colección de papa más importante del mundo, después de la del Centro Internacional de la Papa (CIP), que tiene 20 % de diversidad. El tipo de material almacenado en esta colección incluye especies silvestres y cultivares de agricultor procedentes de los departamentos de Nariño, Cauca, Boyacá, Cundinamarca, Santander, Norte de Santander, Caldas, Quindío y Magdalena, y algunas introducciones de Perú, Bolivia, Ecuador, México, Argentina, Inglaterra, Escocia, Alemania, Holanda y Bélgica y material de mejoramiento de cruces entre *S. andigena* x *S. tuberosum* (Moreno y Valbuena 2006). La CORPOICA ha priorizado en la investigación de la criopreservación de papa, ya que los cálculos de los costos de conservación para el año 2005 arrojaron los montos de COP31 724 910 y COP53 869 967 para el manejo de las colecciones bajo condiciones *in vitro* y en campo, respectivamente, y se estima que la criopreservación podría reducir en un 20 % el costo de conservación en campo (Cerón *et al.* 2005, citado por Rivera *et al.* 2008).

De *S. tuberosum* Grupo *phureja* se conservan aproximadamente 113 accesiones de las que se hacen subcultivos periódicos cada cuatro a seis meses, según el genotipo. A esta especie pertenecen las papas amarillas o criollas, que tienen un valor nutricional alto y una precocidad considerable para la producción, si se comparan con variedades de otras especies. El cultivo de papa amarilla ocupa el tercer renglón de toda el área sembrada en Colombia y actualmente hay posibilidad de exportarla. Es, además, una especie importante para el fitomejoramiento del cultivo de papa, porque posee genes de resistencia al hongo *Phytophthora infestans*. Dada la importancia de este cultivo para el país, es necesario desarrollar (e implementar luego) alternativas metodológicas que amplíen el tiempo de conservación, minimicen los costos operativos de ese proceso y garanticen la conformación de copias de seguridad de la colección.

Con ese fin, la CORPOICA inició un proyecto para poner en práctica las técnicas de criopreservación, en el cual utilizó a *S. tuberosum* Grupo *phureja* como modelo. Este proyecto se realizó en dos fases:

- Primera fase: Se trataron 10 accesiones de la colección mediante los protocolos publicados por Hirai y Sakai (2000), Golmirzaie (1996), Debabrata (2000) y Bouahal (1996), y su evaluación no indicó que hubiera en ellas respuesta alguna después del tiempo de congelación (citados por Villa *et al.* 2007).
- Segunda fase: Se planeó entonces esta fase de experimentación para tratar de ajustar las condiciones de manejo de las accesiones, partiendo de la experiencia del CIAT en la criopreservación de yuca mediante la técnica de encapsulación-deshidratación, ya que no se había logrado respuesta alguna en la fase previa. Se redujo el número de individuos experimentales de 10 a 1, y se escogió *S. phureja* 100 porque, además de



tener sus datos de pasaporte del CIP y contar con el código CIP703292, mostró vigor durante el subcultivo posterior a la fase de almacenamiento en el banco.

Identificados los puntos críticos del proceso, se ajustaron las condiciones de manejo del tejido inicial, tales como la edad de la planta fuente del explante, el medio de cultivo (que aumentaría el vigor y mejoraría la calidad de la planta y el ápice) y las condiciones de crecimiento en el cuarto de propagación y mantenimiento. En la etapa previa a la criopreservación, también se ajustó el medio de preacondicionamiento para la congelación. Se determinó finalmente, en esa etapa previa, el efecto de la concentración y del tiempo de acción de la sacarosa en el tejido tratado, la respuesta del ápice encapsulado en gel de sílice al tiempo de deshidratación a que fue sometido y el efecto de las soluciones vitrificantes PVS2 y PVS4 en el tejido mencionado.

Hechos esos ajustes, la investigación continuó luego en la estación de Tibaitatá. El objetivo ahora es ajustar aún más las condiciones de criopreservación de papa, para llevarlas a un punto óptimo, ya que el modelo usado es la subespecie *S. tuberosum* Grupo *phureja*. Este material, en realidad, es muy susceptible al estrés físico y al estrés químico, por lo que la tasa de recuperación después del congelamiento ha sido hasta ahora de 10 %.

S. tuberosum ssp. *andigena*: Este trabajo se desarrolló como una tesis de maestría entre la CORPOICA y la Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira (Rivera *et al.* 2008). Para su desarrollo se definieron como explantes los microtubérculos de dos accesiones de *S. tuberosum* de la CCC de papa, con códigos CCC-4318 (carriza) y CCC-4981 (guata negra). Este proyecto se realizó en dos fases:

- Primera fase: Se recuperó el material de las condiciones de almacenamiento *in vitro*, se propagó en medio basal Murashige y Skoog (1962) sin adición de reguladores de crecimiento, 3 % de sacarosa y 0.2 % de carbón activado. Para la inducción de los microtubérculos se adicionó al medio 10 mg/L de cloruro de cloro colina (CCC) y 5mg/L de BAP bajo condiciones de oscuridad, 18 °C y 60 % de humedad relativa (HR). A partir de los tubérculos obtenidos se extrajeron yemas de estos para iniciar las pruebas de secado en cámara de flujo por exposición directa al flujo durante tiempos variables (de 15 minutos a una hora). Tiempos de secado altos reducen drásticamente la viabilidad de la yema previa a la fase de congelación.
- Segunda fase: Yemas de microtubérculos desecadas en cámara de flujo por 30 minutos fueron congeladas por inmersión directa y recuperadas en medio convencional con 8 % de sacarosa. La supervivencia observada de las yemas fue del 99 %, 71 %, 36 % y 0 % de yemas sin secado (control), secadas por 30 minutos, secadas-congeladas y sin secar-congeladas, respectivamente (Rivera *et al.* 2008). Sin embargo, no se logró recuperar planta a partir del material congelado, una vez se pasó de condiciones de penumbra (14 días posteriores a la congelación, d.p.c.) a condiciones de luz (30 d.p.c.).



Crioconservación de semillas

Semillas botánicas de *Manihot* spp.

La semilla de yuca se clasifica como ortodoxa. Marín *et al.* (1990) establecieron un protocolo sencillo de crioconservación para la semilla botánica de yuca y de algunas especies afines silvestres. Esta metodología consta de los siguientes pasos: se inicia con semillas cuyo contenido de humedad sea cercano a 8 %; las semillas se colocan en viales y se congelan mediante una programación (inicio: 25 °C; 2 °C/min hasta -50 °C, e inmersión directa en nitrógeno líquido) o sumergiéndolas directamente en nitrógeno líquido. Posterior a la congelación se recuperan como plantas, con una eficiencia cercana a 97 %, semillas descongeladas lentamente (del nitrógeno líquido a -70 °C, luego a 15 °C y luego temperatura ambiente, cada paso por una hora) para evitar rupturas de las semillas. Cuando se descongela rápidamente, se rompen del 7 % al 10 % de las semillas tratadas.

Posteriormente, Escobar y Mafla (datos no publicados) lograron descongelar viales directamente a temperatura ambiente, incrementando el número de semillas por vial, ajustando bien las semillas sin dejar espacio entre una y otra en el interior, para evitar que se fracturaran durante el proceso de descongelación.

Embriones de café

Patiño *et al.* (1999), investigadores del Centro Nacional de Investigación del Café (Cenicafé) de Colombia, trabajaron en la crioconservación de embriones cigóticos y somáticos de café. Obtuvieron resultados prometedores congelando embriones cigóticos adheridos a las semillas (previamente secadas a la sombra). Una vez descongeladas las semillas, los investigadores permitieron que estos embriones germinaran *in vitro* y lograron un 54 % de germinación. Los embriones somáticos descongelados y puestos a germinar arrojaron un porcentaje de germinación (como respuesta) mucho más bajo (26 %), lo que sugiere, según los autores, que es necesario ensayar otros métodos de crioconservación, tales como la encapsulación-deshidratación y la vitrificación.

Semillas de palma de chontaruro

En el marco del convenio 046/2004 suscrito por el CIAT con el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia, en dicho Centro se realizaron experimentos para desarrollar técnicas de conservación en nitrógeno líquido de varias especies de palmas, para lo cual se tomó como modelo metodológico la palma de chontaruro (*Bactris gasipaes* Kunth). Esta palma cultivada se escogió como modelo por las siguientes razones:

- Aumentó la demanda de material de propagación del cultivo, que se había convertido en opción del Plan Nacional de Desarrollo Alternativo (PLANTE).



- Era necesario responder a las preguntas biológicas sobre las actividades prioritarias de conservación de la flora amenazada en Colombia.

En este contexto, dos especies de importancia del género *Bactris* —el chontaruro (*Bactris gasipaes* var. *gasipaes*) y el chinamato (*B. gasipaes* var. *chinchagui*)— habían sido incluidas por Bernal y Galeano en 2004 en la lista roja de fanerógamas de Colombia (citado por Aranzales 2005). Estos autores informaron que en 1992 se hallaban amenazadas de extinción en Colombia 47 de las 258 especies de la familia Palmae y que en 1994 ese número había ascendido a 208 de esas 258 especies.

Como parte de un trabajo de tesis desarrollado en el CIAT (Aranzales 2005), se logró determinar el efecto del secado en la viabilidad y la germinación de las semillas de chontaruro antes y después de la fase de congelamiento. La HR de las semillas recién colectadas de frutos maduros e inmaduros (tres meses después de la polinización), que se cosecharon en la finca de un agricultor, oscilaba en alrededor de 45 %. El trabajo comprendió las siguientes actividades:

- Las semillas se colocaron en cuartos de secado a 20 °C y a 40 % de HR, y se obtuvieron así semillas con 40 %, 20 % y 10 % de HR, en las cuales se determinó la viabilidad y el porcentaje de germinación antes y después de la congelación.
- Las semillas desecadas sin congelar se colocaron en camas con arena estéril para evaluar su germinación. Pasados tres o cuatro meses, se observó respuesta en las que tenían 40 % de HR y no fue visible ninguna reacción en las de 20 % y 10 % de HR. En consecuencia, fue necesario implementar la técnica de rescate de embriones y diseñar una carta de colores para leer la prueba con sales de tetrazolio al 0.5 %.
- Las semillas desecadas se empacaron en bolsas de aluminio selladas al vacío (10 semillas por bolsa) y se sumergieron directamente en nitrógeno líquido para congelarlas. Pasados 7 y 30 días después de la congelación (DDC), se evaluaron en ellas, como respuesta a la congelación, dos parámetros: viabilidad y emisión de brotes. Se observó que 30 DDC solo los embriones de semillas cuya HR era 10 % daban una respuesta positiva, tanto en viabilidad (80 %) como en brotes (53 %).

Se hicieron posteriormente ajustes a esta técnica de congelación. Si las semillas llevan de 8 % a 10 % de HR antes de la congelación, se obtiene en ellas un 80 % de viabilidad y un 60 % forman plantas. Asimismo, para validar y ampliar los resultados de este trabajo, se ensayó esta técnica en la palma africana (*Elaeis guineensis* Jacq.) y en el güérregue (*Astrocaryum standleyanum* Bailey), y en ambas especies se obtuvieron resultados positivos después de la congelación.

Con este trabajo se dio una respuesta (como alternativa metodológica) al interrogante inicial sobre la posibilidad de desarrollar sistemas de conservación alternos para las especies amenazadas de extinción de la familia Palmae en Colombia.



Embriones de palma de aceite

La CORPOICA realiza trabajos de conservación de otras especies de palmas como parte de su estrategia de manejo de los bancos nacionales de recursos genéticos. El banco de germoplasma de palmáceas de Colombia alberga cerca de 339 accesiones de palma, chontaruro y cocotero, que se mantienen, principalmente, en condiciones de campo en el Centro de Investigación El Mira, en Tumaco (Nariño), en Colombia. Esta colección, activa y de trabajo, está continuamente expuesta a factores bióticos y abióticos que pueden ocasionar la pérdida del material biológico. Por consiguiente, el Programa de Recursos Genéticos y Mejoramiento Vegetal de la CORPOICA se dio a la tarea de desarrollar un sistema alternativo de conservación que permitiera mantener una copia de seguridad de estas especies, que son cultivos estratégicos para la economía del país, y que redujera a la vez los costos operativos y de mantenimiento de la colección mencionada.

Partiendo de esa necesidad, se logró establecer, mediante experimentación, un protocolo para la crioconservación de embriones cigóticos de palma de aceite, que consta de los siguientes pasos:

- Se deshidratan los embriones durante dos horas en recipientes que contienen gel de sílice.
- Los embriones desecados se introducen en viales y se someten a congelación directa por inmersión de los viales en nitrógeno líquido.
- Cuando se descongelan, los viales se colocan en un baño a 37 °C durante tres minutos, y así se obtiene una tasa de recuperación de 84.37 %.

Esta metodología exige prestar atención especial al estado del embrión como tal previo a la congelación, es decir, a su desarrollo, su tamaño, su edad, la posición (o conformación) de la semilla en el racimo y las condiciones en que fue beneficiada la semilla, entre otros aspectos. La razón es que el proceso de desecación en gel de sílice causa daños severos e irreversibles al embrión (tanto en la radícula como en el haustorio), los que disminuyen su porcentaje de germinación después de la congelación (Villa *et al.* 2007).

Semillas de *Cratylia*

Esta leguminosa arbustiva presenta gran interés en el trópico de Latinoamérica, ya que se convierte en una buena fuente de alimento para el ganado en épocas secas, pues presenta una alta retención foliar, capacidad de rebrotar en época seca y tolerancia a suelos pobres y ácidos, pero bien drenados (Peters *et al.* 2003). A pesar de que presenta una buena producción y calidad de semilla sin marcada latencia física o fisiológica, bajo ciertas condiciones de almacenamiento presenta una pérdida drástica de viabilidad, vigor y germinación (Lascano 1998, citado por Montoya *et al.* 2009).

Semillas con porcentajes de humedad variables (10 %, 8 % y 6 %) obtenidos mediante manejos de una relación de 1:2 entre semilla y gel de sílice, empacadas en



bolsas metálicas selladas y empacadas al vacío fueron transferidas directamente a nitrógeno líquido. El mayor porcentaje (86 %) de germinación poscongelación y el menor número de plantas anormales (5 %) se obtuvieron en semillas con 8 % de HR. Al comparar tres condiciones de conservación —en nitrógeno líquido, en cuarto frío (55 % de HR y 18 °C) y en ambiente— se observa un efecto marcado sobre la germinación de las semillas de *Cratylia* de las condiciones de almacenamiento y la humedad de la semilla. Las mayores pérdidas en germinación se observaron en ambiente con 6 % de HR, seguido por el almacenamiento en cuarto frío con -6 % de HR.

Los resultados de Montoya *et al.* (2009) sugieren un comportamiento no ortodoxo de las semillas de *Cratylia*.

Crioconservación de la flora amenazada

La Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira, mediante su Facultad de Ingeniería Agroindustrial y del Programa de Investigación en Recursos Genéticos de Plantas Medicinales, Aromáticas y Condimentarias, ha realizado experimentos, junto con el CIAT, en la crioconservación de la flora amenazada de extinción.

Semilla de chambimbe

En este proyecto se tomó como modelo experimental el chambimbe [*Sapindus saponaria* var. *Drummondii* (Hook. & Arn.) L. Benson]. El trabajo, que se incorporó en una tesis de pregrado (Arce *et al.* 2007), dio como resultado la caracterización morfo-anatómica de la semilla y la evaluación del efecto sobre la germinación de tres métodos para escarificar mecánicamente la semilla: a) con lija, b) con cortes hechos cerca del micrópilo con una segueta, y c) perforando con una broca de 3 mm.

Semillas con porcentajes de humedad variables (12 %, 5 % y 4 %) obtenidos mediante manejos de la relación entre semilla y gel de sílice, empacadas en bolsas metálicas selladas y empacadas al vacío, fueron transferidas directamente a nitrógeno líquido.

Semillas escarificadas mediante perforaciones con la broca de 3 mm mostraron una germinación del 96 %. También se observó un comportamiento no ortodoxo de las semillas de chambimbe. Semillas desecadas hasta un 12 % de humedad y congeladas mostraron un 92 % de germinación en camas de arena.

Crioconservación de frutales

Tomate de árbol

Los cultivadores de tomate de árbol manejan tres cultivares según la morfología, la calidad y, principalmente, el color del fruto (rojo común, morado y amarillo). Los tres cultivares son aceptados en el mercado y sus precios dependen de los mecanismos de



demanda y oferta. El CIAT hizo una incursión en el campo de la conservación de frutales y tomó como modelo el tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt.).

Partiendo de semilla botánica colectada de frutos maduros y sanos adquiridos en los mercados locales, se desarrolló un protocolo de conservación en nitrógeno líquido (Montoya *et al.* 2002).

El protocolo consta de los siguientes pasos:

- Se obtienen semillas de frutos maduros y sanos de los tres cultivares, y se sumergen en agua durante 24 horas para lavarlas y removerles el mucílago; luego se desinfectan en cámara de flujo laminar con alcohol al 70 % y con hipoclorito al 1 %.
- Las semillas tratadas se colocan luego en cajas de Petri abiertas, que se sitúan contra el flujo de aire de la cámara para deshidratar sus tejidos; este tratamiento dura de una a dos horas y media continuas, según el material experimental, hasta que la humedad de las semillas esté cerca del 7 %. La semilla de los frutos morados (variedad Mora) necesita más tiempo para llegar a ese punto. Este porcentaje de humedad es un requisito previo a la congelación de las semillas.
- Las semillas deshidratadas se colocan en viales y se congelan por inmersión directa en un tanque de nitrógeno líquido.
- Descongelados más tarde los tejidos en un baño a 37 °C, las semillas se siembran en un medio de cultivo, donde vuelven a crecer y producen plántulas normales y vigorosas que se trasplantan al suelo del invernadero.

La respuesta después de la congelación (en formación de plantas) de los cultivares o clones Mora y Común fue superior a 80 %, mientras que la del clon Amarillo fue solo de 38 %. Se hicieron luego pruebas con sales de tetrazolio y el resultado indicó que las semillas congeladas del clon Amarillo eran viables (tinción positiva y sólida del embrión) pero no estaban capacitadas para iniciar el proceso de germinación. La causa probable de esta condición es un daño celular o un estado de “dormancia” o letargo de las semillas inducido durante el proceso.

Maracuyá y granadilla

Se obtuvieron semillas botánicas de frutos maduros de *Pasiflora edulis* f. *flavicarpa* y de *P. ligularis* y se sometieron a diferentes tipos de secado para determinar el efecto de este tratamiento en la germinación y en la congelación de las semillas. El porcentaje de humedad relativa (HR%) de las semillas recién extraídas de los frutos de *P. edulis* y de *P. ligularis* es de 21 % y 30 %, respectivamente. En cuanto al proceso de desecación, *P. edulis* es muy sensible y *P. ligularis* es de comportamiento intermedio (Ospina *et al.* 2000). Se han reportado porcentajes de viabilidad (medida con sales de tetrazolio) después de la congelación de 72 % para *P. edulis* y de 89.3 % para *P. ligularis*; en los ensayos se usaron semillas desecadas hasta un 11 %, en el primer caso, y hasta un 9 %, en el segundo. El sistema de secamiento no fue significativo en la respuesta a la congelación, un resultado que confirma el grado de sensibilidad de los materiales a la desecación.



A pesar de la respuesta de viabilidad observada, no fue posible obtener plantas después del proceso de congelación, porque la semilla de las pasifloras experimenta un fuerte efecto de latencia. Esta condición debe resolverse antes de seguir con las técnicas de conservación, las cuales garantizarían la recuperación de las plantas después del proceso de almacenamiento a que se sometían las semillas.

Nuevas iniciativas de crioconservación

Crioconservación de *Phytophthora* spp.

En el CIAT se han llevado a cabo trabajos preliminares de crioconservación de microorganismos como una experimentación alterna a los ensayos que se hacen con plantas. Sirvieron de modelo para este trabajo 80 aislamientos del género *Phytophthora* de la colección del Programa de Patología del Centro (Bedoya *et al.* 1999).

Es necesario mantener continuamente en replicación la copia activa de la colección del hongo en un refrigerador; por ello puede perder el aislamiento, entre otros atributos, la viabilidad o la pureza o la virulencia, o puede ocurrir que desarrolle una variabilidad no deseada. En este trabajo se evaluaron aislamientos del género *Phytophthora* obtenidos de tejidos de yuca, que fueron purificados y crecieron antes de entrar en la fase de congelación en un medio de agar-avena. Del micelio que creció durante cinco días a 27 °C se obtuvieron discos centrales con un sacabocados esterilizado en cámara de flujo, y se colocaron en viales con DMSO al 15 %. La congelación programada se ejecutó mediante el programador Cryomed 1010.

Se recuperaron al azar 32 de los 80 aislamientos congelados, y con ellos se infectaron algunas plantas bajo condiciones controladas en el invernadero. Se pudo demostrar que estos aislamientos congelados no perdían su poder de causar patogenicidad en las plantas de yuca susceptibles al patógeno, porque se compararon con los testigos no congelados y mantenidos como control del tratamiento.

Banco de tejidos y de ADN crioconservados

El auge de las técnicas de biología molecular y los estudios que se han hecho sobre diversidad genética, ecología, sistemática, biogeografía, genética de poblaciones y filogenia han despertado el interés de los investigadores en tener acceso directo al ADN para hacer más expeditos los trabajos que realizan.

El Instituto de Investigación en Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (IAvH) y el Ministerio del Medio Ambiente de Colombia crearon en 1998 un banco de tejidos y un banco de ADN, con el fin de disponer de una colección de referencia para el estudio de la biodiversidad colombiana desde la perspectiva genética y evolutiva (Palacio-Mejía 2006). En Latinoamérica, después de Brasil y Argentina, la colección de Colombia es la más representativa y diversa del mundo, con 1536 especies y alrededor de 11 000 muestras. Además, anualmente recibe un promedio de 1000 nuevas entradas. Del total de muestras de ADN almacenadas, 47.1 %



corresponde a aves, 39.53 % a plantas, 3.54 % a mamíferos, 6.29 % a reptiles, 2.57 % a peces y el 0.97 % restante a anfibios, insectos y microorganismos. En el banco de ADN del IAvH hay dos tanques de almacenamiento con capacidad para alojar 76 000 muestras cada uno. De ellos, uno está en servicio activo y el otro se mantiene en reserva como sistema de seguridad, en caso de una falla mecánica, y para ampliar la capacidad del banco.

Una muestra de ADN puede incluirse en esa colección, si tiene completos sus datos de pasaporte, que son la clave para la curaduría de la muestra, para dar información sobre ella y para darle sentido biológico al análisis, presente o futuro, en que ella intervenga. Cada ejemplar almacenado tiene una muestra de respaldo (voucher) en otra colección biológica, razón por la cual se trabaja en unión con la iniciativa de la Facultad de Ciencias de la Universidad de los Andes, a través del Banco de ADN y Tejidos del Museo de Historia Natural (BAT). Este se considera la segunda colección de tejidos más grande de Colombia y la primera en soportar información biológica asociada a cada espécimen a través de una base de datos donde se consigna información de caracteres morfológicos, ecológicos, geográficos y taxonómicos (voucher). Actualmente en el BAT se encuentran 1390 tejidos, 500 alícuotas de ADN total que abarcan 18 órdenes, 45 familias y 220 géneros de aves. Las muestras en el BAT se mantienen en seco a -80 °C y cada una tiene su duplicado en la colección central del IAvH.

El CIAT inició recientemente una investigación que permite establecer un banco de ADN de yuca, frijol, arroz, pastos tropicales y algunos frutales, cuyo objetivo es agilizar el servicio de entrega de muestras que se requieran para los análisis moleculares practicados dentro y fuera de la institución (Chacón *et al.* 2008). Este sistema de conservación tendrá, como ocurre en el sistema convencional *in vitro*, un protocolo de acceso fácil que debe descansar en la firma de un acuerdo normalizado para el intercambio de germoplasma (SMTA, por sus siglas en inglés) o para el intercambio de información en forma de ADN.

Otros casos

La Convocatoria Nacional 2007 para la Cofinanciación de Programas y Proyectos de Investigación, Desarrollo Tecnológico e Innovación para el Sector Agropecuario por Cadenas Productivas, del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia, ha permitido que la Pontificia Universidad Javeriana, a través de su Facultad de Ciencias, ejecute actualmente un programa denominado “Desarrollo del paquete tecnológico para la certificación molecular y la conservación de clones de melina (*Gmelina arborea* L. Roxb.)”. Uno de los proyectos del programa busca implementar la crioconservación del germoplasma de este cultivo, con el fin de promover el interés en él de parte del sector comercial.

En el campo forestal probablemente existen oportunidades para desarrollar protocolos propios para materiales de importancia económica que sean objeto de programas de mejoramiento genético, en los cuales la técnica de la embriogénesis somática desempeñaría un papel decisivo para el desarrollo de líneas celulares en pinos, eucaliptos o acacias, cuyo valor agregado sería alto.



Conclusiones

En Colombia se cuenta con una experiencia amplia en la aplicación de técnicas de la crioconservación en diversos cultivos. La mayoría de estas investigaciones han sido desarrolladas mediante trabajos de pregrado y posgrado en universidades. Lamentablemente, una vez culminados, a dichos estudios no se les da seguimiento ni se establecen las colecciones pertinentes, debido en particular a aspectos financieros, por lo que los especialistas formados migran a otras actividades y/o proyectos de investigación.

No se han logrado establecer bancos de germoplasma como iniciativas continuas, con excepción del banco del IAvH, adscrito al Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial de Colombia, que opera como el banco de referencia y análisis de la diversidad genética colombiana de varios grupos biológicos, y la colección de yuca que mantiene el CIAT.

Agradecimientos

A los doctores William M. Roca, Joe Tohme y Daniel Debouck, quienes han apoyado durante años el trabajo de crioconservación en la agenda de investigación del CIAT y han permitido no solo aplicar nuestra experiencia a otras especies y cultivos de importancia en la región latinoamericana, sino ampliarla mediante la exploración de nuevas posibilidades. Al Sr. Francisco Motta, por la edición técnica del documento, y a la Sra. Lynn Menéndez, por la revisión final de él.

Referencias

- Aranzales, E. 2005. Desarrollo de protocolos de conservación *in vitro* para especies de palmas usando como modelo la palma de chontaruro (*Bactris gasipaes* Kunth). Tesis Ing. Prod. Biotec. Cúcuta, CO, Universidad Francisco de Paula Santander. 80 p.
- Arce, K; Bonilla, CR; Sánchez, M; Escobar, R. 2007. Morfoanatomía y respuesta fisiológica de las semillas de chambimbe [*Sapindus saponaria* var. *drummondii* (Hook. & Arn.) Benson] a condiciones de crioconservación. Acta Agronómica 56(3):135-140.
- Bedoya, FA; Escobar, RH; Álvarez, E; Roca, WM. 1999. Criopreservación en nitrógeno líquido de aislamientos de *Phytophthora* spp. In XX Congreso Nacional de Fitopatología (1999, Manizales, CO). Memoria. Manizales, CO, ASCOLFI. p. 28.
- Chacón, J; Debouck, D; Tohme, J. 2008. Establecimiento de un banco de ADN en el Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT. In III Congreso Colombiano de Biotecnología y II Seminario Internacional de Bionegocios (2008, Bogotá, CO). Poster.



- Charoensub, R; Phansiri, S; Sakay, A; Youngmanitchai, W. 1999. Cryopreservation of cassava in vitro shoot tips cooled to -196 °C by vitrification. *CryoLetters* 20:89-94.
- Engelmann, F. 2000. Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources. *In* Engelmann, F; Takagi, H. eds. *Cryopreservation of tropical plant germplasm: current research progress and application*. Los Baños, PH, JIRCAS-IPGRI. p. 8-20.
- Escobar, R; Manrique, N; Gil, F; Santos, LG; Tohme, J; Debouck, D; Roca, WM. 2001. Cryopreservation of cassava tissues using different techniques. *In* 5th International Meeting of the Cassava Biotechnology Network (2001, St. Louis, US). Fauquet, CM; Taylor, NJ. eds. *Memorias. Cassava: An ancient crop for modern times (CD3)*. St. Louis, US.
- Escobar, RH. 2005. Aspectos logísticos de manejo y determinación de la estabilidad genética de materiales crioconservados de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Tesis de Maestría. Cali, CO, Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira. 99 p.
- _____; Debouck, D; Roca, WM. 2000. Development of cassava cryopreservation. *In* Engelmann, F; Takagi, H. eds. *Cryopreservation of tropical plant germplasm: current research progress and application*. Los Baños, PH, JIRCAS-IPGRI. p. 222-226.
- _____; Mafla, G; Roca, WM. 1997. A methodology for recovering cassava plants from shoot tips maintained in liquid nitrogen. *Plant Cell Reports* 16:474-478.
- _____; Manrique, NC; Debouck, DG; Tohme, J; Roca, WM. 2001a. Cryopreservation of cassava shoot tips using an encapsulation-dehydration technique. *In* CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical, CO). *Annual Report: Assessing and utilizing agrobiodiversity through biotechnology*. Parte A, Cali, CO. p. 243-247.
- _____; Manrique, NC; Gil, F; Tohme, J; Debouck, DG. 2001b. Preliminary studies on the cryopreservation of meristems and seeds of wild *Manihot* species. *In* CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical, CO). *Annual Report: Assessing and utilizing agrobiodiversity through biotechnology*. Parte B. Cali, CO. p. 248-251.
- _____; Manrique, NC; Ríos, A; Gallego, G; Ocampo, C; Debouck, D; Tohme, J; Roca, WM. 2002. Implementation of the encapsulation-dehydration method on the cassava core collection. *In* CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical, CO). *Annual Report: Assessing and utilizing agrobiodiversity through biotechnology*. Cali, CO. p. 274-277.
- _____; Roca, WM. 1997. Cryopreservation of cassava shoot tip through rapid freezing. *African Journal of Root and Tuber Crops* 2:214-215.

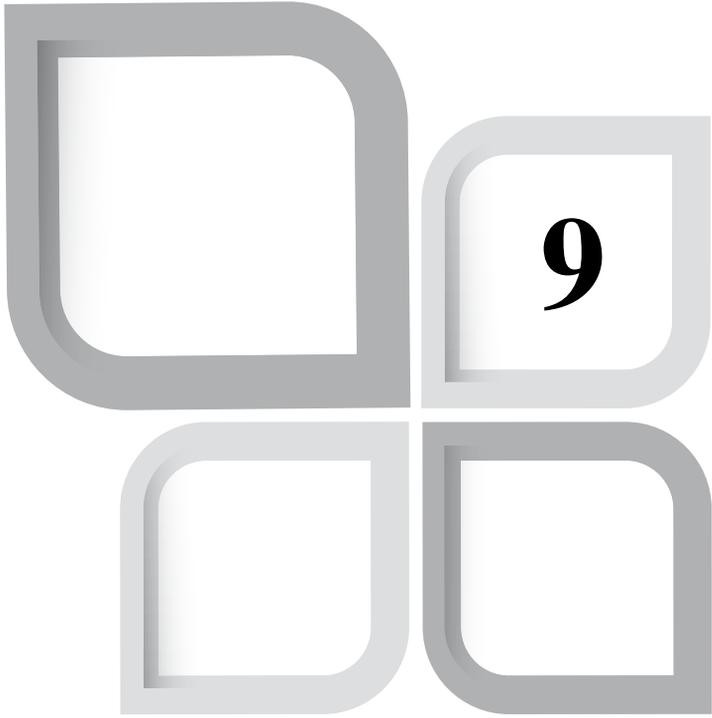


- Fabre, J; Dereuddre, J. 1990. Encapsulation-dehidration: a new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot tips. *CryoLetters* 11:413-426.
- Fahy, GM; Macfarlane, DR; Angell, CA; Meryman, HT. 1984. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* 21(4):407-426.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, IT). 1996. Informe sobre el estado de los recursos fitogenéticos en el mundo. *In Conferencia Técnica Internacional sobre Recursos Fitogenéticos (1996, Leipzig, DE).*
- Marín, ML; Mafla, G; Roca, WM; Withers, LA. 1990. Cryopreservation of cassava zygotic embryos and whole seed in liquid nitrogen. *CryoLetters* 11:257-264.
- Montoya, DM; Bonilla, CR; Sánchez, MS; Cardozo, CI; Escobar, R. 2009. Respuesta fisiológica de semillas de *Cratylia argentea* (Desvaux) O. Kuntze a condiciones de almacenamiento y crioconservación. *Acta Agronomica* 58(3):167-173.
- Montoya, JE. 2001. Desarrollo de una metodología para la crioconservación de la semilla sexual de tomate de árbol [*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt]. Tesis Ing. Agron. Medellín, CO, Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. 61 p.
- _____; Escobar, RH; Debouck, D. 2002. Development of freezing methodology in liquid nitrogen of tree tomato (*Cyphomandra betacea* (Cav) Sendt) seeds. Cali, CO, CIAT.
- Moreno, JD; Valbuena, RI. 2006. Colección Central Colombiana de papa: riqueza genética para el mejoramiento del cultivo. *Innovación y Cambio Tecnológico* 24(4):16-24.
- Murashigue, T; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- Ospina, JA; Guevara, CL; Caicedo, LE; Barney, V. 2000. Effects of moisture content on *Passiflora* seed viability after immersion in liquid nitrogen. *In Engelmann, F; Takagi, H. eds. Cryopreservation of tropical plant germplasm: current research progress and application. Tsukuba, JP, JIRCAS-IPGRI. p. 378-381.*
- Palacio-Mejía, JD. 2006. Tissue collections as a means of storing DNA: a contribution to the conservation of Colombian biodiversity. *In Vicente, MC de; Andersson, MS. eds. Are DNA banks providing novel options for genebanks?: Topical review in agricultural biodiversity. Roma, IT, IPGRI. p. 49-55.*
- Patiño-Echeverri, C; Acuña, R; Moreno, G; Cortina, H. 1999. Crioconservación de embriones cigóticos y somáticos de café. *In VI Congreso de la Sociedad Colombiana de Fitomejoramiento y Producción de Cultivos (1999, Villavicencio, CO), Memorias. p. 37.*



- Peters, M; Franco, LH; Schmidt, A; Hincapie, B. 2003. Especies forrajeras multipropósito: opción para productores de Centroamérica (en línea). Cali, Colombia, CIAT, BMZ, GTZ. CIAT n.º 333. Disponible en http://books.google.com.co/books?id=OxcbAyx8UFsC&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false.
- Rivera, AL; Valbuena, RI; Hidalgo, R; Moreno, JD. 2008. Crioconservación de yemas de microtubérculos de papa *Solanum tuberosum* spp. *andigena* mediante desecado de tejidos. Ciencia y Tecnología Agropecuaria 9(2):37-44.
- Roca, WM. 1984. Cassava. In Sharp, WR; Evans, DA; Ammirato, P; Yamada, Y. eds. Handbook of plant cell culture; 2: Crop species. Nueva York, US, McMillan. p. 269-301.
- Santos, LG. 2002. Estudio exploratorio para desarrollar una metodología de crioconservación de callo embriogénico friable (CEF) de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) en las variedades MCol 2215 y MNig 11. Tesis Ing. Agrón. Palmira, CO, Universidad Nacional de Colombia. 75 p.
- Taylor, NJ; Edwards, M; Kiernan, RJ; Davey, CD; Blakesley, D; Henshaw, GG. 1996. Development of friable embryogenic callus and embryogenic suspension culture systems in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). Nature Biotechnology 14(6):726-730.
- Velásquez, H. 1995. Mejoramiento de las técnicas para conservación y micropropagación *in vitro* de la población de especies silvestres de yuca (*Manihot* spp., Euphorbiaceae). Tesis Biol. Cali, CO, Universidad del Valle. 75 p.
- Villa, AL; Jiménez, PE; Valbuena, RI; Bastidas, S; Núñez, VM. 2007. Estudio preliminar para el establecimiento de un protocolo de crioconservación para palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.). Agronomía Colombiana 25(2):215-223.
- _____; Sánchez, AM; Valbuena, RI; Escobar, R. 2007. Evaluación preliminar de técnicas de crioconservación en una accesión de *Solanum phureja*. Revista Corpoica (Colombia) 8 (2):50-59.





Crioconservación de germoplasma vegetal en Costa Rica

Ana Abdelnour-Esquivel¹, María Elena Aguilar Vega²

1. Centro de Investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR), Cartago, Costa Rica, aabdelnour@itcr.ac.cr.

2. Laboratorios de Biotecnología, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba, Costa Rica, aguilarm@catie.ac.cr.

En Costa Rica, la investigación en crioconservación se inició en 1990 en el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), mediante un proyecto que contó con el apoyo del Consejo Internacional para los Recursos Fitogenéticos (IBPGR). El objetivo general de ese proyecto fue desarrollar un método para crioconservar el germoplasma de bananos y plátanos (*Musa* spp.) (Abdelnour-Esquivel 1996). En 1992, con el apoyo de la Agencia de los Estados Unidos para el Desarrollo Internacional (USAID), el CATIE y la Universidad de Florida iniciaron trabajos en crioconservación de café (*Coffea* spp.) (Abdelnour-Esquivel 1996). También se trabajó en pejibaye (*Bactris gasipaes*), cacao (*Theobroma cacao*) y la bacteria *Pausteria penetrans*, un biocontrolador de nematodos. En 1995, el Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR) y la Universidad Estatal a Distancia (UNED), con el apoyo del Gobierno de Italia, iniciaron trabajos en crioconservación de especies de orquídeas en peligro de extinción (Abdelnour y Muñoz 1999). El ITCR continúa la investigación en crioconservación en especies hortícolas y forestales maderables. El CATIE continuó la investigación en café y musáceas y recientemente inició con especies forestales. Con apoyo del Instituto de Investigación para el Desarrollo (IRD) de Francia, el CATIE trabajó en la definición de una “core collection” de la colección de café en campo (Anthony y Dussert 2007) y, tomándola como referencia, estableció el primer criobanco mundial de semillas de café (Dussert *et al.* 1999, 2002, 2007; Vásquez *et al.* 2001, 2005).

Además, el CATIE y el ITCR han contribuido al desarrollo de capacidades regionales en el tema de la crioconservación mediante la organización de diferentes eventos internacionales (cursos, talleres, simposios, capacitaciones) y la realización de tesis de grado y posgrado. Para el logro de todo ese desarrollo y labor de proyección ha sido muy importante el apoyo técnico y financiero que han brindado instituciones como el IRD, el Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI) —actualmente Bioversity International—, la Red de Cooperación Técnica en Biotecnología Agropecuaria para América Latina y el Caribe (REDBIO-FAO), la Red Latinoamericana de Botánica (RELAB), el Programa de la Universidad de las Naciones Unidas/Biotecnología para América Latina y el Caribe (UNU-BIOLAC) y el Consejo Nacional para Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT) de Costa Rica.

Bananos y plátanos (*Musa* spp.)

Aunque los bananos y plátanos son nativos del sudeste asiático, su cultivo constituye una de las principales actividades agrícolas de muchos de los países del trópico americano y, por lo tanto, representan un rubro muy importante en la seguridad alimentaria y en la economía de exportación de estos países. En Costa Rica el banano es uno de los principales rubros de exportación (Aguilar *et al.* 2008).

Debido a que la mayoría de los cultivares son estériles y, por lo tanto, de propagación vegetativa, surge el interés de desarrollar diferentes estrategias para su conservación y almacenamiento. Dada la importancia genética de los progenitores fértiles *Musa acuminata* (AA) y *Musa balbisiana* (BB), también es importante la conservación



segura de este germoplasma. En estos diploides se evaluó el método de aislamiento del embrión, desecación en un flujo de aire estéril y congelamiento rápido en nitrógeno líquido (NL). Los embriones maduros fueron muy resistentes a la desecación y la tasa de supervivencia al congelamiento en NL fue alta (83 % y 94 % para las dos especies respectivamente), cuando presentaron contenidos de agua de alrededor del 15 %; incluso con contenidos de humedad menores (9 %), se obtuvo supervivencia. Plantas regeneradas a partir de los embriones congelados fueron sembradas en el campo y comparadas con plantas regeneradas a partir de embriones no congelados; no se observaron diferencias morfológicas entre los materiales (Abdelnour-Esquivel *et al.* 1992a).

Dado que los embriones somáticos, los callos y las suspensiones celulares embriogénicas son muy útiles para la micropropagación, la transformación genética y la conservación de germoplasma, se desarrolló investigación en estas áreas. Se experimentó en crioconservación de embriones somáticos y pequeños agregados de tres a cuatro embriones de banano, *Musa* AAA cv 'Gran Enano', inducidos a partir de flores masculinas de acuerdo con la metodología descrita por Escalant *et al.* (1994). El material experimental fue cultivado de uno a tres días en un medio con concentraciones crecientes de sacarosa (0.3 M) y, una hora antes del congelamiento, los embriones fueron incubados en medio líquido con 5 % de DMSO. El congelamiento se llevó a cabo lentamente, 1 °C/min hasta -40 °C y luego los embriones se introdujeron en NL. Se obtuvo supervivencia a través de la germinación directa de los embriones (40 %) y también por producción de callos (35 %); sin embargo, los embriones que sobrevivieron como callo rápidamente produjeron embriones somáticos. Los embriones germinaron normalmente y fueron transferidos al invernadero para su aclimatización (Abdelnour-Esquivel y Escalant 1994).

Por otra parte, el protocolo de crioconservación de suspensiones celulares desarrollado por Panis *et al.* (1990) fue utilizado para la crioconservación de suspensiones celulares embriogénicas de *Musa* spp. obtenidas a partir de flores masculinas (Yah 1998). Posteriormente se utilizó el procedimiento adaptado por Yah (1998) y los trabajos realizados en mandarina común (Aguilar *et al.* 1993, Engelmann *et al.* 1994) a suspensiones de células embriogénicas (SCE) de cultivares locales de plátano y banano provenientes de flores femeninas (Grapin *et al.* 1998, 2000) y masculinas (Cote *et al.* 1996), respectivamente. La supervivencia y recuperación celular de las SCE de 'Gran Enano' y 'Gros Michel' fue alta en la mayoría de los casos durante el precultivo, lo que indica que el acondicionamiento celular durante siete días en presencia de 0.39 M de sacarosa parece ser adecuado para las SCE del género *Musa* sp. (Yah 1998, Aguilar *et al.* 2000). En el cv. 'Gran Enano', el porcentaje de cultivos sobrevivientes y la capacidad de recuperación del crecimiento celular en el medio de regeneración M3 son mayores en concentraciones más altas de sacarosa, siendo 0.53 M la concentración que permite la mayor recuperación, tal como ha sido manifestado por Panis *et al.* (1990). No obstante, la germinación de embriones en el medio M4 después de la congelación a -196 °C solo fue posible cuando se utilizó una concentración de 0.26 M de sacarosa en el medio crioprotector. La respuesta del cv. 'Gros Michel' parece ser favorecida por concentraciones inferiores de sacarosa. Otros cultivares ('Curraré', 'Dominico' y 'Dátil') que también fueron evaluados en estas



condiciones no sobrevivieron a la congelación en NL. Esto nos indica que posiblemente existe una respuesta genotípica y que, dependiendo del cultivar, es necesario hacer ajustes en la metodología, principalmente en la concentración de azúcar del medio crioprotector (Aguilar y Ortiz, sin publicar).

Café (*Coffea* spp.)

América Central es la tercera región cafetalera más importante del mundo. El café constituye uno de sus principales productos de exportación, por lo que está estrechamente ligado al desarrollo socioeconómico de los países de esa subregión (Bertrand y Rapidel 1999). La introducción de *Coffea arabica* en el continente americano data de comienzos del siglo XVIII, realizada por holandeses, franceses e ingleses (Anthony *et al.* 1999). El CATIE alberga una colección internacional de germoplasma de café en campo que es considerada la tercera más grande del mundo, la que comprende prácticamente toda la diversidad genética de *C. arabica* (Anthony *et al.* 1999), con un total de 1992 acepciones y más de 9000 cafetos (Ebert *et al.* 2007). Debido a la importancia estratégica de ese germoplasma y a la naturaleza recalcitrante de las semillas de café, el desarrollo de estrategias de conservación a largo plazo constituye una prioridad para la caficultura de la región centroamericana.

Por lo tanto, en café se ha experimentado en la crioconservación de embriones cigóticos y somáticos, brotes apicales y posteriormente semillas. Con brotes apicales de *C. arabica* cv ‘Catimor’, el protocolo de vitrificación descrito por Towill (1988) fue evaluado. La incubación de los brotes en un medio con sacarosa al 0.4 M y PVS2 (30 % de glicerol, 15 % de etilenglicol y 15 % de DMSO) al 20 % por 20 minutos antes de congelarlos rápidamente en NL fue el único tratamiento que permitió la supervivencia de los brotes (28 %). La recuperación de los brotes se realizó a través de producción de callos (Abdelnour-Esquivel, sin publicar). Con respecto a los embriones cigóticos, se experimentó con tres genotipos —*Coffea arabica* cv ‘Caturra’, *C. canephora* cv ‘Robusta’ y el híbrido Arabusta (*C. arabica* x *C. canephora*) y dos estadios de maduración de los embriones: frutos verdes (dos meses antes de la cosecha) y frutos amarillos (cuatro días antes de la cosecha). El método de desecación por flujo de aire estéril y congelamiento rápido en NL fue utilizado debido a su simplicidad y eficiencia en muchas especies. Las mayores tasas de supervivencia se obtuvieron con los embriones maduros, aislados de los frutos amarillos (96 % de supervivencia para *C. arabica* al 16 % de humedad), comparado con los aislados de frutos verdes (50 % de supervivencia al 21 % de humedad). Sin embargo, el enriquecimiento del medio de recuperación con AG₃, conocido por promover el crecimiento de embriones inmaduros, permitió la supervivencia de un mayor porcentaje de embriones inmaduros de *C. arabica* (83 %), comparable al porcentaje obtenido con los embriones maduros (Abdelnour-Esquivel *et al.* 1992b).

Para la experimentación con embriones somáticos se utilizaron dos genotipos: *C. arabica* cv ‘Catimor’ y *C. canephora* cv ‘Robusta’. Los cultivos embriogénicos



se iniciaron colocando secciones de hoja de 1.5 cm² en el medio de inducción. El protocolo de crioconservación consistió en el cultivo de los embriones en concentraciones crecientes de sacarosa (hasta 0.75 M), seguido de infiltración en 5 % DMSO y congelamiento lento, 0.5 °C/min hasta -40°C, antes del almacenamiento en NL. La tasa promedio de recuperación de Robusta fue del 61 %; sin embargo, para Catimor fue muy baja, alcanzando en el mejor de los casos el 9 %. Los resultados obtenidos con *C. arabica* pudieron deberse a lo inadecuado de los medios, tanto de embriogénesis como de recuperación, ya que durante el proceso de embriogénesis la aparición de embriones anormales fue muy frecuente; además, el porcentaje de germinación es muy bajo en este cultivar. Estos resultados ponen en evidencia la necesidad de contar con protocolos de cultivo *in vitro* eficientes antes de iniciar la investigación en crioconservación (Abdelnour-Esquivel *et al.* 1993).

Posteriormente, el CATIE, con apoyo del IRD (Francia) y el IPGRI (actualmente Bioversity Internacional), trabajó en el establecimiento de un protocolo para la deshidratación y congelación de semillas de *C. arabica*, con lo cual se estableció el primer criobanco mundial para semillas de café (Dussert *et al.* 1999, 2002, 2007; Vásquez *et al.* 2001, 2005). El procedimiento consistió en la colecta y secado de las semillas a temperatura ambiente, luego de lo cual fueron llevadas en bolsas de papel al laboratorio. Posteriormente fueron deshidratadas con una solución saturada de NH₄Cl durante tres semanas, bajo un 78 % de humedad relativa (HR). El contenido de humedad de las semillas (expresado en g H₂O/g dw) se estimó utilizando tres réplicas de 10 semillas y su peso tomado después de dos días de desecación en un horno a 105 °C. Después de la desecación las semillas fueron colocadas y selladas herméticamente en un criotubo de polipropileno de 5 ml (15 semillas por criotubo). Posteriormente fueron inmersas directamente en NL. Las semillas criopreservadas fueron almacenadas a -196 °C y un año después se efectuaron algunas pruebas de su viabilidad, con porcentajes que alcanzaron hasta un 90 % en el mejor de los casos. Actualmente el criobanco posee 95 accesiones y la meta es llegar a tener al menos 150 accesiones, no solo de la *core collection*, sino de otros materiales de interés por su procedencia y la cantidad de plantas de la colección del CATIE.

Chayote (*Sechium edule*)

El chayote (*Sechium edule*) es una cucurbitácea con semillas clasificadas como recalcitrantes para el almacenamiento. Es vivíparo y la semilla no presenta periodo de latencia. El embrión germina en el fruto aún adherido a la planta y se daña si se extrae, debido a la ausencia parcial o total de testa lignificada. El método de conservación que se ha utilizado tradicionalmente es la colección de campo, aun cuando resulta costosa y riesgosa como lo confirma la pérdida de varias colecciones que han sido establecidas en Costa Rica. En 1998 se inició un proyecto de investigación en chayote (*Sechium edule*) bajo la responsabilidad del ITCR y con la colaboración del IPGRI. Su objetivo fue desarrollar una metodología que asegurara la disponibilidad de los materiales a largo plazo para los programas de mejoramiento genético.



En el estudio se desarrollaron protocolos de crioconservación para embriones cigóticos y ápices. Los embriones de dos cultivares, Cocoro negro (CN) y Claudio (CI), resistieron la crioconservación, mostrando porcentajes de supervivencia de 10 % y 30 %, después de la deshidratación a 23 % y 19 % de humedad (con base en el peso fresco), respectivamente. Se logró crioconservar con éxito ápices de vitropiantas de los cultivares CI, 13 y JM, para lo cual se utilizó la técnica de la vitrificación. Las condiciones óptimas incluyeron el cultivo de las plantas madre durante 22 días en medio de cultivo enriquecido con 0.3 M de sacarosa, el cultivo de los ápices disectados en el mismo medio por un día, la incubación de estos ápices por 20 minutos en 2 M de glicerol + 0.4 M de sacarosa y el tratamiento con una serie de soluciones diluidas de PVS2 (60 % de PVS2 seguida por 80 % de PVS2 durante 15 minutos (cultivar CB) o 30 minutos (cultivares CN y CI) en cada concentración, congelamiento y descongelamiento rápidos, lavado de los ápices con una solución de 1.2 M de sacarosa y, por último, el cultivo en medio de recuperación disminuyendo la concentración de sacarosa hasta que se alcanzó la concentración estándar de 0.1 M. Los mayores porcentajes de supervivencia variaron entre el 17 % y el 38 %, dependiendo del cultivar (Abdelnour-Esquivel y Engelmann 2002).

Cacao (*Theobroma cacao*)

La colección de cacao del CATIE, establecida en 1947, es la segunda colección internacional más grande en el dominio público en el mundo (Ebert *et al.* 2007), con un total de 1070 accesiones (Phillips-Mora *et al.* 2006). La recalcitrancia de las semillas y las limitaciones en la propagación vegetativa de esta especie hacen necesaria la búsqueda de estrategias de conservación complementarias a la conservación en campo.

La recuperación de embriones cigóticos y somáticos de cacao después del congelamiento en NL fue posible, cuando embriones cigóticos inmaduros fueron incubados en concentraciones crecientes de sacarosa (hasta 0.6 M) y congelados rápidamente en NL; el 70 % de los embriones sobrevivió como callo. Cuando estos embriones fueron cultivados por tres días en un medio de cultivo enriquecido con 1 g/l de caseína hidrolizada y 10 % de agua de coco e incubados durante 12 horas en un medio con 1 M de sacarosa antes del congelamiento (0.5 °C/min hasta -40 °C + NL), el 14 % de los embriones se recuperaron mediante embriogénesis somática. Por otra parte, cuando los embriones somáticos fueron incubados durante 24 horas en un medio de cultivo con 0.75 M de sacarosa y congelados tanto lentamente (0.5 °C/min hasta -40 °C + NL) como rápidamente (directo en el NL), la supervivencia alcanzó el 20 % (Cisne 1992). Este porcentaje de supervivencia muestra claramente la necesidad de continuar con la investigación y evaluar otras velocidades de enfriamiento y nuevas metodologías de crioconservación, que pueden resultar en una mayor supervivencia (Engelmann 2007).



Especies forestales arbóreas

La criopreservación de semillas de especies forestales tropicales es poco documentada (Wesley-Smith *et al.* 2001, Marzalina y Normah 2002, Salomão 2002). Por lo tanto, consideramos de importancia trabajar en el desarrollo de estrategias sencillas para la conservación a largo plazo de estas especies, en beneficio tanto de los bancos de conservación y distribución comercial de semillas como de los programas de mejoramiento genético forestal. Aunque se considera que muchas de estas especies tienen semillas ortodoxas porque soportan el almacenamiento a bajas temperaturas (5 °C) durante algunos meses y posiblemente varios años, la experiencia nos ha indicado que la viabilidad y la calidad de estas semillas disminuye con el tiempo de almacenamiento, lo que se evidencia con la reducción del porcentaje de germinación y el aumento en la contaminación de las semillas por hongos y bacterias. Estudios comparativos del tiempo de almacenamiento de las semillas en bancos de conservación (5 °C y -17 °C) y su viabilidad con respecto a almacenamiento en NL son necesarios para asegurar la conservación y el almacenamiento efectivos de estos recursos genéticos. Se presentan resultados sobre la criopreservación de semillas de varias especies utilizando las técnicas de desecación-congelamiento rápido y congelación lenta (Abdelnour-Esquivel *et al.* 2007, Aguilar y Abdelnour-Esquivel 2010).

La congelación directa en NL de semillas de cedro, cenízaro (*Samanea saman*), leucaena (*Leucaena leucocephala*) y madero negro (*Gliricidia sepium*) fue evaluada después de la recuperación *in vitro* o en invernadero. La mejor supervivencia se observó en las semillas de cedro inoculadas *in vitro* (86 %) después del congelamiento y en semillas de madero negro recuperadas en invernadero (95 %). Solo el 24 % de las semillas de *Leucaena* inoculadas *in vitro* sobrevivió a la congelación y ninguna supervivencia se dio en invernadero. La especie menos tolerante a la congelación fue el cenízaro, con solo un 3 % de supervivencia después del congelamiento y la recuperación en invernadero.

También fue evaluada la viabilidad de las semillas de diferentes especies de caoba y cedro sometidas a diversos procedimientos de criopreservación. Semillas con testa y sin testa de *S. macrophylla* con diferentes contenidos de humedad (4 % y 6.2 %) fueron sometidas a inmersión directa en NL. La supervivencia fue superior en las semillas sin testa y con 6.2 % de contenido de humedad: el 80 % de ellas germinaron y el 70 % se desarrolló en plántula. En la mayoría de los casos, los bajos porcentajes de germinación de semillas con testa (7-17 %) se relacionaron principalmente con pérdidas por contaminación, lo cual significa que el proceso de escarificación permite, además de reducir la barrera de germinación, seleccionar la semilla de mejor calidad. Semillas de *S. humilis* (6.1 % de contenido de humedad) y *S. mahoganii* (5.3 % de contenido de humedad) sin testa también presentaron altos porcentajes de germinación (67 % y 73 %, respectivamente) y de plantas desarrolladas (67 % y 60 %, respectivamente) después de la inmersión directa en NL. Comparativamente las semillas de cedro (*C. odorata*), con un contenido de humedad del 5.1 %, mostraron mayor vulnerabilidad a la congelación directa en NL: germinaron el 27 % y solo el 17 % se desarrolló en plántula. La criopreservación



de ejes embrionicos de caoba (*S. macrophylla*) mediante la técnica de encapsulación-deshidratación muestra los mejores resultados de supervivencia en un precultivo de 24 horas en un medio enriquecido con 0.75 M de sacarosa y una deshidratación al flujo laminar de dos horas y media (83 % de germinación, 40 % de desarrollo de plántula) y cuatro horas (90 % de germinación y 76 % de desarrollo de plántula). En la mayoría de los tratamientos solo hubo germinación de los ejes embrionicos después de la congelación (Aguilar y Abdelnour 2010). Por otra parte, la germinación de semillas de cedro después de la desecación a un contenido de humedad del 8 % fue de alrededor del 96 % y el porcentaje de germinación presentó valores similares después de 6 meses de almacenamiento en nitrógeno líquido (García y Abdelnour, sin publicar).

Al evaluar la supervivencia de embriones cigóticos de pilón (*Hieronyma alchorneoides*) deshidratados y congelados, se observó que los embriones no deshidratados y con 15 % de contenido de humedad no sobrevivieron al congelamiento. Se determinó que a partir de los 15 minutos y hasta los 60 minutos de deshidratación (3-4 % de contenido de humedad aproximadamente), la supervivencia de los embriones congelados fue alrededor de 2.7 % y 5.3 % de germinación. Sin embargo, una planta completa fue desarrollada en los embriones deshidratados durante 60 minutos (Abdelnour-Esquivel *et al.* 2007, Aguilar y Abdelnour-Esquivel 2010).

Las semillas de teca (*Tectona grandis*) también fueron criopreservadas por inmersión directa en NL y la recuperación fue realizada en medios de cultivo enriquecidos con reguladores del crecimiento (benciladenina [BA] y ácido giberélico [GA₃]). Al utilizar BA en el medio de recuperación, el porcentaje de supervivencia varió del 28 % a 0 mg/l de BA a 38 % cuando se utilizó 1.5 mg/l. No obstante, se observó porcentajes de recuperación mayores (45-55 %), cuando se utilizó GA₃ en el medio de cultivo indistintamente de la concentración utilizada. Esta especie, aunque es introducida, tiene gran importancia industrial en Costa Rica.

Dentro de este grupo de leñosas se menciona la criopreservación de suspensiones celulares y ápices de ña de gato (*Uncaria tomentosa*). Las suspensiones regeneraron callo después del congelamiento rápido en nitrógeno líquido, cuando fueron precultivadas por 24 y 48 horas en un medio de cultivo con 0.15 M sacarosa y pretratadas durante 1 hora en este medio con DMSO al 5 %. Con los ápices los mejores resultados (porcentaje de recuperación mayor al 50 %) se obtuvieron al combinar los siguientes factores: 10 o 20 min de LS, 30 min en PVS2 y con un precultivo en un medio con 0.5 M de sacarosa, antes del congelamiento en nitrógeno líquido (sin publicar).

Orquídeas nativas

La familia de las orquídeas es la más grande y diversa de las angiospermas. De acuerdo con estudios conservadores, Costa Rica posee 1416 especies agrupadas en 179 géneros, que van desde la gran vainilla hasta la diminuta orquídea del musgo; sin embargo, muchas de estas orquídeas nativas están en peligro de desaparecer, debido a la deforestación, la



urbanización y la sobre colecta para fines comerciales (Mora-Retana y García 1992). En 1995, el ITCR inició un proyecto de investigación que utilizó técnicas del cultivo *in vitro*, con el fin de contribuir al rescate, multiplicación masiva y conservación de esos materiales. Se experimentó en crioconservación de yemas de *Lycaste bradeorum* utilizando la solución vitrificadora PVS2 como crioprotector y el congelamiento rápido en NL, técnica utilizada en varias especies agrícolas. La incubación de las yemas en PVS2 por 30, 45 y 60 minutos redujo la supervivencia al 67 %, 67 % y 20 %, respectivamente; sin embargo, fue posible obtener crecimiento organizado después del congelamiento en NL (14 %, 33 % y 3 %, respectivamente). Deberán dedicarse mayores esfuerzos a la conservación de las orquídeas nativas, pero estos resultados iniciales evidencian el potencial de la crioconservación para su almacenamiento a largo plazo (Abdelnour y Muñoz 1999). Actualmente la experimentación en crioconservación de orquídeas se ha enfocado en semillas y protocormos de varias especies nativas (Alvarado y Abdelnour, sin publicar).

Microorganismos

Pausteria penetrans

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

Mycosphaerella fijiensis (sigatoka negra)

La crioconservación por inmersión directa en NL (-196 °C) se estableció para la conservación del hongo patógeno *Mycosphaerella fijiensis*, causante de la sigatoka negra en banano y plátano, con fines de transferencia y fuente de material genético de buena calidad para trabajos de investigación fitopatológica. En esta investigación se incluyeron 10 cepas del hongo procedentes de la zona Atlántica de Costa Rica, las que fueron colocadas en un medio crioprotector constituido por una suspensión de agua y aceite mineral al 0.5 %. Posteriormente muestras de 1 ml fueron colocadas en criotubos y congeladas por inmersión directa en NL. La descongelación se realizó en un baño de agua a 40 °C. El grado de recuperación de las cepas después de la congelación fue entre



el 20 % y el 100 %, medido como la superficie del medio de cultivo de cajas de Petri cubierta por las colonias y el micelio del hongo. La producción de conidios fue superior a 150 000 conidios por ml en el 90 % de las cepas. La patogenicidad fue mantenida en todas las cepas (Jiménez 2001).

***Rosellinia* spp.**

Muchas colecciones pequeñas de hongos (temporales) son mantenidas por fitopatólogos durante su investigación y reciben un manejo que resulta inadecuado para asegurar su estabilidad. El mantenimiento de colecciones de hongos en condiciones puras y viables, minimizando los cambios fisiológicos y morfológicos es, sin embargo, una necesidad. Ten Hoopen *et al.* (2004) realizaron un estudio con el objetivo de encontrar técnicas de preservación para tres aislados de *Rosellinia*. Varios sustratos inertes y nutritivos, sólidos y líquidos, fueron usados para evaluar su estabilidad para la conservación de esos aislados. Diferentes crioprotectantes y tasas de enfriamiento y descongelación fueron evaluados para optimizar los procedimientos de almacenamiento en NL. Tasas de supervivencia y/o crecimiento también fueron evaluadas en el tiempo.

Rosellinia bunodes fue la especie más difícil de almacenar, con una supervivencia que no superó los seis a nueve meses usando métodos de almacenamiento tradicional en aceite mineral y gel de sílice. El almacenamiento de *Rosellinia necatrix* y *Rosellinia pepo* fue exitoso por periodos de hasta 16 meses en diferentes sustratos y para *R. necatrix* hasta por dos años en gel de sílice. El almacenamiento en NL no dio problemas para *R. necatrix* y *R. pepo*, con un 100 % de supervivencia en todos los casos, aunque las tasas de crecimiento radial después de la recuperación fueron afectadas por las sustancias crioprotectoras y la descongelación. Las tasas de enfriamiento no afectaron el crecimiento radial en ninguno de los aislados. Los resultados mostraron que el desarrollo de un procedimiento generalizado para el almacenamiento de *Rosellinia* no fue posible y que deben desarrollarse protocolos exitosos de almacenamiento para aislados individuales (Ten Hoopen *et al.* 2004).

Conclusiones

La crioconservación, como método para el establecimiento de bancos de germoplasma de especies problemáticas para el almacenamiento, tiene un gran potencial, especialmente para países en desarrollo como Costa Rica, cuya diversidad de plantas es una de sus mayores riquezas. El uso de técnicas criogénicas para la conservación de material vegetal ha avanzado en ese país, tal como lo evidencian los resultados obtenidos con una variedad de especies y materiales (embriones cigóticos y somáticos, callos, suspensiones celulares embriogénicas y ápices). Sin embargo, las investigaciones se han realizado en el marco de proyectos cortos con reducido apoyo financiero, lo que no ha permitido optimizar algunas de las metodologías básicas establecidas durante el periodo de ejecución de los proyectos.



Aunque se han alcanzado logros significativos, el avance del uso de la crioconservación como una técnica rutinaria en laboratorios y bancos de conservación de Costa Rica ha sido lento. Entre las mayores limitaciones se pueden mencionar la falta de una cantidad significativa de personal entrenado en las técnicas específicas y la ausencia de apoyo sostenido por parte de las instituciones gubernamentales nacionales e internacionales responsables de la conservación de los recursos fitogenéticos. En muchos casos, la carencia de protocolos eficientes para el cultivo *in vitro* de una especie de interés ha retrasado o limitado el inicio de una investigación sobre crioconservación de esa especie, por lo que futuros proyectos de investigación deberán considerar ese factor.

Referencias

- Abdelnour-Esquivel, A. 1996. Papel de la crioconservación en la fitoprotección. *In X Congreso Nacional Agronómico y de Recursos Naturales* (1996, San José, CR). Bertsh, F; Badilla, W; García, J. Memorias. Vol. 1. San José, CR. p. 89-91.
- _____; Engelmann, F. 2002. Cryopreservation of chayote (*Sechium edule* JACQ.SW.) zygotic embryos and shoot-tips from *in vitro* plantlets. *CryoLetters* 23:299-308.
- _____; Engelmann, F; Hibjan, C; Villalobos, V; Gray, D; Dufour, M. 1993. Cryopreservation of zygotic and somatic embryos of coffee. *In 15th International Scientific Colloquium on Coffea* (1993, Montpellier, FR).
- _____; Escalant, JV. 1994. Crioconservación de embriones somáticos de Musa Gran Enano (AAA). *In XI Reunión ACORBAT* (1994, San José, CR). Resúmenes. s.p.
- _____; Mora, A; Villalobos, V. 1992a. Cryopreservation of *Musa acuminata* (AA) and *M. balbisiana* (BB). *CryoLetters* 13:159-164.
- _____; Muñoz, A. 1999. Rescate, establecimiento y conservación de orquídeas en vías de extinción. *Tecnología en Marcha* 13:24-30.
- _____; Rojas, G; Alfaro, U. 2007. Estudios preliminares para la crioconservación de especies forestales arbóreas. *Tecnología en Marcha* 20(1): 98-103.
- _____; Villalobos, V; Engelmann, F. 1992b. Cryopreservation of zygotic embryos of *Coffea* spp. *CryoLetters* 13:197-302.
- Aguilar, ME; Abdelnour-Esquivel, A. 2010. Desarrollo de modelos para la crioconservación de semillas y material clonal de especies forestales de Costa Rica en peligro de extinción y seleccionadas en los programas de mejoramiento genético. *Boletín de Ciencia y Tecnología* n.º 99. San José, CR, CONICIT. Disponible en <http://163.178.205.6/boletin/boletin99/PalabrasMariaElenaAguilar.html>



- _____; Engelmann, F; Michaux-Ferriere, N. 1993. Cryopreservation of cells suspensions of *Citrus deliciosa* Tan. and histological study. *CryoLetters* 14:217-228.
- _____; Ortiz, JL; Sandoval, JA. 2008. Embriogénesis somática en plátanos y bananos: perspectivas y limitaciones. 1 ed. Turrialba, CR, CATIE. Serie técnica. Boletín técnico/CATIE n.º 27. 50 p.
- _____; Vasquez, N; Yah, E; Engelmann, F; Cote, F. 2000. Cryopreservation at CATIE: an additional tool for the conservation of tropical agricultural crops and forest species. *In* Engelmann, F; Takahi, H. Eds. *Cryopreservation of tropical plant germplasm: current research progress and application*. Tsukuba, JP, JIRCAS; Roma, IT, IPGRI. p. 449-452.
- Anthony, F; Astorga, C; Berthaud, J. 1999. Los recursos genéticos: las bases de una solución genética a los problemas de la caficultura latinoamericana. *In* Bertrand, B; Rapidel, B. eds. *Desafíos de la caficultura en Centroamérica*. San José, CR, CIRAD, IRD, CCCR, IICA, PROMECAFE. p. 369-406.
- _____; Dussert, S. 2007. Construction of coffee core collections. *In* Engelmann, F; Dulloo, ME; Astorga, C; Dussert, S; Anthony, F. eds. *Complementary strategies for ex situ conservation of coffee (Coffea arabica L.) genetic resources. A case study in CATIE, Costa Rica*. *Tropical Reviews in Agricultural Biodiversity*. Roma, IT, Bioversity International. p. 45-48.
- Bertrand, B; Rapidel, B. 1999. *Desafíos de la caficultura en Centroamérica*. San José, CR, CIRAD, IRD, CCCR, IICA, PROMECAFE. 426 p.
- Cisne, JD. 1992. Crioconservación de embriones cigóticos y somáticos de cacao (*Theobroma cacao L.*). Tesis Magister Scientiae. CATIE, Turrialba, CR. 85 p.
- Cote, F; Domergue, R; Mommarson, S; Schwendiman, J; Teisson, C; Escalant, JV. 1996. Embryogenic cell suspensions from the male flower of *Musa AAA* cv. Grand nain. *Physiologia Plantarum* 97:285-290.
- Dávila, MI. 1991. Crioconservación de callos de *Musa Gran Enano (AAA)* y *Musa acuminata (AA)*. Tesis Magister Scientiae. CATIE, Turrialba, CR. 69 p.
- Dussert, S; Chabrillange, N; Engelmann, F; Anthony, F; Vásquez, N; Hamon, S. 2002. Cryopreservation of *Coffea* (coffee). *In* Towill, LE; Bajaj, YPS. eds. *Biotechnology in agriculture and forestry Vol. 50. Cryopreservation of plant germplasm II*. Berlín, Heidelberg, DE, Springer-Verlag. p. 220-233.
- _____; Chabrillange, N; Vásquez, N; Engelmann, F; Anthony, F; Guyot, A. 1999. Beneficial effect of post-thawing osmoconditioning on the recovery of cryopreserved coffee (*Coffea arabica l.*) seeds. *CryoLetters* 21:47-52.

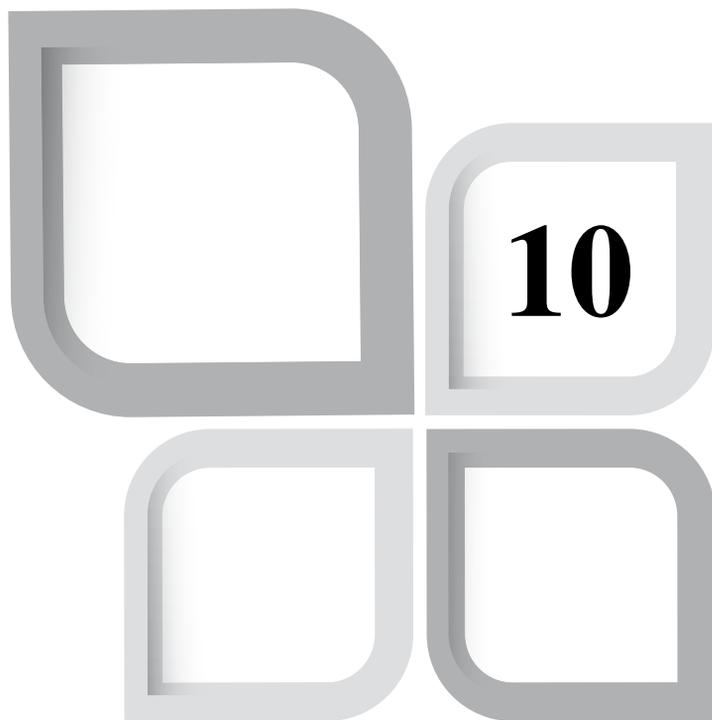


- _____; Vásquez, N; Salazar, K; Anthony, F; Engelmann, F. 2007. Cryopreservation of coffee genetic resources. In Engelmann, F; Dulloo, ME; Astorga, C; Dussert, S ; Anthony, F. eds. Complementary strategies for ex situ conservation of coffee (*Coffea arabica* L.) genetic resources. A case study in CATIE, Costa Rica. Tropical Reviews in Agricultural Biodiversity. Roma, IT, Bioversity International. p. 49-58.
- Ebert, A; Astorga, C; Ebert, I; Mora, A; Umaña, C. 2007. Securing our future: CATIE's germplasm collections. 1 ed. Turrialba, CR, CATIE. 204 p. Serie técnica. Boletín técnico/CATIE n.º 26.
- Engelmann, F. 2004. Plant cryopreservation: progress and prospects. In *Vitro Cell & Developmental Biology-Plant* 40:427-433.
- _____; Aguilar, ME; Dambier, D; Cabasson, C; Michaux-Ferriere, N; Ollitrault, P. 1994. Advantages of cryopreservation of cell suspensions and embryogenic calli for Citrus breeding programmes. *Fruits* 49(1):23-30.
- _____; Dumet, N; Chabrilange, A; Abdelnour-Esquelvel, A; Assy-Bah, B; Dereuddre, J; Duval, Y. 1995. Cryopreservation of zygotic and somatic embryos from recalcitrant and intermediate-seed species. Roma, IT, IPGRI, FAO. *Plant Genetic Resources Newsletters* 103:27-31.
- Escalant, JV; Teisson, C; Côte, F. 1994. Amplified somatic embryogenesis from male flower of Triploid Banana and Plantain Cultivars (*Musa* spp). *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 30:181-186.
- Grapin, A; Ortiz, JL; Domergue, R; Babeau, J; Monmarson, J; Escalant, JV; Teisson, C; Côte, F. 1998. Establishment of embryogenic callus and initiation and regeneration of embryogenic cell suspensions from female and male immature flowers of *Musa*. *INFOMUSA* 7(1):13-15.
- _____; Ortiz, JL; Lescot, T; Ferriere, N; Cote, F. 2000 Recovery and regeneration of embryogenic cultures from female flowers of false horn plantain. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 61:237-244.
- Jiménez, J. 2001 Establecimiento de una metodología para la crioconservación de cepas del hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet en nitrógeno líquido (-196°C). Tesis Magister Scientiae. Turrialba, CR, CATIE. 54 p.
- Marzalina, M; Normah, MN. 2002 Cryopreservation techniques for the long-term storage of mahogany (*Swietenia macrophylla*) seeds. *Journal of Tropical Forest Science* 14(4):525-535.



- Mora-Retana, D; García, J. 1992. Lista actualizada de las orquídeas de Costa Rica (Orchidaceae). *Bremesia* 37:79-124.
- Panis, B; Withers, LA; De Langhe, E. 1990. Cryopreservation of *Musa* suspension cultures and subsequent regeneration of plants. *CryoLetters* 11:337-350.
- Phillips-Mora, W; Mora, A; Johnson, E; Astorga, C. 2006. Recent efforts to improve the genetic and physical conditions of the international cacao collection at CATIE. In International Cocoa Research Conference (2006, San José, CR).
- Rojas, T. 1993. *Pausteria penetrans*: adherencia y parasitismo en *Meloidogine incognita* y *M. arabicida*. Tesis Magister Scientiae. CATIE, Turrialba, CR. 110 p.
- Salomão, AN. 2002. Tropical seed species responses to liquid nitrogen exposure. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 14(2):133-138.
- Ten Hoopen, GM; Ortiz, JL; Aguilar, ME; Krauss, U. 2004. Preservation methodology for *Rosellinia* species. *Mycological Research* 108(3):274-282.
- Towill, EL. 1988. Survival of shoot tips from mint species after short-term exposures to cryogenic conditions. *HortScience* 23:839-841.
- Vásquez, N; Salazar, K; Anthony, F; Chabrilange, N; Engelmann, F; Dussert, S. 2005. Variability in response of seeds to liquid nitrogen exposure in wild coffee (*Coffea arabica* L.). *Seed Science and Technology* 33(2):293-301.
- _____; Salazar, K; Dussert, S; Anthony, F; Aguilar, ME; Engelmann, F. 2001. Método alternativo para el almacenamiento y conservación de *Coffea arabica* a largo plazo. In XVII Seminario Panamericano de Semillas. Rueda de Negocios y Foro Mundial sobre Biotecnología y Marketing de Semillas (2001, Punta del Este, UY). Resúmenes de trabajos presentados. p. 41.
- Villalobos, VM; Engelmann, F. 1995. *Ex situ* conservation of plant germplasm using biotechnology. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 11:375-382.
- Wesley-Smith, J; Pammenter, NW; Berjak, P; Walters, C. 2001 The effects of two drying rates on the desiccation tolerance of embryonic axes of recalcitrant jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lamk.) seeds. *Annals of Botany* 88(4):653-664.
- Yah, EV. 1998. Crioconservación de suspensiones celulares embriogénicas de *Musa* spp. iniciadas a partir de flores inmaduras. Tesis Magister Scientiae. Turrialba, CR, CATIE. 79 p.





Desarrollo de la crioconservación de las plantas en Cuba

Marcos Edel Martínez Montero¹,
María Teresa González–Arnao², María de los Ángeles
Torres Mederos³, Leyanis García⁴, Zoila Fundora⁵

-
1. Centro de Bioplasmas, Universidad "Máximo Gómez Báez" de Ciego de Ávila, Ciego de Ávila, Cuba, marcosem@bioplasmas.cu, cubaplantas@gmail.com.
 2. Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC), La Habana. Dirección actual: Universidad Veracruzana, Facultad de Ciencias Químicas, Orizaba, Veracruz, México, mtgarnao1@hotmail.com, teregonzalez@uv.mx.
 3. Instituto Nacional de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical (INIFAT), Cuba, matorres@inifat.co.cu.
 4. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Cuba, leyanis@ibp.co.cu.
 5. Instituto Nacional de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical (INIFAT), Cuba, zfundora@infomed.sld.cu.

Introducción

El acceso a tecnologías de avanzada ha sido considerado un aspecto prioritario para fortalecer el desarrollo de la ciencia en Cuba. En este sentido, las investigaciones dirigidas a la conservación de los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura han recibido especial atención y se han beneficiado de apoyos mediante proyectos internacionales y nacionales de cooperación técnica, los cuales han fomentado la formación de recursos humanos y la creación de infraestructuras tecnológicas en diferentes instituciones del país (Fundora *et al.* 2007).

El área de actividades dedicadas a la conservación *ex situ* se ha trabajado por más de 10 años en diversos bancos de germoplasma asociados al Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos. Hasta el presente, la forma de almacenamiento más utilizada sigue siendo el resguardo en colecciones de campo y sólo una pequeña cantidad de muestras es mantenida a largo plazo en bancos de semillas *in vitro* a corto mediano plazo mediante la reducción de crecimiento.

Por esta razón, uno de los objetivos estratégicos actuales se refiere al establecimiento y uso de las técnicas de criopreservación como alternativa adicional a las colecciones de plantas enteras, ya que se evitaría que el material se encuentre sometido a numerosos riesgos de carácter biótico y abiótico agudizados en los últimos años por el cambio climático del planeta. Además, se está trabajando en el ajuste de protocolos criogénicos sencillos que puedan ser aplicados satisfactoriamente a diferentes especies y que estén al alcance de la mayoría de los laboratorios del país que disponen de bancos de germoplasma (Fundora *et al.* 2007).

En Cuba, los estudios sobre criopreservación en plantas se iniciaron a finales de los años ochenta por un pequeño grupo de investigadores pertenecientes a entonces Laboratorio de Criobiología y Liofilización del Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC) de La Habana. El Dr. Tomas Moreira, jefe de dicho laboratorio, fue la persona que introdujo el uso de las ultra-bajas temperaturas en el país. Sin embargo, el verdadero despegue en Cuba de esta especialidad en el campo vegetal se logró a partir de 1991, con la aprobación por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) de un proyecto sobre criopreservación de germoplasma de caña de azúcar (TCP/CUB/0056). La ejecución exitosa de este proyecto pionero en el CNIC generó la aprobación de otros apoyos internacionales mediante el Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI), actualmente Bioversity Internacional, que dieron continuidad a nuevos trabajos de criopreservación con germoplasma de banano, cítricos y piña. También impulsó la colaboración científica con la Universidad de Nottingham en el Reino Unido y fundamentalmente con el Instituto Francés de Investigación Científica para el Desarrollo en Cooperación (ORSTOM), ubicado en Montpellier, Francia, hoy en día Instituto de Investigación para el Desarrollo (IRD), y con el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) de España.



A partir de 1994, otras dos instituciones cubanas iniciaron estudios criogénicos en plantas con la colaboración del CNIC: el Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical “Alejandro de Humboldt” (INIFAT), que recibió un apoyo importante mediante el proyecto FAO TPC/CUB/2359 “Conservación *in vitro* de germoplasma de hortalizas, raíces y tubérculos”; y el Centro de Bioplantitas de la Universidad de Ciego de Ávila, que obtuvo financiamientos del IPGRI y la *International Foundation for Science* (IFS) de Suecia. Más tarde, en 2003, el Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP), adscrito a la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, también inició investigaciones en esa temática, para lo cual contó con el apoyo de *University Development Cooperation* (VLIR) de Bélgica.

En materia de asesoría internacional, los investigadores cubanos se han beneficiado a lo largo de todos estos años de la certera orientación científica de valiosos especialistas, como el Dr. Bart Panis (Bélgica), la Dra. Erica Benson (Gran Bretaña), el Dr. Joachim Keller (Alemania) y especialmente del Dr. Florent Engelmann (Francia). Adicionalmente, en La Habana se han realizado diversos cursos y entrenamientos tanto para especialistas cubanos como de otros países de América Latina y el Caribe (ALC), destacándose el realizado en el CNIC con el auspicio del IPGRI en 1998 durante el evento de la Red de Biotecnología Vegetal de la FAO, “REDBIO 98”, en el que participaron representantes de nueve países latinoamericanos.

De manera general, puede señalarse que en Cuba se han definido metodologías para crioconservar varias formas cultivables *in vitro* de especies de importancia económica, alimentaria y biotecnológica como caña de azúcar, plátanos y bananos, ajo y papaya. Además, cada metodología ha tenido sus peculiaridades en dependencia del centro de investigación donde se ha desarrollado. A continuación se presentan brevemente los avances de los trabajos realizados.

Caña de azúcar

La caña de azúcar es una planta que se propaga por la vía vegetativa y que está considerada entre los cultivos de mayor importancia económica en Cuba; por esta razón, ha recibido desde siempre especial atención. La vía biotecnológica más segura de conservar a largo plazo los recursos genéticos de esta especie y las diferentes formas de germoplasma *in vitro* es el desarrollo de protocolos de crioconservación.

Ápices

La crioconservación exitosa de ápices de caña de azúcar se logró por primera vez utilizando el procedimiento de encapsulación-deshidratación establecido por González-Arno *et al.* (1993). Ápices aislados de vitroplantas 15 días posteriores al último subcultivo se precultivaron por 24 horas en un medio semisólido Murashige-Skoog (MS) (Murashige y Skoog 1962) modificado y suplementado con 0.3 M de sacarosa. Posteriormente los tejidos se encapsularon en alginato de calcio al 3 %, se precultivaron en medio líquido con 0.75 M de sacarosa durante 24 horas, se desecaron hasta alcanzar alrededor de



22 % de humedad en las cápsulas (expresado en base fresca) y se congelaron por la inmersión directa en nitrógeno líquido (González-Arnao *et al.* 1993, 1996). Después de la crioconservación, los tejidos encapsulados se transfirieron de los crioviales a placas de Petri para exponerlos al aire corriente en la campana de flujo laminar por dos a tres minutos, para proceder a elevar la temperatura hasta alcanzar la temperatura ambiental. Las muestras descongeladas se recultivaron durante la primera semana a la oscuridad sobre el medio de propagación con 2 g L⁻¹ de carbón activado. No fue necesario extraer los ápices de las cápsulas para garantizar su desarrollo ulterior.

El protocolo de encapsulación-deshidratación establecido se aplicó a 15 variedades comerciales de caña de azúcar con diferentes complejidades genéticas y pertenecientes a dos colecciones *in vitro*, una del Centro de Cooperación Internacional en Investigación Agronómica para el Desarrollo (CIRAD), ubicado en Montpellier, Francia, y la otra del CNIC, La Habana. Los niveles de supervivencia y regeneración de nuevas plantas oscilaron entre 24 % y 86 % en dependencia del genotipo (González-Arnao 1996, González-Arnao y Engelmann 2006).

La evaluación de seis características morfoagronómicas en plantas regeneradas de ápices crioconservados de dos variedades comerciales de caña de azúcar (González-Arnao *et al.* 1999) y los estudios con diferentes sistemas isoenzimáticos (González-Arnao 1996) demostraron que el protocolo establecido no indujo variabilidad genética después del almacenamiento por un año en nitrógeno líquido. Adicionalmente se comprobó que la conservación a temperaturas superiores a -196 °C provocó la pérdida progresiva de la supervivencia después de 10 días de almacenados, a diferencia de lo observado con el material mantenido en nitrógeno líquido, que no experimentó cambios significativos en su viabilidad (González-Arnao y Engelmann 2006).

Callos

Las investigaciones sobre la crioconservación de callos con estructuras embriogénicas y de los embriones somáticos están asociadas al programa de regeneración de plantas mediante la estrategia de semilla artificial, lo que constituye una alternativa potencial para el incremento de la eficiencia y proliferación de la especie. Además, la utilización de la crioconservación para estas formas cultivables *in vitro* permite prevenir la pérdida en el tiempo de la capacidad embriogénica y regenerativa de los callos, así como disponer de embriones somáticos almacenados en un estado de quiescencia, con tolerancia a la desecación y en condiciones seguras y sin grandes costos por el manejo o mantenimiento durante un largo período de tiempo (Martínez-Montero *et al.* 2006).

Cuando se iniciaron los estudios para crioconservar callos de caña de azúcar con estructuras embriogénicas, ya existían antecedentes exitosos de varios grupos de investigadores como Ulrich *et al.* (1979), Jian *et al.* (1987), Gnanapragasam y Vasil (1992) y Eksomtramage *et al.* (1992). Sin embargo, en todos los casos



los trabajos publicados coincidían en que los callos se habían obtenido a partir de hojas inmaduras de plantas cultivadas *in vitro* y en que se había utilizado la estrategia de deshidratación por congelación extracelular aplicando un régimen de enfriamiento lento en un equipo de congelación programable costoso, por lo que era necesario vencer diferentes retos tecnológicos para poner a punto una metodología de crioconservación sencilla y eficiente.

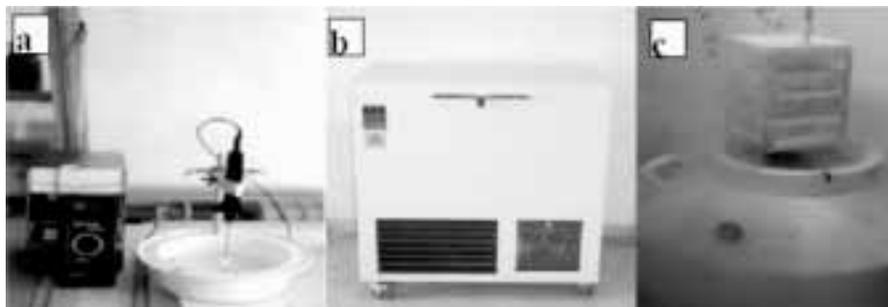
En este sentido se estableció una metodología para crioconservar callos con estructuras embriogénicas obtenidos a partir de inflorescencias inmaduras (Martínez-Montero *et al.* 1998, 2006) aplicando un procedimiento de enfriamiento simple sin utilizar un congelador programable y teniendo como precedente los trabajos de Maddox *et al.* (1983) y Withers (1985), quienes lo utilizaron con éxito para suspensiones celulares de *Nicotiana* y *Musa*, respectivamente.

Los mejores resultados de la metodología desarrollada comprendieron la selección de callos a un tiempo post-subcultivo de 15 días, los cuales se colocaron en crioviales de polipropileno (volumen del criovial: 2.0 mL). Los crioviales con las muestras se pasaron a un baño de hielo para adicionarles 1.0 mL de medio de cultivo con $0.3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarosa previamente pre-enfriado en hielo. La duración total fue de 60 minutos. Seguidamente, se realizó un tratamiento crioprotector con dimetilsulfóxido a los crioviales con las muestras y sacarosa, a las que se le adicionó el dimetilsulfóxido puro ($14 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) hasta que alcanzó la concentración final de 10 % (v/v) en la solución. El dimetilsulfóxido se adicionó progresivamente durante los primeros 30 minutos del tratamiento crioprotector, cuya duración total fue de 60 minutos.

Para el procedimiento de enfriamiento, previamente se realizó un control de la temperatura en el tiempo, para lo cual se utilizó un termómetro digital con termopar acoplado de cobre-constantán y se determinó el punto de subenfriamiento y la temperatura de congelación en equilibrio de diferentes mezclas crioprotectoras de sacarosa contenidas en los crioviales, los cuales se encontraban en un baño de etanol (95 %) preenfriado ($0 \text{ }^{\circ}\text{C}$) y colocados a su vez en un congelador a $-40 \text{ }^{\circ}\text{C}$. La siembra de los primeros cristales de hielo en el medio extracelular se llevó a cabo sumergiendo instantáneamente la base de los crioviales en nitrógeno líquido. Esto se realizó a $-8 \text{ }^{\circ}\text{C}$ antes de que se alcanzara la temperatura de congelación en equilibrio durante el tiempo de inducción (5 s). La pre-congelación se realizó a $-40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante dos horas. El almacenamiento de los crioviales en nitrógeno líquido se extendió por dos horas, seguidas de una descongelación rápida.



Figura 10.1. Aditamentos utilizados para el desarrollo del procedimiento simple de congelación: a) baño de alcohol y termómetro digital con termopar acoplado de cobre-constantán sumergido en un criovial; b) congelador de laboratorio a -40°C ; c) tanque con nitrógeno líquido para la inmersión y almacenamiento de los crioviales.



Fuente: Martínez-Montero *et al.* 2006.

Se evaluaron los porcentajes de supervivencia y regeneración de plantas *in vitro* (plantas regeneradas por cada 500 mg de callos). Una vez acotadas las mejores condiciones, se realizó la validación de la metodología criogénica según el tiempo de almacenamiento de los callos en nitrógeno líquido (hasta 16 meses), según las diferentes procedencias del explante (para callos de la variedad CP52-43 procedentes de inflorescencias inmaduras y procedentes de hojas inmaduras de plantas cultivadas *in vitro*) y según diferentes variedades (los genotipos CP52-43, C91-301 y C1051-73).

La validación de la metodología también se realizó tomando en cuenta otros dos aspectos: la determinación de algunos cambios bioquímicos en las membranas celulares luego de la crioconservación de los callos y una comparación en condiciones de campo de las plantas obtenidas a partir de callos crioconservados y no crioconservados, y de las plantas obtenidas por propagación vegetativa convencional.

La crioconservación de los callos provocó cambios significativos en la pérdida de electrolitos, la peroxidación lipídica y el contenido de proteínas de las membranas celulares, pero estas modificaciones tuvieron un carácter temporal y desaparecieron a los cinco días de la recuperación post-crioconservación (Martínez-Montero *et al.* 2002a). La comparación de las plantas cultivadas en condiciones de campo reveló que existieron diferencias significativas entre los tratamientos durante los primeros seis meses de crecimiento de la cepa planta, las cuales desaparecieron a los 12 meses (Martínez-Montero *et al.* 2002b).

Embriones somáticos

Cuando se iniciaron los estudios para la crioconservación de embriones somáticos en caña de azúcar, no existían antecedentes de su éxito. Esta investigación se desarrolló en el marco del proyecto internacional de la IFS (Suecia) denominado “*The role of sucrose*

and glycerol during the acquisition of tolerance to cryopreservation of sugarcane embryos by encapsulation-vitrification”, cuyos resultados constituyen el primer informe sobre la crioconservación de embriones somáticos de caña de azúcar (Martínez-Montero *et al.* 2008).

En este sentido se compararon tres técnicas de crioconservación basadas en la denominada vitrificación para el establecimiento de un procedimiento de crioconservación para embriones somáticos en caña de azúcar. Los resultados demostraron que los *clusters* con los embriones somáticos son muy sensibles a la deshidratación por la solución vitrificadora, lo que se debe en gran medida a la composición de la solución PVS2, la cual presenta crioprotectores como glicerol, etilenglicol o dimetilsulfóxido. Es decir, no es factible la utilización directa de la solución PVS2 mediante el procedimiento de vitrificación completa y, por tanto, se hace necesario emplear alternativas.

Una alternativa es la utilización del procedimiento de encapsulación-vitrificación, según Matsumoto *et al.* (1995). Estos autores plantearon que es posible disminuir la toxicidad del PVS2 con el empleo de las cápsulas de alginato, y desde el punto de vista práctico, también reducir el número de manipulaciones del material. Los resultados obtenidos corroboraron en parte lo planteado por Matsumoto *et al.* (1995). Se infirió, sin embargo, que la tolerancia a esta solución podría mejorarse optimizando las condiciones para la deshidratación con la solución vitrificadora, lo que elevaría los valores de la viabilidad celular del material crioconservado.

La otra alternativa la constituye un nuevo procedimiento modificado de vitrificación (Leunufna y Keller 2005, Panis *et al.* 2005), el cual se basa en la combinación del procedimiento del microgoteo-congelación y el ampliamente utilizado procedimiento de vitrificación. Este ofrece amplias perspectivas de éxito y aplicabilidad, porque se pueden obtener mayores velocidades de congelación y calentamiento en comparación con otros. Como conclusión importante de la secuencia de experimentos se seleccionó la alternativa del procedimiento de microgoteo-vitrificación, por sus posibilidades para la crioconservación de los embriones somáticos en caña de azúcar. Por lo tanto, estos resultados constituyeron el punto de partida para refinar el procedimiento seleccionado en el tercer experimento.

Para el refinamiento de la técnica de gota-vitrificación se evaluó el efecto de la concentración de glicerol y sacarosa del medio crioprotector, así como el tiempo de exposición a este medio en la viabilidad de *clusters* de embriones somáticos. En el caso de las muestras controles sin crioconservar, se observó que la concentración de glicerol tuvo un efecto significativo (disminución) en los niveles de viabilidad celular de los *clusters*. Para el material crioconservado con el mejor tratamiento de 1.5 mol.L^{-1} de glicerol, se obtuvo una viabilidad de 40 %. En cuanto a la sacarosa, en las muestras controles sin crioconservar se observó que la concentración de sacarosa tuvo un efecto significativo (disminución), pero no muy marcado en los niveles de supervivencia de los *clusters*. Para el material crioconservado con el mejor tratamiento de 0.3 mol.L^{-1} de sacarosa, se obtuvo una supervivencia de cerca de 55 %.



Plátanos y bananos

Explantos meristemáticos

Las primeras experiencias se realizaron tomando como material vegetal un cultivar de plátano, el 'Burro Criollo' (Grupo ABB, subgrupo Bluggoe), cultivar tradicional de alto consumo en la región oriental del país y susceptible a la raza 2 del Mal de Panamá (*Fusarium oxisporum* F. sp. cubense). Después de evaluar la técnica de encapsulación-deshidratación, que no resultó exitosa, se ensayó la técnica descrita por Panis (1995), utilizando como explantes meristemas tipo coliflor, obtenidos por subcultivos en medio de multiplicación MS modificado con 44.5 μM de 6-bencil-amino-purina (BAP), según el método descrito por Vuylsteke (1989).

Mediante este método, los agregados de meristemas proliferantes se subcultivaron en medio MS sólido, con niveles de 0.2 a 0.6 M de sacarosa, por tres semanas, y a continuación se sumergieron directamente en nitrógeno líquido por una hora. El retorno a la temperatura ambiente se llevó a cabo introduciendo los crioviales en un baño de agua a +40 °C, por 80 segundos. Con el precultivo en medio MS con 0.4 y 0.5 M de sacarosa, durante tres semanas, se lograron los primeros resultados de supervivencia a la criopreservación (Torres *et al.* 1995). Con el precultivo en sacarosa en concentración 0.4 M, la regeneración fue de 10 %, y a la concentración 0.5 M se obtuvo el mejor resultado, con 65 %.

Las plantas obtenidas de los ápices criopreservados se sembraron en las áreas agrícolas del INIFAT. Sus caracteres morfoagronómicos se evaluaron según los descriptores del cultivo (IPGRI 1996) y, al compararlos con el material de origen, no se encontraron variaciones en ninguna fase del desarrollo, desde la vitroplanta hasta la fase de corte del racimo, que pudieran atribuirse al desarrollo de los meristemas proliferantes *in vitro* o a la criopreservación.

El Departamento de Genética de la Facultad de Biología de la Universidad de La Habana evaluó la estabilidad isoenzimática de los plantones de campo derivados del material proliferante después de la criopreservación. Los zimogramas de las isoenzimas peroxidadas (3 bandas), polifenoloxidasas (4 bandas) y esterasas (6 bandas) revelaron predominio del patrón balbisiana y gran homogeneidad del material, sin que se encontraran diferencias entre los patrones de bandas de las plantas derivadas de los meristemas criopreservados y las derivadas del material original. Aunque se considera que el análisis de isoenzimas aporta información sobre una parte relativamente pequeña del genoma, estos resultados constituyen un elemento a favor del criterio de que no se produjo alta variabilidad.

Piña

En el caso del cultivo de la piña, se ha investigado la aplicación de las técnicas de criopreservación para ápices de vitroplantas, callos y óvulos con diferentes objetivos. La criopreservación de ápices constituye la estrategia más adecuada para el almacenamiento



a largo plazo de los recursos genéticos de las especies que se propagan vegetativamente. La crioconservación de callos puede proveer una herramienta efectiva para realizar ensayos *in vitro* en la evaluación de germoplasma resistente a la enfermedad de la fusariosis. Además, el almacenamiento a largo plazo de óvulos de piña facilitarían el cruzamiento de plantas con crecimiento en diferentes lugares y/o diferentes períodos de floración.

Ápices

Ápices de aproximadamente 3 mm aislados de plantas *in vitro* de piña (*Ananas comosus*) tomadas 15 días posteriores al último subcultivo se sometieron después del explante al precultivo de dos días en medio semisólido MS suplementado con 0.3 M de sacarosa. Los tejidos pre-acondicionados se crioconservaron exitosamente siguiendo un procedimiento de vitrificación que contempló un tratamiento inicial de carga por 25 minutos en el medio MS líquido con 0.75 M de sacarosa + 1 M de glicerol, seguido por la exposición a 0 °C durante siete horas a la solución vitrificadora PVS2 (glicerol al 30 % (p/v) + etilenglicol al 15 % (p/v) + dimetil sulfóxido (DMSO) al 15 % (m/v) + sacarosa a 0.4 M (m/v)) (Sakai *et al.* 1990) antes de la inmersión rápida de las muestras al nitrógeno líquido.

El calentamiento de las muestras después de la crioconservación se llevó a cabo en un baño María a +40 °C y la solución vitrificadora se excluyó por el lavado de los tejidos con abundante medio líquido suplementado con 1.2 M de sacarosa durante 30 minutos aproximadamente. Para el recultivo los ápices se transfirieron al medio usado normalmente para la micropropagación y se mantuvieron la primera semana en la oscuridad, y en la siguiente fueron transferidos a las condiciones de fotoperíodo establecidas. Este protocolo criogénico resultó en 65 % y 35 % de supervivencia en ápices de las variedades Puerto Rico y Perolera, respectivamente. La recuperación de los tejidos crioconservados tuvo lugar en todos los casos por la regeneración directa de nuevas plantas sin la formación transitoria de callos. Estos resultados constituyeron el primer reporte exitoso sobre la crioconservación de ápices de esta especie (González-Arno *et al.* 1998a).

Los siguientes estudios sobre crioconservación de ápices de piña se realizaron igualmente con tejidos de 3 mm aislados de plantas *in vitro* de 2.5-3.0 cm de altura, luego de 5-6 subcultivos en el medio de propagación y pre-acondicionados por dos días en medio de cultivo sólido suplementado con 0.3 M de sacarosa después del explante. Sin embargo, al procedimiento de vitrificación establecido se le realizaron modificaciones referentes a la composición de la solución de carga y a la PVS utilizadas. En los nuevos ensayos se empleó la mezcla de 0.4 M de sacarosa + 2 M de glicerol para el tratamiento de carga y la PVS3 (50 % de glicerol (m/v) + 50 % de sacarosa (m/v)) (Sakai 1993) en lugar de la PVS2. En la etapa de recultivo, los ápices de los diferentes tratamientos se colocaron sobre papel filtro y se pasaron a placas de Petri que contenían el mismo medio de propagación, pero suplementado con 0.3 M de sacarosa. A las 24 horas, los explantes se transfirieron al medio normal de micropropagación y continuaron en la oscuridad durante una semana, antes de ser transferidos a las condiciones controladas de iluminación (Martínez-Montero *et al.* 2005).



Cuando se aplicó este protocolo a ápices de vitroplantas de nueve cultivares de piña pertenecientes a la colección nacional *in vitro* de germoplasma de piña cubano, se obtuvo un 100 % de resultados exitosos de crioconservación (Martínez-Montero *et al.* 2009). Sin embargo, el porcentaje de supervivencia de los genotipos utilizados varió: Puerto Rico (72.1 %), Perolera (51.3 %), MD2 (60.2 %), Cabezona (27.9 %), Española roja P3R5 (20.0 %), Española roja del Caney (15.9 %), Cayena lisa Serrana (35.3 %), Piña blanca del Caney (24.6 %) y Piñuela Karata (6.7 %) (Mendez-Pelegrín 2009).

Los resultados obtenidos demostraron que, independientemente de las modificaciones realizadas al protocolo criogénico, el tiempo de siete horas de deshidratación tanto en la PVS2 como en la PVS3 fue el que garantizó niveles adecuados de supervivencia después del nitrógeno líquido (Martínez-Montero *et al.* 2005). No obstante, existe una tendencia a la disminución de la tasa de regeneración, la cual solamente se puede contrarrestar mediante la utilización de la micropropagación a partir de los ápices que presentan supervivencia y proliferación después del almacenamiento en nitrógeno líquido.

Callos

Para la crioconservación de los callos de piña, se ensayó el procedimiento simple de enfriamiento aplicado con anterioridad para callos de caña de azúcar (Martínez-Montero *et al.* 1998). En los experimentos se utilizaron dos cultivares (Cayena lisa y Perolera) con 15-20 días de edad y 3-6 mm de diámetro. Los callos se sometieron a una solución crioprotectora que contenía 15 % (v/v) de DMSO y 0.5 M de sacarosa durante una hora a 0 °C. Más tarde, los callos se transfirieron directamente al medio de recuperación (medio MS suplementado con dicamba: BAP (2.5:0.5 mg.L⁻¹) y ácido cítrico (0.1 mg.L⁻¹). La supervivencia se evaluó después de los 45 días de descongelación y se midió por el porcentaje de callos que incrementaron su tamaño durante la recuperación. Como resultado, el porcentaje de supervivencia de los callos crioprotegidos con DMSO fue bastante similar para ambos cultivares: 57 % para Cayena lisa y 67 % para Perolera (Martínez-Montero *et al.* 2005). El recrecimiento de los callos fue bastante rápido con un evidente crecimiento en tamaño durante su recuperación. Con este experimento se confirma que el protocolo establecido para los callos de caña de azúcar tiene un amplio margen de aplicabilidad en otras especies.

Cítricos

Ápices de plantas juveniles

La crioconservación de ápices aislados de plantas de cítricos obtenidas por la germinación *in vitro* de semillas se logró mediante la aplicación de un protocolo de encapsulación-deshidratación con un régimen de enfriamiento lento. Ápices de aproximadamente 1 mm provenientes de plantas juveniles de *Poncirus trifoliata* se utilizaron como caso de estudio. Los tejidos después del explante se mantuvieron en el mismo medio MS modificado de propagación durante 24 horas y posteriormente se



encapsularon en alginato de calcio al 3 %. Se estudió tanto el precultivo directo en medio líquido con altas concentraciones de sacarosa (0.3, 0.5, 0.75 hasta 1 M), manteniendo los tejidos a una misma molaridad desde 1 hasta 10 días, así como el precultivo progresivo en tres pasos, por el incremento diario de la concentración al nivel inmediato superior (ejemplo: 0.3 M/24h + 0.5 M/24h + 0.75 M/ 24h).

Sin embargo, los ápices de cítricos mostraron una gran sensibilidad a las concentraciones más altas de sacarosa, por lo que resultó más conveniente crioconservar los tejidos de cítricos después de aplicar un precultivo prolongado de hasta tres días en sacarosa a 0.5 M o el tratamiento progresivo en sacarosa desde 0.3 M hasta 0.75 M. El proceso de desecación de los tejidos encapsulados y precultivados bajo ambas condiciones se realizó hasta aproximadamente el 25 % de humedad en las cápsulas (expresado en base fresca), y la congelación se llevó a cabo de forma rápida mediante inmersión directa al nitrógeno líquido o la aplicación de una velocidad de enfriamiento lenta, con la disminución gradual de la temperatura a $0.5\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ de $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ antes de transferir las muestras a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$.

El régimen de congelación lento en comparación con el rápido resultó más favorable, ya que permitió la obtención del doble de supervivencia (40 %). Todos los ápices recuperados después de la crioconservación produjeron nuevas plantas sin necesidad de ser extraídos de las cápsulas sintéticas (González-Arnao *et al.* 1998b). La aplicación de este protocolo a las especies de cítricos utilizadas como tutores, *Citrange troyer* y *Citrange carrizo*, garantizó niveles de supervivencia después de la crioconservación del 36 % y del 55 %, respectivamente (González-Arnao *et al.* 2000).

Embriones somáticos y óvulos

La crioconservación de embriones somáticos de cítricos obtenidos mediante el cultivo *in vitro* de óvulos ya se había experimentado con un cultivar de naranjo dulce aplicando un método clásico de enfriamiento lento (Marín *et al.* 1993). Sin embargo, los resultados obtenidos eran muy erráticos y la supervivencia baja, además de ser necesaria la selección rigurosa de los embriones en un estado temprano de desarrollo para que toleraran el enfriamiento. Por otra parte, no se había logrado supervivencia después de la crioconservación de óvulos mediante los protocolos convencionales.

La aplicación de la técnica de encapsulación-deshidratación permitió establecer condiciones favorables para crioconservar exitosamente embriones somáticos de diferentes genotipos de cítricos (figura 10.2), obtenidos a partir de dos fuentes embriogénicas (el cultivo de óvulos y el cultivo de explantes constituidos por capas finas de 0.4-0.5 mm cortadas del estigma, del estilo o de ovarios). El protocolo que garantizó altos niveles de supervivencia (entre el 75 % y el 100 %) después de la crioconservación, independientemente del origen de los embriones, contempló la encapsulación de los tejidos en alginato de calcio al 3 %, el precultivo de 24 horas en medio líquido suplementado con 0.75 M de sacarosa, la desecación hasta alrededor del 25 % de humedad en las cápsulas (expresado en base fresca) y la congelación rápida de las muestras por la inmersión directa al nitrógeno líquido (González-Arnao *et al.* 2003).



El estudio del procedimiento de encapsulación-deshidratación para crioconservar óvulos de cítricos permitió obtener por primera vez supervivencia después de la congelación, pero los resultados fueron muy erráticos y la recuperación muy baja en todos los genotipos ensayados, por lo que no se lograron definir condiciones adecuadas que aseguraran la crioconservación de este tipo de material.

Figura 10.2. Recuperación de embriones somáticos de cítricos crioconservados por encapsulación-deshidratación.



Fuente: González-Armao 2003.

Ajo

La crioconservación de ápices de ajo se trabajó con nueve clones (ocho de la provincia de La Habana, una de las principales regiones productoras del país, y un clon de la región oriental). Después de la desinfección con etanol e hipoclorito de sodio, la vitrificación de los ápices del diente se realizó con la solución PVS3 (50 % w/v glicerol + 50 % w/v sacarosa), siguiendo el procedimiento descrito por Makowska *et al.* (1999).

El protocolo se desarrolló tomando como material biológico bulbos de ajo desinfectados y germinados *in vitro*. Se extrajeron los ápices de crecimiento, constituidos por el meristemo y varios primordios foliares (manteniendo parte de la base), con un tamaño no mayor de los 4 mm. Después del corte, los ápices se mantuvieron hasta el día siguiente en el medio MS suplementado con 0.1 mg/L de ácido indolacético y 0.1 mg/L de kinetina (a la temperatura de 25 °C). A continuación, se colocaron en crioviales de 1.8 ml y se trataron con una solución de 2 M de glicerol + 0.4 M de sacarosa (20 minutos a la temperatura de 25 °C), la que se reemplazó con 1.5 ml de la solución de vitrificación PVS3 (50 % de glicerol + 50 % de sacarosa). El criovial se movió ligeramente para que los ápices quedaran cubiertos, y se dejaron en la solución por períodos de una a tres horas (según los experimentos), con el objetivo de provocar la deshidratación. Posteriormente, la PVS3 se renovó (volumen, 0.5 ml) y los crioviales se sumergieron en el nitrógeno líquido (-196 °C) durante dos horas. La muestra se transfirió a la temperatura ambiente al sumergirla, con agitación, en un baño de agua a la temperatura de 40 °C, por 80 segundos. Por último, se extrajo la solución PVS3 y los ápices se lavaron con 1.5 ml de una solución del medio MS con 1.2 M de sacarosa, por un período de 10 minutos.

Este protocolo se evaluó en nueve clones de ajo. Los valores de supervivencia obtenidos en todos los casos fueron superiores al 64 %, con valores más frecuentes

en torno al 80 % (Torres *et al.* 2008). No se encontraron diferencias significativas con respecto a la muestra testigo (que recibió igual tratamiento, exceptuando la inmersión en el nitrógeno líquido), lo que demuestra que el protocolo resultó flexible y eficiente y que la vitrificación de los ápices del bulbo puede ser una opción viable para la crioconservación del germoplasma nacional de ajo.

A pesar de que se obtuvieron altos valores de supervivencia y regeneración, en los primeros ensayos se encontró con frecuencia la manifestación de la hiperhidricidad en la fase de recuperación de los ápices, tanto del material crioconservado como del testigo.

En la continuidad del trabajo, con el objetivo de reducir la hiperhidricidad, se utilizó como medio de recuperación el medio Linsmaier y Skoog (1965), modificado en la proporción nitrato/amonio de 56.5/3.5 (Nagakubo *et al.* 1993). Además, después de la primera semana, los explantes se transfirieron de las placas de Petri a erlenmeyers de 100 ml (para alejar de los explantes el agua condensada en las paredes del vaso), y se evitó la consistencia semisólida del medio, manteniendo la concentración de agar en 0.7 % (George 1996). Con este procedimiento se logró reducir considerablemente la manifestación de la hiperhidricidad severa y obtener altos porcentajes de supervivencia y de vitroplantas, las que siguieron su ciclo biológico, similar al de las plantas cultivadas *in vitro* sin tratamiento de crioconservación (emisión del brote, desarrollo de la vitroplanta y bulbificación) (figura 10.3).

Figura 10.3. Crioconservación de ápices de bulbos de ajo: a) regeneración de brotes al mes de la crioconservación; b) plantas desarrolladas a los tres meses del tratamiento.



Fuente: Torres *et al.* 2008.

Papaya

Para la crioconservación de los meristemos del híbrido de papaya fue necesario establecer condiciones de precultivo de las plantas donantes de los tejidos con diferentes concentraciones de sacarosa (30, 40, 50, 60 y 70 g L⁻¹). Durante el estudio se determinó el tamaño del ápice meristemático y el tiempo de inmersión de los meristemos en la solución de vitrificación PVS2. La crioconservación de meristemos de papaya fue posible realizando un precultivo de las plantas donantes en 50 g L⁻¹ de sacarosa durante 14 días. Los ápices con



una longitud de 2.0 mm y con 2-3 primordios foliares requirieron para su deshidratación una inmersión de 40 minutos en la solución vitrificadora PVS2. Esta estrategia de deshidratación de los meristemas proporcionó porcentajes de supervivencia de 73.3 % posterior a la criopreservación. La incorporación de los ápices criopreservados a la multiplicación *in vitro* y la obtención de brotes derivados de yemas axilares se produjeron a partir del segundo subcultivo bajo las condiciones óptimas de cultivo.

Conclusiones

El estado de desarrollo actual de la criopreservación vegetal en Cuba demuestra que existen condiciones favorables en diferentes instituciones del país para continuar avanzando en la investigación científica y apoyar el establecimiento y/o adecuación de protocolos criogénicos en correspondencia con los objetivos estratégicos trazados por el Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos. Es necesario, sin embargo, introducir en la práctica social los logros alcanzados a nivel de los bancos de germoplasma.

Sería conveniente establecer una red nacional en esa temática que promueva una mayor sensibilidad institucional en la aplicación rutinaria de la criopreservación y que contribuya a coordinar apropiadamente las acciones futuras en esta área.

Referencias

- Eksomtramage, T; Paulet, F; Guiderdoni, E; Glaszmann, JC; Engelmann, F. 1992. Development of a cryopreservation process for embryogenic calluses of a commercial hybrid of sugarcane (*Saccharum* sp.) and application to different varieties. *CryoLetters* 13:239-252.
- Fundora, Z; López, MC; Ferrer, M; Lacerra, J; Puldón, V; Milián, M; Álvarez, O; Fuentes, V; Shagardovsky, T; Valdés, C; Castillo, J; Reino, J; Martínez, M; Campo Zabala, R; Soravilla, L; Parrado, O; Soto, R; Isidró, M; Lescay, E; Quintero, E; Díaz, MF; Santos, L; Cristóbal, R; Gómez, PJ. 2007. Cuba: Segundo informe nacional sobre los recursos fitogenéticos para la agricultura y la alimentación.
- George, EF. 1996. Plant propagation by tissue culture. Part 1. The technology. Edington, UK, Exegetics Ltd. 574 p.
- Gnanapragasam, S; Vasil, IK. 1992. Cryopreservation of immature embryos, embryogenic callus and cell suspension cultures of gramineous species. *Plant Science* 83:205-215.
- González-Arno, MT. 1996. Desarrollo de una técnica para la criopreservación de meristemas apicales de caña de azúcar. Tesis de Doctorado. La Habana, CU, Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC).



- _____; Engelmann, F. 2006. Cryopreservation of plant germplasm using the encapsulation-dehydration technique: review and case study on sugarcane. *CryoLetters* 27(3):155-168.
- _____; Engelmann, F; Huet, C; Urra, C. 1993. Cryopreservation of encapsulated apices of sugarcane: effect of freezing procedure and histology. *CryoLetters* 14:303-308.
- _____; Engelmann, F; Urra-Villavicencio, C; Morenza, M; Rios, A. 1998b. Cryopreservation of citrus apices using the encapsulation-dehydration technique. *CryoLetters* 19:177-182.
- _____; Juarez, J; Ortega, C; Navarro, L; Duran-Vila, N. 2003. Cryopreservation of ovules and somatic embryos of citrus using the encapsulation-dehydration technique. *CryoLetters* 24:85-94.
- _____; Moreira, T; Urra, C. 1996. Importance of pregrowth with sucrose and vitrification for the cryopreservation of sugarcane apices using encapsulation-dehydration. *CryoLetters* 17:141-148.
- _____; Panta, A; Roca, WM; Escobar, RH; Engelmann, F. 2008. Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 92:1-13.
- _____; Ravelo, MM; Urra-Villavicencio, C; Martínez-Montero, MM; Engelmann, F. 1998a. Cryopreservation of pineapple (*Ananas comosus*) apices. *CryoLetters* 19:375-382.
- _____; Urra, C; Engelmann, F; Ortiz, R; Fe, C de la. 1999. Cryopreservation of encapsulated sugarcane apices. Effect of storage temperature and storage duration. *CryoLetters* 20:347-352.
- Hirai, D; Sakai, A. 2003. Simplified cryopreservation of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) by optimizing conditions for osmoprotection. *Plant Cell Report* 21(10):961-966.
- IPGRI (Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, IT). 1996. Descriptores para el banano (*Musa* spp.). Roma, IT, IPGRI, CIRAD, INIBAP. 55 p.
- Jian, LC; Sun, DL; Sun, LH. 1987. Sugarcane callus cryopreservation. In Li, PH. ed. *Plant cold hardiness*. Nueva York, US, Alan R. Liss, Inc. p. 323-337.



- Lambardi, M; Fabbri, A; Caccavale, A. 2000. Cryopreservation of white poplar (*Populus alba* L.) by vitrification of in vitro-grown shoot tips. *Plant Cell Report* 19:213-218.
- Leunufna, S; Keller, ERJ. 2005. Cryopreservation of yams using vitrification modified by droplet method: effects of cold acclimation and sucrose. *CryoLetters* 26(2):93-102.
- Linsmaier, EM; Skoog, F. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 18:100-127.
- Maddox, AD; Gonsalves, F; Shields, R. 1983. Successful preservation of suspension cultures of three *Nicotiana* species at the temperature of liquid nitrogen. *Plant Science Letters* 28:157-62.
- Makowska, Z; Keller, J; Engelmann, F. 1999. Cryopreservation of apices isolated from garlic (*Allium sativum* L.) bulbils and cloves. *CryoLetters* 20:175-182.
- Marin, ML; Gogorcena, Y; Ortiz, J; Duran-Vila, N. 1993. Recovery of whole plants of sweet orange from somatic embryos subjected to freezing thawing treatments. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 34:27-33.
- Martínez-Montero, ME; González-Arno, MT; Borroto-Nordelo, C; Puentes-Díaz, C; Engelmann, F. 1998. Cryopreservation of sugarcane embryogenic callus using a simplified freezing process. *CryoLetters* 19:171-176.
- _____; Lorenzo, JC; Ojeda, E; Quiñones, J; Mora, N; Sánchez, M; Iglesias, A; Martínez, J; Castillo, R. 2006. Methodology for the cryopreservation of calli with embryogenic structures for the culture of sugarcane. *Biotecnología Aplicada* 23(4):360-375.
- _____; Martínez, J; Castillo, R; Engelmann, F; González-Arno, MT. 2005. Cryopreservation of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr) apices and calluses. *Acta Horticulturae (ISHS)* 666: 127-131.
- _____; Martínez, J; Engelmann, F. 2008. Cryopreservation of sugarcane somatic embryos. *CryoLetters* 29(3):229-242.
- _____; Méndez-Pelegrin, R; Martínez, J. 2009. Cryogenic strategy for the establishment of pineapple (*Ananas comosus* L. Merrill) germplasm bank. *Pineapple News* 10:14. Newsletter of the Pineapple Working Group, International Society for Horticultural Science.

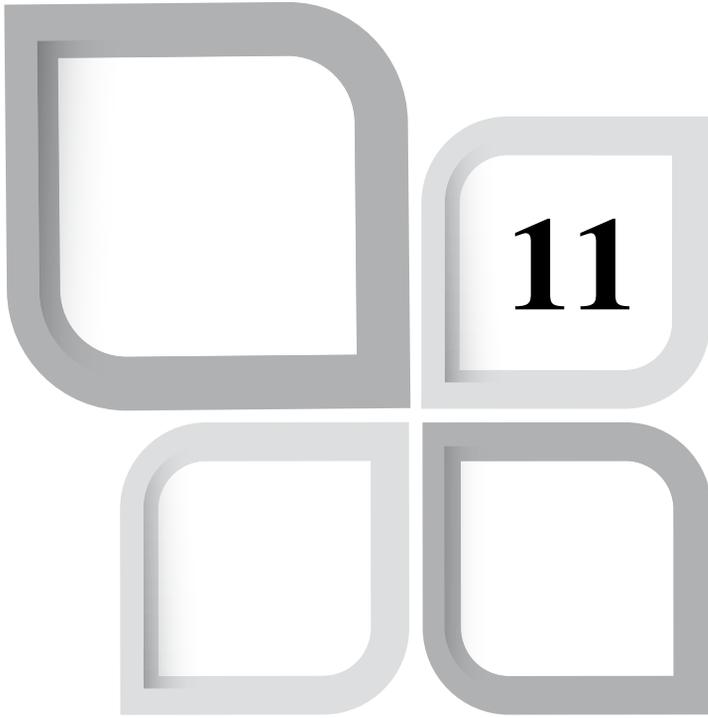


- _____; Mora, N; Quiñones, J; González-Arno, MT; Engelmann, F; Lorenzo, JC. 2002b. Effect of cryopreservation on the structural and functional integrity of cell membranes of sugarcane embryogenic calluses. *CryoLetters* 23:237-244.
- _____; Ojeda, E; Espinosa, A; Sánchez, M; Castillo, R; González-Arno, MT; Engelmann, F; Lorenzo, JC. 2002a. Field performance of cryopreserved callus-derived sugarcane plants. *CryoLetters* 23(1):21-26.
- Matsumoto, T; Sakai, A; Takahashi, C; Yamada, K. 1995. Cryopreservation of *in vitro* grown apical meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) by encapsulation-vitrification method. *CryoLetters* 16:189-196.
- Méndez-Peigrín, R. 2009. Estrategia criogénica para el para el establecimiento de un banco de germoplasma de piña. Tesis de Maestría. Ciego de Ávila, CU, Universidad de Ciego de Ávila. 90 p.
- Murashige, T; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- Nagakubo, T; Nagasawa, A; Ohkawa, H. 1993. Micropropagation of garlic through *in vitro* bulblet formation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 32:175-183.
- Panis, B. 1995. Cryopreservation of banana (*Musa* spp.) germplasm. *Dissertationes de Agricultura* 272. Lovaina, BE, Catholic University of Leuven. 201 p.
- _____; Piette, B; Swennen, R. 2005. Droplet vitrification of meristems: a cryopreservation protocol applicable to all *Musaceae*. *Plant Science* 168:45-55.
- Sakai, A. 1993. Cryopreservation of plant genetic resources in Japan. Cryopreservation of Plant Genetic Resources. Japan International Cooperation Agency. Ref No 6, March 1993, p.5-26.
- _____; Kobayashi, S; Oiyama, I. 1990. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Reports* 9:30-33.
- Torres, MA; Font, A; Llorente, O; Moreno, V; Rodríguez, AJ. 2008. Estrategias para la conservación *in vitro* de ajo (*Allium sativum* L.) en Cuba. In Congreso Convención Trópico (2008, La Habana, CU). Memorias. p. 866-878.
- _____; González-Arno, MT; Urra, C; Moreira, T; Engelmann, F. 1995. Avances en biotecnología moderna. *Biotecnología Habana'95* 3:II-22.



- Ulrich, JM; Finkle, BJ; Moore, PH; Ginoza, H. 1979. Effect of a mixture of cryoprotectants in attaining liquid nitrogen survival of callus cultures of a tropical plant. *Cryobiology* 16:550-556.
- Vuylsteke, DR. 1989. Shoot-tip culture for the propagation, conservation and exchange of *Musa* germplasm. IBPGR. Practical manuals for handlings crop germplasm *in vitro* 2. 56 p.
- Withers, LA. 1985. Cryopreservation of cultures plant cells and protoplasts. *In* Kartha, KK. ed. Cryopreservation of plant cells and organs. Boca Raton, US, CRC Press. p. 243-267.





Avances en la crioconservación de plantas en Ecuador

María de Lourdes Torres¹, Sofía Korneva², Román Maribona Kornev³,
Joffre A. Mendoza O.⁴, Fernando E. Piña T.⁵, Rodolfo Maribona H.^{6(†)},
Pedro J. González P.⁷, Venancio Arahana⁸

1. Universidad San Francisco de Quito, Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Ecuador, ltorres@usfq.edu.ec.

2. Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL), Campus Gustavo Galindo, Guayaquil, Ecuador, skorneva@espol.edu.ec.

3. Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL), Guayaquil, Ecuador, romanmaribona@hotmail.com.

4. Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL), Guayaquil, Ecuador, joffmendo@hotmail.com.

5. Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL), Guayaquil, Ecuador, fpina@espol.edu.ec.

6. Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL), Guayaquil, Ecuador.

7. Universidad San Francisco de Quito, Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Ecuador, pedrogc@hotmail.com.

8. Universidad San Francisco de Quito, Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Ecuador, varahana@usfq.edu.ec.

Los autores agradecen el apoyo de Diana Ayala y Nicolás Bastidas en la recopilación de información utilizada para elaborar este capítulo.

Ecuador es uno de los países más ricos en biodiversidad en todo el mundo. Su ubicación geográfica, sus orígenes geológicos, la presencia de la cordillera de los Andes, la influencia de corrientes marinas, los vientos amazónicos y la existencia de innumerables hábitats húmedos determinan que sea un país megadiverso con una gran cantidad de bosques y microclimas (Tapia *et al.* 2008).

Sierra (1999) describe 34 tipos de vegetación para el Ecuador, gracias a lo cual posee una gran riqueza de ecosistemas y de especies. De hecho, es el país que tiene la mayor cantidad de especies de vertebrados por cada 1000 km² de superficie, ocupa el segundo lugar a nivel mundial en el número de especies de vertebrados endémicos por cada 1000 km² y se ubica en los primeros lugares en la cantidad absoluta de especies de anfibios, aves y mariposas que habitan en su territorio (Ministerio del Ambiente de Ecuador *et al.* 2001).

Flora

En el país existe un elevado número de especies de plantas por unidad de área. La flora comprende de 22 000 a 25 000 especies de plantas vasculares, con un endemismo estimado de 32.25 %. Los bosques húmedos tropicales del noroccidente están considerados entre los más diversos del mundo, como lo demuestra el registro de más de 1250 especies de plantas vasculares, pertenecientes a 136 familias, en menos de 1 km² en el Centro Científico de Río Palenque, uno de los últimos reductos de bosque tropical primario en la provincia de Los Ríos (Estrella *et al.* 1995).

En la zona del río Napo se estima que existen alrededor de 4000 especies de plantas vasculares. Los bosques secos tropicales del occidente tienen varias especies únicas en el mundo, como *Ceiba trichistandra* e *Hymenocallis quitoensis*. En los últimos años, gran parte de estos bosques han estado sujetos a una intensa explotación, lo que ha provocado una gran erosión genética en ciertas especies como tagua (*Phytelephas aequatoriales*), cedro colorado (*Ocotea* sp.) y palma real (*Ynesa colenda*), entre otras (IICA 2008).

Los bosques montanos, ubicados entre 900 y 3000 msnm, cuentan con una amplia diversidad de bromelias y orquídeas. Contienen cerca de la mitad de especies de plantas del Ecuador, en una superficie que comprende solamente el 10 % de la superficie del país. Se ha reportado que en ellos existen 292 géneros pertenecientes a 93 familias y 1566 especies de árboles y arbustos nativos de la zona andina sobre los 2400 msnm, siendo la familia Asteraceae la más rica con 43 géneros y 249 especies (Estrella *et al.* 1995).

Las diversas regiones geográficas del país son muy ricas en parientes silvestres de las especies cultivadas. Por ejemplo, los materiales silvestres de papa, frijol, tomate y frutales tropicales y subtropicales, así como los parientes silvestres de especies como el aguacate (*Persea* spp.) y la papaya (*Carica* spp.), reflejan el gran potencial de la agrobiodiversidad ecuatoriana (Tapia *et al.* 2008).



Bancos de germoplasma

Frente a la riqueza botánica que presenta el Ecuador, es de vital importancia su conservación *in situ* y *ex situ*. El Sistema Nacional de Áreas Protegidas cuenta con 40 reservas que abarcan aproximadamente 96 000 km², en las cuales se realizan grandes esfuerzos para manejar adecuadamente ecosistemas que albergan gran parte de nuestra biodiversidad. En cuanto a las estrategias de conservación *ex situ*, es importante resaltar que con el apoyo de organismos nacionales e internacionales en el país se han realizado actividades de recolección y conservación de material vegetal. Los bancos de germoplasma en que se conserva el mayor número de especies son el del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) y el de la Universidad Nacional de Loja (UNL). Además de esos bancos, algunas universidades y entidades públicas y privadas contribuyen a la conservación de material vegetal y actualmente buscan apoyo para desarrollar, establecer o fortalecer nuevos bancos de germoplasma.

Banco de germoplasma del INIAP

El Departamento Nacional de Estudios Fitogenéticos del INIAP conserva alrededor de 13 711 muestras de semillas pertenecientes a 170 géneros de cultivos y 4209 muestras en campo o duplicadas en colecciones *in vitro* pertenecientes a 399 especies forestales, alimenticias, medicinales y forrajeras, lo que suma un total de 17 920 accesiones de especies de plantas que se conservan en varias estaciones experimentales (Tapia *et al.* 2008).

Dentro de las accesiones conservadas caben destacar las siguientes especies: papa (*Solanum tuberosum*), ajíes y pimientos (*Capsicum annuum*), quinua (*Chenopodium quinoa*), oca (*Oxalis tuberosa*), melloco (*Ullucus tuberosus*), fréjol (*Phaseolus vulgaris*), amaranto (*Amaranthus* spp.), granadilla silvestre (*Passiflora* spp.), uvilla (*Physalis peruviana*), maní (*Arachis hypogaea*), arroz (*Oryza sativa*), sorgo (*Sorghum bicolor*), chocho (*Lupinus* sp.), cucurbita (*Cucurbita ficifolia*), tortas (*Phaseolus lunatus*), haba (*Vicia faba*), arveja (*Pisum sativum*), maíz (*Zea mays*), mashua (*Tropaeolum tuberosum*), zanahoria blanca (*Arracacia xanthorrhiza*), jícama (*Smilax sonchifolius*) y cacao (*Theobroma cacao*). Además de conservar ese material vegetal, se han realizado estudios de diversidad genética y de los patógenos que afectan esas especies, así como actividades de regeneración del 40 % de las accesiones mantenidas (Tapia *et al.* 2008).

Banco de germoplasma de la UNL

El segundo banco de germoplasma en importancia del país es el de la UNL, que cuenta con 5754 accesiones de diferentes especies, entre las cuales destacan *Annona cherimola*, *Solanum lycopersicum*, *Solanum cheesmanii*, *Zea mays*, *Bixa orellana*, *Solanum quitoense* y *Vasconcella pentagona* (Tapia *et al.* 2008).



Otras iniciativas

Otras instituciones se han interesado en consolidar en el país estrategias de conservación *ex situ* de especies. Así, el Banco de Germoplasma de la Universidad Técnica Particular de Loja (UTPL) conserva varias accesiones de semillas de más de 150 especies de familias representativas de la región sur del Ecuador, como Bignoniaceae, Bombacaceae, Caesalpinaceae, Fabaceae, Sapindaceae y Orchidaceae (Rivera 2011). De igual manera, la Pontificia Universidad Católica del Ecuador - Sede Ibarra mantiene con el INIAP el Banco Activo de Germoplasma de la Sierra Norte del Ecuador. Por otra parte, el Jardín Botánico de Quito recientemente estableció una colección de orquídeas *ex situ* de alrededor de 7000 plantas de 500 especies, tanto de clima cálido como de clima templado y en su gran mayoría nativas del Ecuador, entre las que se destacan *Cyrtochilum aurea*, *Odontoglossum hallii* y *Caucaea phalaenopsis* (Vaca 2011).

Cultivo de tejidos *in vitro* e iniciativas de crioconservación

El Catálogo Nacional de Laboratorios de Agrobiotecnología del Ecuador registra 28 laboratorios en el país, en los que se lleva a cabo cultivo *in vitro* de diferentes especies vegetales, principalmente de interés agrícola, forestal u ornamental para Ecuador. Muchos de estos laboratorios se encuentran en universidades o centros de investigación del sector público y del privado. Entre las técnicas que más se utilizan en ellos se pueden mencionar la micropropagación, la embriogénesis somática, el cultivo de anteras y microsporas y el rescate de embriones, entre otras (Morillo *et al.* 2009).

En ese contexto, pocas son las iniciativas de crioconservación que se han reportado, seguramente porque la mayoría de los laboratorios y los grupos de investigación están orientando sus primeros esfuerzos al establecimiento y fortalecimiento de líneas de investigación específicas en determinadas especies vegetales. Seguramente todavía habrá que esperar para que en el país se reconozca a la crioconservación como una excelente herramienta para la conservación de materiales vegetales de interés ambiental, agrícola, florícola, medicinal, etc.

A continuación se describen tres ejemplos de trabajos en crioconservación realizados en el país, sobre los cuales se ha podido recabar información. A pesar del esfuerzo por identificar otras investigaciones en este campo, no fue posible determinar otros proyectos relacionados con crioconservación de plantas. Sin embargo, esto no excluye que en efecto existan otras iniciativas que no han podido ser incluidas en este capítulo.

Banano (Musa spp.)

El banano es uno de los principales productos agrícolas de exportación del Ecuador. Más del 12 % de la población está involucrada en su producción y comercialización. El banano, que representa el 28 % de las exportaciones del país, aporta anualmente más de USD 900 millones de ingresos (Rizzo 2005).



Sin embargo, al igual que otros cultivos, está sujeto al ataque de plagas y enfermedades, lo que ocasiona grandes pérdidas en su rendimiento agrícola. La sigatoka negra es, sin lugar a dudas, el mayor problema que tiene este cultivo en el Ecuador, por lo que se realizan grandes esfuerzos para encontrar soluciones a esa enfermedad.

Dada la gran importancia de la producción bananera para la economía ecuatoriana, con el auspicio del Gobierno de Bélgica, la Universidad Católica de Lovaina y la Universidad de Gent, en la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL) de Guayaquil se estableció el Programa VLIR-ESPOL: “*Tools for an environmental friendly banana production*”.

Con el financiamiento de ese Programa y de la ESPOL, en 2000 se creó el Centro de Investigaciones Biotecnológicas de Ecuador (CIBE), bajo la dirección del Dr. Rodolfo Maribona Hernández (promotor) y del Dr. Rony Swennen (contraparte de Bélgica). Este Centro posee laboratorios, tales como Biología Molecular, Cultivo de tejidos, Fitopatología, Genética y Productos Naturales, que realizan esfuerzos coordinados orientados a disminuir los efectos de la sigatoka negra sobre diferentes variedades de *Musa spp.* También han realizado varios estudios enfocados en la interacción planta-patógeno y en la obtención de nuevas variedades resistentes a dicha enfermedad.

El Laboratorio de Cultivo de Tejidos del CIBE-ESPOL tiene como objetivos principales el desarrollo de diferentes métodos de propagación acelerada de plantas *in vitro* y la obtención de nuevas variedades de *Musa spp.* con diferentes niveles de tolerancia a la sigatoka negra, mediante la aplicación de sistemas de selección *in vitro* y la transformación genética, utilizando las suspensiones celulares embriogénicas de alta conversión en plantas. Además, en ese laboratorio, mediante la técnica de conservación *in vitro*, durante más de ocho años se han mantenido 22 variedades de banano y plátano procedentes del Banco Mundial de Germoplasma. También se han crioconservado más de 50 variedades de *Musa spp.*, para lo cual se han utilizado diferentes explantes de la planta.

A continuación se describen los trabajos más relevantes realizados por este grupo de investigación en crioconservación de banano y plátano:

Crioconservación de meristemos apicales de *Musa spp.*

La crioconservación exitosa de meristemos apicales de *Musa spp.* (somaclon de la variedad Williams) se logró por primera vez en el Ecuador en 2003, para lo cual se utilizó el procedimiento descrito por Panis y Thinh (2001), que resultó en una supervivencia de meristemos mayor al 34 % después de la descongelación (Korneva *et al.* 2004).

El mismo procedimiento, con algunas modificaciones, fue utilizado posteriormente para la crioconservación de ápices meristemáticos de 15 accesiones de diferentes genotipos (M. ac., AA, AAA, ABB y AAA-h) del género *Musa spp.* procedentes del Banco de Germoplasma Mundial (Transit Center, INIBAP, Bélgica) (Korneva *et al.* 2009a, 2009b). Las vitroplantas de las variedades mencionadas

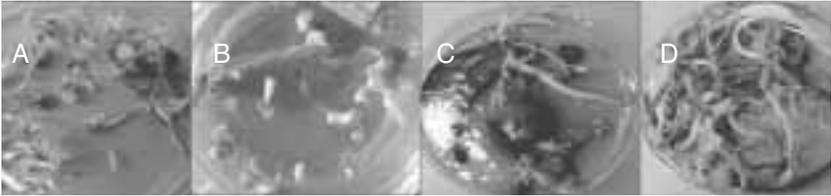


fueron propagadas *in vitro*, precultivadas durante cuatro a seis semanas en el medio de cultivo MS modificado (Murashige y Skoog 1962) en presencia de 6 % de sacarosa. Los ápices meristemáticos fueron extraídos bajo observación en el estéreo microscopio y colocados posteriormente en la solución LS (MS con 2 M de glicerol y 0.4 M de sacarosa). Después de 20 minutos, los meristemos fueron trasladados a la solución PVS2 (MS con 30 % de glicerol, 15 % de etilenglicol, 15 % DMSO y 0.4 % de sacarosa) donde permanecieron durante 30 minutos a 4 °C. Posteriormente, los explantes fueron ubicados sobre tiras de papel de aluminio enfriados a 4 °C, colocados en criotubos de 2 ml y rápidamente congelados durante 10-30 minutos en nitrógeno líquido.

Para evaluar la viabilidad de los meristemos crioconservados, estos fueron rápidamente descongelados a 40 °C (baño termostático), lavados durante 15 minutos con la solución RS (MS en presencia de 1.2 M de sacarosa) para eliminar el DMSO y sembrados posteriormente en el medio de MS modificado (Korneva *et al.* 2004, Panis y Thinh 2001).

Los resultados obtenidos mostraron que más del 50 % de las accesiones regeneraron brotes. Los porcentajes de regeneración logrados fueron los siguientes: 34.61 % para *Musa ac.*, 26.67 % para las variedades del grupo AA, 24.09 % para las del grupo AAA, 37.97 % para AAA-h y 50.9 % para el grupo genómico ABB (figura 11.1).

Figura 11.1. Regeneración de plantas después de la crioconservación de los meristemos de algunas variedades de *Musa spp.* pertenecientes a distintos grupos genómicos: a) y b) *Musa ac.*, c) AA, d) AAA-h.



Fuente: Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Centro de Investigaciones Biotecnológicas de Ecuador (CIBE-ESPOL). Proyecto de Crioconservación del Banco Mundial de Germoplasma de *Musa spp.* (en cooperación con la Universidad Católica de Leuven, Bélgica, año 2004-2005). Fotografías tomadas por el Ing. Roman Maribona y los señores Jofre Mendoza y Fernando Piña (ejecutores del proyecto).

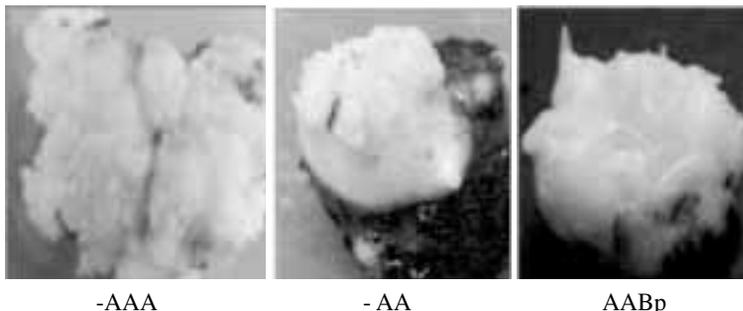
Crioconservación de plantas de *Musa spp.* a partir de meristemos en proliferación (scalps)

Los multimeristemos en proliferación fueron obtenidos sembrando los domos meristemáticos de vitroplantas de las variedades procedentes de diferentes grupos genómicos (AAA, AA, ABB, AAB, AAB p) en MS modificado en presencia de 10mg/l de TDZ. Después de dos meses, estos fueron resemebrados y subcultivados mensualmente en el medio MS con adición de 100 mmol de 6-bencilaminopurina (medio P4), hasta la obtención de las estructuras deseadas (Panis y Thinh 2001).



Los fragmentos de scalps que presentaban entre 2-4 domos meristemáticos en un área de 2-4 mm² de diámetro (dependiendo de la accesión utilizada) fueron precultivados durante una o dos semanas en MS modificado con 0.4 M de sacarosa. El tejido muerto, de color café, fue eliminado y los multimeristemas de color saludable (blanco-yeso) fueron tratados con las soluciones criopreservantes LS (20 minutos) y PVS2 (dos horas) para su deshidratación, colocados sobre tiras de aluminio enfriadas a 4 °C y rápidamente congelados en nitrógeno líquido durante una hora (figura 11.2).

Figura 11.2. Diferentes tipos de scalps utilizados en la crioconservación de *Musa* spp.



Fuente: Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Centro de Investigaciones Biotecnológicas de Ecuador (CIBE-ESPOL). Proyecto de Crioconservación del Banco Mundial de Germoplasma de *Musa* spp. (en cooperación con la Universidad Católica de Leuven, Bélgica, año 2004-2005). Fotografías tomadas por el Ing. Roman Maribona y los señores Jofre Mendoza y Fernando Piña (ejecutores del proyecto).

Posteriormente, los explantes fueron extraídos del nitrógeno líquido, descongelados rápidamente en baño María a 40 °C durante aproximadamente un minuto, lavados con la solución RS durante 15-20 minutos y sembrados en el medio MS con 30 g de sacarosa. Al día siguiente, los scalps fueron resebrados en el medio MS con 2.22 mmol de BAP y cultivados en la oscuridad por una semana.

Los resultados mostraron una mayor regeneración de brotes a partir de scalps crioconservados en las variedades de los grupos genómicos AAA y ABB (69.5 % y 43.4 %, respectivamente) y menor en el grupo AAB, con un valor promedio de 20.1 % (Korneva *et al.* 2009a, 2009b).

Los resultados de la crioconservación de *Musa* spp. mediante la utilización de meristemas apicales fueron comparados con los obtenidos en la crioconservación de scalps. Se observó una mayor regeneración de brotes cuando se utilizaron meristemas apicales (Korneva *et al.* 2010a).

Crioconservación de las suspensiones celulares de banano Williams

Se establecieron suspensiones celulares embriogénicas de las variedades comerciales de banano Williams (AAA) y Morado (AAA), susceptibles a la sigatoka negra; los



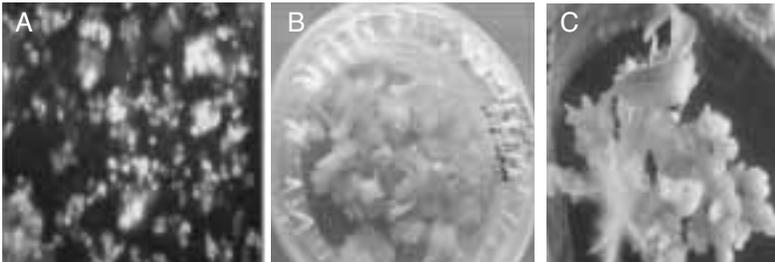
plátanos Barraganete (AAB) y Dominicó (AAB) y la variedad silvestre Calcutta - 4, altamente resistente a dicha enfermedad. Las suspensiones celulares se lograron mediante la desagregación de callos embriogénicos obtenidos a partir de la inflorescencia masculina y de micromeristemas apicales de vitroplantas (Korneva 2007, Korneva *et al.* 2010b).

Antes de realizar los experimentos de crioconservación, se comprobó el potencial embriogénico de las suspensiones celulares establecidas. Así, en 0,4 ml de células embriogénicas precipitadas, se obtuvieron 3879 embrioides de la variedad Williams y 1383 de la variedad Calcutta 4.

Suspensiones celulares, de seis meses de edad, de las variedades mencionadas fueron pretratadas con DMSO al 15 %, preparado en el medio ZZ con 180 gr/l de sacarosa para aumentar la tolerancia a la congelación y disminuir un posible daño de las células por el frío. Posteriormente, se colocó 1 ml de estas suspensiones en criotubos de 2 ml y se procedió a su congelación hasta -40 °C bajo un régimen de -1 °C/minuto. Las suspensiones luego fueron sumergidas rápidamente en nitrógeno líquido (Panis y Thinh 2001).

La descongelación de las suspensiones celulares se realizó mediante la agitación de los criotubos en un baño María termostático a 40 °C durante un minuto. El contenido de los tubos fue diluido (1:1) con el medio ZZ fresco. Las células obtenidas fueron sembradas en medio RDI para la obtención de embrioides y su posterior neoformación en plantas. Para la variedad Williams, se obtuvo 64.01 % de embrioides en comparación con el control, de los cuales el 87.15 % formaron plantas. En el caso de la variedad Calcutta 4, se obtuvo 37.4 % de embrioides en relación con el control y de estos solo el 48.25 % se desarrollaron en plantas (figura 11.3).

Figura 11.3. Diferentes etapas en la formación de plantas a partir de suspensiones celulares crioconservadas: a) evaluación de la vitalidad de las suspensiones celulares con FDA al 1 %; b) germinación de embrioides de la variedad Williams sometidos a crioconservación; c) primer brote obtenido de la suspensión celular crioconservada.



Fuente: Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Centro de Investigaciones Biotecnológicas de Ecuador (CIBE-ESPOL).
Fotografías tomadas por la Ing. Sofía Korneva de Maribona, Jefe de Investigación, 2007.

Aunque las variedades de plátano Barraganete y Dominicó pertenecen a otro grupo genómico de *Musa* spp., la obtención de embrioides después del proceso de crioconservación ha sido muy satisfactoria, similar a la obtenida en variedades del grupo AAA (Williams y Morado). Actualmente, los embrioides de estas variedades están sembrados en los medios de cultivo RDI y MPK para su neoformación en plantas.

Las plantas obtenidas de las suspensiones celulares crioconservadas de la variedad de banano Williams fueron sembradas para su adaptación bajo condiciones controladas de invernadero. Se observó menos del 2 % de mortalidad y la variación somaclonal fue menor del 5 %.

Naranjilla (Solanum quitoense Lam)

La naranjilla es un frutal andino que pertenece a la sección Lasiocarpa, un subgrupo del género *Solanum*, cuya diversidad está concentrada principalmente en la parte norte de Sudamérica (Whalen *et al.* 1981). Este cultivo prospera en los valles andinos húmedos ubicados a una altura de 1200-2100 msnm.

En el Ecuador, la naranjilla se cultiva en la zona oriental, en especial cerca de Baños, Baeza, Puyo, Archidona, Loreto, Lago Agrio, Sucúa, Zamora, Lita, Nanegalito, Los Bancos, Chiriboga, y Pallatanga; en el valle del río Quijos y en los alrededores del volcán Reventador. A lo interno del país, la naranjilla se consume en estado fresco, principalmente para la elaboración de jugos, helados y mermeladas. También se comercializa fuera del país casi exclusivamente como alimento semiprocesado (jugos, pulpa y fruta congelada), debido a la rápida perecibilidad del fruto en estado natural.

En general, esta solanácea es una especie susceptible a plagas y enfermedades presentes en el campo, lo que influye directamente en la pérdida de los sembrados y de la variabilidad genética del cultivo. Por este motivo, se han desarrollado protocolos de conservación de germoplasma, con el objetivo de mantener la diversidad biológica de la especie a largo plazo. Sin embargo, la crioconservación todavía no ha sido ampliamente explotada. Uno de los pocos esfuerzos en ese sentido lo realizó el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad San Francisco de Quito, que implementó un proyecto de investigación con el objetivo principal de estandarizar un método de crioconservación *in vitro* de yemas apicales de naranjilla (*Solanum quitoense* var. *quitoense*) por vitrificación.

Se obtuvieron plántulas de naranjilla *in vitro*, de las cuales se tomaron yemas apicales de 1.5 mm (figura 11.4a). Estas yemas fueron transferidas a medio MS semisólido con cuatro diferentes concentraciones de sacarosa (0.4 M, 0.5 M, 0.6 M y 0.7 M) e incubadas durante una semana a 23 °C ± 2 °C con un fotoperiodo de 16 horas luz, luego del cual las yemas fueron sometidas a vitrificación. Para ello, en cada criotubo se colocaron cinco yemas y 1 ml de solución de carga LS (2 M de glicerol + 0.4 M de sacarosa) (Matsumoto *et al.* 1994), y los tubos fueron incubados a 26 °C durante 25 minutos. A continuación,



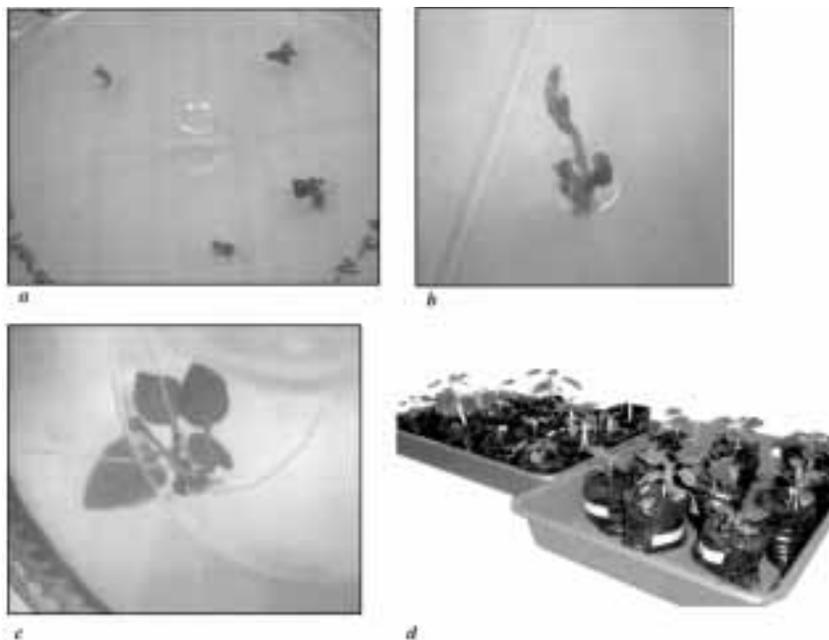
las yemas fueron colocadas en 1 ml de solución PVS 2 (30 % de glicerol, 15 % de etilenglicol, 15 % de dimetilsulfóxido y 0.4 M de sacarosa en medio MS líquido) (Sakai *et al.* 1990) e incubadas durante 60 minutos a 4 °C. Finalmente, los criotubos fueron sumergidos rápidamente en nitrógeno líquido, donde fueron almacenados durante 10 días. Para su descongelamiento, los tubos fueron extraídos del nitrógeno líquido y colocados directamente en baño María a 40 °C por 90 segundos (Wang *et al.* 2005).

En seguida, las yemas fueron lavadas con tres soluciones MS que contenían concentraciones de sacarosa decrecientes (1.2 M, 0.8 M y 0.4 M), durante 15 minutos cada vez (Wang *et al.* 2005). A continuación, las yemas fueron cultivadas en medio MS semi-sólido suplementado con 0.1 mg l⁻¹ de 6-bencilaminopurina (BAP), 0.05 mg l⁻¹ de ácido 3-indol-butírico (IBA), 0.1 mg l⁻¹ de ácido giberélico (GA3) y 30 g l⁻¹ de sacarosa (modificado de Wang *et al.* 2005) (figura 11.4b). Posteriormente, las yemas fueron incubadas durante tres días en la oscuridad a 25 °C, luego de lo cual fueron colocadas en el cuarto de cultivo por cuatro semanas (16 horas luz y 23 °C ± 2 °C), tiempo en el que brotaron y formaron plántulas. Estas fueron transferidas a medio MS basal, donde enraizaron y se desarrollaron normalmente (figura 11.4c). Finalmente, fueron transferidas a tierra para su aclimatación hasta la etapa de invernadero (figura 11.4d).

Entre los resultados obtenidos, vale resaltar que la tasa de supervivencia más elevada fue obtenida con sacarosa 0.5 M (82.3 % ± 13). Asimismo, la adición de GA₃ (0.1 mg l⁻¹) al medio de regeneración (MS con BAP 0.1 mg l⁻¹, IBA 0.05 mg l⁻¹ y sucrosa 30 g l⁻¹) (Wang *et al.* 2005) incrementó significativamente la eficiencia en el desarrollo de las yemas, alcanzando un 69 % ± 9.8 en comparación con el medio de regeneración sin la hormona mencionada (40.2 % ± 6.4). Es recomendable añadir reguladores de crecimiento exógenos, debido a que estos ayudan al explante a iniciar su desarrollo, luego de experimentar condiciones altamente estresantes durante la vitrificación (Sarkar y Naik 1998). El enraizamiento de las plántulas fue realizado en medio MS basal durante tres semanas, lo que resultó en un 100 % de éxito. La aclimatación de los individuos tomó cuatro semanas y su eficiencia fue del 85 %. Finalmente, las plantas fueron transferidas al invernadero, cuando alcanzaron 10 cm de altura y poseían al menos cinco hojas completamente expandidas (González *et al.* 2010).



Figura 11.4. Desarrollo, enraizamiento y aclimatación de yemas apicales de naranjilla luego de la crioconservación: a) yemas extraídas utilizadas para la vitrificación; b) yemas alargadas durante tres semanas luego del descongelamiento; c) plantas alargadas y enraizadas luego de seis semanas desde el descongelamiento; d) plantas aclimatadas durante cuatro semanas luego del enraizamiento.



Fuente: Laboratorio Biotecnología Vegetal, Universidad San Francisco de Quito.

Orquídea (Oncidium stenotis)

El Ecuador posee probablemente la más grande diversidad de orquídeas del mundo, debido a las singulares características de su clima. Sin embargo, actualmente la familia Orchidaceae se encuentra amenazada, pues una gran cantidad de sus especies está en peligro de extinción. Las causas principales de ello han sido la depredación selectiva y la destrucción masiva de hábitats, lo que ha traído como consecuencia la pérdida acelerada de germoplasma de un incalculable valor científico, ecológico y comercial.

La conservación de recursos fitogenéticos a bajas temperaturas constituye una valiosa herramienta para enfrentar esa situación, pues permite conservar dichos recursos a largo plazo. En este contexto, el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Escuela Politécnica del Ejército llevó a cabo un estudio sobre la germinación *in vitro* de semillas de *Oncidium stenotis* a partir de cápsulas maduras, en el que se evaluó la interacción de varias hormonas vegetales como ANA, BAP, AIA y GA3 en el medio de cultivo Knudson C, tanto



líquido como sólido, con el fin de establecer el medio más adecuado para obtener un alto porcentaje de germinación en el menor tiempo posible. Se analizó, además, la incidencia de las diferentes fases del proceso de crioconservación en la viabilidad de los protocormos, mediante el recultivo de estos. Se realizaron pruebas de tinción con TTC, pérdida de electrolitos, contenido de malondialdehído y contenido de proteínas totales, con el fin de observar la relación entre las fases del proceso de crioconservación y la supervivencia de los protocormos.

Los mejores tratamientos para la germinación *in vitro* fueron los que contenían 1.0, 1.5 y 2.0 mg l⁻¹ de AIA en medio Knudson sólido. Las fases de deshidratación y congelamiento en nitrógeno líquido fueron las más importantes en el proceso de crioconservación, debido a su efecto en la supervivencia de los protocormos. El mejor tratamiento para la recuperación de los protocormos post-congelamiento fue el que utilizó 0.5 mg l⁻¹ de BAP y 0.1 mg l⁻¹ de IBA en medio Knudson modificado con un 80 % de recuperación (figura 11.5).

La técnica de encapsulación-deshidratación es una herramienta eficiente para la crioconservación de protocormos de *Oncidium stenotis*, pues permite recuperarlos en un alto porcentaje (Jadán M. y Roura A., comunicación personal).

Figura 11.5. Plántula de *Oncidium stenotis* recuperada luego de un proceso de crioconservación vista con un estéreo microscopio.



Fuente: Roura, A. Escuela Politécnica del Ejército.

Conclusiones

La crioconservación aún constituye un campo poco explorado en el Ecuador. Sin embargo, los resultados obtenidos en los trabajos citados evidencian que las técnicas para la crioconservación de diversas especies vegetales son altamente eficientes y que en el país existen varios grupos de investigación con la capacidad para llevar a cabo investigaciones en ese campo.

Hoy se hace necesario utilizar adecuadamente y conservar la rica biodiversidad que existe en el Ecuador. Para ello es de suma importancia impulsar el desarrollo de proyectos de investigación en el campo de la crioconservación de especies vegetales, lo que sin duda contribuirá a reforzar las estrategias nacionales de desarrollo agrícola, forestal, florícola y económico.

Referencias

- Estrella, J; Muñoz, L; Tapia, C; Mazón, N; Velásquez, J. 1995. Ecuador: informe nacional para la Conferencia Técnica Internacional de la FAO sobre los Recursos Fitogenéticos. Quito, EC, INIAP.
- González, PJ; Arias, A; Arahana, V; Torres, ML. 2010. Cryopreservation of naranjilla (*Solanum quitoense* var. *quitoense*) shoot tips by vitrification. In Al-Mughrabi, K. ed. Plant science and biotechnology in North America: Focus on Canada I. The Americas Journal of Plant Science and Biotechnology 4(Special issue 2):82-86.
- IICA (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, EC). 2007. El agro y vida rural en Ecuador: comportamiento 2000-2007 y perspectivas 2008. Quito, EC.
- Korneva, S. 2007. Crioconservación de las suspensiones celulares embriogénicas de banano Williams y su posterior regeneración en plantas. In VI Encuentro Latinoamericano y del Caribe de Biotecnología Agrícola (2007, Viña del Mar, CL). Libro resúmenes #753, sección Frutales.
- _____; Maribona Kornev, R; Mendoza, J; Maribona Hernández, RH. 2004. Criopreservación de plantas de *Musa* spp. (-196 °C). Revista Tecnológica ESPOL. Memorias de las III Jornadas de Investigación ESPOL-Ciencia. Guayaquil, Ecuador.
- _____; Maribona Kornev, R; Mendoza, J; Piña, F; Maribona, RH. 2009a. Crioconservación de 14 variedades de *Musa* spp. mediante uso de los meristemos apicales y de scalps. In Congreso Internacional de Biotecnología Vegetal (2009, Ciego de Ávila, CU). Memorias.
- _____; Maribona Kornev, R; Mendoza, J; Piña, F; Ruiz, O; Maribona Hernández, RH. 2009b. Criopreservation of different biological material obtained from plants of genre *Musa* spp. In The 1st International Symposium on Criopreservation in Horticultural Species (2009, Lovaina, BE). Memoria. p. 99.
- _____; Maribona Kornev, R; Mendoza, J; Piña, F; Ruiz, O; Maribona Hernández, RH. 2010a. Crioconservación de banano y plátano mediante uso de diferentes explantes.



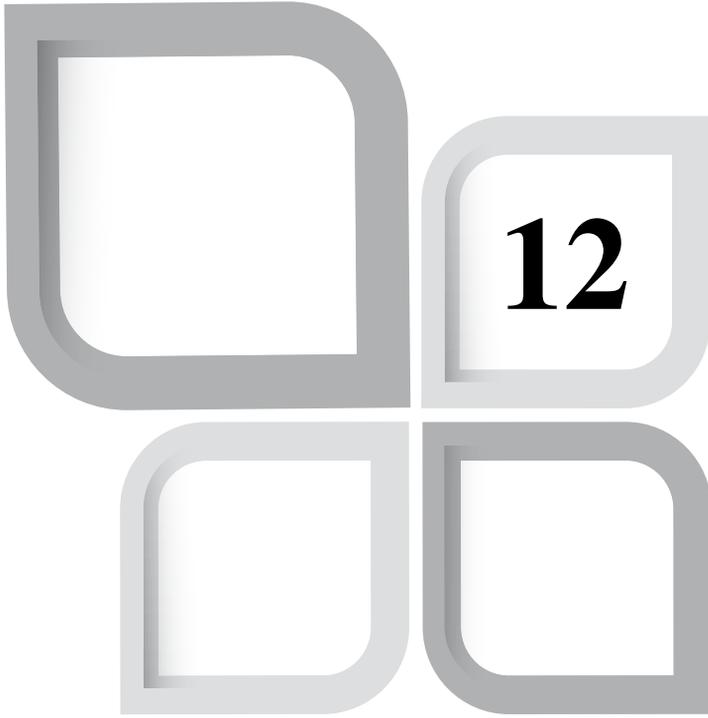
In VII Encuentro Latinoamericano y del Caribe sobre Biotecnología Agropecuaria REDBIO (2010, Guadalajara, MX).

- _____; Ortega, N; Santos, E; Peralta, EL. 2010b. Obtención de suspensiones celulares embriogénicas de *Musa* spp. a partir de diferentes explantes de la planta. In XIX Congreso Internacional ACORBAT (2010, Medellín, CO). Memoria. p. 351-356.
- Matsumoto, T; Sakai, A; Yamada, K. 1994. Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) by vitrification and subsequent high plant regeneration. *Plant Cell Reports* 13:442-446.
- Ministerio del Ambiente de Ecuador, EcoCiencia, UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza, CH). 2001. La biodiversidad del Ecuador: informe 2000. Quito, EC.
- Morillo, E; Taípe, M; Escobar, J. 2009. Catálogo nacional de laboratorios de agrobiotecnología del Ecuador. Quito, EC, INIAP, IICA. 103 p.
- Murashige, T; Skoog, F. 1962. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum* 15:473-497.
- Panis, B; Thinh, NT. 2001. Crioconservación de germoplasma de *Musa*. Quito, EC, INIBAP. Guías técnicas INIBAP #5.
- Rivera, D. 2011. Flora del sur de Ecuador se conserva en banco de germoplasma-UTPL (en línea). Informativo UTPL 4(55):8. Consultado 16 feb. 2011. Disponible en <http://www.utpl.edu.ec/comunicacion/2010/02/flora-del-sur-de-ecuador-se-conserva-en-banco-de-germoplasma-utpl/>. Loja, EC, Universidad Técnica Particular de Loja.
- Rizzo, P. 2005. El rol de banano en la economía ecuatoriana (en línea). Consultado en 2008. Disponible en www.sica.gov.ec.
- Sakai, A; Kobayashi, S; Oiyama, I. 1990. Cryopreservation of nucellar cells of naval orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Reports* 9:30-35.
- Sarkar, D; Naik, PS. 1998. Cryopreservation of shoot tips of tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) clones by vitrification. *Annals of Botany* 82:455-461.
- Sierra, R. 1999. Propuesta preliminar de un sistema de clasificación de vegetación para el Ecuador Continental. Quito, EC, Proyecto INEFAN/GEF-BIRF y EcoCiencia.
- Tapia, C; Zambrano, E; Monteros, Á. 2008. Estado de los recursos fitogenéticos para la agricultura y la alimentación en Ecuador. Quito, EC, INIAP.



- Vaca, L. 2011. Proyecto Banco de Germoplasma de Orquídeas (en línea). Consultado 18 feb. 2011. Disponible en http://www.jardinbotanicoquito.com/d_proyectos.html. Quito, EC, Jardín Botánico de Quito, Departamento de Proyectos.
- Wang, YL; Fan, MJ; Liaw, SI. 2005. Cryopreservation of in vitro grown shoot tips of papaya (*Carica papaya* L.) by vitrification. Botanical Bulletin of Academia Sinica 46:29-34.
- Whalen, MD; Costich, DE; Heiser, CB. 1981. Taxonomy of *Solanum* section Lasiocarpa. Gentes Herbarum 12:41-129.





Estado actual de la crioconservación vegetal en México

María Teresa González-Arno¹, Roberto Gámez Pastrana²,
Yolanda Martínez Ocampo³, Silvia Valdés Rodríguez⁴,
José Óscar Mascorro⁵, Antelmo Osorio Sáenz⁶,
Miriam Pastelín Solana⁷, Marina Guevara Valencia⁸,
Carlos A. Cruz Cruz⁹

1. Universidad Veracruzana (UV), Facultad de Ciencias Químicas y Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Veracruz, México, mtgarnao1@hotmail.com y/o teregonzalez@uv.mx.

2. Universidad Veracruzana (UV), Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Peñuela, Veracruz, México, gamezpas@yahoo.com.

3. Universidad Veracruzana (UV), Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Peñuela, Veracruz, México, yolimar001@hotmail.com.

4. Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados (CINVESTAV), Unidad Irapuato, Guanajuato, México, svaldes@cinvesta.ira.mx.

5. Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados (CINVESTAV), Unidad Irapuato, Guanajuato, México.

6. Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados (CINVESTAV), Unidad Irapuato, Guanajuato, México.

7. Universidad Veracruzana (UV), Facultad de Ciencias Químicas, Orizaba, Veracruz, México, mpastelin@uv.mx.

8. Universidad Veracruzana (UV), Facultad de Ciencias Químicas, Orizaba, Veracruz, México, fcqmgv@hotmail.com.

9. Universidad Veracruzana (UV), Facultad de Ciencias Químicas, Orizaba, Veracruz, México, qacarlos@yahoo.com.mx.

Introducción

México es un país dotado de una gran diversidad biológica que se combina con una amplia riqueza cultural, en donde se encuentra el 10 % del total de plantas vasculares que existen en el mundo, muchas de las cuales son endémicas. Debido a su ubicación geográfica y a la existencia de un complejo mosaico de condiciones edafoclimáticas, dicha biodiversidad se halla distribuida en diferentes hábitats y tipos de climas, que van desde cálidos húmedos hasta semiáridos. México es uno de los ocho centros de origen de plantas comestibles cultivadas (Dirzo y Koleff 2010).

A lo largo de cientos de años, los 59 grupos indígenas asentados en México han aprovechado y aprendido a manejar los recursos bióticos que los rodean. Se estima que agricultores prehispánicos domesticaron, total o parcialmente, más de 118 especies de plantas económicamente importantes. Las culturas mesoamericanas, además de que han domesticado una gran cantidad de especies, por tradición han usado las plantas silvestres y cultivadas con fines alimenticios, terapéuticos, textiles, religiosos, de ornato y de construcción (Dirzo y Koleff 2010).

A pesar de los escenarios que se enfrentan por el cambio climático y el estrechamiento de la base genética de las variedades mejoradas, actualmente persiste una enorme variabilidad biológica en el territorio mexicano, que constituye un reservorio importante de soluciones a corto, mediano y largo plazos. Ello representa no solo un privilegio, sino también una gran responsabilidad, porque genera la obligación de buscar alternativas seguras para conservar ese tesoro natural y prevenir la pérdida del germoplasma. La diversidad ambiental ha permitido, asimismo, que prosperen con éxito numerosas especies introducidas en el país, que se han convertido en fundamentales para el desarrollo agrícola y forestal de muchas regiones. Actualmente son varias las instituciones mexicanas que han desarrollado proyectos mediante los cuales se han creado bancos de germoplasma en que se conservan principalmente especies arbóreas de zonas áridas, templadas y tropicales, maíz (*Zea spp.*) y chile (*Capsicum spp.*), entre otras. Esencialmente, todas esas colecciones se resguardan en bancos de semillas y/o colecciones en campo.

Grupos de instituciones públicas y privadas han aplicado técnicas de cultivo de tejidos que les han permitido conservar, mediante el uso de métodos biotecnológicos, reducidas colecciones de germoplasma, para lo cual han utilizado la propagación *in vitro*, sistemas de biorreactores de inmersión temporal y/o modificaciones para lograr el crecimiento lento de los cultivos y, así, conservarlos a corto y mediano plazos.

En el campo de la crioconservación vegetal, los avances han sido más recientes y hasta la fecha solo han estado dirigidos al desarrollo de la investigación científica. Sin embargo, ya se han dado pasos importantes para iniciar la implementación de esta tecnología y se espera que en un futuro cercano se logren resguardar a largo plazo recursos genéticos originarios de relevancia agroalimentaria, contribuir a la protección de las especies amenazadas, prevenir su pérdida y aportar material genético de utilidad



que brinde mayores opciones a los programas de mejora, de cruzamientos y de obtención de nuevas variedades.

En ese sentido, a finales de 2008 se proyectó la creación del Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG), ubicado en las instalaciones del Centro Experimental del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), en Tepatitlán de Morelos, estado de Jalisco. Dicha institución está diseñada para preservar la riqueza genética de los países de América Latina y de otras regiones del mundo, por lo que cuenta con capacidad y tecnología de vanguardia que será utilizada para conservar hasta tres millones de muestras por largos periodos de tiempo y resguardará, en un solo espacio, muestras acuícolas, agrícolas, forestales, microbianas y pecuarias. La provisión de colaboración internacional a la sección de crioconservación de plantas del CNRG se ha iniciado fundamentalmente con el apoyo y la asesoría técnica que brindan reconocidos especialistas de Japón (Carlos Castillo, 2011, comunicación personal).

En México, probablemente desde principios de los años noventa las investigaciones criogénicas en plantas comenzaron a llamar la atención de biólogos y agrónomos adscritos a jardines botánicos, universidades o centros de investigación. Sin embargo, no consta la difusión de ningún trabajo realizado en este sentido hasta el año 1997, cuando en la revista BIOTAM se publica un artículo sobre la utilización de un régimen lento de congelación para almacenar en nitrógeno líquido callos embriogénicos de cítricos (González-Arno *et al.* 1997). Estas investigaciones se realizaron en el marco de un proyecto apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) otorgado a la Universidad Autónoma de Tamaulipas (UAT), el cual se llevó a cabo en colaboración con el Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC), de La Habana, Cuba.

Los trabajos en criogenia vegetal comenzaron a consolidarse en el país en 1998, liderados por la Universidad Veracruzana (UV). La colaboración internacional igualmente realizada con Cuba contribuyó a la formación doctoral de especialistas mexicanos en ese campo. En la actualidad, en las facultades de Ciencias Químicas de Orizaba y de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de Peñuela, ambas pertenecientes al campus Córdoba-Orizaba de la UV, se desarrollan permanentemente líneas de investigación dirigidas a profundizar en aspectos básicos y tecnológicos de la crioconservación en plantas. Además, se han ampliado las relaciones de colaboración, intra e interinstitucionales a nivel nacional, lo que ha permitido ejecutar nuevos proyectos conjuntos orientados al estudio de eventos termofísicos por calorimetría diferencial de barrido en vinculación con el Instituto de Ciencias Básicas de la UV, al análisis proteómico diferencial con el Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Irapuato y a la aplicación de técnicas de transformación genética para incrementar la tolerancia a la crioconservación, con el apoyo de la Universidad Autónoma Chapingo. En ese contexto, la mayoría de los proyectos de investigación y desarrollo de la UV han contado con el apoyo del CONACyT y del Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos (SINAREFI), con la perspectiva de crear una red temática que involucre en primera instancia países de Centroamérica y que se extienda progresivamente a otros países de la región.



A nivel internacional, la mayoría de actividades de intercambio de experiencias y de difusión científica se han realizado hasta la fecha en colaboración con el *Institute de recherche pour le développement* (IRD) de Montpellier, Francia, mediante la organización de cursos y otras actividades de capacitación para especialistas mexicanos y estudiantes de programas de posgrado, así como la publicación y presentación conjunta de trabajos en eventos especializados.

De manera general, se puede resumir que en el área de la crioconservación de plantas, las investigaciones realizadas en México se han orientado en tres direcciones: 1) adaptación y/o refinamiento de protocolos descritos para especies que ya han sido crioconservadas; 2) estudios básicos sobre aspectos físico-químicos relacionados con agentes crioprotectores y procedimientos criogénicos; y 3) desarrollo de protocolos para especies en las que no existen antecedentes de crioconservación.

Adaptación y/o refinamiento de protocolos de crioconservación

Piña (Ananas comusus (L.) Merr.)

Se realizaron modificaciones a los protocolos de vitrificación originalmente descritos por González-Arnao *et al.* (1998) y Martínez-Montero *et al.* (2002) para crioconservar ápices de plantas *in vitro* de diferentes variedades de piña. Se logró reducir significativamente el tiempo requerido de exposición (de siete horas a 60 minutos) a la solución vitrificadora para garantizar una adecuada deshidratación antes del enfriamiento y se obtuvieron altos niveles de supervivencia con dos variedades de esta especie (Gámez-Pastrana *et al.* 2004). Utilizando como base la metodología de encapsulación-vitrificación, los tejidos aislados de vitroplantas se encapsularon en alginato de calcio y, previo a efectuar el tratamiento de carga y la deshidratación con las PVS (PVS2 y PVS3), las muestras se sometieron durante 2 días a precultivos en medios líquidos que contenían sacarosa y prolina.

Las condiciones que permitieron obtener los mejores resultados (54 % de supervivencia con la variedad MD-2 y 83 % con la variedad Puerto Rico), contemplaron la encapsulación de los ápices de piña en alginato de calcio al 3 %, el precultivo en medio líquido con 0.16 M de sacarosa + 0.3 M de prolina por 24 horas, seguido por 24 horas adicionales en medio líquido con 0.3 M de sacarosa + 0.3 M de prolina. Posteriormente se realizó un tratamiento de carga con la solución de 0.75 M de sacarosa + 1 M de glicerol por 25 minutos y la exposición a la PVS3 a 0 °C durante 60 minutos. La inmersión de las muestras al nitrógeno líquido se realizó de forma rápida y en crioviales que contenían los tejidos encapsulados, además de 1 mL de la solución vitrificadora fresca. Para el retorno a la temperatura de cultivo normal, se empleó un baño María a +40 °C y el lavado de los crioprotectores se realizó en medio líquido suplementado con sacarosa a 1.2 M por 30 minutos. Las muestras se recultivaron durante la primera semana a la oscuridad, luego de lo cual fueron transferidas a las condiciones usuales de iluminación (Gámez-Pastrana *et al.* 2004).



Caña de azúcar (Saccharum spp.)

Se realizó la crioconservación de ápices de vitroplantas de caña de azúcar, para lo cual se utilizó el protocolo de encapsulación-deshidratación descrito por González-Arno *et al.* (1993). Durante el proceso criogénico, se estudió el efecto del tamaño de los ápices en la ocurrencia de los eventos termofísicos a bajas temperaturas en el complejo cápsula-tejido. También se evaluaron dos tiempos de reticulación (5 y 20 minutos) de las cápsulas de alginato de calcio para la inmovilización de los tejidos y se evaluó su influencia en los fenómenos de transporte de masas durante el precultivo en medio líquido con sacarosa y la desecación con gel de sílice hasta alcanzar de 20 % a 25 % de humedad en las cápsulas expresado en base fresca.

Se evidenció que el tamaño de los ápices influyó en el comportamiento térmico del sistema. Los tejidos de menores dimensiones garantizaron mayor estabilidad del sólido amorfo registrado por calorimetría diferencial de barrido, pero también presentaron una menor capacidad para desarrollarse como órgano reproductivo independiente. Por lo tanto, para lograr una mejor recuperación del material crioconservado, es más recomendable utilizar tejidos de caña de azúcar de 3-4 mm, independientemente de los posibles gradientes térmicos que se generen en el sistema íntegro cápsula-tejido. Por otro lado, el tiempo de reticulación de la matriz de alginato de calcio influyó significativamente en el incremento de sólidos, en la pérdida de agua, en la velocidad de deshidratación y en las propiedades térmicas de la cubierta sintética. El período de 20 minutos fue el que permitió obtener los mayores niveles de supervivencia en las tres variedades ensayadas de caña de azúcar (Martínez-Ocampo *et al.* 2006).

Crisantemo (Dendranthema grandiflorum Kitam.)

El crisantemo es una planta que ha sido sometida a procesos de crioconservación con diferentes enfoques y procedimientos criogénicos y mediante la utilización de diversas especies, variedades e híbridos afines. Se han ensayado desde los métodos convencionales con un régimen de congelación lento, hasta diversos protocolos basados en las técnicas de la vitrificación, la encapsulación-deshidratación y la gota-vitrificación. También se han realizado varios estudios comparativos de algunas de esas mismas metodologías (Osorio-Saenz *et al.* 2011).

Con la finalidad de investigar el efecto de la acumulación intracelular de un osmolito compatible como el azúcar trehalosa y evaluar su repercusión en la respuesta de tolerancia ante la crioconservación en tejidos de un cultivar de crisantemo susceptible al frío, se aplicaron técnicas de transformación genética por agroinfección y se produjeron líneas transgénicas de plantas pertenecientes a la variedad Indianápolis (Valle-Sandoval 2008). Se seleccionaron dos líneas modificadas (Línea 1: 35S-8 y Línea 2: 35S-19) con niveles de acumulación endógena de trehalosa equivalentes a 26.1 ng.mg⁻¹ y 107.7 ng.mg⁻¹ en peso fresco, respectivamente, y se multiplicaron *in vitro*. A partir de vitroplantas de ambas líneas transgénicas y de vitroplantas no transgénicas, las cuales presentaban un contenido de trehalosa en base fresca igual a 20 ng.mg⁻¹, se aislaron meristemos apicales

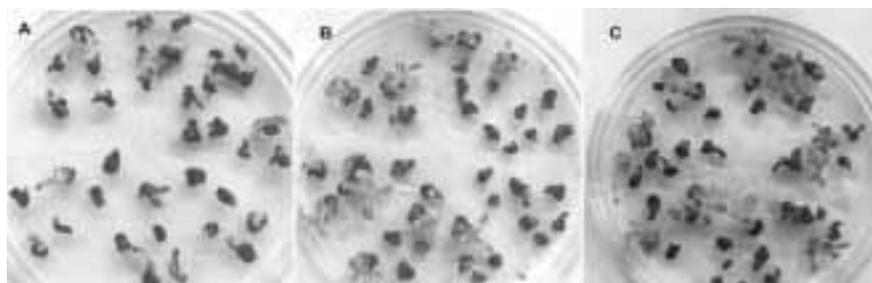


que se crioconservaron siguiendo la metodología básica de vitrificación y utilizando dos soluciones vitrificadoras (PVS2 y PVS3).

Los niveles más elevados de regeneración a partir de material crioconservado se obtuvieron después del precultivo por cuatro días en medio semi-sólido suplementado con 0.3 M de sacarosa, el tratamiento de carga con 0.4 M de sacarosa + 2 M de glicerol durante 20-30 minutos y la exposición a temperatura ambiente por 40 minutos, a cualquiera de las dos soluciones PVS antes de la inmersión rápida al nitrógeno líquido (González-Arnao *et al.* 2011b). Los tejidos de ambas líneas transgénicas resultaron más tolerantes a la crioconservación que los provenientes de plantas no transformadas y, en especial, los aislados de la línea con mayor contenido endógeno de trehalosa. La regeneración de nuevos brotes (figura 12.1) ocurrió de forma directa y fue 1.5 veces mayor a partir del material transgénico (L1: 48 % y L2: 67 %), que del control no transformado (33 %) (Osorio-Saenz *et al.* 2011).

Una observación interesante de este trabajo fue el hecho de que resultaron más tolerantes a la crioconservación los meristemos apicales aislados de las plantas transgénicas correspondientes a la Línea 1, con un nivel bajo de acumulación de trehalosa (26 ng.mg⁻¹), que los de las plantas controles no transformadas, a pesar de tener una acumulación intracelular muy similar (20 ng.mg⁻¹) de trehalosa. Estos resultados indican que la acumulación endógena de la trehalosa necesita ser inducida o que su sistema de transportación en las células debe ser activado, para que potencialice un mejor efecto (González-Arnao *et al.* 2011b).

Figura 12.1. Recuperación de meristemos apicales de crisantemo después de la crioconservación, a los 45 días de recultivo: A) control no transformado genéticamente, B) línea transgénica 1 (L1), y C) línea transgénica 2 (L 2).



Fuente: Osorio-Sáenz *et al.* 2011.

Estudio de eventos termofísicos asociados a técnicas de crioconservación

Con la finalidad de evaluar la influencia de diferentes tratamientos crioprotectores de deshidratación en protocolos criogénicos que involucran la encapsulación del material biológico, como son la técnica de encapsulación-deshidratación y la de encapsulación-

vitrificación, en la Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la UV se desarrollaron estudios de transferencia de masas y por calorimetría diferencial de barrido, controlando valores de peso seco, contenido total de agua, contenido de agua congelable y transiciones térmicas en cápsulas vacías de alginato de calcio.

Con el procedimiento de encapsulación-deshidratación, se realizó el precultivo de las cápsulas en medio líquido suplementado con 0.75 M de sacarosa, seguido por la desecación en gel de sílice a temperatura ambiente. Se comprobaron dos procesos de transferencia de masas: la cápsula pierde cerca del 80 % de su contenido inicial de agua, mientras que su peso seco se triplica por el efecto del ingreso de la sacarosa. La dinámica de ambos procesos alcanzó un equilibrio tras aproximadamente seis horas de tratamiento, por lo que el empleo de tiempos de precultivo más prolongados, desde el punto de vista fisicoquímico, no ejerce ningún efecto y solo suele extenderse por cuestiones de tipo práctico (González-Arnao y Engelmann 2006).

Por otra parte, el precultivo es responsable de una importante reducción en la temperatura de fusión, en el cambio de entalpía y en el contenido de agua congelable; sin embargo, el precultivo por sí solo no evita la cristalización del agua congelable remanente. En cambio, cuando ocurre la desecación de las cápsulas, el contenido de agua se reduce a niveles muy bajos (cerca de 0.2 g agua/g peso seco) y permite que las cápsulas experimenten una transición vítrea a temperaturas de entre los -40 °C y los -30 °C. Colateralmente los resultados demostraron que las cápsulas no precultivadas en medio con sacarosa pierden agua a una mayor velocidad y experimentan una contracción volumétrica más severa que las precultivadas y que, además, en ellas no se presentan transiciones vítreas a temperaturas superiores a -70 °C. Lo anterior demuestra que el precultivo es necesario para que los eventos térmicos que potencialmente evitan la cristalización del agua presente en los materiales protectores ocurran lo más temprano posible.

Cuando después de la encapsulación se realizaron los tratamientos de carga y de exposición a las soluciones vitrificadoras vegetales (PVS2 y PVS3) bajo el procedimiento de encapsulación-vitrificación, se observó que durante la carga las cápsulas reducen su contenido de humedad e incrementan su peso seco a valores muy similares a los observados en la etapa de precultivo de la técnica de encapsulación-deshidratación, solo que en un periodo de tiempo mucho menor (20 minutos). En esta etapa se produce la eliminación de cerca del 40 % del contenido original de agua congelable y, durante la fase de deshidratación con las PVS, los resultados mostraron que, independientemente de las condiciones empleadas (temperatura de exposición y composición de la solución vitrificadora), después de 30 minutos se elimina la totalidad del agua congelable contenida en la cápsula. No obstante, la composición de la solución vitrificadora afecta la velocidad con la que esto ocurre, de manera que la PVS2 remueve con mayor facilidad el agua congelable que la solución PVS3. De la misma forma, la reducción en la temperatura de exposición (de 25 °C a 0 °C) hace más lenta la eliminación del agua congelable y disminuye la migración de solutos hacia la cápsula (Gámez-Pastrana *et al.* 2011).



Actualmente se continúan realizando otros estudios complementarios del proceso de encapsulación, utilizando otras técnicas analíticas como la espectrometría de absorción atómica y la cromatografía de gases (González-Arnao *et al.*, resultados no publicados).

Desarrollo de protocolos de crioconservación para nuevas especies

Vainilla (Vanilla planifolia)

La vainilla es una orquídea originaria de Centroamérica y del sur de México con gran importancia mundial para la industria alimentaria y de fragancias; a pesar de ello, su reserva genética y su hábitat natural están hoy en día amenazados y en peligro de extinción. El genofondo primario de *Vanilla planifolia*, la de mayor importancia económica, es estrecho y las áreas de megadiversidad localizadas en el sudeste mexicano y Centroamérica se encuentran igualmente afectadas (González-Arnao *et al.* 2009). Los problemas con la fuente genética primaria de este cultivo advierte la necesidad imperiosa de establecer tecnologías seguras para preservar el germoplasma de la vainilla.

En el marco de un proyecto de fondos mixtos CONACYT-Gobierno del Estado de Veracruz (FOMIX 37551), se iniciaron los estudios para crioconservar ápices de vainilla en la Facultad de Ciencias Químicas de Orizaba, adscrita a la UV. Se ensayaron diferentes procedimientos criogénicos como la encapsulación-deshidratación, el método de la vitrificación y el protocolo derivado de este último conocido como gota-vitrificación. Se utilizaron ápices aislados de plantas *in vitro* subcultivadas cada dos meses en un medio MS (Murashige y Skoog 1962) suplementado con 1 mg L⁻¹ de ácido indolbutírico (AIB), 2 mg L⁻¹ de bencilaminopurina (BAP), 30 g/L⁻¹ de sacarosa y solidificado con agar. Las condiciones que permitieron obtener los primeros resultados de supervivencia y regeneración de nuevos brotes después de la crioconservación contemplaron el precultivo por un día de los ápices recién explantados en el medio MS suplementado con 0.3 M de sacarosa, seguido por un tratamiento de 20-30 minutos en la solución de carga compuesta por el medio MS suplementado con 0.4 M de sacarosa y 2 M de glicerol, la exposición de los tejidos a la solución vitrificadora PVS3 durante 30 minutos y el enfriamiento ultra rápido mediante la colocación de material biológico en gotas de PVS3 sobre pequeñas láminas de papel aluminio que fueron inmersas directamente en nitrógeno líquido. La descongelación y la descarga de los crioprotectores se efectuaron a temperatura ambiente, manteniendo los ápices durante 15 minutos en abundante solución de medio MS con 1.2 M de sacarosa. El recultivo para la recuperación de los ápices crioconservados se realizó en el medio normal de propagación. Las muestras se mantuvieron durante la primera semana en la oscuridad, luego de lo cual fueron transferidas a las condiciones de fotoperiodo habitual (González-Arnao *et al.* 2009). La supervivencia de los tejidos de *Vanilla planifolia* después de haber sido sometidos a la crioconservación fue de 30 %, con un 10 % de regeneración de nuevos brotes; sin embargo, nunca antes se había reportado ni logrado la crioconservación de germoplasma en esta especie (figura 12.2).



Actualmente se continúa trabajando para garantizar una mejor protección de los tejidos, dado que los resultados, además de bajos, son erráticos y, por consiguiente, poco reproducibles. En este sentido y con la finalidad de identificar a nivel de proteínas, posibles afectaciones inducidas durante el proceso criogénico, se iniciaron estudios proteómicos comparando muestras de ápices de vainilla en dos etapas del protocolo previamente descrito: ápices después de un día de precultivo en medio sólido con 0.3 M de sacarosa y ápices sometidos al precultivo en sacarosa, al tratamiento de carga y expuestos a la solución PVS3 durante 30 minutos. Los primeros resultados del análisis comparativo realizado por electroforesis bidimensional permitieron identificar alrededor de 206 proteínas consistentemente reproducibles, de las cuales 15 mostraron cambios cuantitativos en el porcentaje de volumen (13 aumentaron su nivel de expresión y dos lo disminuyeron), así como cambios cualitativos (una inducción y una supresión) en dos proteínas (González-Arno *et al.* 2011a). Los trabajos en curso sobre la identificación de estas proteínas por espectrometría de masas (Valdés-Rodríguez *et al.*, en preparación) permitirán seguir avanzando en el conocimiento de los procesos bioquímicos y moleculares asociados a la tecnología de la crioconservación, así como potenciar la optimización del protocolo que permita el almacenamiento seguro en nitrógeno líquido de los tejidos de la vainilla. Asimismo, se aportará información de interés para enfrentar situaciones similares con otras especies que también presenten un comportamiento recalcitrante frente a la criogenia.

Figura 12.2. Recuperación y aclimatación de brotes de vainilla (*Vanilla planifolia*) regenerados a partir de ápices crioconservados mediante el protocolo de gota-vitrificación.



Fuente: González-Arno *et al.* 2009.

***Heliopsis longipes* Gray**

La *Heliopsis longipes* es una planta que se utiliza en la herbolaria y la medicina tradicional de México y otros países como anestésico local, suplemento alimentario y biocida de microorganismos nocivos para la agricultura. En años recientes, se ha comprobado también su incidencia favorable en el desarrollo del sistema radicular de plantas (Ramírez-Chávez *et al.* 2004). Su importancia radica en la capacidad de producir y acumular metabolitos



secundarios (alcamidas) mayormente en sus raíces, pero como muchas otras especies, sus poblaciones silvestres y variedades locales están severamente amenazadas de extinción.

Mediante multiplicación *in vitro*, se creó una colección abundante de vitroplantas. Se observó que, durante el proceso de propagación, se formaba una masa de callo en la parte inferior de las plantas, alrededor de la zona donde se realizaba el corte y que estaba en contacto directo con el medio de cultivo. Por consiguiente, se aprovecharon los callos regenerados y se estudió la crioconservación de meristemos apicales y la de los callos embriogénicos obtenidos. Para los trabajos con meristemos, los tejidos se aislaron de las vitroplantas y se sometieron a los procedimientos de encapsulación-deshidratación y de gota-vitrificación. La recuperación del material crioconservado por encapsulación-deshidratación fue errática a través de callos e inferior al 30 %. Los meristemos sometidos al procedimiento de gota-vitrificación se trataron con soluciones de carga compuestas por 1 o 2 M de glicerol combinadas con sacarosa, trehalosa o con la mezcla de ambos azúcares durante 20 minutos. Los tejidos se congelaron directamente en nitrógeno líquido inmersos en gotas de las soluciones vitrificadoras PVS2 o PVS3 sobre láminas de papel de aluminio. En todos los protocolos en que se utilizó la solución PVS3, se logró una supervivencia de los tejidos superior al 50 %, pero igualmente formaron callo, por lo que resulta necesario optimizar las condiciones de cultivo tanto para antes de la crioconservación como para después de esta (González-Arno *et al.* 2007).

El protocolo criogénico recomendado para la crioconservación de callos de *H. longipes*, con el que se obtuvo hasta un 87 % de recuperación, comprendió la selección inicial del material con apariencia friable y de coloración amarillo-verdosa, seguida por el tratamiento con una solución a 7.5 % de dimetilsulfóxido (DMSO) durante una hora a 0 °C y la aplicación de un régimen de congelación lento a 1 °C min⁻¹ hasta -40 °C, antes de la inmersión rápida al nitrógeno líquido de los crioviales con las muestras, compuestas por 1 mL de la solución crioprotectora y pequeñas porciones de callo. Durante el descenso de la temperatura en el proceso de congelación, la inducción de la nucleación heterogénea o siembra de cristales se realizó a -10 °C, sin detener el enfriamiento progresivo hasta -40 °C. La descongelación se llevó a cabo de forma rápida en baño María a +40 °C y el lavado posterior de los crioprotectores se hizo con medio MS líquido, colocando los callos sobre papel filtro para inducir una difusión más rápida de la solución. El recultivo de los callos se realizó en medio sólido, para lo cual los cultivos se mantuvieron en la oscuridad (Santiago-Jiménez 2011).

Trabajos en perspectivas

A pesar de que muchos de los trabajos de crioconservación vegetal que paulatinamente se han venido desarrollando en distintas instituciones mexicanas no están reportados, se ha podido constatar, a través de las presentaciones realizadas en eventos científicos y la elaboración de tesis de licenciatura y posgrado, que en el país se está investigando la crioconservación de distintas especies endémicas de orquídeas y de varios cultivos de importancia agroindustrial.



Recientemente se han dado los primeros pasos en la realización de estudios en el área de la crioterapia, que consiste en aplicar técnicas de crioconservación de tejidos meristemáticos para el saneamiento de plantas. El proyecto propuesto contempla la erradicación del virus del mosaico en caña de azúcar y chayote (*Sechium edule* spp.). Este es un tema totalmente nuevo en México y en general para estos cultivos, de los cuales hasta el momento no existe ningún reporte sobre crioterapia.

Conclusiones

El desarrollo de la crioconservación vegetal en México ha alcanzado mayor auge en los últimos 10 años, tal como lo demuestra la participación de un buen número de especialistas que complementan, con diferentes enfoques tecnológicos, la investigación en ese campo, así como la iniciativa de crear el Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG), en cuyo marco se contempla una unidad encargada de la asimilación y aplicación de las técnicas criogénicas.

Sin embargo, aún es insuficiente la difusión de información sobre el tema mediante publicaciones científicas internacionales. Ello, por una parte, no permite conocer todos los trabajos que se llevan a cabo en el país en el campo de la crioconservación vegetal y, por otra, limita la integración de especialistas en una red temática que potencie la colaboración nacional e internacional.

Es de suma importancia lograr más apoyo para la realización de nuevos proyectos en esa área, mediante los cuales se pueda adquirir un conocimiento más profundo de muchas especies nativas y garantizar la implementación, en un futuro cercano, de protocolos criogénicos eficientes que permitan resguardar a largo plazo la mayor diversidad genética posible.

Referencias

- Dirzo, R; Koleff, P. 2010. La biodiversidad: personalidad y colorido del planeta. Revista Ciencia y Desarrollo 236(247):42-47. México D.F., MX, CONACyT.
- Gómez-Pastrana, R; González-Arno, MT; Martínez, Y; Engelmann, F. 2011. Thermal events in calcium alginate beads during encapsulation-dehydration and encapsulation-vitrification protocols. Acta Horticulturae 908:47-54.
- _____; Martínez-Ocampo, Y; Beristain, CI; González-Arno, MT. 2004. An improved cryopreservation protocol for pineapple apices using the encapsulation-vitrification. CryoLetters 25:405-414.
- González-Arno, MT; Cárdenas-Lara, MA; Urra, C. 1997. Crioconservación de callos embriogénicos de *Citrus sinensis* var. Pineapple. Revista BIOTAM 8(23):21-32. Victoria, Tamaulipas, MX, Universidad Autónoma de Tamaulipas.

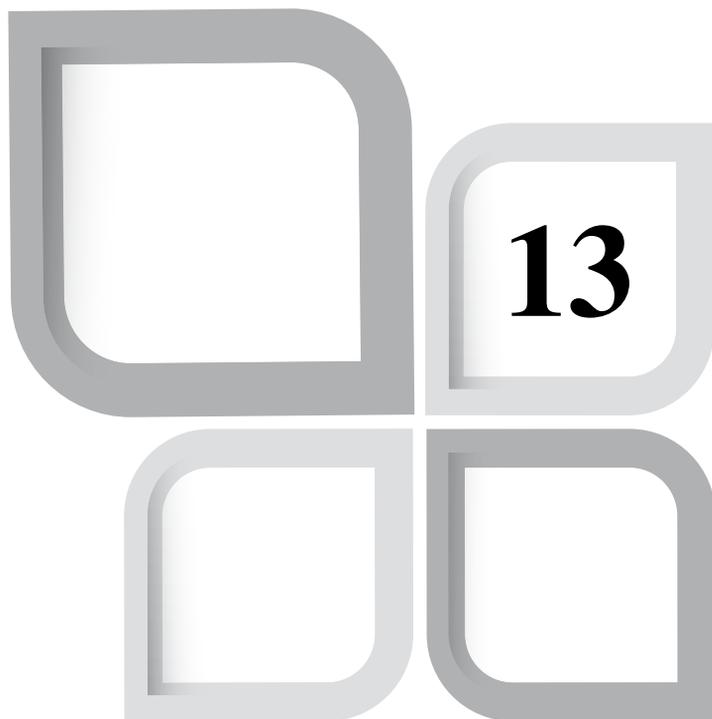


- _____; Durán, B; Valdés-Rodríguez, S; Jiménez, B; Guerrero, A; Lázaro-Vallejo, C. 2011a. Cryopreservation and proteomic analysis of vanilla (*V. planifolia*) apices treated with osmoprotectants. *Acta Horticulturae* 908:67-72.
- _____; Engelmann, F. 2006. Cryopreservation of plant germplasm using the encapsulation-dehydration technique: review and case study on sugarcane. *CryoLetters* 27(3):155-168.
- _____; Engelmann, F; Huet, C; Urra, C. 1993. Cryopreservation of encapsulated apices of sugarcane: effect of freezing procedure and histology. *CryoLetters* 14:303-308.
- _____; Lazaro-Vallejo, CE; Engelmann, F; Gámez-Pastrana, R; Martínez-Ocampo, Y; Pastelin-Solano, MC; Diaz-Ramos, C. 2009. Multiplication and cryopreservation of vanilla (*Vanilla planifolia* 'Andrews'). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 45:574-582.
- _____; Márquez, M; Urra, C; Martínez-Montero, M; Engelmann, F. 1998. Cryopreservation of pineapple (*Ananas comosus*) apices. *CryoLetters* 19:375-382.
- _____; Mascorro-Gallardo, JO; Osorio-Saenz, A; Valle-Sandoval, MR; Engelmann, F. 2011b. Improvements in tolerance to cryopreservation using shoot-tips of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* Kitam.) from genetically modified plants that accumulate trehalose. *Cryogenics: theory, processes, and applications*. Ed. AE Hayes. Nueva York, US, Nova Science Publishers. p. 137-148.
- _____; Román Ángeles, Y; Alvarado García, JL; Lázaro Vallejo, C; Guevara Valencia, M; Molina Torres, J. 2007. Estudios preliminares para la crioconservación de ápices de plantas *in vitro* de *Heliopsis longipes* Gray. *In Simposio de Recursos Genéticos para América Latina y el Caribe (SIRGEALC) (2007, México D.F., MX)*.
- Martínez-Montero, M; González-Arno, MT; Martínez, J; Engelmann, F. 2002. Cryopreservation of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr) apices and calluses. *Pineapple News* no. 9:17.
- Martínez-Ocampo, Y; González-Arno, MT; Gámez-Pastrana, R; Beristain, CI; Molina Torres, J. 2006. Crioconservación de germoplasma de caña de azúcar. Estudio del efecto de la deshidratación. *In Avances en la investigación agrícola, pecuaria, forestal y acuícola en el trópico mexicano*. Libro científico n.º 3. Xalapa, Veracruz, MX, Atlántida Casa de Ciencia y Cultura, S.A. de C. V.
- Murashige, T; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.



- Osorio-Saenz, A; Mascorro-Gallardo, JO; Valle-Sandoval, MR; González-Arno, MT; Engelmann, F. 2011. Genetically engineered trehalose accumulation improves cryopreservation tolerance of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* Kitam.) shoot-tips. *CryoLetters* 32(6):477-486.
- Ramírez-Chávez, E; López-Bucio, J; Herrera-Estrella, L; Molina-Torres, J. 2004. Alkamides isolated from plants promote growth and alter root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 134:1056-1058.
- Santiago Jiménez, VC. 2010. Efecto de la velocidad de enfriamiento en la criopreservación de callos de *Heliopsis longipes*. Tesis de Licenciatura para Químico-Farmacéutico-Biólogo (QFB). Orizaba, MX, Universidad Veracruzana – Región Córdoba-Orizaba, Facultad de Ciencias Químicas.
- Valle-Sandoval, MR. 2008. Obtención de plantas transgénicas de crisantemo (*Dendranthema x grandiflorum* Kitam) cv Indianapolis que acumulan trehalosa. Tesis de Doctorado en Ciencias Hortícolas. Chapingo, Estado de México, MX, Instituto de Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo. 137 p.





Crioconservación de recursos genéticos de tubérculos y raíces andinos en el Perú

Ana Panta¹, Brenda Zea², Dino Sánchez³,
David Tay⁴, William Roca⁵

1. Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú, apanta@cgiar.org
2. Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú, b.zea@cgiar.org
3. Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú, d.favio666@hotmail.com
4. Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú, dt26012012@gmail.com
5. Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú, wroca@cgiar.org

Introducción

El Perú, como otros países andino-amazónicos, comprende regiones eco-geográficas muy diferentes, las que proveen un extraordinario y amplio rango de condiciones para la proliferación de una rica flora y fauna. Como parte de la región andina, el Perú es centro de origen y diversidad de numerosas especies que sostienen la actual producción alimenticia mundial y la industria. De hecho, más de la tercera parte (35.6 %) de los cultivos alimenticios e industriales del mundo proviene de la región andino-amazónica (CAN 2002).

Solo en el complejo territorio peruano se ha reportado la existencia de 28 de los 32 climas reconocidos en el mundo y 84 de las 117 zonas microclimáticas encontradas en el mundo (Brack, 2003). En territorio peruano se han domesticado cinco especies animales y 182 especies vegetales, de las cuales aproximadamente 80 son de gran importancia agrícola (CAN 2002). Dentro de dicha biodiversidad, al menos 15 especies son tubérculos y raíces de uso alimenticio de gran importancia socio-económica (Consortio GTZ/FUNDECO/IE 2001).

En el III Taller Regional “Conservación ex situ”, realizado en el Ecuador en 2001, Zúñiga reportó que en el Perú existen 42 bancos de germoplasma nacionales que albergan aproximadamente 12 246 accesiones de 11 tipos de cultivos, 3397 de las cuales son de raíces y tubérculos (Consortio GTZ/FUNDECO/IE 2001). Una gran cantidad de especies vegetales originadas de la región andina es conservada y investigada en los centros internacionales pertenecientes al Grupo Consultivo para la Investigación Agrícola Internacional (CGIAR), como el Centro Internacional de la Papa (CIP), en Lima, el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), en Colombia, y el Centro Internacional para el Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT), en México. En el cuadro 13.1 se presenta un inventario de los recursos fitogenéticos que esos tres centros conservan.

Conservación de tubérculos y raíces andinos en el Perú

Uno de las principales funciones del CIP es desarrollar tecnologías para la conservación de recursos fitogenéticos. El CIP ha integrado las colecciones más grandes de recursos genéticos de los tres tubérculos más importantes de la zona alto-andina: papa (*Solanum* spp.), oca (*Oxalis tuberosa*) y ulluco (*Ullucus tuberosus*). El CIP también mantiene una colección de camote (*Ipomoea batatas*), una raíz tuberosa de gran diversidad en la costa norte peruana, donde es altamente consumida por los pobladores de bajos recursos, la cual contiene recursos colectados en la zona andina, Centroamérica, Asia y África. El mandato del CIP también incluye la conservación de otros seis cultivos de raíces y tubérculos: maca (*Lepidium meyenii*), mashua (*Tropaeolum tuberosum*), yacón (*Smallanthus sonchifolius*), arracacha (*Arracacia xanthoriza*), mauka (*Mirabilis expansa*), achira (*Canna edulis*) y ahípa (*Pachyrhizus ahípa*). La conservación de estos últimos es compartida con instituciones nacionales como universidades y el Instituto Nacional de Investigación Agraria (INIA). En el CIP, las colecciones de germoplasma de los cultivos mencionados se conservan en el campo, en invernaderos, en forma de semilla botánica en cámaras frías e *in vitro* mediante la aplicación de técnicas de cultivo de tejidos bajo crecimiento lento.



Cuadro 13.1. Recursos fitogenéticos conservados y estudiados en los bancos de germoplasma de los centros internacionales miembros del Grupo Consultivo para la Investigación Agrícola Internacional (CGIAR) presentes en Latinoamérica.

Banco de germoplasma	Recursos fitogenéticos (n.º de accesiones)
Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT)	<i>Arachis</i> spp. (250), forrajes tropicales (60), especies silvestres de <i>Manihot</i> spp. (40), <i>M. esculenta</i> (5541), <i>Oryza sativa</i> (260), especies silvestres de <i>Phaseolus</i> spp. (69), <i>P. vulgaris</i> (27 458)
Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT)	<i>Hordeum vulgare</i> (3), <i>Secale cereale</i> (54), <i>Triticum aestivum</i> spp. <i>aestivum</i> (63 290), <i>T. turgidum</i> (50), <i>Zea mays</i> (17 807), <i>Z. perennis</i> (162)
Centro Internacional de la Papa (CIP)	<i>Arracacia</i> (42), <i>Canna indica</i> (64), especies silvestres de <i>Ipomoea</i> spp. (1255), <i>I. batatas</i> (6847), especies silvestres de <i>Lepidium</i> spp. (21), <i>L. meyenii</i> (35), especies silvestres de <i>Oxalis</i> spp. (85), <i>O. tuberosa</i> (708), <i>Smallanthus sonchifolius</i> (48), especies silvestres de <i>Solanum</i> spp. (2596), <i>S. ajanhuri</i> (14), <i>S. chaucha</i> (121), <i>S. curtilobum</i> (12), <i>S. juzepczukii</i> (36), <i>S. phureja</i> (211), <i>S. stenotomum</i> subsp. <i>goniocalyx</i> (112), <i>S. stenotomum</i> subsp. <i>stenotomum</i> (307), <i>S. tuberosum</i> subsp. <i>tuberosum</i> (180), <i>S. tuberosum</i> subsp. <i>andigena</i> (3246), <i>Tropaeolum tuberosum</i> subsp. <i>tuberosum</i> (150), especies silvestres de <i>Ullucus</i> spp. (20), <i>U. tuberosus</i> (573)

Fuente: Roca *et al.* 2004.

El mantenimiento de germoplasma en el campo requiere un gran espacio, muchísimo tiempo y el uso intensivo de mano de obra; por otro lado, el mantenimiento *in vitro* requiere mano de obra especializada. Dependiendo de la especie y el sistema de conservación *in vitro* utilizado, el germoplasma podría verse expuesto a variación somaclonal y a inestabilidad genética (Harding 1994). Tanto la conservación en el campo como *in vitro* constituyen formas de conservación de corto-mediano plazo. Las dificultades y los altos costos de la conservación en el campo e *in vitro* han estimulado el desarrollo de técnicas de criopreservación, las que permiten conservar los recursos filogenéticos por tiempo ilimitado y teóricamente libres de cambios genéticos. En los últimos años el CIP ha llevado adelante investigaciones para desarrollar métodos y técnicas de criopreservación de papa, y actualmente cuenta con una criocolección clonal de papas nativas andinas (González-Arnao *et al.* 2008). Asimismo, el CIP está adelantando la criopreservación de camote, oca y ulluco.

Importancia, diversidad y conservación de la papa

El valor y el aporte de la papa para disminuir el hambre y la desnutrición fueron oficialmente reconocidos por primera vez cuando la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) nombró el 2008 como el “Año Internacional de la Papa” (Secretaría del Año Internacional de la Papa 2008).



La papa procede de las zonas alto-andinas de Suramérica, donde fue domesticada hace más de 8000 años. Recientes evidencias científicas indican que su centro de origen es la región al norte del lago Titicaca (Spooner *et al.* 2005). Desde su centro de origen la papa andina emigró hacia el Sur y el Norte del continente, y después del descubrimiento de América, fue llevada a Europa. La papa *Chilotanum* también fue llevada a Europa unos años después, desde donde llegó al resto del mundo (Ames y Spooner 2008). Actualmente la papa se cultiva en 130 países, con una producción global de 320 millones de toneladas al año, y es uno de los alimentos más consumidos por el ser humano en 151 países. En el Perú, 600 000 familias dependen del cultivo de la papa como alimento y fuente de ingreso económico y 220 000 ha se destinan a la siembra de ese cultivo, con una producción total anual de 3 millones de toneladas (Sistema de las Naciones Unidas en el Perú 2008).

A nivel global, la papa es el cuarto alimento básico en el mundo, después del arroz, el trigo y el maíz. Sus tubérculos son fuente de energía, proteína, vitaminas (principalmente ácido ascórbico) y minerales como calcio, potasio y fósforo (Storey y Davies 1992). A través de miles de años de domesticación, además de sus atributos nutritivos, la papa ha adquirido diversas cualidades que la hacen altamente adaptable a las cambiantes y duras condiciones ambientales de la zona alto-andina.

El Perú es el país con mayor biodiversidad de papas en el mundo. En su territorio se encuentran ocho especies nativas domesticadas y cerca de 2800 de las más de 4000 variedades que existen en Latinoamérica. Además, el país posee 91 de las 200 especies de parientes silvestres de la papa presentes en el continente americano, de las cuales 82 son endémicas (Sistema de las Naciones Unidas en el Perú 2008).

Los recursos genéticos de la papa a nivel mundial se encuentran en no más de 30 colecciones, que contienen aproximadamente 65 000 accesiones en total. La mayoría de las colecciones se encuentran en los países de la región andina, Europa, Norteamérica y algunos países de Asia (Van Soest 2006). El germoplasma de la papa se conserva en la forma de semilla botánica, tubérculo e *in vitro*, y se estima que el 90 % se encuentra en las 23 colecciones principales. Las colecciones que mantienen los bancos de germoplasma de los países andinos y el CIP conservan cultivares nativos procedentes de siete especies, así como accesiones de especies silvestres. Las colecciones europeas y norteamericanas mantienen cultivares modernos y materiales mejorados procedentes de una sola especie (*S. tuberosum*, subsp. *tuberosum*), así como de algunas especies silvestres.

La conservación de cultivares y variedades de papa se realiza clonalmente en el campo o *in vitro*. La colección *in vitro* que mantiene el CIP contiene 4440 cultivares nativos y aproximadamente 5400 accesiones mejoradas. El mantenimiento de esta gran colección *in vitro* (a corto y mediano plazo), la más grande del mundo, es costoso y conlleva el riesgo potencial de que se den mezclas por error humano y/o cambios somaclonales. Asimismo, el CIP está trabajando en el desarrollo de una colección clonal de germoplasma de papa a largo plazo mediante las técnicas de crioconservación.



Crioconservación de la papa

Los primeros estudios sobre crioconservación de papa fueron realizados por Bajaj (1977), y el primer reporte de una experiencia exitosa lo hicieron Grout y Henshaw (1978) en Inglaterra. Los métodos más utilizados actualmente están basados en las técnicas de congelamiento rápido de ápices meristemáticos previamente tratados con crioprotectores como el dimetilsulfóxido (DMSO) (Schaffer-Menuhr 1996) y la llamada solución de vitrificación (PVS2) desarrollada por Sakai y colaboradores (Sakai *et al.* 1990). Las criocolecciones de germoplasma de papa más importantes del mundo se encuentran en el Instituto Leibniz de Genética Vegetal e Investigación en Cultivos (IPK) en Alemania, donde se conservan más de 1000 accesiones de variedades mejoradas europeas (Keller *et al.* 2008), y en la colección desarrollada por el CIP en Lima, Perú, con 980 accesiones de papas nativas cultivadas.

En el CIP, la investigación sobre crioconservación se inició en 1995 mediante el método de vitrificación desarrollado por Steponkus y colaboradores (Steponkus *et al.* 1992, Golmirzaie y Panta 1997). Mediante esta técnica, los ápices meristemáticos son crioprotectados en una solución de vitrificación que contiene etilenglicol:sorbitol:albúmina de suero bovino (50:15:6) y congelados en capilares de 0.25 ml de propileno que contienen 70 μ l de solución de vitrificación. En un proyecto piloto del CIP se estudiaron 197 genotipos, resultando una supervivencia a la crioconservación de 65 % de genotipos, y el promedio de supervivencia fue de 46 % (Golmirzaie y Panta 2000). Observaciones de la ultraestructura de los ápices de brotes congelados en nitrógeno líquido reveló mayormente el citoplasma anormal, la plasmólisis de la célula en diferentes etapas y un gran número de pequeñas vesículas (Golmirzaie *et al.* 2000a). Usando el mismo protocolo, se probaron cerca de 400 cultivares de papa, que comprendieron siete especies cultivadas con poliploides ($2n=2x$, $3x$ y $4x$). Los resultados mostraron una gran variabilidad en la supervivencia: aproximadamente el 30 % de los genotipos no sobrevivió al tratamiento y otro 30 % mostró una supervivencia menor a 15 %; estos resultados indicaron la necesidad de mejorar el protocolo. En 2004 el CIP, en colaboración con la *Katholieke Universiteit Leuven*, de Bélgica, adaptó para la papa el procedimiento de crioconservación que utiliza la solución PVS2, denominado “método de vitrificación de la micro-gota”, el cual fue originalmente diseñado para la crioconservación de ápices meristemáticos de banano (Panis *et al.* 2005). El método resultante fue reportado en 2006 (Panta *et al.* 2006). A continuación se describen los pasos del protocolo:

1. Cultivo *in vitro* previo a la crioconservación: Las plántulas se cultivan en envases “Magenta”® que contienen 25 ml de medio Murashige Skoog (MS) (Murashige y Skoog 1962), a partir de 20 micro-esquejes por envase, y se incuban durante tres semanas a 22°C, 3000 lux y 16 horas luz.
2. Preparación de ápices meristemáticos: Ápices meristemáticos apicales de 2-3 mm son aislados de plántulas de tres semanas de crecimiento a 22 °C. Los ápices son colocados en papel filtro sobre medio de cultivo de meristemas en placas de Petri; se colocan diez ápices sobre pedazos de papel filtro de 1 cm²; las placas son incubadas a temperatura ambiente aproximadamente durante una hora.



3. Crioprotección LS: Los explantes son expuestos durante 15-20 minutos a la solución osmoprotectora conocida como “solución de carga”, por su nominación en inglés “loading solution” (LS), compuesta por 2 M de glicerol y 0.4 M de sacarosa disueltos en solución de sales MS y esterilizada por filtración.
4. Vitricación: Las muestras se exponen durante 50 minutos a la solución de vitricación PVS2 a 0 °C (sobre hielo); dicha solución contiene glicerol 30 %, etilenglicol 15 %, DMSO 15 % y 0.4 M de sacarosa, disueltos en sales MS, y es esterilizada por filtración. Luego se transfieren 10 ápices meristemáticos a una gota de PVS2 sobre una tira de lámina de aluminio de 2 cm x 0.5 cm, la cual es rápidamente congelada en nitrógeno líquido.
5. Almacenamiento en nitrógeno líquido: Dos láminas de aluminio con las muestras vitrificadas (congeladas) se almacenan en crioviales de 2 ml de capacidad que contienen nitrógeno líquido y que fueron previamente etiquetados. Los crioviales son almacenados en criocajas dentro de un criotank que contiene nitrógeno líquido.
6. Descongelamiento: Las dos láminas de aluminio que contienen los ápices meristemáticos se extraen de los crioviales y dichos ápices son descongelados rápidamente por inmersión en 15 ml de solución de recuperación (RS) (MS con 1.2 M de sucrosa, esterilizada por filtración) colocada en una placa de Petri. Los ápices son enjuagados mediante agitación suave y la solución se reemplaza por solución fresca después de cinco minutos. Los explantes inmersos en la solución se mantienen por 30 minutos adicionales, con agitación suave a temperatura ambiente.
7. Cultivo post-descongelamiento: los ápices descongelados se colocan sobre papel filtro en medio semisólido para cultivo de meristemos (MS enriquecido con kinetina 0.04 mg/l, ácido giberélico 0.1 mg/l y phytigel 2.8 g/l), el que contiene una alta concentración de sacarosa (0.3 M). Después de uno o dos días se transfieren al mismo medio, pero con menos sacarosa (0.1 M). Uno o dos días después, los ápices se transfieren nuevamente al medio de meristemos frescos con una concentración normal de sacarosa (0.07 M), retirando el papel filtro. Durante estos pasos las muestras se incuban a 22 °C en oscuridad. Después de tres o cuatro días la incubación se realiza a 22 °C, 45 mmol.m².s⁻¹ y 16 horas luz. Después de seis semanas se evalúa la supervivencia del tejido y la recuperación de las plantas.

En la actualidad el CIP aplica esta técnica rutinariamente, utilizando plántulas *in vitro* que han sido cultivadas a 6 °C. Este tratamiento ha permitido ampliar el rango de genotipos que responden positivamente a la crioconservación. Hasta el 2010, aproximadamente 850 accesiones habían sido crioconservadas en nitrógeno líquido, almacenando 100 ápices por accesión en dos sets de 50 unidades cada uno. Con el fin de evaluar la viabilidad, adicionalmente se prepara un control de 20 muestras que son congeladas, descongeladas un día después y transferidas a las condiciones de cultivo post-descongelamiento. El 74 % de los genotipos han mostrado una recuperación de 20-100 % (en promedio 30 %) y el 17 % de los genotipos son recuperados con una tasa menor (5-19 %).



De acuerdo con el estudio de probabilidades de recuperación mediante crioconservación publicado por Dussert y colaboradores (Dussert *et al.* 2003), trabajando con 20 muestras descongeladas y 50 almacenadas, una tasa de recuperación de 20 % a 100 % asegura que por lo menos un ápice meristemático pueda ser recuperado con 95 % de confianza. Para los genotipos que son recuperados con una tasa menor de 20 %, un set adicional de explantes será crioconservado a fin de alcanzar la meta probabilística de recuperación al 95 %. La investigación continúa con el objetivo de conservar a largo plazo en forma segura 4640 accesiones de cultivares nativos de papa. En el camino se sigue trabajando para mejorar el protocolo a fin de incrementar la tasa de recuperación. Mediante la aplicación de este protocolo un técnico puede crioconservar 50 accesiones por año.

Importancia, diversidad y conservación de camote

El camote (*Ipomoea batatas* L.) es uno de los cultivos alimenticios más importantes, pues se siembra y consume ampliamente en más de 100 países y es el quinto cultivo en producción mundial después del arroz, el maíz, la papa y la yuca. El 95 % de la producción mundial de camote, que en 2009 superó los 126 millones de toneladas (FAO 2009), se cosecha en países en vías de desarrollo, siendo China el principal productor. El camote se cultiva en regiones del trópico y subtropical. Como producto alimenticio va adquiriendo mayor importancia por su alto potencial de rendimiento y su rusticidad, que lo convierten en una fuente económica con alto valor energético debido a su contenido de almidón. El camote también es una fuente importante de otros elementos nutritivos como vitaminas A y C, minerales y algunos aminoácidos (USDA 2010). El camote es uno de los recursos alimenticios más importante en América Latina, pero también en algunas regiones de África, donde es llamado “*cilera abana*”, que significa “protector de los niños”, lo que evidencia el importante rol que cumple en la erradicación del hambre y en la prevención de la ceguera infantil por deficiencia de vitamina A (Chamba 2009).

Se considera que el camote es originario de América meridional tropical, aunque el sitio exacto de su origen y domesticación no ha sido aún bien definido. Austin (1977), basado en el análisis de caracteres morfológicos del camote y de las especies silvestres de *Ipomoea*, postuló que *Ipomoea batatas* L. se originó en algún lugar de la región comprendida entre la península de Yucatán en México y la desembocadura del río Orinoco en Venezuela.

El camote es hexaploide, con número cromosómico $2x = 2n = 90$ y un número básico de $n = 15$. Las especies silvestres de *Ipomoea* relacionadas con el camote pueden ser desde diploides a hexaploides. *I. littoralis* y *I. tilliacea* son tetraploides; las otras especies son diploides ($2n = 2x = 30$), pero *I. trifida* puede incluir plantas $2x$ a $6x$ (Huaman 1992). Tanto el origen de la poliploidía del camote como la identidad de su ancestro silvestre todavía se encuentran en debate. Ambos procesos, la aloploidía (Magoon *et al.* 1970) y la autopoliploidía (Nishiyama *et al.* 1975), han sido sugeridos como causantes de la poliploidización del camote. Nishiyama



(1971) sugiere que el camote es un autopoliploide derivado del doblamiento de un grupo de 15 cromosomas de *I. leucantha* (2x), describiendo así la posible ruta de evolución del camote.

A nivel mundial los recursos fitogenéticos del camote se conservan *ex situ*, ya sea en campo o *in vitro*. Existen 36 colecciones de germoplasma que contienen 29 016 accesiones (Roca *et al.* 2007). La colección de camote del CIP, considerada la más grande del mundo, contiene 8102 accesiones de *Ipomoea batatas*, de las cuales 5489 se mantienen clonalmente *in vitro*. El mantenimiento *in vitro* se realiza en el CIP desde 1985 y requiere subcultivos anuales. Este manejo resulta costoso y puede llevar a riesgos de pérdidas por error humano y variación somaclonal. Con el fin de establecer métodos eficientes de conservación a largo plazo de germoplasma de camote, actualmente el CIP está trabajando en el desarrollo de técnicas de crioconservación, con base en la experiencia obtenida con la papa.

Crioconservación del camote

En el Perú, las investigaciones sobre crioconservación de camote se realizan en el CIP. Este trabajo se viene desarrollando mediante un proyecto colaborativo implementado con la *Katholieke Universiteit Leuven*, de Bélgica, y la participación de expertos del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), Fort Collins (EE.UU.). La ventaja comparativa del CIP para llevar a cabo este nuevo proyecto no solo se debe a su experiencia en diversos aspectos agronómicos y genéticos del cultivo del camote, sino también a su larga experiencia en el área de la investigación en crioconservación y a la posesión de las instalaciones y equipos necesarios. Los logros alcanzados por el CIP en la crioconservación de papa pueden ser aplicados al camote con los correspondientes ajustes.

Los estudios de crioconservación de camote hasta la fecha reportados (cuadro 13.2) han sido realizados en el USDA, EE.UU. (Towill y Jarret 1992, Pennycooke y Towill 2000), en Japón (Hirai y Sakai 2003), en la *Katholieke Universiteit Leuven* de Bélgica (Hardman 2006) y en el CIP (Golmirzaie *et al.* 2000b). Los métodos principalmente aplicados han sido la vitrificación y la encapsulación-vitrificación, utilizando PVS2. Varios protocolos han sido preliminarmente probados en el CIP para el camote. Golmirzaie *et al.* (2000b) encontraron en promedio 19 % de supervivencia usando cuatro genotipos (María Angola, Jonathan, Morada INTA y Jewel) crioconservados utilizando un método de vitrificación basado en la investigación de Towill y Jarret (1992). En 2007, se evaluaron cuatro genotipos (Espelma, Mataserrano, CMR Ira 1112 y Jewel), siguiendo el método de vitrificación aplicado en papa (Panta *et al.* 2006), y se hicieron ensayos con cuatro periodos de exposición a PVS2 (10, 20, 30, 40 y 50 minutos). Se observó una recuperación de 10 % solo en el genotipo CMR Ira 1112, con tratamiento de exposición a PVS2 de 30 minutos. Estos resultados confirmaron que la vitrificación es un método promisorio para el camote.



Cuadro 13.2. Métodos de crioconservación ensayados en camote por el CIP y otros investigadores¹.

	CIP	NCGRP (USA)		Instituto de Biotecnología Kagoshima (Japón)	Hardeman (KUL)
	Ensayo, 1999: Vitrificación basada en Towill y Jarret, 1992	Método reportado por Towill y Jarret, 1992	Basado en Pennycooke y Towill, 2000	Método de encapsulación y vitrificación probado por Hirai y Sakai, 2003	Ensayo 2005-2006: Vitrificación basada en Pennycooke y Towill, 2000
Multiplicación de plantas	Medio de propagación del CIP: 23-25°C: 4 semanas	Medio MS basal + 2 % w/v sacarosa a 25°C, 8-12 semanas	Medio MS; 25 °C; 4-13 semanas - 8 horas de oscuridad antes de la escisión	Medio basal MS +1g/L ácido casamino a 25°C: 3-4 semanas	Medio de propagación del CIP, 4-8 semanas
Explantes	Ápices meristemáticos apicales (0.5-0.7mm)	Ápices meristemáticos axilares (0.5-0.7 mm)	Ápices meristemáticos (0.5-1.0 mm)	Ápices meristemáticos apicales (1 mm)	Ápices meristemáticos apicales (0.5 mm) y axilares (0.5-1mm)
Pre-cultivo	I: 0.06 M de sacarosa en MS x 24 h II: 0.3 M de sacarosa en MS x 24 h		0.3 M de sacarosa x 24 horas a 25°C	I: perlas de alginato en 40 ml medio MS basal líquido + 1g/L ácido casamino x 24 horas a 25°C II: Medio líquido basal x 16 horas a 25°C	Medio MS, 1-5 horas
Crioprotección con LS	0.4 M de sacarosa + 2 M de glicerol en MS x 1 h	Medio MS + 3 % EG por dos días a 25°C	0.4 M de sacarosa + 2 M de glicerol x 60 minutos a 22°C	Ensayo con 2 M de glicerol, 0.4-1.8 M de sacarosa en MS por tres horas a 25°C Mejor tratamiento: glicerol + 1.6 M de sacarosa en medio MS por tres horas a 25°C	0.4 M de sacarosa en MS x 20 minutos
Vitrificación	Ápices meristemáticos expuestos 1, 5, 10 y 60 minutos a 100, 80, 60 y 40 % PVS2	Ensayo de concentración de PVS2 temperatura y tiempo de exposición. Mejor tratamiento: 80 % - 10 minutos y 60 % - 5 minutos a 0°C, 40 % - 10 minutos y 20 % - 60 minutos a 22°C	PVS2 : 16 min	Ensayo con PVS2 (0-100 minutos) Mejor tratamiento: 60 minutos	PVS2 : 15, 30, 45, 60 minutos
Congelamiento en nitrógeno líquido	Sobre tiras de papel aluminio	Sobre tiras de papel aluminio	Sobre tiras de papel aluminio	En crioviales	Sobre tiras de papel aluminio
Descongelamiento	1.2 M de sucrosa x 20 minutos a temperatura ambiente	1.2 M de sacarosa en medio MS x 30-45 minutos de 30 °C a 22°C	1.2 M de sacarosa x 20 minutos a 22°C	12 M de sacarosa sustituido dos veces a intervalos de 10 minutos	1.2 M de sacarosa x 15 minutos a temperatura ambiente



Pos-descongelamiento del cultivo	Medio para meristemos del CIP, a 22 °C	MS + 0.5 mg/L BA + 0.1 mg/L IBA + 3 % de sacarosa, y 0.7 % agar a 25 °C	Dos días de oscuridad, tres días a media luz, seguido de nueve días a luz normal, usando medio de recuperación modificado ²	I: Medio basal + 0.5mg/L BA, 1 mg/L GA3 x 7 días a 25°C II: Medio basal + 0.5 mg/L GA3 x 21 días	A 250°C, usado por Hirai y Sakai 2003, nueve días de noche, luego luz normal a 25°C
Evaluación	Supervivencia : después de 30 días	Supervivencia: después de 60 días		Supervivencia: después de 30 días	
Resultados	19 % de supervivencia probado en cuatro genotipos	26-64 % de supervivencia variable probado en dos genotipos: PI508515 y PI290657, respectivamente	0-60 % supervivencia variable	Sobre el 80 % de recuperación; tres genotipos: Beniazuma, Chikou-Igou y Kogame-sengan	39 % de supervivencia probado en tres genotipos

1 **Fuentes:** Golmirzaie *et al.* 2000b, Towill y Jarret 1992, Pennycooke y Towill 2000, Hirai y Sakai 2003, Hardeman 2006.
2 Medio modificado para recuperación de camote: micronutrientes y MS, 25 g/L sucrosa, gelrite 3.5 g/L, kinetina 0.001 mg/ml, BAP 0.0005 mg/ml, IBA 0.0001 mg/ml a un pH 5.7.

Recientemente se han estado realizando ajustes en ese método, con el fin de determinar las condiciones óptimas, como son el tamaño del ápice meristemático y el tiempo de exposición a las soluciones LS y PVS2. Se utilizan tres genotipos: Trujillano, Cintavo y CMR 1112, procedentes del banco *in vitro* del CIP. A la fecha, los ensayos realizados han permitido la crioconservación de 12 genotipos de camote. Las plántulas donantes de ápices meristemáticos fueron cultivadas durante cuatro o cinco semanas a 24 °C, mmol.m2.s-1, 16 horas luz. Se utilizó el medio semisólido para micropropagación de camote (MPB): sales MS (4.33 g/l), pantotenato de calcio (2mg/l), nitrato de calcio (100mg/l), L-arginina (100 mg/l), ácido ascórbico (200mg/l), putrescina-HCL (20 mg/l), sacarosa (30g/l), ácido giberélico (10mg/l) y phytigel (2.8g/l). Se utilizaron ápices meristemáticos de 1.5 mm. El tratamiento LS fue de 75 minutos, el cual se probó comparando períodos de exposición a PVS2 de 30, 35, 40 y 45 minutos. Para el congelamiento y almacenamiento en nitrógeno líquido se siguió el método aplicado a la papa. Para el descongelamiento los crioviales que contenían las muestras fueron sumergidos en agua a 38-40 °C por uno a dos minutos. Luego los ápices fueron transferidos a RS, donde se mantuvieron durante 10 minutos; después se repitió el tratamiento RS una vez más.

Para el cultivo post-descongelamiento, los ápices fueron cultivados por un día sobre papel filtro estéril usando el medio de meristemos semisólido 1 (MMB: sales MS, ácido ascórbico 0.1 g/l, nitrato de calcio 0.1 g/l, pantotenato de calcio 2 mg/l, ácido giberélico 20 mg/l, arginina 0.1 mg/l, putrescina-HCL 20 mg/l, agua de coco 10 ml/l, phytigel 2.7 g/l) contenido en una placa de Petri. Luego fueron transferidos a otra placa de Petri que contenía medio de meristemos semisólido 2 (MMB suplementado con 0.1 M de sacarosa) y cultivados por tres días. Finalmente los meristemos fueron transferidos directamente sobre el medio semisólido MMB que contenía sacarosa (30 g/l). Las condiciones de cultivo fueron 23 °C y mmol.m2.s-1



de intensidad luminosa, excepto en la primera semana, en que se utiliza luz tenue; el fotoperíodo fue de 16 horas. Las evaluaciones de supervivencia de tejido y recuperación de plántulas se realizaron a los 30 días de cultivo. El período de exposición a PVS2 de 45 minutos mostró la mayor tasa de supervivencia y recuperación para el genotipo Trujillano, 60 % y 48 % respectivamente (figura 13.1, cuadro 13.3). Sin embargo, este tratamiento resultó estadísticamente semejante a 35 minutos de exposición. La viabilidad es muy variable entre genotipos, lo que puede deberse a diversos factores que actualmente están siendo investigados.

Figura 13.1. Meristemos apicales de camote evaluados a los 20 días de cultivo después del descongelamiento: genotipo Trujillano (A), genotipo CMR 1112 (B); y meristemos apicales de ulluco (C) y oca (D) después de 15 días de cultivo luego del descongelamiento.



Fuentes: A y B: Brenda Zea, CIP; C y D: Dino Sánchez, CIP.

Cuadro 13.3. Efecto de tratamientos PVS2 en la supervivencia y recuperación de ápices meristemáticos de camote criopreservados utilizando el método de vitrificación de la gota.

Genotipos	Tiempo de exposición a PVS2 (minutos)	Supervivencia (%)	Recuperación (%)
Trujillano	35	54	44
	45	60	48
Cinitavo	35	7	7
	45	29	0
CMR-IRA 1112	35	0	0
	45	14	10

Fuente: Brenda Zea, CIP, comunicación personal.

Importancia, diversidad y conservación de ulluco y oca

El ulluco (*Ullucus tuberosus*) y la oca (*Oxalis tuberosa*) son dos importantes tubérculos que crecen en las zonas alto-andinas de Perú y Bolivia. Estos tubérculos, junto con la papa, fueron domesticados por los pobladores altoandinos y actualmente se conservan como recursos de importancia económica, medicinal y nutricional para la subsistencia de



familias campesinas de los Andes (National Research Council 1990, Flores *et al.* 2002). Estos cultivos constituyen la base biológica de la seguridad alimentaria del poblador andino por su gran variabilidad genética y su potencial de cultivo.

El ulluco o papalisa se distribuye desde Venezuela hasta el norte de Argentina a altitudes de 2400 a 3900 msnm. Una gran variedad de ecotipos se encuentra en el sur de Ecuador, Perú y norte de Bolivia (Tapia 1991, Castillo y Tapia 1998). Los tubérculos de ulluco poseen un alto contenido de vitamina C (23 mg/100 g de peso fresco), además de 85 % de humedad, 14 % de almidón y azúcares y 1 % de proteínas. El ulluco tiene gran demanda en el mercado tanto costero como andino, es uno de los cultivos más extendidos, crece de manera fácil y es resistente a las heladas y moderadamente tolerante a las sequías. Además, se produce de forma razonable en suelos marginales (National Research Council 1990).

La oca es una planta anual herbácea que presenta una amplia distribución, desde Colombia hasta Argentina. En el Perú se encuentra a altitudes de 3500 a 4000 msnm, siendo la zona sur donde se cultiva intensamente (Seminario 1988, Jaime 1994). Los tubérculos de oca contienen de 70 % a 80 % de humedad, de 11 % a 12 % de carbohidratos, alrededor de 1 % de grasas y fibras y una cantidad bien balanceada de aminoácidos esenciales. Las plantas de oca resisten las bajas temperaturas, prosperan en climas moderadamente fríos y pueden tolerar suelos ácidos, aunque las heladas matan su follaje y las altas temperaturas causan marchitamientos que llevan a la muerte de las hojas (National Research Council 1990).

La distribución de la diversidad y variabilidad genética del ulluco y la oca no es uniforme a lo largo de la región andina. Se concentran en lugares denominados microgenocentros de diversidad con características medioambientales, sociales y culturales favorables para su cultivo y conservación. Sin embargo, se ha detectado una serie de riesgos que afectan la conservación, tales como la influencia de costumbres modernas y la pérdida de las costumbres tradicionales, la preferencia de hábitos de consumo moderno y factores bióticos como enfermedades y plagas que eventualmente podrían provocar la erosión genética de estos cultivos (García *et al.* 2003). Para contrarrestar estos riesgos se realizan actividades dirigidas al manejo y la conservación de los recursos genéticos de estos cultivos aplicando estrategias integradas de conservación *in situ* y *ex situ* (Van den Hurk 2000, Cadima *et al.* 2003).

La diversidad genética del ulluco y la oca colectada en los Andes es actualmente conservada en bancos de germoplasma de diferentes instituciones (Castillo y Tapia 1998). En el CIP actualmente se conservan *in vitro* 460 accesiones de oca y 424 accesiones de ulluco, utilizando una combinación de agentes osmóticos, bajas temperaturas y baja intensidad de luz, con el fin de prolongar el tiempo entre subcultivos. El medio de cultivo utilizado es el medio básico MS suplementado con sacarosa (2 %), pantotenato de calcio (2 mg/L), sorbitol (4 %) para ambos cultivos, con pH 5.6 e incubados a 18-22 °C y con 16 horas de fotoperíodo.



Crioconservación de ulluco y oca

Dados los buenos resultados obtenidos en la crioconservación de la papa (Panta *et al.* 2006), el CIP está desarrollando métodos de crioconservación de ulluco y oca, para lo cual utiliza tratamientos que endurecen los tejidos, como es el cultivo *in vitro* a baja temperatura (Sánchez *et al.* 2011).

Se han utilizado cuatro genotipos de ulluco (Ulluco amarillo ñato, Huahuaquepe, Huariaca, y Ulluco U13 83) y cuatro de oca (Yuraq oca, Oca ARB 5325, K'ellopanti y Oca morada) provenientes del Banco de Germoplasma *in vitro* que mantiene el CIP. Esos genotipos son variedades nativas del norte, centro y sur del Perú seleccionadas como representativas de las colecciones *in vitro*.

Diferentes soluciones de vitrificación para plantas han sido exitosamente desarrolladas y utilizadas como crioprotectores (Takagi 2000), de las cuales la más utilizada es la solución PVS2. Sin embargo, esta solución puede resultar muy tóxica y la duración de la exposición a esa solución es un factor crítico en el proceso de crioconservación. Por esta razón, los experimentos iniciales para la crioconservación de oca y ulluco se realizaron con el objeto de determinar la tolerancia de estos cultivos a PVS2.

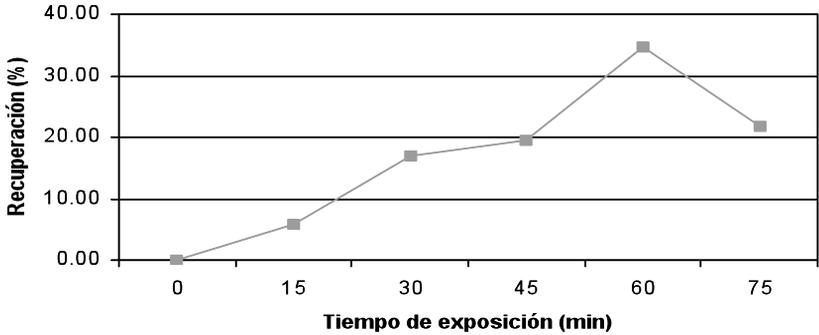
Se empezó con el cultivo de plántulas madre, durante tres semanas, para obtener ápices meristemáticos de 2 mm de tamaño. Los pasos de la vitrificación mediante el método de la gota fueron: i) exposición de los ápices a LS por 20 minutos; ii) exposición a PVS2 en seis períodos diferentes (0, 15, 30, 45, 60 y 75 minutos); iii) congelamiento rápido mediante el método de la gota sobre láminas de papel aluminio; iv) descongelamiento en solución de sacarosa de 1.2 M; v) cultivo en medio post-descongelamiento (sales MS, kinetina 0.04 mg/l, ácido giberélico 0.1 mg/l) con dos concentraciones de sacarosa (0.3 M, 0.1 M); vi) cultivo en medio definitivo (sales MS, kinetina 0.04 mg/l, ácido giberélico 0.1 mg/l, pantotenato de calcio 2 mg/l y sacarosa 20 %). El mejor tratamiento fue el de 60 minutos de exposición a PVS2, con un promedio de 39 % de supervivencia y 35 % de recuperación para el ulluco y de un promedio de 21 % de supervivencia y 15 % de recuperación para la oca (figuras 13.2 y 13.3). La supervivencia y la recuperación de ápices después de la crioconservación pueden ser incrementadas aclimatando las plantas a bajas temperaturas (Vandenbussche y De Proft 1998, Senula *et al.* 2007).

Con el fin de evaluar el efecto de la temperatura en la viabilidad después de la crioconservación, plántulas *in vitro* de ulluco y oca fueron cultivadas durante tres semanas siguiendo tres regímenes de temperatura: 6 °C, 18 °C (una semana) / 6 °C (dos semanas) y 18 °C (control). El tratamiento con la temperatura de 18 °C fue el que mostró los porcentajes más altos de supervivencia (25 %) y recuperación (16 %) para el ulluco; para la oca se logró obtener una supervivencia de 15 % y una recuperación de 9 %. Los otros regímenes de temperatura mostraron un menor porcentaje de supervivencia y recuperación. Las accesiones de ulluco y oca variaron en su respuesta a la exposición de PVS-2, lo que evidencia sensibilidad a esa solución y a la



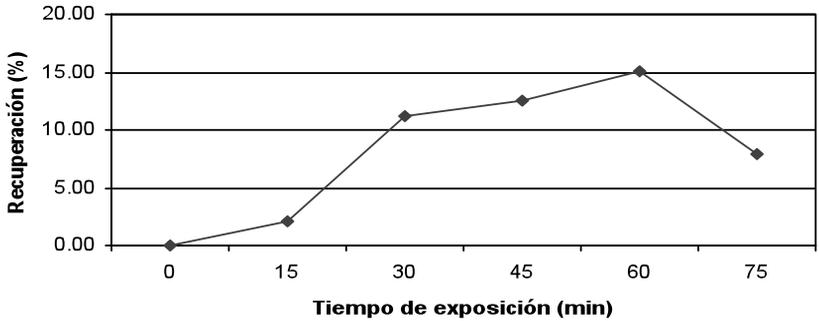
exposición a diferentes regímenes de temperatura. Los porcentajes de supervivencia y regeneración obtenidos fueron dependientes de las accesiones utilizadas, tanto para el ulluco como para la oca.

Figura 13.2. Respuesta de la recuperación de ápices de ulluco crioconservados siguiendo tratamientos con PVS2.



Fuente: Sanchez *et al.* 2011.

Figura 13.3. Respuesta de la recuperación de ápices de oca crioconservados siguiendo tratamientos con PVS2.



Fuente: Sanchez *et al.* 2011.

Estrategia para la crioconservación de cultivos clonales en el Perú

La necesidad de incluir la crioconservación en la estrategia de conservación a largo plazo de recursos fitogenéticos clonales, como es el caso de las raíces y los tubérculos andinos, responde a la necesidad de conservar estos cultivos milenarios, con el fin de



mantener su identidad genética y evitar su erosión. También se busca desarrollar métodos más eficientes en términos de costo y seguridad. Las colecciones de germoplasma mundiales y regionales existentes en la región andina recibieron financiamiento para su conservación durante las primeras décadas de su existencia, pero ese financiamiento se ha venido reduciendo paulatinamente. El desarrollo de métodos más eficientes de conservación es una necesidad urgente para los bancos de germoplasma del país.

En el Perú se ha reportado la existencia de 182 especies vegetales nativas, todas ellas con potencial para generar beneficio socioeconómico (Roca *et al.* 2004). Gran parte de ellas se conserva en 42 bancos de germoplasma, de los cuales 34 contienen cultivos de propagación clonal, incluidos raíces y tubérculos andinos de costa y trópico, cultivos industriales, frutales de sierra y selva, hortalizas nativas y plantas medicinales y aromáticas. La conservación de estos cultivos se realiza principalmente en el campo. La conservación *in vitro*, además de la que se realiza en el CIP, se está utilizando en baja escala en el Perú para la yuca (*Manihot sculenta*), ña de gato (*Uncaria tomentosa*, *U. guianensis*), awaymanto (*Physalis peruviana*) y sachatamate (*Cyphomandra hartwegii*), entre otros (Rodríguez 2004). A mediano plazo se espera el desarrollo de capacidades para salvaguardar todas las especies y sus correspondientes accesiones en condiciones *in vitro*. El eficiente manejo *in vitro* implica la incorporación de técnicas de criopreservación de propágulos vegetativos. Además, estas técnicas son potencialmente fáciles de aplicar en la conservación a largo plazo de polen y semillas. A fin de salvaguardar los cultivos nativos del Perú, se hace necesario un plan nacional para investigar y desarrollar dichas técnicas.

Los resultados de la investigación del CIP en la criopreservación de la papa indican que es factible ensayar y aplicar esta tecnología para la conservación a largo plazo de cultivos clonales. Los estudios iniciales comprendieron el ensayo de los métodos reportados para la papa, el de vitrificación desarrollado por Steponkus *et al.* (1992) y el de crioprotección con DMSO (Schafer-Menuhr 1996). Los resultados demostraron la necesidad de desarrollar métodos ajustados a la amplia diversidad de papas nativas de la región. En los últimos 15 años, más de 200 especies vegetales han respondido exitosamente a métodos de criopreservación basados en vitrificación (González-Arno *et al.* 2008). Estos métodos son sencillos y no requieren equipo sofisticado. Basados en los protocolos de vitrificación aplicados en papa y banano (Sarkar y Naik 1998, Panis *et al.* 2005), se desarrolló el método de vitrificación de la gota para la papa utilizando PVS2 (Panta *et al.* 2006). Este método ha permitido la criopreservación exitosa de un amplio rango de genotipos; y siguiendo el método probabilístico de Dussert y colaboradores (Dussert *et al.* 2003), la tasa de recuperación obtenida asegura que, al menos, un propágulo puede ser recuperado con un 95 % de certeza después del almacenamiento en nitrógeno líquido. La adaptación de este método implicó ensayos para determinar tratamientos óptimos del periodo de cultivo de las plántulas donantes de ápices meristemáticos a criopreservar, el tipo y el tamaño de los ápices meristemáticos, la exposición a LS y PVS2, el material soporte para el congelamiento, la exposición a RS y el número de muestras a criopreservar. Después se demostró que tratamientos de endurecimiento de los cultivos de plántulas donantes de ápices meristemáticos, como es el cultivo previo a temperatura baja (6 °C), favorece la recuperación de mayor número de genotipos criopreservados.



Actualmente, se investiga la correlación de componentes celulares ligados a la tolerancia a la deshidratación inducida por estreses de agua, sequía o heladas con la respuesta a la criopreservación. Se ha encontrado que el contenido de ácido linoleico en ápices meristemáticos de genotipos tolerantes a heladas está directamente correlacionado con la respuesta positiva a la criopreservación (Panta *et al.* 2008). La estrategia seguida en papa se está aplicando en el desarrollo de criopreservación de oca, ulluco y camote; y se estima que podría ser útil para otros cultivos de propagación clonal.

Capacidades para establecer una criocolección

El establecimiento de la criocolección de papa en el CIP es el producto de varios años de investigación, inicialmente dedicados a la capacitación del personal y la adquisición de equipos. La adquisición de una planta para la producción de nitrógeno líquido fue esencial para asegurar la disponibilidad constante del producto a un costo razonable, lo que facilitó el avance de las actividades seguidas para seleccionar y mejorar protocolos. Mientras el nitrógeno líquido tiene un costo de USD3/litro en el mercado local, el que produce la planta tiene un costo de USD1.5/litro aproximadamente.

La capacitación de personal es el aspecto más importante para incorporar la criopreservación en la estrategia de conservación de germoplasma aplicada en un banco. Bajo las condiciones del CIP, y aplicando el protocolo de vitrificación de la gota de PVS2, un técnico capacitado puede realizar la criopreservación de 50 accesiones por año.

Después del congelamiento y el almacenamiento, los recursos necesarios para el mantenimiento son mínimos; solo se debe reponer el nitrógeno que constantemente se evapora. En general, el costo del mantenimiento de las muestras criopreservadas depende del costo del nitrógeno líquido que se utiliza. En un criotank de 130 litros de capacidad se almacenan aproximadamente 900 accesiones. El costo de almacenamiento es de USD1.7 por accesión por año, valor casi 10 veces menor que el costo de la conservación *in vitro* en el CIP. Definitivamente la criopreservación es más eficiente en términos de costos y mano de obra. Sin embargo, introducir una accesión en nitrógeno líquido aún resulta costoso en el Perú; en el CIP se ha estimado que alcanza aproximadamente USD300. Este costo a primera vista puede considerarse alto, pero teniendo en cuenta que el material estará conservado en forma segura sin riesgos de contaminación, mezclas ni cambios genéticos por un tiempo ilimitado, la criopreservación resulta ventajosa en todo sentido. Para garantizar la seguridad de las criocolecciones de germoplasma, se requiere establecer copias de seguridad que deben ser ubicadas en otros lugares del país o en el extranjero; el requisito indispensable es que las instituciones o lugares hospedantes cuenten con las facilidades físicas que aseguren la conservación de las copias de criocolecciones. Esto incluye mecanismos de alarma para el reemplazo de nitrógeno líquido y fuentes seguras de provisión del nitrógeno líquido.

Dado que la criopreservación se aplica en un contexto de largo plazo y que la capacidad para criopreservar es de 50 accesiones por técnico por año, es absolutamente necesario establecer un programa de capacitación constante para estudiantes y técnicos.



Los recursos genéticos de los cultivos clonales presentes en los bancos de germoplasma del Perú también deberán ser objeto de criopreservación en un período cercano, para lo cual será fundamental contar con recursos humanos capacitados.

Conclusiones y perspectivas

Debido a la gran diversidad de recursos filogenéticos presentes en el Perú, se requiere reforzar las capacidades técnicas para implementar estrategias eficientes de conservación de germoplasma. La aplicación de la criopreservación tiene un gran potencial a esos efectos, pero primero se requiere contar con técnicas eficientes de conservación *in vitro*, sin las cuales no es posible llevar a cabo acciones de criopreservación.

El CIP ha desempeñado un papel esencial en el desarrollo de la conservación *in vitro* y la criopreservación de raíces y tubérculos andinos. Los esfuerzos que ha dirigido a ese objetivo le han permitido generar criotecnologías que aseguran la conservación a largo plazo de los recursos genéticos de cultivos clonales, para beneficio de las generaciones actuales y futuras.

El impacto inmediato de la aplicación de la criopreservación es el ahorro y la minimización de los riesgos de cambios genéticos en la conservación de las colecciones en comparación con las técnicas de conservación en campo e *in vitro*.

Los estudios en criopreservación implican tratamientos de estreses osmótico, hídrico, baja temperatura y congelamiento, entre otros; la respuesta a estos tratamientos *in vitro* brinda información sobre las características de tolerancias de los genotipos ensayados; esta información contribuye a la valorización del germoplasma.

Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento a Rosalva Villagaray y Wendy García, por su valioso aporte técnico en la ejecución de los trabajos de criopreservación en el CIP. También es necesario resaltar el apoyo financiero del Banco Mundial, la Cooperación Técnica Belga y el Fondo Mundial para la Diversidad de Cultivos.

Referencias

- Ames, M; Spooner, D. 2008. DNA from herbarium specimens settles a controversy about origins of the European potato. *American Journal of Botany* 95(2):252–257.
- Austin, D.F. 1977. Hybrid polyploids in *Ipomoea* section *batatas*. *The Journal of Heredity* 68:259-260.
- Bajaj, Y.P.S. 1977. Initiation of shoots and callus from potato-tuber sprouts and axillary buds frozen at -196°C. *Crop Improvement* 4:48-53.



- Brack, A. 2003. Biodiversidad y Desarrollo sostenible. Consultado 16 de Noviembre, 2012. Disponible en <http://ibcperu.org/doc/isis/6593.pdf>. 59 p.
- Cadima, X; García, W; Ramos, J. 2003. Capítulo II: Conservación *in situ* y *ex situ* del cultivo de la papalisa. In Conservación y producción del cultivo de la papalisa (*Ullucus tuberosus*). Cochabamba, BO, Área Temática de Recursos Genéticos, Fundación PROINPA. 84 p.
- CAN (Comunidad Andina). 2002. Informe sobre agrobiodiversidad. Ed. E Gonzales Jiménez. Caracas, VE, Proyecto Estrategia Regional de Biodiversidad para los Países del Trópico Andino. 121 p.
- Castillo, R; Tapia, C. 1998. Ulluco/melloco (*Ullucus tuberosus* Caldas). Quito, EC, Departamento Nacional de Recursos Genéticos y Biotecnología (DENAREF), Instituto Nacional de Investigación en Agricultura (INIAP).
- Chamba, L. 2009. Cultivo del camote para el mercado internacional (en línea). Consultado 16 nov. 2012. Disponible en <http://biotecnologiaproyecto09.wikispaces.com/file/view/cultivo-del-camote.doc>. 31 p.
- Consortio GTZ/FUNDECO/IE. 2001. Estrategia regional de biodiversidad para los países del trópico andino. Conservación *ex situ*. Documento temático (en línea). In III Taller Regional Conservación *ex Situ* (2001, La Paz, BO). Consultado 21 mar. 2009. Disponible en <http://www.comunidadandina.org/desarrollo/dct3.PDF>. 129 p.
- Dussert, S; Engelmann, F; Noirot. M. 2003. Development of probabilistic tools to assist in the establishment and management of cryopreserved plant germplasm collections. *CryoLetters* 24(3):149-160.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, IT). 2009. FAOSTAT (en línea). Roma, IT, División de Estadística. Consultado 10 feb. 2011. Disponible en <http://faostat.fao.org>.
- Flores, H; Walker, T; Guimaraes, R; Vivanco, J. 2002. Andean root and tuber crops: underground rainbows. *HortScience* 38(2):161-167.
- García, W; Cadima, X; Terrazas, F; Gandarillas, A. 2003. La agrobiodiversidad sostenible. Conservación *in situ* y *ex situ*. In Manejo sostenible de la agrobiodiversidad de tubérculos andinos: síntesis de investigaciones y experiencias en Bolivia. Conservación y uso de la biodiversidad de raíces y tubérculos andinos: Una década de investigación para el desarrollo (1993-2003). Cochabamba, BO, PROINPA, CIP, COSUDE. 208 p.



- Golmirzaie, A; Panta, A. 1997. Advances in potato cryopreservation by vitrification. Lima, PE, CIP. CIP Program Report: 71-76.
- _____; Panta, A. 2000. Advances in potato cryopreservation at CIP. *In* Engelmann, F; Takagi, H. eds. Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application, Tsukuba, JP, Japan International Research Center for Agricultural Sciences. p. 250-254.
- _____; Panta, A; Delgado, C. 2000a. Structural observations on potato shoot-tips after thawing from liquid nitrogen. *In* Engelmann, F; Takagi, H. eds. Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application. Tsukuba, JP, Japan International Research Center for Agricultural Sciences. p. 388-389.
- _____; Panta, A; Diaz, S. 2000b. Systematic determination of an adequate method for large-scale sweet potato cryopreservation at CIP. *In* Engelmann, F; Takagi, H. eds. Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application. Tsukuba, JP, Japan International Research Center for Agricultural Sciences. p. 460-462.
- Gonzalez-Arno, T; Panta, A; Roca, W; Escobar, R; Engelmann, F. 2008. Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 92:1-13.
- Grout, B; Henshaw, G. 1978. Freeze preservation of potato shoot-tip cultures. *Annals of Botany* 42:1227-1229.
- Harding, K. 1994. The methylation status of DNA derived from potato plants recovered from slow growth. *Plant cell, tissue and organ culture* 37:31-38.
- Hardman, D. 2006. Cryopreservation of sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.)) and oca (*Oxalis tuberosa* (Mol.)). Tesis Mag. Sc. Lovaina, BE, Universidad Católica de Lovaina; Wageningen, NL, Universidad de Wageningen. Programa Erasmus. 69 p.
- Hirai, D ; Sakai, A. 2003. Simplified cryopreservation of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] by optimizing conditions for osmoprotection. *Plant Cell Reports* 21:961-966.
- Huaman, Z. 1992. Systematic botany and morphology of the sweet potato plant. Lima, PE, CIP. Technical Information Bulletin 25. 22 p.
- Jaime, J. 1994. Los tubérculos y granos andinos en el Perú. Tingo María, PE, Universidad Nacional Agraria de la Selva (UNAS).
- Keller, J; Kaczmarczyk, A; Senula, A. 2008. Cryopreservation for plant genebanks – a matter between high expectations and cautious reservation. *CryoLetters* 29(1):53-62.



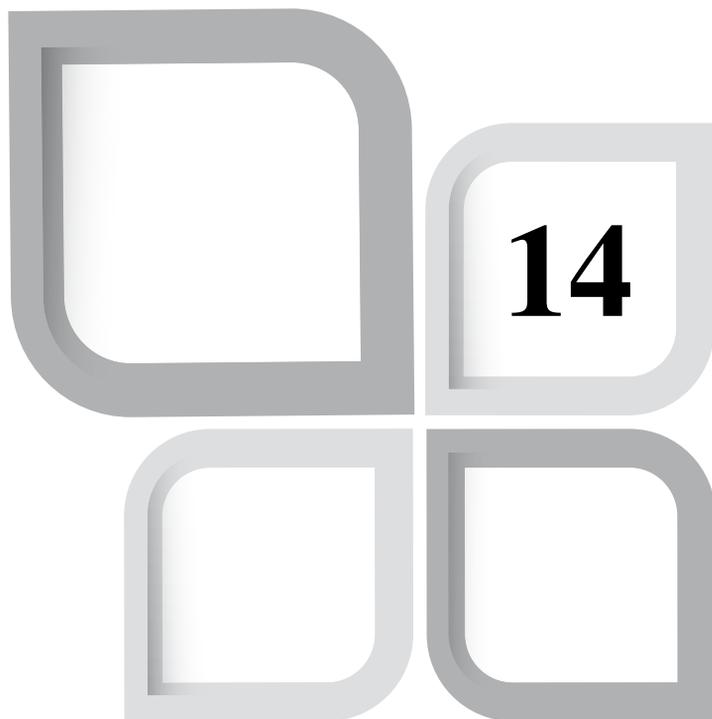
- Magoon, M; Kirsshan, R; Vijaya Bai, K. 1970. Cytological evidence on the origin of sweet potato. *Theoretical and Applied Genetics* 40:360-366.
- Murashige, T; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays of tobaccos culture. *Physiological Plantarum* 15:473-497.
- National Research Council. 1990. Lost crops of the Incas: little-known plants of the Andes with promise for worldwide cultivation. Washington D.C.
- Nishiyama, I. 1971. Evolution and domestication of the sweet potato. *Botanical Magazine* 84:377-387.
- _____; Miyazaki, T; Sakamoto, S. 1975. Evolutionary autopoloidy in the sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) and its progenitors. *Euphytica* 24(1):197-208.
- Panis, B; Piette, B; Swennen, R. 2005. Droplet vitrification of apical meristem: a cryopreservation protocol applicable to all Musaceae. *Plant Science* 168:45-55.
- Panta, A; Panis, B; Ynouye, C; Criel, B; Swennen, R; Roca, W. 2006. Improvement of potato cryopreservation for the long-term conservation of Andean landraces at CIP. *Criobiology* 53:401.
- _____; Panis, B; Sanchez, D; Ynouye, C; Geuns, J; Swennen, R; Tay, D; Roca, W. 2008. Andean food tuber crops: cryopreservation and links with their response to abiotic stress. *In Society for Low Temperature Biology. Symposium 2008* (2008, Copenhagen, DK).
- Pennycooke, J; Towill, L. 2000. Cryopreservation of shoot tips from *in vitro* plants of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) by vitrification. *Plant Cell Reports* 19:733-737.
- Roca, W; Espinoza, C; Panta, A. 2004. Agricultural applications of biotechnology and the potential for biodiversity valorization in Latin America and the Caribbean. *AgBioForum* 7:13-22.
- _____; Rossel, G; Campilan, D. 2007. Global strategy for *ex situ* conservation of sweet potato genetic resources: consultation report (en línea). Consultado 16 nov. 2012. Disponible en <http://www.croptrust.org/documents/cropstrategies/sweetpotato.pdf>
- Rodriguez, A. 2004. Conservation strategies for plant genetic resources in Peru. Tesis Mag. Sc. Lovaina, BE, Universidad Católica de Lovaina. 147 p.

- Sakai, A; Kobayashi, S; Oiyama, I. 1990. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Obs. var *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Reports* 9:30-33.
- Sanchez, D; Panta, A; Tay, D; Roca, W. 2011. Cryopreservation of ulluco (*Ullucus tuberosus* Cal.) and oca (*Oxalis tuberosa* Mol.) shoot tips using the PVS2 droplet-vitrification method. *Act. Hort.* 908:339-346.
- Sarkar, D; Naik, P. 1998. Cryopreservation of shoot tips of tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) clones by vitrification. *Annals of Botany* 82:455-461.
- Schafer-Menuhr, A. 1996. Refinement of cryopreservation techniques for potato. Roma, IT, IPGRI. Reporte final para el periodo septiembre de 1991 a 31 de agosto de 1996. 41 p.
- Secretaría del Año Internacional de la Papa. 2008. Concepto del AIP (en línea). Roma, IT, FAO. Consultado 15 nov. 2012. Disponible en <http://www.potato2008.org/es/elaip/concepto.html>
- Seminario, J. 1988. Cultivos andinos: la oca, *Oxalis tuberosa* Mol. Cajamarca, PE, Universidad Nacional de Cajamarca, CONCYTEC.
- Senula, A; Keler, E; Sanduijav, T; Yohannes, T. 2007. Cryopreservation of cold-acclimated mint (*Mentha* spp.) shoot tips using a simple vitrification protocol. *CryoLetters* 28(1):1-12.
- Sistema de las Naciones Unidas en el Perú. 2008. La papa es el alimento del año (en línea). Lima, PE. Consultado 15 nov. 2012. Disponible en <http://www.onu.org.pe/Publico/CentroPrensa/DetalleNoticia.aspx?id=1244>. Noticias y notas de prensa.
- Spooner, D; McLean, K; Ramsay, G; Waugh, R; Bryan, G. 2005. A single domestication for potato based on multilocus amplified fragment length polymorphism genotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102(41):14694-14699.
- Steponkus, P; Langis, R; Fujikawa, S. 1992. Cryopreservation of plant tissues by vitrification. *Advances in Low-Temperature Biology* 1:1-61.
- Storey, R; Davies, H. 1992. Tuber quality. In Harris, PM. ed. *The potato crop*, 2 ed. Londres, UK, Chapman y Hall. p. 507-569.
- Takagi, H. 2000. Recent development in cryopreservation of shoot apices of tropical species. In Engelmann, F; Takagi, H. eds. *Cryopreservation of tropical plant germplasm: current research progress and application*. Tsukuba, JP, JIRCAS; Roma, IT, IPGRI. p. 178-193.



- Tapia, M. 1991. Origen y distribución. *In* Piatila, L; Tapia, M. eds. Investigaciones sobre ulluku. Turku, FI, Universidad de Turku. 67 p.
- Towill, L; Jarret, B. 1992. Cryopreservation of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) shoot tips by vitrification. *Plant Cell Reports* 11:175-178.
- USDA (Departamento de Agricultura de los Estados Unidos). 2010. Nutrient data laboratory. Agriculture research service. Consultado 22 feb. 2011. Disponible en <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>.
- Van den Hurk, A. 2000. Complementariedad entre la conservación *ex situ* y la *in situ*. *In* Reunión Boliviana sobre Recursos Fitogenéticos de Cultivo Nativos (2000, Cochabamba, BO). Memorias. Eds. ML Ugarte, C Villaroel, G Aguirre. Cochabamba, BO, PROINPA. 215 p.
- Van Soest, L. 2006. Global strategy for the ex situ conservation of potato: consultation report. Consultado 16 nov. 2012. Disponible en <http://www.croptrust.org/documents/web/Potato-Strategy-FINAL-30Jan07.pdf>
- Vandenbussche, B; De Prof, MP. 1998. Cryopreservation of in vitro sugar beet shoot tips using the encapsulation-dehydration technique: influence of abscisic acid and cold acclimation. *Plant Cell Reports* 17:791-793.





Conclusiones

Florent Engelmann¹,
María Teresa González-Arno²

1. Instituto de Investigación para el Desarrollo (IRD - UMR DIADE), Francia, florent.engelmann@ird.fr.

2. Facultad de Ciencias Químicas de Orizaba, Universidad Veracruzana, México, mtgarnao1@hotmail.com y/o teregonzalez@uv.mx.

Las contribuciones recibidas de nueve países de América Latina y el Caribe (ALC), así como de las representaciones en esa región de dos organismos internacionales, la Red de Cooperación Técnica en Biotecnología Agrícola (REDBIO/FAO) y *Biodiversity International*, demuestran que la crioconservación vegetal es un área de investigación que está ganando gran importancia en ALC. Lo anterior se refleja en el incremento progresivo del número de especialistas que trabajan en esa área y de la cantidad de especies para las que se han desarrollado protocolos criogénicos. A modo de ejemplo, se pueden mencionar cultivos agroindustriales como el café, la caña de azúcar y la palma de aceite; cultivos de subsistencia como los frutales, los tubérculos y raíces y las leguminosas, entre otros; y especies forestales, algunas raras y/o amenazadas, originarias de regiones de clima tropical y templado. La mayoría de esas plantas son de propagación vegetativa o producen semillas no ortodoxas, por lo que su crioconservación cobra aún mayor relevancia.

Como se ha mostrado en los capítulos de este libro, se han logrado mayores avances en la crioconservación de especies que se propagan vegetativamente que de especies de semillas no ortodoxas. Sin embargo, muchas de las plantas de propagación vegetativa crioconservadas hasta ahora son fundamentalmente especies de importancia comercial, para las cuales las técnicas de cultivo y propagación *in vitro* están bien establecidas. Además, el material en condiciones asépticas se encuentra relativamente “sincronizado” y homogéneo en términos de tamaño, composición celular, estado fisiológico y respuesta de crecimiento, lo que incrementa las posibilidades de éxito y contribuye a obtener un comportamiento más uniforme ante los tratamientos que involucra la crioconservación de germoplasma (Engelmann 2011).

Por otro lado, la mayoría de las especies silvestres están clasificadas como no ortodoxas o recalcitrantes, lo que genera mayores dificultades para el desarrollo de un protocolo criogénico eficiente. Además, en muchos casos no existe o solo se dispone de información muy limitada sobre la biología y el comportamiento de las semillas frente al almacenamiento. Por lo tanto, para avanzar en la crioconservación de ellas, es de crucial importancia el intercambio de experiencias con botánicos, fisiólogos de semillas y otros especialistas. Existen ejemplos de cultivos, como los cítricos (Hor *et al.* 2005) y el café (Dussert *et al.* 2011), para los cuales se pensó que no sería posible obtener supervivencia después de la exposición de sus semillas al nitrógeno líquido. Sin embargo, finalmente se logró crioconservarlos en forma exitosa mediante el control de los niveles de desecación y la optimización de los métodos de enfriamiento y calentamiento, lo que permitió ampliar los conocimientos sobre esas plantas.

La crioconservación de embriones, ejes embrionarios y ápices constituye una alternativa estratégica para preservar especies con semillas recalcitrantes e incluso las que presentan un comportamiento intermedio. Sin embargo, es indispensable establecer con antelación a los ensayos criogénicos un protocolo de cultivo *in vitro* que sea operativo para el explante seleccionado. Por consiguiente, la participación de especialistas en el cultivo de tejidos vegetales es una condición requerida desde el inicio de un proyecto de crioconservación y durante todo su desarrollo.



Otro aspecto importante que se debe considerar es no restringir el uso de la criopreservación únicamente a las especies de propagación vegetativa y con semillas no ortodoxas. Investigaciones recientes han demostrado la necesidad de contemplar y extender la criogenia para almacenar a largo plazo germoplasma de plantas que producen semillas ortodoxas. En los últimos 30 años ha salido a la luz la evidencia de que la conservación a la temperatura de los bancos de semillas ofrece una longevidad menor de la esperada (Li y Pritchard 2009). Los autores detectaron que las semillas de casi 200 especies originarias de localidades muy cálidas y secas, acorde a mediciones anuales de temperatura y lluvia, tendían mayormente hacia la clasificación de P50, que se refiere al tiempo de almacenamiento en que la viabilidad cae al 50 %, y que reflejaban un envejecimiento acelerado en comparación con las semillas provenientes de condiciones climáticas frías y húmedas (Probert *et al.* 2009). Se encontró que las especies con valores P50 se correlacionaban con el comportamiento de accesiones de diferentes plantas que perdieron significativamente su viabilidad después de 20 años de almacenamiento pre-equilibradas a 15 % de humedad relativa y a -20 °C en bancos de semillas (FAO e IPGRI 1994).

Otro estudio realizado con semillas de 276 especies almacenadas a -5 °C durante un promedio de 38 años y a -18 °C por 25 años arrojó que la vida media de las semillas de solo 61 de esas especies sería mayor a 100 años, lo que equivale a 22 % (Walters *et al.* 2005). Esto demuestra que la criopreservación puede ser considerada como una alternativa extra de seguridad, incluso para las plantas que producen semillas ortodoxas e independientemente de que se mantengan conservadas por la vía clásica bajo las condiciones de los bancos de semillas (Pritchard *et al.* 2009). Además, se corrobora el valor de todas las estrategias de conservación, tanto *ex situ* como *in situ*, para aprovechar de forma complementaria las ventajas que ofrece cada una y compensar las respectivas desventajas.

Al revisar los trabajos sobre criopreservación de germoplasma vegetal que se presentan en este libro, se puede apreciar que en ALC las actividades en esa área se iniciaron en el período 1988-1990 y que estuvieron primeramente dirigidas a la capacitación de especialistas fuera de sus países de residencia. Sin embargo, hoy en día ya son varios los proyectos que se han desarrollado en diversas instituciones de las naciones latinoamericanas y que abordan estudios de criopreservación para más de 30 especies de importancia mundial y específica para la región (González-Arno y Engelmann 2011). Dichos trabajos también evidencian el uso de herramientas tecnológicas avanzadas, como la calorimetría diferencial de barrido (Gámez-Pastrana *et al.* 2011), los marcadores moleculares y bioquímicos (Martínez-Montero *et al.* 2002, Escobar 2005) y más recientemente las denominadas “ómicas” (González-Arno *et al.* 2011a). Todo ello ha servido para profundizar en aspectos básicos relacionados con el establecimiento y la optimización de diferentes protocolos criogénicos, así como para verificar la estabilidad del material criopreservado. Incluso se han realizado ensayos con tejidos aislados de plantas genéticamente modificadas para aumentar su capacidad de biosíntesis de trehalosa y evaluar posteriormente la respuesta de la tolerancia frente a la criopreservación (González-Arno *et al.* 2011b; Osorio Saenz *et al.* 2011).

La criopreservación de germoplasma vegetal es un proceso dinámico que se enriquece día a día con el conocimiento que se adquiere de estudiar diferentes aspectos físicos,



biológicos y moleculares asociados a las especies y a sus mecanismos de respuesta. En ALC existen cinco redes para los recursos genéticos de plantas: CAPGERNET (Red de Recursos Fitogenéticos del Caribe), REMERFI (Red Mesoamericana de Recursos Fitogenéticos), REDARFIT (Red Andina de Recursos Fitogenéticos), TROPIGEN (Red Amazónica de Recursos Fitogenéticos) y REGENSUR (Red de Recursos Genéticos del Cono Sur). Todas estas redes serán decisivas para impulsar la implementación de las técnicas criogénicas en los bancos de germoplasma, así como para establecer y estructurar colecciones crioconservadas en los diferentes países miembros. Sin embargo, como se muestra en los diferentes capítulos de este libro, la investigación en el campo de la criobiología vegetal en ALC ha estado mayormente concentrada en institutos de investigación y universidades, por lo que es necesario que todos los investigadores unan sus esfuerzos para el establecimiento conjunto de una red regional. Esta red podría contar con el apoyo de las instituciones que impulsan la conservación de los recursos fitogenéticos en ALC, como la FAO, *Bioversity International* y el IICA, entre otras.

La publicación de este libro constituye el primer paso en la identificación de especialistas e instituciones que trabajan en el área de la crioconservación vegetal en ALC y en la divulgación de los avances logrados en esa área en dicha región. La colaboración entusiasta de todos los contribuyentes demuestra el gran potencial de la crioconservación en ALC. Para aprovechar plenamente ese potencial, ahora se requiere que en forma conjunta y organizada se impulse la creación de una red temática, la cual podrá contribuir significativamente a la capacitación de recursos humanos, a la incorporación de nuevos participantes y, sobre todo, a la aplicación de los conocimientos generados en el campo de la crioconservación, que beneficiará la conservación a largo plazo de la rica, y en algunos casos única, diversidad genética vegetal de ALC.

Referencias

- Dussert, S; Couturon, E; Bertrand, B; Joët, T; Engelmann, F. 2011. Progress in the implementation of the French Coffee Cryobank. *In* Abst. COST Action 871 “Cryopreservation of crop species in Europe” Final Meeting (2011, Angers, FR).
- Engelmann, F. 2011. Germplasm collection, storage and preservation. *In* Plant biotechnology and agriculture: prospects for the 21st century. Eds. A Altman; PM Hazegawa. Oxford, UK, Oxford Academic Press. p. 255-268.
- Escobar, RH. 2005. Aspectos logísticos de manejo y determinación de la estabilidad genética de materiales crioconservados de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Tesis de maestría. Palmira, CO, Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira. 99 p.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, IT); IPGRI (Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, IT). 1994. Genebank standards. Roma, IT.



- Gámez-Pastrana, R; González-Arno, MT; Martínez, Y; Engelmann, F. 2011. Thermal events in calcium alginate beads during encapsulation-dehydration and encapsulation-vitrification protocols. *Acta Horticulturae* 908:47-54.
- González-Arno, MT; Durán, B; Valdés-Rodríguez, S; Jiménez, B; Guerrero, A; Lázaro-Vallejo, C. 2011a. Cryopreservation and proteomic analysis of vanilla (*V. planifolia*) apices treated with osmoprotectants. *Acta Horticulturae* 908:67-72.
- _____; Engelmann, F. 2011. Current development and application of plant cryopreservation in Latin America and the Caribbean. *Acta Horticulturae* 908:447-51.
- _____; Mascorro-Gallardo, JO; Osorio-Saenz, A; Valle-Sandoval, MR; Engelmann, F. 2011b. Improvements in tolerance to cryopreservation using shoot-tips of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* Kitam.) from genetically modified plants that accumulate trehalose. *In* Cryogenics: theory, processes, and applications. Ed. AE Hayes. Nueva York, US, Nova Science Publishers. p. 137-148.
- Hor, YL; Kim, YJ; Ugap, A; Chabrilange, N; Sinniah, UR; Engelmann, F; Dussert, S. 2005. Optimal hydration status for cryopreservation of intermediate oily seeds: *Citrus* as a case study. *Annals of Botany* 95(7):1153-1161.
- Li, DZ; Pritchard, HW. 2009. The science and economics of *ex situ* plant conservation. *Trends in Plant Science* 14:614-621.
- Martínez-Montero, ME; Ojeda, E; Espinosa, A; Sánchez, M; Castillo, R; González-Arno, MT; Engelmann, F; Lorenzo, JC. 2002. Field performance of cryopreserved callus-derived sugarcane plants. *CryoLetters* 23(1):21-26.
- Osorio Saenz, A; Mascorro-Gallardo, JO; Valle-Sandoval, MR; González-Arno, MT; Engelmann, F. 2011. Genetically engineered trehalose accumulation improves cryopreservation tolerance of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* Kitam.) shoot-tips. *CryoLetters* 32(6):477-486.
- Pritchard, HW; Ashmore, S; Berjak, P; Engelmann, F; González-Benito, ME; Li, DZ; Nadarajan, J; Panis, B; Pence, V; Walters, C. 2009. Storage stability and the biophysics of preservation. *In* Conference: Plant Conservation for the Next Decade. A Celebration of Kew's 250th Anniversary (2009, Londres, UK). Proceedings. Londres, UK, Royal Botanic Gardens Kew.
- Probert, RJ; Daws, MI; Hay, F. 2009. Ecological correlates of *ex situ* seed longevity: a comparative study on 195 species. *Annals of Botany* 104 :57-69.
- Walters, C; Wheeler, LJ; Grotenhuis, JM. 2005. Longevity of seeds stored in a genebank: species characteristics. *Seed Science Research* 15:1-20.



Sobre los editores

María Teresa González-Arno se dedica a las investigaciones criobiológicas en plantas, fundamentalmente de especies tropicales, las cuales inició en La Habana, Cuba. Actualmente es responsable del Laboratorio de Biotecnología y Criobiología Vegetal de la Facultad de Ciencias Químicas adscrita a la Universidad Veracruzana en Orizaba, Veracruz, México. Es autora de más de 50 publicaciones en revistas, libros y memorias de eventos científicos especializados. Ha dirigido varios proyectos de cooperación técnica internacional y ha contribuido a la formación de otros especialistas de América Latina y el Caribe.

Florent Engelmann es el Director de Investigación en el Instituto de Investigación para el Desarrollo (IRD). Actualmente trabaja en el Centro del IRD ubicado en Montpellier, Francia, donde lidera el equipo de investigación que estudia los mecanismos de adquisición de tolerancia a la desecación de los tejidos de plantas y órganos. Es uno de los pioneros de la criopreservación aplicada a la conservación de especies vegetales tropicales. Ha publicado más de 130 artículos de investigación en esta área.



Impreso en la Imprenta del IICA
Sede Central, San José, Costa Rica
Tiraje: 500 ejemplares



Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura

Sede Central. Apartado Postal 55-2200
San José, Vázquez de Coronado, San Isidro 11101 – Costa Rica
Tel.: (506) 2216 0222 / Fax: (506) 2216 0233
Dirección electrónica: iicahq@iica.int
Sitio web: www.iica.int

