

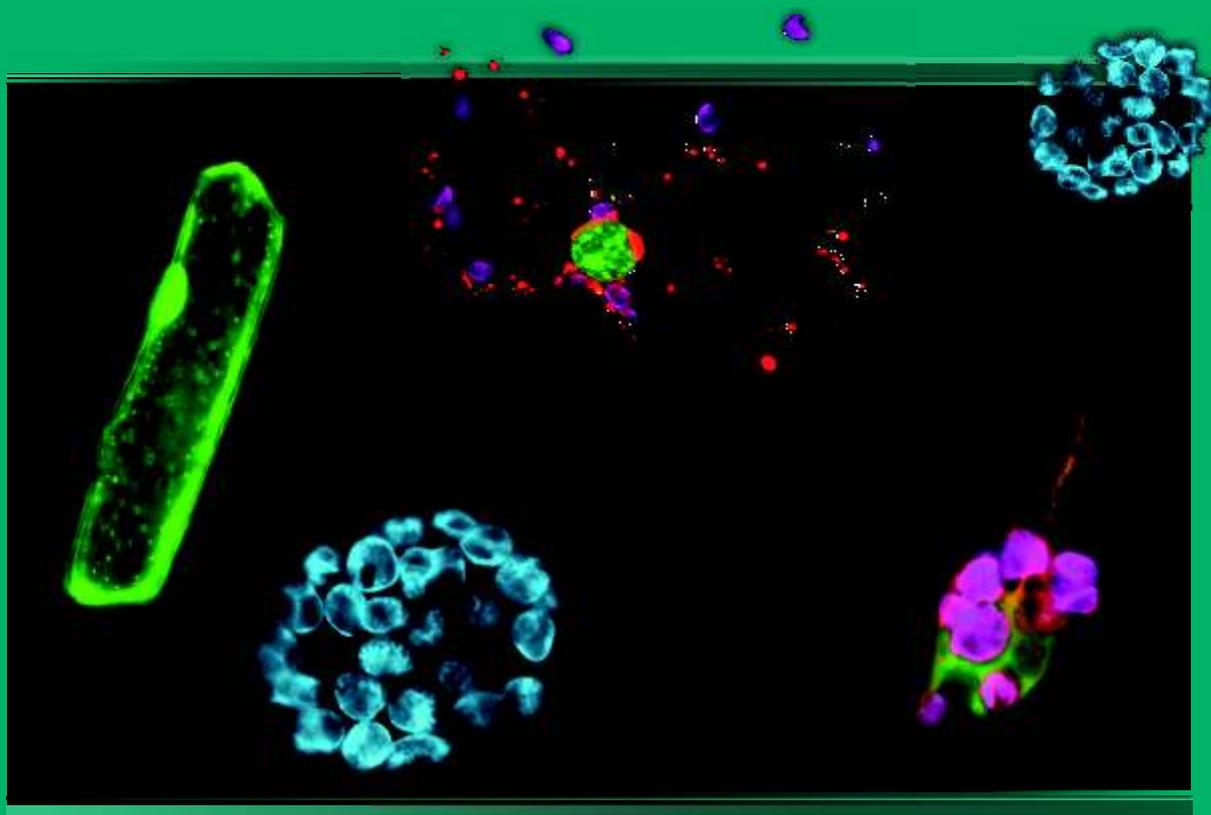
Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II

Editores:

Gabriela Levitus, Viviana Echenique,
Clara Rubinstein, Esteban Hopp y Luis Mroginski

ArgenBio 

Consejo Argentino para la Información
y el Desarrollo de la Biotecnología



■ Ediciones

Instituto Nacional de
Tecnología Agropecuaria





Consejo Argentino para la Información
y el Desarrollo de la Biotecnología

Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II

Editores:

Dra. Gabriela Levitus,
Dra. Viviana Echenique,
Dra. Clara Rubinstein,
Dr. Esteban Hopp
Ing. Agr. Luis Mroginski.

Índice

Prefacio	6
Agradecimientos	7
Lista de Autores	7
Prólogo a la Primera Edición. Dr. Francisco García Olmedo	11
Prólogo a la Segunda Edición. Dr. Francisco García Olmedo	11
Parte I: Herramientas Básicas	15
Capítulo 1: Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. Luis Mroginski, Pedro Sansberro y Eduardo Flaschland	17
Capítulo 2: Morfogénesis. Silvia Radice	26
Capítulo 3: La citogenética molecular e inmunocitogenética en el estudio de los genomas vegetales. Guillermo Seijo, Graciela I. Lavia, Germán Robledo, Aveliano Fernández y Viviana G. Solís Neffa.	34
Capítulo 4: Herramientas básicas de ingeniería genética. Ingrid Garbus, Marisa Gómez y Viviana Echenique.	47
Capítulo 5: Marcadores moleculares. María Carolina Martínez, Marcelo Helguera y Alicia Carrera.	70
Capítulo 6: Construcción de mapas de ligamiento genético, localización de genes y regiones cromosómicas asociadas a caracteres de interés en plantas. Gerardo D. L. Cervigni, Juan Pablo A. Ortiz y Sergio E. Feingold.	86
Capítulo 7: Genómica. Viviana Echenique, Juan P. Selva, Mauro Meier, Pablo Roncallo y Gustavo Schrauf.	100
Capítulo 8: Transcriptómica. Silvina Pessino y Silvina Felitti.	121
Capítulo 9: Proteómica. Paula Casati y María F. Drincovich	136
Capítulo 10: Metabolómica. Fernando Carrari, Telma E. Scarpeci, Luciano A. Abriata, Alejandro J. Vila y Estela M. Valle.	146
Capítulo 11: Metagenómica. O. Mario Aguilar y Daniel H. Grasso.	157
Capítulo 12: Bioinformática aplicada a la biotecnología vegetal. Norma Paniego, Ruth Heinz, Paula Fernández, Verónica Lia, Corina Fusari.	170
Parte II: Métodos para generar y analizar diversidad	183
Capítulo 1: Polinización y fertilización in vitro. Susana Cardone, Gladys Pérez Camargo y Aurora Picca.	185
Capítulo 2: Hibridación somática. Pablo Polci y Pablo Friedrich.	197

Capítulo 3: Epigenética y evolución. Ricardo W. Masuelli y Carlos F. Marfil	211
Capítulo 4. Mutagénesis, TILLING y EcoTILLING. Alberto Prina, Alejandra Landau, María Gabriela Pacheco y Esteban Hopp	217
Capítulo 5: Variación somaclonal. Susana Cardone, Sofía Olmos y Viviana Echenique.	229
Capítulo 6: Aplicación de la transformación genética al mejoramiento vegetal. Marina L. Díaz, Diego C. Zappacosta, Pascual M. Franzone y Raúl D. Ríos	243
Capítulo 7: Usos del silenciamiento génico para el análisis funcional de genes candidatos. Cecilia Vázquez Rovere, Ariel Bazzini, Cecilia Rodríguez, Natalia Almasia y Sebastián Asurmendi ..	259
Capítulo 8: Análisis de experimentos biológicos. Sofía Olmos, Miguel DiRenzo, Mercedes Ibáñez, Nélica Winzer	271
Capítulo 9: Métodos multivariados para estimar variabilidad genética. Nélica Winzer, Miguel DiRenzo, Sofía Olmos y Mercedes Ibáñez.	283
Parte III: Métodos para acelerar programas de mejoramiento e identificación varietal	295
Capítulo 1: Obtención de plantas doblehaploides. Pablo Polci, Verónica Conti y Rubén Miranda y Nicolás Gear.	297
Capítulo 2: Aplicaciones de los marcadores moleculares. Alicia Carrera, Gabriela Tranquilli, Antonio Garayalde y Marcelo Helguera.	311
Capítulo 3: Marcadores moleculares y mejoramiento genético de cultivos. Carlos Sala, Mariano Bulos, Analía Fresco y Emiliano Altieri.	325
Capítulo 4: Identificación y registro de variedades. Ana Laura Vicario, Marcelo Labarta y María Alicia Loray	339
Parte IV: Métodos de propagación y conservación de germoplasma	351
Capítulo 1: Micropropagación. Sofía Olmos, Gabriela Luciani y Ernestina Galdeano	353
Capítulo 2: Semilla sintética. Hebe Rey y Luis Mroginski	363
Capítulo 3: Conservación de germoplasma in vitro. Adriana Scocchi y Hebe Rey.	369
Parte V: Ejemplos de aplicaciones de la biotecnología vegetal	377
Capítulo 1: Aportes de la citogenética al estudio de genomas vegetales. Lidia Poggio, Graciela González, María Rosa Ferrari, Ana María García, Arturo Wulff, Eduardo Greizerstein, Pablo Tomas y Gustavo Schrauf.	379
Capítulo 2: Mejoramiento de plantas forrajeras en la era genómica. Germán Spangenberg, Mauro Meier y Viviana Echenique	389
Capítulo 3: Caracterización molecular de la apomixis y su aplicación en la agricultura. Silvana C. Pessino y Juan Pablo A. Ortiz	403
Capítulo 4: Avances de la biotecnología en cultivos ornamentales. Alejandro S. Escandón, Pablo A. Marinangeli y Mariana Pérez de la Torre.	421

Capítulo 5: Aplicación de la biotecnología en la mejora y conservación de especies forestales. Susana Marcucci Poltri, Leonardo Gallo, Noga Zelener, Susana Torales, Sandra Sharry	435
Capítulo 6: Técnicas de ingeniería genética para conferir resistencia a virus en plantas. Mariana del Vas, Ana Julia Distéfano, Cecilia Vázquez-Rovere, Esteban H. Hopp.	447
Capítulo 7: Obtención de plantas resistentes a enfermedades bacterianas. Adrián Vojnov, Mercedes Rivero y Diego Zappacosta	457
Capítulo 8: Aproximaciones biotecnológicas para un manejo sustentable del estrés fúngico en la agricultura. Juan Carlos Díaz Ricci; Ursula Tonello; Gustavo Martínez-Zamora; Sergio Salazar; Nadia Chalfoun; Gabriel Vellicce; Carlos Grellet; Paula Filippone; Alicia Mamani; Marta Ontivero y Atilio Pedro Castagnaro.	467
Capítulo 9: Utilización de cultivos de tejidos para la obtención y conservación de plantas libres de enfermedades. Vilma Conci.	481
Capítulo 10: Obtención de plantas resistentes a insectos. Dalia Lewi y Clara Rubinstein	495
Capítulo 11: Aplicaciones biotecnológicas al manejo de malezas. Germán Ferrari y Julio E. DeLucchi.	507
Capítulo 12: Obtención de plantas tolerantes a distintos tipos de estreses abióticos. Florencia del Viso, Andrea F. Puebla, Néstor Carrillo y Raquel L. Chan	519
Capítulo 13: Manipulación genética del metabolismo secundario en plantas. Alicia Zelada, María Binaghi	529
Capítulo 14: Mejoras de calidad en alimentos. Clara Rubinstein, Gabriela Levitus	539
Capítulo 15: Fitorremediación. María Eugenia Segretín, Paula Bey y Alejandro Mentaberry	545
Capítulo 16: Plantas como biorreactores. Fernando Bravo Almonacid, Sonia Wirth, María Eugenia Segretin, Mauro Morgenfeld, Ezequiel Matías Lentz.	559
 Parte VI: Manejo responsable de la tecnología	 569
 Capítulo 1: Criterios científicos para la evaluación de la bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados. Clara Rubinstein	 571
Capítulo 2: Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados - Marcos Regulatorios. Moisés Burachik	583
Capítulo 3: Flujo génico y su posible impacto ambiental. Mónica Poverene, Soledad Ureta y Agustina Gutiérrez.	595
Capítulo 4: Detección de OGM en la cadena agroalimentaria. Florencia Longo y Ana Vicario.	603
Capítulo 5: Manejo integrado de plagas – Programa de Refugios. Viviana Confalonieri y Cecilia Roca.	613
Capítulo 6: Resistencia de malezas a herbicidas: evolución y estrategias de manejo. Daniel Tuesca, Luisa Nisensohn, Mario R. Sabbatini, Guillermo Chantre.	621
 Parte VII: Biotecnología y sociedad	 631
 Capítulo 1: La transformación tecnológica y los nuevos desafíos. Carmen Vicién.	 633

Capítulo 2: Adopción de los cultivos genéticamente modificados en Argentina y en el mundo. Gabriela Levitus	639
Capítulo 3: Biotecnología en la mira: el problema de la percepción. Valeria Durand	643

IV. CAPÍTULO 3

Conservación de Germoplasma *in vitro*.

Adriana Scocchi y Hebe Rey

Abreviaturas usadas en este capítulo:

DMSO (Dimetilsulfóxido); PVP (Polivinilpirrolidona); PVS2 (30% glicerol, 15% etilenglicol, 15% DMSO, 0.04M sacarosa), TTC (Cloruro 2,3,5-Trifenil-Tetrazolio), PEG (Polietilenglicol).

Introducción

Desde sus inicios, el hombre ha dependido básicamente de los vegetales como fuente de energía. Al aumentar rápidamente la población, se ha hecho necesario implantar técnicas de explotación, en particular agropecuarias, que han contribuido a la destrucción de las poblaciones pioneras vegetales que fueron producto de siglos de evolución. Por otro lado, las técnicas modernas de producción de variedades mejoradas altamente homogéneas han provocado la reducción de la variabilidad genética de las especies cultivadas, ocasionando una "erosión genética".

En este contexto es cuando se recurre a las fuentes genéticas originales de la variabilidad, las que se deben preservar adecuadamente. Cuando se habla de preservación de germoplasma hay que subrayar que el objetivo es conservar, con la mayor integridad posible, la variabilidad genética de las poblaciones seleccionadas.

Métodos empleados para la conservación de germoplasma:

La estrategia a seguir para la conservación de germoplasma, depende de la naturaleza del material vegetal, y está definida por la duración de su ciclo de vida, el modo de reproducción y el tamaño de sus individuos. De acuerdo con estas características se han intentado diversas alternativas de conservación, que van desde el tradicional banco de semillas hasta el mantenimiento de áreas de reservas. Sin embargo, en muchos casos el mantenimiento no es posible

y en otros casos resulta sumamente costoso y los riesgos de pérdidas por manipulación o desastres naturales son muy altos. Por lo tanto, se buscó implantar nuevas estrategias para conservar los recursos genéticos en forma más eficiente.

Los métodos de conservación de germoplasma se pueden dividir en:

Métodos de Conservación *in situ*;

Métodos de Conservación *ex situ*.

Los primeros se basan en la conservación de las plantas en sus habitats naturales e incluyen la conservación en Parques Nacionales y en Reservas Ecológicas, los cuales requieren un considerable espacio físico, altos costos asociados a la necesidad de mano de obra especializada, control permanente de enfermedades y malezas, a la par que las plantas están expuestas a las inclemencias del clima y de los incendios.

Por otra parte, los métodos de conservación *ex situ* se basan en el mantenimiento del material biológico en bancos de semillas, bancos de cultivo *in vitro*, colecciones de plantas (en campo, viveros, jardines botánicos).

En general, los bancos de semillas constituyen uno de los métodos más convenientes para la conservación de germoplasma *ex situ*, porque permiten almacenar una gran variabilidad genética en forma económica y práctica. Para la conservación de semillas la International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI) recomienda su desecación hasta un 3-7% de humedad y su almacenamiento a bajas temperaturas (-18°C). Este protocolo de conservación es en general el más recomendado para la mayoría de las especies que se propagan por semillas y cuyas semillas resisten la desecación sin que ello implique pérdida de viabilidad. A las semillas que presentan estas características se las denominan "semillas ortodoxas" como por ejemplo las semillas de arroz, trigo, avena, tabaco, tomate y lechuga. Sin embargo, en ciertos casos este método de conservación no es aplicado, porque la especie se propaga, en la práctica, vegetativamente (como la mandioca, papa, caña de azúcar, plátanos y bananos) o bien porque sus semillas pierden rápidamente la viabilidad cuando son sometidas a procesos de desecación. A estas semillas se

las denominan "semillas recalcitrantes". Las semillas de numerosas especies que viven en zonas tropicales o subtropicales se incluyen en esta categoría, como por ejemplo las de coco, cacao, frutales tropicales perennes y diversas palmeras.

Otro método de conservación de germoplasma *ex situ*, es mediante el cultivo *in vitro* de tejidos. El descubrimiento de la totipotencialidad de las células vegetales y la posibilidad de desarrollar plantas normales y completas a partir de diferentes explantes, ha permitido pensar en el establecimiento de bancos de germoplasma utilizando el cultivo de tejidos vegetales. Algunos de los primeros estudios sobre el mantenimiento *in vitro* del germoplasma fueron realizados en mandioca en el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) y en papa en el Centro Internacional de la Papa (CIP). Recién en 1980 se reconoció el potencial de los métodos del cultivo *in vitro* para la conservación de especies de plantas "difíciles". Este término se refiere a las especies propagadas vegetativamente en forma obligada o que tienen semillas recalcitrantes. En estos casos, la conservación de los genotipos se realiza mediante el mantenimiento de plantas vivas o mediante el cultivo *in vitro* de ápices caulinares o de nudos.

El mantenimiento de los recursos fitogenéticos mediante los métodos del cultivo *in vitro* se logra haciendo cambios en el ambiente de cultivo para desacelerar el crecimiento de las células y de los tejidos. El objetivo es aumentar al máximo el período de transferencia del cultivo. Es esta necesidad la que estimuló algunos de los primeros estudios sobre el mantenimiento *in vitro* del germoplasma de diversas especies. Este método cubre un amplio espectro de técnicas que implican el cultivo, bajo condiciones de asepsia, de órganos o fragmentos de órganos (meristemas, semillas, embriones somáticos, embriones cigóticos, hojas, tallos, raíces, yemas, polen, anteras, callos o protoplastos), en un medio de cultivo artificial definido, bajo condiciones ambientales controladas. Esta técnica ha sido usada para mantener colecciones en crecimiento mínimo, para lo cual se requiere: reducir la temperatura, reducir las condiciones de luminosidad, modificar el medio de cultivo, adicionar al mismo inhibidores osmóticos o re-

tardantes del crecimiento, deshidratadores de tejido o modificar la fase gaseosa del recipiente de cultivo. La modificación de uno o más de estos factores es usada para la conservación de numerosas especies, como por ejemplo para la conservación de microestacas de *Manihot esculenta*; de vástagos de especies de *Fragaria*, *Ipomoea*, *Rubus*, *Musa*, *Saccharum*, *Zingiber*, *Ananas*, *Coffea*, *Dioscorea* y de microtubérculos de *Solanum*. Estas técnicas de almacenamiento se realizan a mediano plazo, es decir, se basan en reducir el metabolismo celular y con ello reducir el crecimiento y el número de subcultivos durante meses hasta un año, sin que ello afecte la viabilidad de los cultivos. En el Laboratorio de Cultivo *in vitro* del Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE), en la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNNE, desde hace varios años se llevan a cabo experimentos referidos a la conservación de germoplasma de paraíso (*Melia azedarach*). Utilizando como explantes meristemas de clones selectos de paraíso mantenidos durante 12 meses a tasas de crecimiento reducidas (medios de cultivo subóptimos o empobrecidos y en condiciones de oscuridad se logró mantener con éxito y regenerar plantas de paraíso que actualmente se encuentran en evaluación a campo (Fig. 1). Asimismo en el IBONE, se realizan experimentos tendientes a optimizar las técnicas de conservación *in vitro* a largo plazo que consisten en el almacenamiento a temperatura del nitrógeno líquido (-196°C) –crioconservación- con lo cual se consigue la supresión del crecimiento hasta llegar a un estado de "suspensión animada". En el Laboratorio del IBONE se ha logrado con éxito la crioconservación de meristemas de paraíso aplicando la técnica de encapsulación-deshidratación (Fig. 1).

Las técnicas de conservación de germoplasma mediante el uso de la crioconservación ofrecen varias ventajas en relación con las técnicas tradicionales de conservación, pues permiten la conservación a largo plazo (años), presenta bajos costos de mantenimiento, una fácil manipulación de las muestras y no dependen del suministro eléctrico.

Desde que en 1968 se informara acerca de la crioconservación de células de lino y luego de los resultados satisfactorios que se obtuvie-

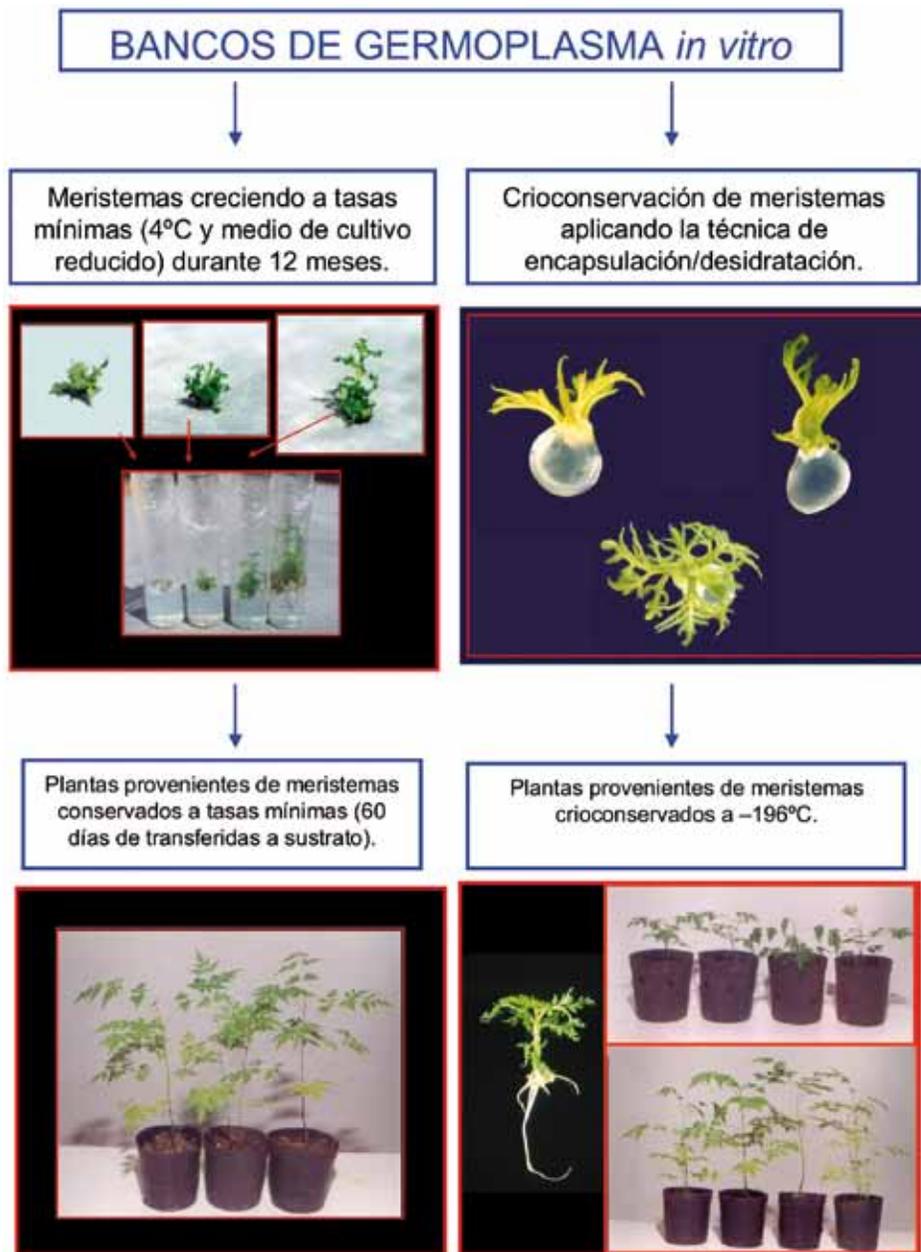


Figura 1: Estrategias para la conservación de germoplasma de paraíso (*Melia azedarach* L.), desarrolladas en el Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales. IBONE. Facultad de Ciencias Agrarias. UNNE

ron con la crioconservación de meristemas de frutilla en el Instituto de Biotecnología de Plantas en Sakatoon - Canadá, se iniciaron en 1985 algunas investigaciones colaborativas entre el CIAT y el IPGRI para desarrollar esta técnica con el cultivo de meristemas de mandioca. A partir de estos estudios, numerosos trabajos dan muestra de la importancia de esta técnica, de sus usos y aplicaciones.

La crioconservación consta de siete pasos:

1.- Selección del material a crioconservar:

Cuando se realiza la selección del material a crioconservar, se debe tener la absoluta seguridad de que a partir del mismo se obtienen plantas completas. El explante seleccionado depende del objetivo de conservación y está estrechamente relacionado con el tipo de pro-

pagación de la especie. Por ejemplo en el caso de la mandioca, la cual se propaga principalmente por vía asexual (mediante estacas), se conserva su germoplasma *in vitro* en el CIAT mediante el cultivo de microestacas y también de meristemas con lo cual paralelamente a la conservación se consigue el saneamiento de los cultivares. Además, se están realizando estudios para la crioconservación de meristemas.

2.- Deshidratación:

La deshidratación del explante es un paso crucial para el éxito de la crioconservación, ya que es necesario eliminar toda el agua libre presente en el tejido vegetal, minimizando así las posibles pérdidas por congelación. La deshidratación del tejido puede realizarse en una cámara a 0°C o en cámaras herméticamente cerradas utilizando sustancias higroscópicas como por ejemplo: silica gel, glicerol (5 - 20%), o sometiendo al explante a una corriente de aire en un flujo laminar de aire estéril.

3.- Aclimatación:

La aclimatación se puede realizar en forma rápida o lenta. La aclimatación rápida consiste en colocar el explante directamente en el nitrógeno líquido, con o sin la adición exógena de crioprotectores; mientras que la aclimatación lenta se realiza bajando gradualmente la temperatura (0.1-3°C/min.). Este punto debe ser manejado cuidadosamente pues una deshidratación excesiva de las células puede exponerlas a una alta concentración interna de los solutos. Por esta razón generalmente el material se congela lentamente, a una velocidad adecuada hasta alcanzar una temperatura próxima a los -40°C y luego se lleva a nitrógeno líquido (-196°C).

Para preparar (aclimatar) al explante a las bajas temperaturas se utilizan sustancias crioprotectoras como azúcares (sacarosa, glucosa); alcoholes (glicerol, etilenglicol, manitol y sorbitol), DMSO, PVP, o también pueden utilizarse soluciones de vitrificación, que son una combinación de crioprotectores tal como el PVS2. Tanto los crioprotectores como las soluciones de vitrificación actúan fundamentalmente como agentes anti-congelantes, aumentan-

do la viscosidad del tejido vegetal y reduciendo la permeabilidad de las células.

4.- Almacenamiento:

De acuerdo al material vegetal que se utilice, se presentan dos grandes sistemas:

-**Sistemas Secos:** comprende todos aquellos tejidos vegetales endógenamente resistentes y tolerantes a las bajas temperaturas y a la deshidratación.

-**Sistemas Hidratados:** son todos aquellos tejidos vegetales no tolerantes a las bajas temperaturas y a la deshidratación por lo que se requiere una protección exógena. Esta protección puede estar dada por el uso de crioprotectores o bien por la utilización de soluciones de vitrificación.

Los sistemas secos, por ser más resistentes necesitan menor preparación para su almacenamiento y comprende aquellas especies que habitan zonas frías y/o templadas. En cambio, los sistemas hidratados son más susceptibles al frío y están representados por todas aquellas especies que habitan zonas tropicales y subtropicales, las cuales no están adaptadas para soportar temperaturas inferiores a 0°C, por este motivo estos tejidos deben ser protegidos exógenamente mediante el uso de crioprotectores.

5.- Descongelamiento y Rehidratación:

Cuando se desea recuperar al explante del nitrógeno líquido, se puede realizar un descongelamiento rápido a Baño María (generalmente 1-2 min. a 30 ó 40°C) o en forma lenta sometiendo al explante a temperatura de laboratorio o a una corriente de aire en el flujo laminar de aire estéril.

6.- Test de Viabilidad:

Los tests de viabilidad nos permiten comprobar las zona/s del tejido que ha/n muerto y cual/es ha/n sobrevivido al frío. La evaluación de la viabilidad puede llevarse a cabo en forma visual, realizando el recultivo y determinando la capacidad de regeneración, utilizando TTC que colorea el tejido que ha sobrevivido a la crioconservación; o midiendo la conductividad

eléctrica, que permite estimar el daño producido en las membranas celulares.

En la última década, han surgido numerosas técnicas que combinan el uso de crioprotectores y de soluciones de vitrificación con técnicas de deshidratación y encapsulación, las cuales

básicamente pueden resumirse en técnicas de:

- Encapsulación-Deshidratación
- Vitrificación
- Encapsulación-Vitrificación
- Desecación
- Precultivo

Técnica Empleada	Explantado y Especie
Encapsulación-Deshidratación	Suspensiones celulares de <i>Catharanthus roseus</i> . Meristemas de 125 variedades de <i>Solanum spp.</i> Meristemas de <i>Dioscorea alata</i> , <i>Malus domestica</i> , <i>Pyrus spp.</i> y <i>Morus spp.</i> Ápices de <i>Pyrus spp.</i> , <i>Malus spp.</i> , <i>Saccharum spp.</i> y <i>Solanum tuberosum</i> Ápices caulinares de <i>Camellia japonica</i> , <i>Coffea racemosa x Coffea sessiliflora</i> , <i>Citrus spp.</i> y de <i>Saccharum spp.</i> Embriones somáticos de <i>Elaeis guineensis</i> .
Vitrificación	Células nucleares de <i>Citrus sinensis</i> . Líneas celulares embriogénicas de <i>Pinus silvestris</i> . Suspensiones celulares y callos embriogénicos de <i>Gossypium hirsutum</i> . Meristemas de <i>Pyrus communis</i> , <i>Malus spp</i> y de <i>Pyrus spp.</i> , <i>Ipomoea batata</i> , <i>Manihot esculenta</i> (15 genotipos), <i>Prunus spp.</i> , y de <i>Solanum spp.</i> Meristemas, polen y anteras de <i>Arachis hypogaea</i> . Ápices de <i>Ananas comosus</i> , <i>Colocasia esculenta</i> . Yemas adventicias de <i>Guazuma crinita</i> Mart., <i>Populus alba</i> . Semillas de <i>Bletilla striata</i> Semillas y protocormos de <i>Dendrobium candidum</i> . Suspensiones celulares embriogénicas de <i>Oryza sativa</i> . Embriones somáticos de <i>Abies cephalonica</i> Semillas, embriones cigóticos, polen, anteras y suspensiones celulares de <i>Triticum spp.</i>
Encapsulación Vitrificación	Meristemas, segmentos nodales, segmentos de raíz y yemas adventicias de <i>Guazuma crinita</i> , y de <i>Fragaria x ananassa</i> . Ápices de <i>Dyanthus cariophyllus</i> , <i>Azoreum rusticana</i> , <i>Lilium spp.</i> y de <i>Wasabia japonica</i>
Desecación	Meristemas de <i>Morus spp.</i> Embriones somáticos de <i>Cucumis melo</i> , y de <i>Elaeis guineensis</i> Embriones somáticos y ejes embriogénicos de <i>Camellia japonica</i> . Ejes embriogénicos de <i>Junglans cinerea</i> . Ejes embriogénicos y semillas de <i>Gossypium hirsutum</i> . Semillas de <i>Pinus silvestris</i> , y de <i>Apium graveolens</i>
Precultivo	Meristemas de <i>Musa spp.</i> Embriones cigóticos de <i>Triticum aestivum</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i> y <i>Oryza spp.</i> Polen y anteras de <i>Oryza spp</i> Líneas celulares y callos de <i>Oryza sativa</i> .
Precultivo Desecación	Embriones somáticos de <i>Phoenix dactylifera</i> , <i>Coffea spp.</i> , <i>Pyrus spp.</i> , <i>Cucurbitaspp.</i> , <i>Cocos nucifera</i> , y de <i>Elaeis guineensis</i> (aplicada como rutina a 80 clones). Embriones cigóticos y microestacas de <i>Asparagus officinalis</i> .
Gotita Congelada	Ápices de 150 variedades de <i>Solanum tuberosum</i> .

Cuadro N° 1: Utilización de técnicas de crioconservación en diferentes explantes de algunas especies de interés agronómico.

- Precultivo-Desecación
- Gotita Congelada.

En el Cuadro N° 1 se detallan las especies y explantes en los cuales cada una de estas técnicas ha sido empleada con resultados satisfactorios.

Encapsulación-Deshidratación:

La técnica de encapsulación-deshidratación esta basada en el desarrollo de la metodología aplicada a las semillas sintéticas, en la cual un explante es recubierto por una matriz de alginato de sodio y polimerizado en una solución de cloruro de calcio formando un gel alrededor del explante de alginato de calcio. Una vez llevada a cabo la encapsulación, se realizan pre-tratamientos generalmente con sacarosa (desde 0.3 hasta 1.5M), que actúa como crioprotector del explante. En especies tolerantes al frío, la exposición de las plantas madres a bajas temperaturas durante varias semanas previas a la criopreservación, incrementa la supervivencia.

La deshidratación puede llevarse a cabo sometiendo las cápsulas de alginato (conteniendo a los explantes) a una corriente de aire en el flujo laminar o exponiéndolas en cámaras herméticamente cerradas con silica gel. Las cápsulas así deshidratadas pueden ser llevadas directamente a inmersión en nitrógeno líquido o bien a un descenso lento de temperatura.

Vitrificación:

Esta técnica, involucra el pre-tratamiento de las muestras con soluciones de vitrificación. Ejemplos de estas soluciones muy utilizadas en el mundo son el PVS2 o bien otra compuesta por 40% etilenglicol, 15% sorbitol y 6% albúmina sérica bovina.

Luego de la exposición a las soluciones de vitrificación (generalmente a una temperatura de 0°C para disminuir los riesgos de fitotoxicidad), las muestras pueden ser sumergidas directamente en nitrógeno líquido o llevadas a un descenso lento de temperatura. Las soluciones crioprotectoras usadas en los protocolos de vitrificación, son generalmente tóxicas para las células y el tiempo de exposición a la solución

debe estar relacionado con el tamaño del explante y la misma debe ser removida rápidamente luego del descongelado.

Encapsulación-Vitrificación:

La técnica de encapsulación-vitrificación, es una combinación de las técnicas de encapsulación-deshidratación y vitrificación. Las muestras son encapsuladas en alginato de calcio y sometidas a vitrificación durante el enfriamiento. Comparada con la técnica de encapsulación-deshidratación tiene un 30% más de supervivencia. Esto puede explicarse debido a que las cápsulas de alginato de calcio reducen la toxicidad de las soluciones de vitrificación.

Desecación:

La técnica de desecación es un proceso muy simple que sólo requiere la deshidratación del material vegetal, la cual es crucial para el éxito de la crioconservación. Esta técnica consiste en someter al explante a una corriente de aire en un flujo laminar o en cámaras herméticamente cerradas conteniendo silica gel; luego de lo cual se realiza un enfriado rápido, sumergiendo el material directamente en nitrógeno líquido.

Precultivo:

La técnica del pre-cultivo, involucra la incorporación de crioprotectores (durante distintos tiempos que dependen del explante) antes del enfriamiento; como por ejemplo la adición de altas dosis de sacarosa para la crioconservación de meristemas de *Musa spp.*; la utilización de PEG y DMSO en embriones cigóticos de *Triticum aestivum* y *Phaseolus vulgaris*; la utilización de sacarosa y DMSO o glicerol en semillas, embriones cigóticos, polen y anteras de *Oryza spp.* y la utilización de ácido abscísico para la conservación de líneas celulares y de callos de *Oryza sativa*.

Precultivo-Desecación:

Esta técnica es una combinación de dos técnicas descritas anteriormente. Las muestras son tratadas con crioprotectores, parcialmente desecadas y luego sometidas a enfriamiento rápido o lento. Generalmente en el precultivo se

emplean azúcares (sacarosa, glucosa) y con un tiempo de duración variable desde horas como en el caso de la conservación de embriones maduros de *Cocos nucifera*, en el cual el pre-cultivo tuvo una duración de 11-20 hs., hasta 7 días como fue aplicado con éxito en embriones somáticos de *Elaeis guineensis*.

Gotita Congelada:

La técnica de la microgota congelada ha sido aplicada con éxito en ápices de *Solanum tuberosum*, la misma consiste en pretratar (2-3 hs) con DMSO en medio líquido y formar una microgota (2.5 µl) la cual se suspende sobre papel de aluminio y se la lleva a inmersión directa en nitrógeno líquido. Este procedimiento es una adaptación de la técnica clásica desarrollada para meristemas de mandioca.

Esta técnica ha sido satisfactoriamente aplicada en 150 variedades de *Solanum tuberosum* con un porcentaje de supervivencia del 40%.

Conclusiones:

Los recursos fitogenéticos constituyen un reservorio de información genética imprescindible para la solución de muchos de los problemas a los que se enfrenta la agricultura. Los métodos para asegurar su conservación son diversos y cada uno de ellos posee sus ventajas e inconvenientes. Por ello, se considera que el conjunto de técnicas de conservación *in situ* y *ex situ*, son métodos complementarios, no excluyentes, para lograr el objetivo común de preservar los recursos fitogenéticos, como parte esencial de una estrategia global para la conservación de la biodiversidad.

En la última década se han producido avances significativos en el desarrollo de técnicas *in vitro* de conservación. La disponibilidad de bancos de germoplasma *in vitro*, tanto en condiciones de crecimiento lento como la conservación a temperaturas ultrabajas (crioconservación), han contribuido a dicho avance. Algunos ejemplos de conservación de germoplasma en crecimiento lento son usados como rutina en Centros Internacionales, como por ejemplo, para la conservación de germoplasma de mandioca en el CIAT Cali, Colombia y para la conservación de germoplasma de papa en el CIP (Centro Internacional de la Papa) en Perú. Además, es

importante resaltar que las técnicas de crioconservación ofrecen una alternativa muy valiosa cuando se piensa en conservar los recursos fitogenéticos por tiempo ilimitado (años), si bien hasta el momento solo se aplica como rutina para la conservación de líneas celulares en laboratorios de investigación y para la conservación de algunos genotipos pertenecientes a los géneros *Rubus spp.*, *Pyrus spp.*, *Solanum spp.* y *Elaeis guineensis*.

Lecturas Recomendadas:

- Engelmann, F. 1997. Status report on the development and application of *in vitro* techniques for the conservation and use of plant genetic resources. Engelmann, F. (ed.) IPGRI :1-63.
- Engelmann, F. and H. Takagi. 2000. Cryopreservation of tropical plant germoplasm. Current research progress and application. Engelmann, F. and H. Takagi (eds.) JIRCAS-IPGRI pp 496.
- Mroginski, L.A., W.M. Roca, K.K. Kartha. 1991. Criopreservación del Germoplasma. En: Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Roca W. M. y L. A. Mroginski (eds.) CIAT (32):715-730.
- Roca, W.M., D.I. Arias y R. Chávez. 1991. Métodos de conservación *in vitro* de germoplasma. En: Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Roca, W.M. y L.A. Mroginski (eds.) CIAT (31):697-714.