

OBSERVACION IN VITRO DE GERMOPLASMA *

Diana Isabel Arias y William M. Roca**

I. INTRODUCCION

Los recursos genéticos de los cultivos pueden ser conservados como semilla, polen, órganos vegetativos o plantaciones en el campo.

Cualquiera que sea el método para conservar material vegetal es necesario que garantice máxima viabilidad y estabilidad genética, además que los materiales se encuentren tan libres de enfermedades como sea posible.

Las semillas cumplen con la mayoría de estos requisitos pero en el caso de especies de propagación vegetativa la conservación de semillas no es apropiada debido a problemas de infertilidad, segregación genética alta, etc. En estos casos la conservación se hace en forma de plantaciones en el campo pero generalmente el material se expone a plagas y enfermedades, a problemas de suelo y climáticos y los requerimientos de tierra, mano de obra y otros insumos son bastante altos.

Las técnicas de cultivo de tejidos ofrecen alternativas para la conservación de germoplasma de especies que se propagan vegetativamente, permitiendo mantener en áreas pequeñas los materiales libres del ataque de plagas, disminuyendo mano de obra facilitando además el intercambio internacional de germoplasma y más aún facilita la formación de genotecas.

En general el uso de los métodos in vitro para la conservación de germoplasmas comprende los siguientes pasos:

1. Excisión del tejido u órgano de la planta madre
2. Establecimiento del cultivo in vitro.
3. Conservación por medio de un método adecuado
4. Recuperación de tejido viable de la fase de conservación
5. Regeneración de plantas

* Contribución Unidad de Biotecnología Centro Internacional de Agricultura Tropical - CIAT

**Respectivamente Bióloga y Fisiólogo Ph.D. Director Unidad de Investigación en Biotecnología, CIAT, A.A. 6713 Cali - Colombia.

Aunque existe un rango amplio de posibles explantes para conservar in vitro, los cultivos de meristemos son particularmente apropiados por su limpieza de microorganismos, requerimientos de pequeño espacio, potencial de propagación alto y estabilidad genética alta.

Es grande el rango de especies vegetales cultivadas cuya conservación es accesible a las técnicas in vitro; algunos ejemplos son:

<u>Solanum</u>	<u>Citrus</u>
<u>Manihot</u>	<u>Eleais</u>
<u>Musa</u>	<u>Coccus</u>
<u>Saccharum</u>	<u>Persea</u>
<u>Vitis</u>	<u>Theobroma</u>
<u>Coffea</u>	<u>Mangifera</u>

Se han propuesto dos tipos de bancos genéticos in vitro:

- a. Banco genético in vitro activo (IVAG en inglés) donde los cultivos se mantienen en crecimiento lento.
- b. Banco genético in vitro básico (IVBG en inglés) donde los cultivos son crioconservados.

El IVAG se está desarrollando en alto grado, para las especies de yuca, papa, batata, banano y caña de azúcar y constituye una colección de trabajo.

El IVBG constituye una colección básica, a largo plazo, este tipo de banco permite un mantenimiento total de la estabilidad genotípica del germoplasma. No obstante debe realizarse una evaluación cuidadosa de las ventajas y desventajas de cada estrategia de conservación in vitro para cada cultivo.

Algunos aspectos que se deben tener en cuenta en la conservación in vitro son:

1. **Regeneración:** a pesar de la totipotencia de las células vegetales, la regeneración de plantas enteras es un problema para ciertas especies, como por ejemplo en cacao donde a pesar de partir de meristemos la obtención de una planta es compleja.
2. **Viabilidad:** los cultivos in vitro deben evaluarse sistemáticamente.

En condiciones de crecimiento lento, en que el período de transferencia de los cultivos se extiende durante meses o años, la frecuencia de evaluación de los cultivos aumenta en comparación con la evalua-

ción que se haría al material almacenado bajo nitrógeno líquido.

Se debe conocer el comportamiento del cultivo in vitro para determinar cuáles son los parámetros a evaluar.

3. **Estabilidad genética:** el material recuperado de la conservación in vitro debe representar genéticamente el material utilizado. Cualquier sistema de cultivo in vitro será inaceptable si introduce un alto riesgo de inestabilidad genética o de selección entre genotipos.

La monitoría de la estabilidad genética se puede hacer mediante criterios morfológicos, bioquímicos y moleculares, deben ser tomados en conjunto y no un sólo sistema por separado.

4. **Sistematización de la información:** toda la información procedente de un banco de germoplasma debe ser almacenada en una base de datos. Esta información será la referente a pasaporte, datos sobre origen, colector, fecha de introducción, etc., caracterización genotípica, tanto en el campo, in vitro, indexación de enfermedades, micropropagaciones, intercambio internacional, personal, equipos, costos, etc.

II. METODOS DE CONSERVACION IN VITRO

Hay dos formas básicas de conservación del germoplasma: mediante la limitación del crecimiento a tasas mínimas y mediante la supresión total del crecimiento.

- Limitación del crecimiento. Consiste en mantener los cultivos en condiciones físicas (factores ambientales) o químicos (composición del medio de cultivo) que permitan extender al máximo el intervalo de transferencia del material viejo a medios frescos sin que ello afecte la viabilidad de los cultivos.

La tasa de crecimiento de los cultivos in vitro puede controlarse usando principalmente los siguientes factores:

- Temperatura y luz
- Reguladores de crecimiento
- Concentración osmótica del medio
- Concentración de nutrientes
- Otros

A pesar de que hay varios sistemas para controlar la tasa de crecimiento de los cultivos se recomienda empezar a ensayar los más sencillos o sea los que modifican sólo condiciones físicas como por ejemplo temperatura o luz.

- Temperatura. La reducción de la temperatura de crecimiento ha sido el factor más ampliamente utilizado; esta reducción depende de la especie en cuestión, de sus condiciones originales de cultivo, es decir si la especie es de zonas templadas resistirá temperaturas muy bajas como por ejemplo fresa 6°C, uva 8-10°C, contrario a lo que pasa con especies tropicales las cuales se conservan entre 18-28°C en promedio, tal es el caso de la yuca que no resiste temperaturas inferiores a 20°C.

- Reguladores del crecimiento. Los reguladores de crecimiento de tipo hormonal influyen en la tasa de crecimiento de los cultivos. Los niveles de citoquininas y de inhibidores del crecimiento, como el ácido abscísico, interaccionan con la concentración de sacarosa y la temperatura de conservación en el mantenimiento de la viabilidad de los cultivos in vitro.

- Concentración osmótica. La limitación del crecimiento por efecto de la concentración osmótica se debe posiblemente a la reducción de la absorción de agua y nutrientes del medio.

La sacarosa, el manitol y el sorbitol pueden actuar osmóticamente y han sido los agentes más usados como osmoreguladores.

- Concentración de nutrientes. La reducción del crecimiento también se logra privando los cultivos de ciertos nutrientes orgánicos o inorgánicos.

La relación entre la concentración de carbohidratos y los componentes nitrogenados del medio nutritivo pueden tener efecto sobre las tasas de crecimiento y la morfogénesis en los cultivos in vitro. Cuando el balance favorece el contenido de nitrógeno en el medio hay formación de vástagos, cuando tiende a mayor contenido de carbono hay mayor formación de raíces.

Hay otra serie de factores que en mayor o menor medida afectan el tiempo de conservación in vitro tales son:

- Fotoperíodo
- Tamaño de los tubos de ensayo
- Calidad del agente gelatinizante
- Tipo de tapa del tubo, etc.

- Supresión del crecimiento. Cuando se conserva germoplasma mediante cultivo de tejidos in vitro a largo plazo siempre existe un riesgo mayor o menor de inestabilidad citogenética. Este riesgo se puede minimizar utilizando tejidos organizados y reduciendo la temperatura.

Conforme se reduce la temperatura de un tejido, el metabolismo celular disminuye hasta llegar a un estado de actividad latente o "suspensión animada" cuando la temperatura alcanza niveles por debajo de -150°C . A esta temperatura, los procesos biológicos han cesado y por lo tanto las posibles causas de inestabilidad citogenética se habrán eliminado.

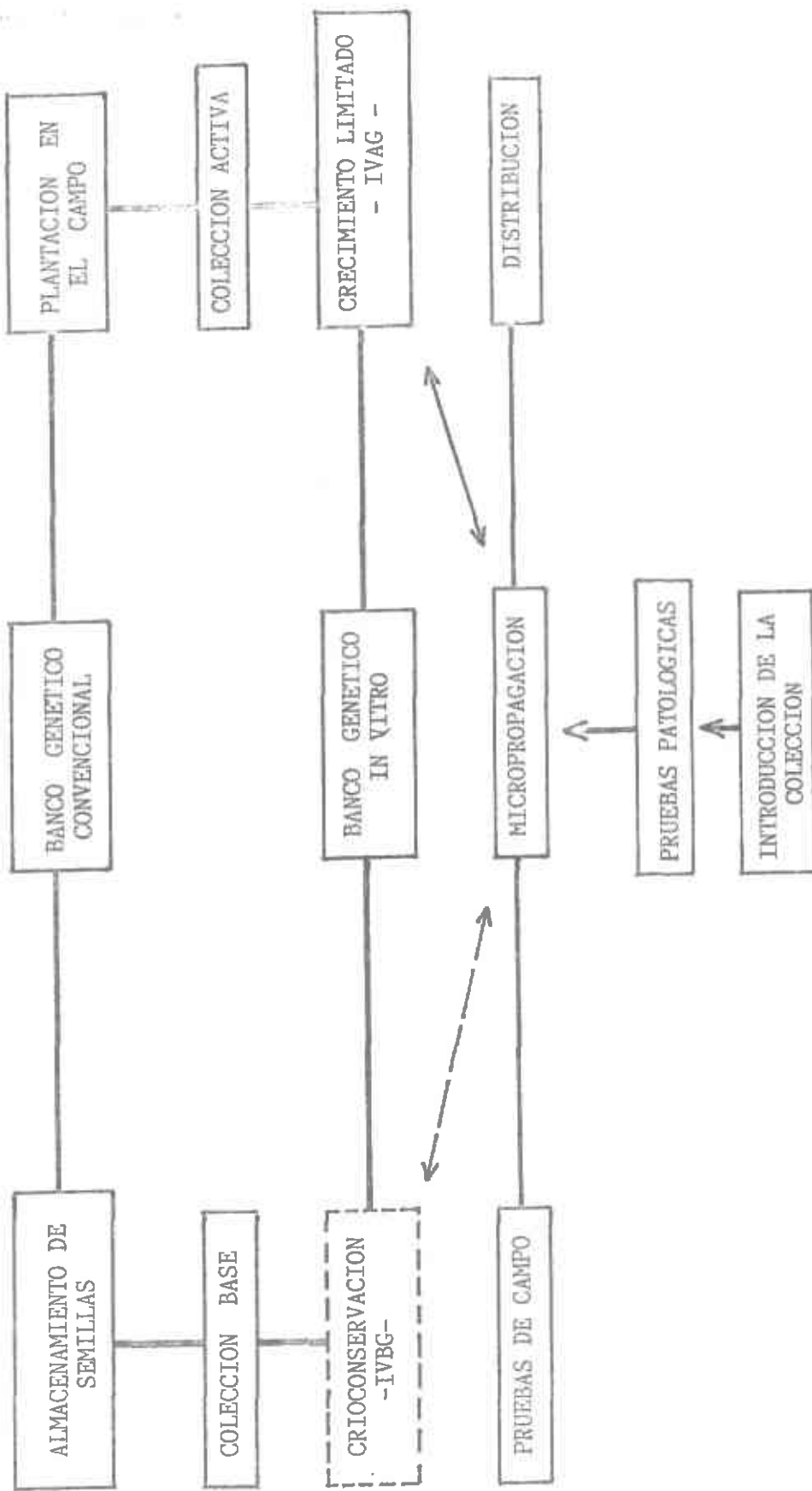
Cualquiera que sea el sistema in vitro escogido para conservar germoplasma, se debe tener en cuenta que estos son complementos para los sistemas tradicionales de conservación.

- Banco de Yuca in vitro. Más de 4.000 variedades de la colección mundial de germoplasma de yuca reunida en el CIAT han sido puestas en almacenamiento in vitro bajo condiciones de crecimiento mínimo.

Dependiendo de la variedad se pueden tener entre 18 y 24 meses sin transferir a medios nuevos. Durante todo este tiempo de almacenamiento, los cultivos producen yemas axilares cuyo número está directamente relacionado con la viabilidad del cultivo y en consecuencia con su potencial de micropropagación. Al final de cada ciclo de almacenamiento; las yemas axilares se transfieren a un medio nuevo y se inicia así un nuevo ciclo.

III. BIBLIOGRAFIA

1. Henshaw, G.G. 1975. Technical aspects of tissue culture storage for genetic conservation. En: Crop genetic resources for today and tomorrow. Frankel, O.H. y Hawks, J.G. (eds.). Cambridge University Press, Inglaterra. p.349-368.
2. IBPGR (International Board for Plant Genetic Resources). 1983. IBPGR Advisory Committee on in vitro storage; Report of the first meeting. Rome, 11 p.
3. Ramírez, H.; Hussain, A.; Roca, W.; Bushuk, W. 1987. Isozyme electrophore grams of sixteen enzymes in five tissues of cassava (Manihot esculenta Crantz) varieties. Euphytica 36: 39-48.
4. Roca, W.M. 1984. Cassava. In: Handbook of Plant Cell Culture. Vol. 2. Eds. W.R. Sharp, D.A. Evans, R.V. Amirato, Y. Yamada. p. 269-301.



Anexo 1. Integración de los métodos in vitro en las estrategias convencionales de conservación de germoplasma de yuca (Manihot esculenta).

5. Roca, W. 1985. Cassava Tissue Culture. In: Cock J.H. and Reyes, J.A. (Ed.). Cassava: Research, production and utilization UNDP-CIAT.
6. Roca, W.M., Chávez, R., Marín, M.L. Arias, D.I., Mafla, G., and Reyes, R. 1989. In vitro methods of germplasm conservation. Genoma 31 (in press).
7. Withers, L.A. 1980. Tissue Culture Storage for Genetic Conservation. IBPGR Technical Report. Rome.
8. Withers, L.A. 1988. In vitro conservation and germplasm utilization. In: Brown, A.D.H.; O.H. Frankel; D.R. Marshall; J.T. Williams (Eds.). The use of crop genetic resources collection. Cambridge Univ. Press.