

PARTE IV
***Métodos de propagación
y conservación de germoplasma***

IV. CAPÍTULO 1

Micropropagación

Sofía Olmos, Gabriela Luciani y Ernestina Galdeano

1 Introducción

La micropropagación consiste en la propagación de plantas en un ambiente artificial controlado, empleando un medio de cultivo adecuado. El cultivo es así una herramienta muy útil en los programas de mejoramiento, ya que tiene el potencial de producir plantas de calidad uniforme a escala comercial, a partir de un genotipo selecto y con una tasa de multiplicación ilimitada. Esto es posible gracias a la propiedad de totipotencia que tienen las células vegetales; esto es la capacidad de regenerar una planta completa cuando están sujetas a los estímulos adecuados. Así, las células somáticas de cualquier tejido podrían formar tallos, raíces o embriones somáticos de acuerdo con la competencia que posea y al estímulo que reciban.

Dependiendo de las características de la planta que se pretenda propagar y del objetivo perseguido, la micropropagación puede realizarse a través de tres vías de regeneración: brotación de yemas adventicias preexistentes, producción de yemas *de novo* y embriogénesis somática.

2 Etapas de la micropropagación

La micropropagación presenta cuatro etapas principales: 1) establecimiento del cultivo, 2) desarrollo y multiplicación de vástagos o embriones, 3) enraizamiento y 4) aclimatación de las plántulas. Generalmente, las etapas de enraizamiento y aclimatación pueden combinarse en condiciones *ex vitro*. En el caso de la embriogénesis somática, el enraizamiento es reemplazado por una etapa de maduración y germinación de los embriones para la diferenciación de los ápices caulinar y radicular. En algunos casos tiene importancia considerar una etapa previa (Etapa 0) que es la etapa de preparación de los explantos para el establecimiento.

Etapa 0: Preparación del material vegetal

La correcta elección y preparación del explanto incide directamente sobre la calidad del mismo y su respuesta frente a los dos principales problemas que afectan al establecimiento del cultivo, que son la contaminación con microorganismos y la oxidación del explanto.

Los factores que influyen sobre la calidad del explanto son: el tipo de órgano que sirve como explanto, la edad ontogénica y fisiológica del mismo, la estación en la cual se colecta el material vegetal, el tamaño y el estado sanitario general de la planta donante.

La planta donante debe elegirse en base a una selección masal positiva para las características agronómicas deseables. Una vez seleccionados los individuos, es preciso definir el tipo de explanto a establecer en condiciones *in vitro*. En general, los órganos jóvenes o bien rejuvenecidos son los que tienen mejor respuesta en el establecimiento que los obtenidos a partir de materiales adultos.

El empleo de explantos que se encuentran expuestos a bajos niveles de patógenos puede resolver el problema de la contaminación por hongos y bacterias durante el establecimiento del cultivo *in vitro*.

Se recomienda colectar explantos primarios a campo durante la estación primaveral y estival, cuando existe una brotación activa de las yemas, ya que el empleo de yemas en estado de dormición ocasiona serios problemas de contaminación.

A fin de lograr explantos de óptima calidad es conveniente hacer crecer las plantas donantes por un tiempo mínimo en condiciones de invernáculo. De esta forma es posible incidir directamente sobre el estado sanitario y la calidad de los explantos mediante el control de la intensidad lumínica, temperatura y reguladores de crecimiento. Para especies ornamentales tropicales y subtropicales se recomienda mantener las plantas donantes en condiciones de alta temperatura (25°C) y baja humedad relativa (75%) a fin de reducir la proliferación de patógenos.

Los procesos morfogénicos de floración, dormición y bulbificación son controlados por el fotoperíodo y la temperatura. Controlando estos factores también es posible obtener plantas

donantes y explantos más homogéneos durante todo el año. Pueden aplicarse además pretratamientos con reguladores de crecimiento a las plantas donantes, así como también a los explantos mismos. En especies leñosas suele utilizarse como pretratamiento la inmersión de los explantos primarios en soluciones con citoquininas a fin de inducir la brotación de yemas.

Etapas 1: Establecimiento del cultivo

El objetivo de esta etapa es establecer cultivos viables y axénicos. El éxito está determinado por la calidad del explanto a utilizar. En esta etapa los principales procesos a controlar son la selección, el aislamiento y la esterilización de los explantos.

Los materiales que demuestran tener mayor capacidad regenerativa son los obtenidos de tejidos meristemáticos jóvenes, ya sean yemas axilares o adventicias, embriones o semillas en plantas herbáceas y aquellos tejidos meristemáticos que determinan el crecimiento en grosor, como el cambium en las plantas leñosas. En este sentido, es importante señalar que el empleo de yemas adventicias (también llamadas yemas formadas de *novo*) está asociado con una mayor probabilidad de ocurrencia de variantes somaclonales respecto de los sistemas de propagación basados en la regeneración a partir de yemas axilares o embriones somáticos.

La obtención de cultivos axénicos puede lograrse trabajando tanto sobre aspectos preventivos como curativos. Una acción preventiva la constituye el empleo de métodos de verificación de patógenos en los explantos. Esto puede realizarse mediante análisis específicos para las enfermedades del cultivo, tales como DAS-ELISA o PCR, análisis generales para patógenos cultivables como el empleo de medios de cultivo para el crecimiento de bacterias y hongos y métodos específicos para la detección e identificación de patógenos intracelulares como virus, viroides y bacterias. La realización de estos análisis directamente sobre las plantas donantes, previo establecimiento, presenta dos ventajas. En primer lugar, el empleo de tejidos maduros permite visualizar los síntomas más marcados de la enfermedad, en segundo lugar,

la carga de patógenos es mayor y por lo tanto la precisión del sistema de detección aumenta. Por otro lado, las plantas enfermas pueden tratarse con técnicas adecuadas para la eliminación de patógenos como la termoterapia, la quimioterapia a través de la aplicación de antibióticos, desinfectantes, antivirales y el cultivo de meristemas.

La desinfección superficial incluye varios pasos: el lavado de los explantos con agua corriente, el empleo de etanol al 70% por 1 minuto, seguido de concentraciones variables de hipoclorito de sodio (0,5 a 1,5% de cloro activo) con unas gotas de tensoactivos para favorecer su penetración y actividad. Posteriormente, los explantos deben ser enjuagados al menos tres veces con agua destilada estéril.

Algunos patógenos permanecen latentes y se expresan cuando son transferidos a un medio de cultivo nuevo. En general, estos patógenos incluyen los patógenos superficiales del material vegetal, los patógenos endógenos y los patógenos propios del manejo en laboratorio. En la Etapa 1 también pueden observarse infecciones por bacterias y hongos asociados a trips que sobreviven a los tratamientos de esterilización y por patógenos endógenos latentes dentro del sistema vascular, resultado de una esterilización inefectiva de los explantos. Estos patógenos latentes podrían manejarse mediante el empleo de bacteriostáticos o antibióticos en el medio de cultivo.

Etapas 2: Multiplicación

El objetivo de esta etapa es mantener y aumentar la cantidad de brotes para los nuevos ciclos de multiplicación sucesivos (subcultivos) y poder destinar parte de ellos a la siguiente etapa de producción (enraizamiento, bulbificación, etc.). Ambas vías de regeneración, organogénesis y embriogénesis, pueden darse en forma directa o indirecta. Esta última implica la formación de callo. En general, la organogénesis conduce a la producción de vástagos unipolares que enraízan en etapas sucesivas, mientras que por embriogénesis somática se forman embriones bipolares a través de etapas ontogénicas similares a la embriogénesis cigótica.

Es importante señalar que cualquiera sea la vía de regeneración empleada, es convenient-

te evitar la formación de callo para disminuir el riesgo de variación somaclonal. Los medios de cultivo, los reguladores de crecimiento como auxinas, citocininas y ácido giberélico y las condiciones de crecimiento juegan un papel crítico sobre la multiplicación clonal de los explantos.

La organogénesis puede darse por inducción de yemas axilares o adventicias. La inducción de yemas axilares comprende la multiplicación de yemas preformadas, usualmente sin formación de callo. La inducción de yemas adventicias comprende la inducción de tejido meristemático localizado mediante un tratamiento con reguladores de crecimiento, conduciendo a la diferenciación del primordio y desarrollo del vástago, esto último generalmente en ausencia del regulador de crecimiento que indujo la organogénesis.

La principal desventaja del primer método es que el número de yemas axilares por explanto limita la cantidad de vástagos. Esto se ve compensado, sin embargo, por un aumento en la tasa de multiplicación con los sucesivos subcultivos. La formación de yemas adventicias ofrece mayor potencial para la producción de vástagos, ya que ocurre en sitios distintos al de los meristemas.

La embriogénesis somática es una vía más conveniente porque permite saltar las etapas de formación de yemas y enraizamiento, regenerando plantas en una forma mucho más rápida y eficiente. A su vez, la disponibilidad de protocolos para la obtención de embriones somáticos es clave para la automatización de la micropropagación y la consecuente reducción de costos para su implementación a escala comercial. Los biorreactores son equipos que contienen aproximadamente 2 litros de medio de cultivo líquido estéril y donde los embriones somáticos pueden regenerar y madurar a partir de suspensiones celulares, sustentados por la circulación permanente de nutrientes y de aire (Fig.1). Hoy en día, el empleo de biorreactores para la micropropagación a gran escala está limitado por dos motivos críticos. En primer lugar, el declinamiento de las líneas celulares (clones) por efecto de la variación somaclonal y segundo, por los altos costos asociados con la conversión de estos embriones somáticos en plántulas.

Las condiciones culturales en las cuales crece el explanto son el resultado de la interacción de tres factores: el estado del explanto o material vegetal, determinado en parte por el medio de cultivo, el recipiente de cultivo y el ambiente externo o condiciones de crecimiento del cuarto de cultivo. La capacidad de respuesta de los explantos a un mismo medio de cultivo cambia con el número de subcultivos, el tipo de explanto subcultivado y el método del repique. Por esto mismo, el medio de cultivo debe optimizarse a fin de lograr la mayor tasa de multiplicación vegetativa. Comúnmente se emplea como medio basal el medio MS completo sugerido por Murashige & Skoog (1962) suplementado con 3% de sacarosa como fuente de carbono. A este medio se le adicionan además reguladores de crecimiento, tanto del tipo de auxinas como de citocininas.

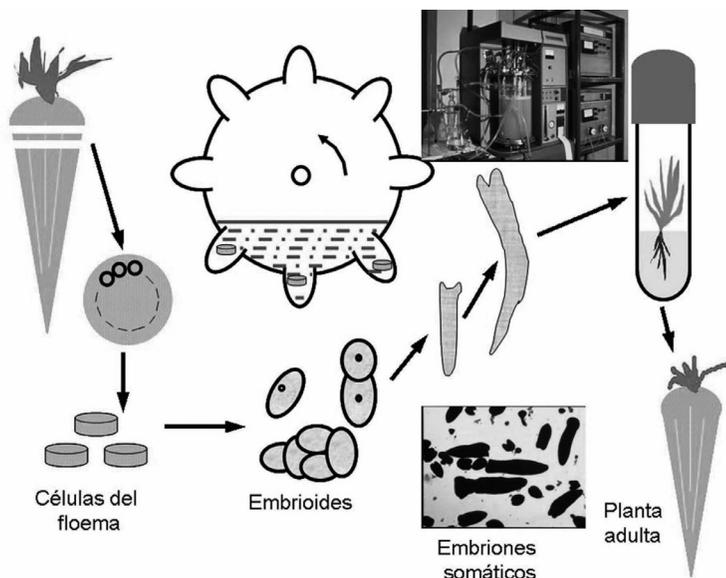


Figura 1: Embriogénesis somática en zanahoria. A partir de células del floema se obtienen los embriones somáticos que son un excelente sistema de propagación clonal. Los biorreactores permiten el cultivo a gran escala de los mismos.

La etapa de multiplicación generalmente comprende dos períodos, la fase de inducción y la fase de multiplicación propiamente dicha. La primera implica, generalmente, el empleo de concentraciones elevadas de reguladores de crecimiento (generalmente de auxinas más que citocininas) para favorecer la dediferenciación. La segunda etapa requiere del empleo de un balance hormonal adecuado para favorecer los procesos de diferenciación y multiplicación celular. En este caso el sistema es más dependiente de reguladores del tipo de las citocininas. En algunos casos, como ocurre en la formación de embriones somáticos, se requiere de una tercera y cuarta etapa, denominadas de maduración y de germinación respectivamente, cuya duración varía entre 1 a 2 semanas. Para la etapa de maduración se adiciona ABA (ácido abscísico) al medio basal en rangos de 5 a 20 μM , seguido del subcultivo a un medio basal conteniendo AG (ácido giberélico) en concentraciones de 0,1-1 μM , cuyo fin es lograr la germinación de los embriones obtenidos.

Los tipos de auxinas más empleados son IBA, 2,4-D, AIA, ANA y picloram, y las citocininas BA, CIN, ZEA, 2ip y TDZ. El rango de concentración empleado varía con el regulador del crecimiento, así es que el 2,4-D, por ejemplo se utiliza en concentraciones de 4-35 μM mientras que otra auxina como el IBA, tiene un rango de 0,1 a 2 μM .

Los tipos de reguladores, sus combinaciones y rangos de concentraciones deben ser optimizados para cada especie, genotipo y etapa de multiplicación determinada. Las condiciones de incubación de los cultivos *in vitro* dependen de las especies con que se trabaje. En el caso de las especies subtropicales, por ejemplo, los cultivos se incuban en luz a $27\pm 2^\circ\text{C}$ con 14 horas de fotoperíodo e intensidad lumínica moderada ($100\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$).

La presencia de compuestos fenólicos oxidados se encuentra asociada con tejidos vegetales sometidos a situaciones de estrés, tales como aquel provocado por el daño mecánico producido durante el aislamiento del explanto de la planta madre o durante la transformación. Los compuestos fenólicos liberados al medio pueden inhibir el crecimiento e incluso matar

al explanto. Para minimizar el daño de estos compuestos se emplean agentes adsorbentes de fenoles en el medio de cultivo, tales como el carbón activado y la polivinilpirrolidona o antioxidantes como el ácido ascórbico, la modificación del potencial redox con agentes reductores, la inactivación de las fenoloxidasas con agentes quelantes o la reducción de su actividad o afinidad por el sustrato utilizando un bajo pH, ó bien cultivando *in vitro* en condiciones de oscuridad.

Es recomendable además lograr que la tasa de intercambio gaseoso entre los ambientes del recipiente y externo sea óptima, evitándose la acumulación de CO_2 y de etileno. En este sentido el sellado del recipiente es importante, el intercambio gaseoso es más limitado con el empleo de una tapa de plástico que con un film de polietileno extensible. La utilización de una tapa perforada con tapón de gomaespuma es altamente recomendable (Fig. 2).

El principal problema que puede presentarse durante los sucesivos subcultivos *in vitro* es la vitrificación. La cual consiste en un proceso de morfogénesis anormal con cambios anatómicos, morfológicos y fisiológicos que producen



Figura 2: Plantas de tabaco creciendo *in vitro* en un recipiente de vidrio con tapa metálica perforada y tapón de gomaespuma, que evita la acumulación de CO_2 , etileno y excesiva humedad en el ambiente de cultivo.

hojas de una apariencia vidriosa. Este fenómeno está regulado por dos factores clave que son la humedad relativa y el potencial agua, y afecta a dos procesos fisiológicos fundamentales, la fotosíntesis y la transpiración. Debido a la disfunción metabólica asociada, las plantas se vuelven completamente heterótrofas y transpiran excesivamente debido a un mal funcionamiento estomático y a cambios estructurales en las paredes celulares. La principal consecuencia de la vitrificación es la baja supervivencia de las plántulas obtenida durante la aclimatización *ex vitro*. Por ello, es fundamental conocer el rol de los distintos factores que inciden negativamente sobre el desarrollo morfogénico normal (parcialmente autótrofo) *in vitro*. Estos factores son el ambiente de cultivo, los componentes orgánicos e inorgánicos del medio, los reguladores de crecimiento, la luz y la temperatura. Una baja humedad relativa, elevada irradiación, la remoción de la fuente de carbohidratos del medio de cultivo y la defoliación de las plantas para estimular la formación de hojas nuevas estimulan la fotosíntesis y otras actividades metabólicas de las hojas en forma normal. Otras estrategias para lograr un óptimo crecimiento implican el empleo de retardantes del crecimiento para estimular la formación de hojas nuevas después del trasplante. O bien, el empleo de altos niveles de CO₂ (antagonista del etileno) para estabilizar la vía de lignificación y prevenir la vitrificación a través de la inhibición de la hiperhidratación, la hipolignificación y la formación de aerénquima.

Etapas 3: Enraizamiento y aclimatización

En esta etapa se produce la formación de raíces adventicias. En las especies herbáceas es relativamente fácil mientras que en muchas especies leñosas resulta más complicada por su limitada capacidad rizogénica.

El enraizamiento puede realizarse tanto en condiciones *in vitro* como *ex vitro*. En el primer caso pueden emplearse varios tipos de sustratos y reguladores de crecimiento (principalmente auxinas) para promover la rizogénesis. Los sustratos incluyen: medio solidificado con agar, perlita y/o vermiculita humedecidas con medio nutritivo o agua. En un medio solidificado con agar, los nutrientes se reducen de ½

a ¼ de la composición original, y la sacarosa se reduce a una concentración final de 1-2%. Medios con baja concentración salina, como el WPM (Lloyd & McCown, 1981) y GD (Gresshoff & Doy, 1972) incrementan el porcentaje de enraizamiento de vástagos axilares en plantas latifoliadas. El empleo de agar presenta ventajas y desventajas sobre la rizogénesis. Por un lado, el enraizamiento de especies forestales en agar se favorecería al producirse una rizogénesis más sincrónica como resultado del contacto íntimo de las estacas con el medio de cultivo. Sin embargo, las raíces producidas por este método son usualmente engrosadas y no poseen pelos radiculares. Adicionalmente, el empleo de agar está asociado con la formación de callo en la base de las estacas, que conduce al establecimiento de conexiones vasculares interrumpidas entre raíces y vástagos.

Comúnmente, a fin de proceder a su enraizamiento, los vástagos de buen tamaño provenientes de la etapa de multiplicación y provistos de al menos 4-5 yemas, se colocan durante periodos cortos en soluciones con concentraciones elevadas de auxinas. La auxina más utilizada es el IBA, que puede utilizarse a concentraciones de 1-10 µM durante pocas horas. Alternativamente se pueden emplear niveles más bajos de auxinas (0,1 a 1 µM), pero manteniendo la inducción por un periodo más prolongado (3 a 7 días). Luego los vástagos se transfieren a un medio de cultivo basal desprovisto de reguladores de crecimiento para permitir el desarrollo de las raíces. Aproximadamente 20 días después del tratamiento de inducción, es posible la obtención de una adecuada cantidad de raíces funcionales que permitan continuar hacia la etapa de aclimatización.

Es importante acentuar que el uso de auxinas a elevadas concentraciones es contraproducente porque induce la formación de callo en la base de las estacas. Por ello para cada cultivo es necesario optimizar un protocolo de rizogénesis que minimice la formación de callo y maximice la tasa de rizogénesis y supervivencia de las plantas.

El enraizamiento *ex vitro* permite que el enraizamiento y aclimatización se logren simultáneamente y que raramente se forme callo en la base de las estacas, asegurando así una

conexión vascular continua entre el vástago y la raíz. Sin embargo, el estrés asociado a la transpiración acelerada de las plantas durante las etapas iniciales del trasplante puede reducir considerablemente la tasa de supervivencia. Por ello, es conveniente contar con instalaciones de invernadero o cámaras de crecimiento adecuadas para brindar temperatura y humedad relativa moderadas que permitan lograr la rusticación de las plantas en forma progresiva. Bajo condiciones *ex vitro* se utilizan diferentes substratos, mezclas de tierra y arena y/o abonos, los cuales convienen que estén debidamente desinfectados.

3 Propagación de especies leñosas

El empleo de clones en programas de reforestación de muchas especies genera al menos un 10 % de incremento en ganancia genética en relación al empleo de plantas regeneradas por semillas de árboles selectos. Sin embargo, la máxima ganancia genética puede ser obtenida mediante el empleo conjunto de propagación sexual y agámica. La reproducción sexual es importante para la introducción de genes nuevos, prevenir los efectos de la endogamia y el mejoramiento de características controladas por efectos aditivos de genes. La reproducción asexual por otro lado permite la multiplicación de individuos o grupos de individuos seleccionados de una población elite, que exhiben una significativa ganancia genética debida a efectos no aditivos de genes.

Tradicionalmente, las especies forestales fueron propagadas vegetativamente mediante el enraizamiento de estacas, de braquiblastos en coníferas, así como por injertos. La propagación por estacas de *Cryptomeria japonica* (cedro japonés), *Populus* spp. (álamos) y *Salix* spp. (sauces) ha sido llevada a cabo durante siglos en Asia y Europa. Sin embargo, para la mayoría de los árboles propagados por estacas se observa una rápida pérdida de capacidad de rizogénesis al aumentar la edad de la planta donante de las estacas. En este sentido, una de las principales ventajas de la micropropagación es la capacidad potencial de desarrollar protocolos de multiplicación optimizados para multiplicar árboles adultos que han demostrado ser fenotípicamente superiores.

Los trabajos pioneros en el cultivo de tejidos cambiales de especies forestales condujeron, en el año 1940, a la formación de yemas adventicias en *Ulmus campestris*. Durante la década del 40 se publicaron logros adicionales en la producción separada de vástagos y raíces en especies latifoliadas. En 1950 se publicó por primera vez la obtención de organogénesis en coníferas, con la formación de vástagos a partir de callos de *Sequoia sempervirens*. En la década 1970-80 se obtuvieron las primeras plantas de álamo (*Populus tremuloides*) y *Pinus palustris*. En ambos casos la formación de plántulas se logró vía organogénesis. Luego del año 1975 la micropropagación de especies latifoliadas se realizó a través de la regeneración indirecta, pasando por una etapa de callo.

El principal método utilizado para especies latifoliadas es la brotación de yemas adventicias, empleando ápices de vástagos, yemas laterales y microestacas. En las coníferas, la elongación de las yemas axilares a partir de braquiblastos de plantas adultas no ha sido muy exitosa. En latifoliadas de clima templado los mejores explantos los constituyen las yemas y vástagos en activo crecimiento más que las yemas en estado de dormición. Los vástagos se colectan en primavera y a principios del verano a fin de obtener material con reducido nivel de contaminación. Alternativamente las yemas en dormición pueden ser colectadas y brotadas en condiciones ambientales controladas.

Para la inducción de vástagos, tanto en gimnospermas como en angiospermas, se requiere el empleo de citocininas. La más usada es la N⁶-benciladenina (BA) o también llamada 6-bencil amino-purina (BAP) y el tidiazurón (TDZ).

Los medios basales más usados para angiospermas son el MS (Murashige & Skoog, 1962) o el WPM (Lloyd & McCown, 1981). Para el caso de gimnospermas, el empleo de medios reducidos en sales minerales y baja cantidad de nitrógeno resulta mucho mejor que el empleo de un medio altamente salino y nitrogenado como el MS.

La inducción de yemas adventicias es el método más empleado para gimnospermas y angiospermas. En este caso, las yemas se inducen directamente sobre el explanto en ge-

neral sin previo pasaje por una etapa de callo. En general, cuanto más joven es el tejido, tanto mayor es la respuesta a los tratamientos que conducen a la organogénesis de *novo*. Los explantos más frecuentes son embriones cigóticos maduros, seguido de cotiledones y epicótilos de plántulas. Generalmente se utiliza BA a concentraciones mayores o iguales a 5 ppm como única fuente de inducción o en combinación con otras citocininas. La adición de auxinas puede ser beneficiosa, aunque en coníferas se ha encontrado que promueve la formación de callo y reduce el proceso de organogénesis.

En algunos casos, como en *Populus spp.*, la formación de yemas adventicias se logra a partir de un callo originado a partir de tejido cambial.

El método llamado multiplicación mediante nódulos meristemáticos es un método también utilizado para *Pinus radiata* y álamo. En este caso se obtiene básicamente un tejido meristemático (no un verdadero callo) usando relaciones altas de auxina/citocinina para luego inducir la producción de vástagos.

La disponibilidad de protocolos vía embriogénesis somática para especies forestales es aún limitada. En la angiospermas los primeros embriones somáticos se obtuvieron de *Santalum album*, donde sin embargo no fue posible la obtención de plantas completas. Recién 20 años después pudieron lograrse plantas completas de abeto (*Picea abies*), una gimnosperma. En las gimnospermas los mayores éxitos se lograron empleando como explantos embriones cigóticos maduros e inmaduros. En la mayoría de los casos los embriones se originan en forma indirecta a partir de callos embriogénicos o bien, directamente desde el explanto. En las coníferas puede ocurrir un proceso de poliembriónía previa formación de callo que conduce a una alta tasa de multiplicación inicial. En general, los medios de cultivo más efectivos para estos fines contienen elevados niveles de sales y suministran nitrógeno tanto como NH_4^+ y NO_3^- . Las auxinas más comúnmente empleadas en el medio de inducción son el 2,4-D y el ANA, en concentraciones mayores de 2 μM . En algunos casos es necesario además el empleo de alguna citocinina, generalmente en concen-

traciones mayores a 1 μM si se trata de BA y entre 0,1-1 μM en el caso del TDZ.

Los explantos jóvenes de especies leñosas, particularmente angiospermas, a menudo secretan al medio de cultivo polifenoles oxidados, visibles como pigmentos marrones y/o negros. Se observa también, que en los explantos de árboles adultos el problema se acentúa. Por ello se recomienda el empleo de explantos primarios juveniles.

Los tipos de explantos más utilizados para el establecimiento *in vitro* son los segmentos nodales de explantos juveniles, las yemas axilares obtenidas por rejuvenecimiento de plantas adultas, y los embriones cigóticos y plántulas obtenidas de semillas de origen sexual.

La desinfección de los mismos se logra mediante inmersión en etanol al 70 % (1 a 2 minutos) seguido de una solución de lavandina comercial conteniendo de 0,8 a 2,4 % de cloro activo durante 5-30 minutos. En la mayoría de los casos se emplean agentes tensoactivos, tales como Triton® ó Tween 20®, adicionados en la solución de lavandina. En todos los casos los explantos son lavados finalmente varias veces con agua destilada estéril.

Los medios basales más empleados son el MS, formulado por Murashige & Skoog (1962), diluido a la mitad o a un cuarto de su formulación original o el WPM, formulado por Lloyd & McCown (1981). Como medios de multiplicación se emplean además el BTM (broadleaved tree medium, Chalupa, 1983) y el medio de Périnet y Lalonde (1983). Los reguladores de crecimiento más utilizados son ANA y BA. También han sido efectivas auxinas como IBA y 2,4-D, y citocininas como 2iP, CIN, ZEA y TDZ.

En la Fig. 3 se muestran las etapas de la micropropagación de plantas de paraíso gigante, *Melia azedarach* var. *gigantea* L. (Olmos *et al.*, 2002).

3.1 Problemas asociados a la micropropagación de especies leñosas

Es mucho más difícil propagar material adulto que juvenil ya que los primeros son recalci-trantes, es decir, difíciles de regenerar. Sin embargo, aún en estos casos es posible extraer explantos de mayor capacidad regenerativa mediante dos formas: 1) seleccionando los te-

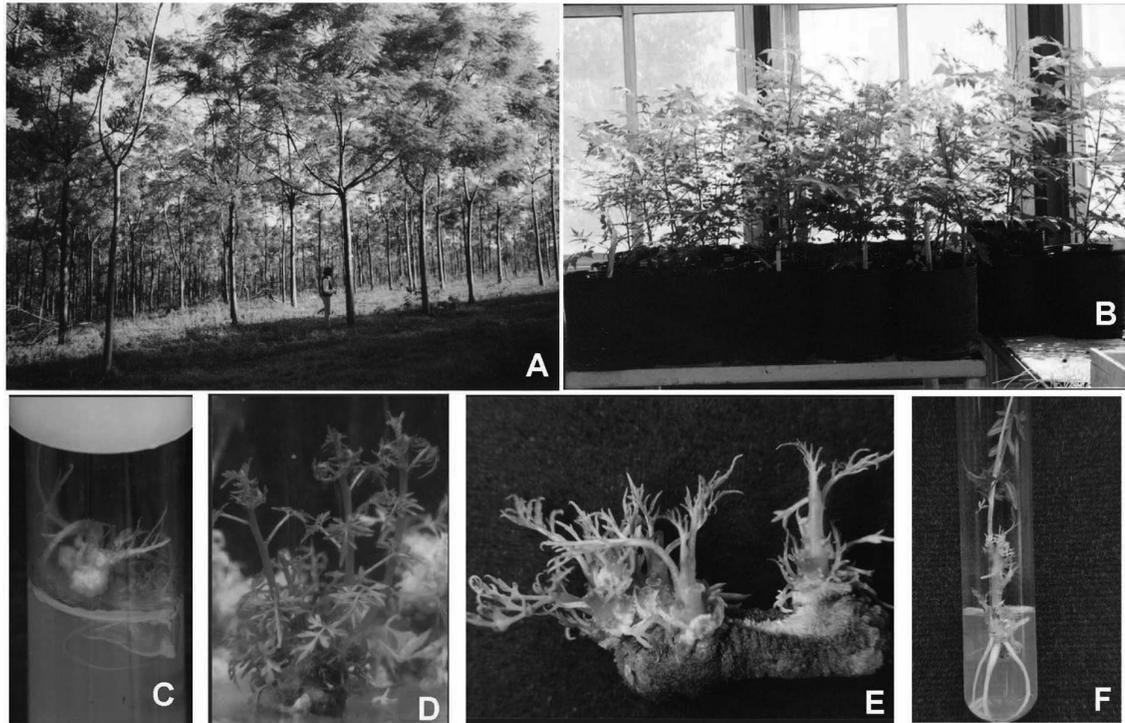


Figura 3: Etapas de la micropropagación en plantas de paraíso gigante, *Melia azedarach* var. *gigantea* L. (Olmos *et al.*, 2002): A) Huerto semillero de paraíso gigante con ejemplares de seis años de edad, provincia de Misiones, Danzer Forestación S.A. Las semillas de los genotipos seleccionados fueron empleadas para generar una población de plantas donantes de explantos. B) Etapa 0, Preparación del material vegetal: plantas de origen sexual de 6 meses de edad crecidas en condiciones de invernadero y utilizadas como donantes de meristemas. C) Etapa 1: Establecimiento del cultivo: vástagos desarrollados a partir de meristemas luego de 30 días sobre medio de establecimiento (Medio basal de Murashige y Skoog, 1962 (MS) suplementado con 2,22 μM 6-bencil amino-purina (BAP) + 0,29 μM ácido giberélico (GA_3) + 0,25 μM ácido 3-indolbutírico (IBA)). D) Etapa de Multiplicación: vástagos luego de 30 días sobre medio de multiplicación (medio MS suplementado con 2,22 μM BAP), estos vástagos fueron empleados como explantos para los subcultivos siguientes o para pasar a la etapa de enraizamiento. E) Explantos provenientes de la etapa de multiplicación con problemas de vitrificación y presencia de callo. En estos casos, el medio de multiplicación para los cultivos subsiguientes fue modificado reduciendo la concentración de BAP a 0,44 μM . F) Vástago enraizado en medio de MS con la concentración salina reducida a la mitad, suplementado con 9,89 μM IBA durante 2 días, seguido por el subcultivo en medio basal durante 30 días hasta estar listo para pasar a la etapa de aclimatización.

jjidos más juveniles dentro de un árbol o, 2) induciendo el *rejuvenecimiento* del árbol donante antes de aislar los explantos.

Para seleccionar el material más juvenil en una planta adulta hay que considerar el fenómeno de *topófisis*. Este es un proceso por el cual el tipo de crecimiento de un nuevo indivi-

duo está determinado por la posición que ocupaba en la planta adulta. Esto es ocasionado por efecto del envejecimiento fisiológico e implica que los explantos más reactivos *in vitro* se encuentran en las yemas de las áreas basales del tronco y raíces.

A su vez, el rejuvenecimiento es un proceso de reversión temporal de las características

adultas que permite lograr material vegetal en estado de juvenilidad. En general, a fin de contrarrestar los efectos debidos a la topósis, se recomienda emplear tejidos juveniles, y un tamaño de explanto muy pequeño.

La juvenilidad puede lograrse por dos métodos. En primer lugar, mediante el empleo de órganos juveniles separados de plantas adultas, la utilización de estacas enraizadas o bien de brotes epicórmicos. En segundo lugar mediante el rejuvenecimiento de partes adultas, la iniciación de yemas adventicias y embriones (en este caso se logra un rejuvenecimiento total por el inicio de un nuevo ciclo ontogénico), del injerto de yemas adultas sobre pies juveniles, de tratamientos con reguladores de crecimiento (como citocininas como el BA), por la poda severa (recepado de árboles adultos) y, a través del cultivo *in vitro* de meristemas.

Tanto los atributos de supervivencia a campo, como la tasa de crecimiento, el plagiotropismo y la susceptibilidad a enfermedades de las plantas, tienen una correlación directa con la calidad de los vástagos durante el cultivo *in vitro*. Un problema crucial a resolver en cada sistema de propagación es la calidad diferencial de las raíces de las plantas regeneradas en relación a aquellas obtenidas por semillas. Por ejemplo, las plantas regeneradas de *Pinus elliotii* suelen tener una raíz principal no ramificada y gruesa. En cambio, las plantas obtenidas a través de semillas tienen raíces más delgadas y de mayor crecimiento lateral que permiten comparativamente un mejor anclaje y una mayor resistencia a los vientos.

4 Propagación de especies herbáceas

La micropropagación de especies herbáceas está orientada a proveer material libre de patógenos, propagar material seleccionado por su mayor rendimiento o por su mayor resistencia a enfermedades y estreses ambientales, conservar la diversidad específica en bancos de germoplasma, obtener material para estudios fisiológicos y genéticos y sentar las bases para la aplicación de técnicas de ingeniería genética.

Existe una gran variedad de protocolos, desarrollados en función de la especie y de los objetivos de la propagación. Existen protocolos generales para monocotiledóneas como en el caso ciertos cereales (trigo, maíz, cebada, ave-

na, arroz), pasturas (pasto bermuda, festuca alta, raigrás, pasto llorón) y hortícolas (cebolla, ajo, puerro); protocolos generales para dicotiledóneas que incluyen especies hortícolas (tomate, papa, pimientos y zanahorias) y leguminosas forrajeras (alfalfa, maní, trébol blanco) y protocolos para especies modelo como *Arabidopsis* y tabaco.

En todos los casos, las formas de propagación son las mismas. Se emplean vías de regeneración por formación de yemas axilares, yemas adventicias y embriogénesis somática. En los dos primeros casos, el sistema de propagación a través de la organogénesis directa asegura la estabilidad genética de las plantas regeneradas y se emplean cuando el objetivo es la propagación clonal a gran escala. La embriogénesis u organogénesis indirecta, con formación de callo, se emplea en cambio para generar variabilidad en programas de mejoramiento.

En el caso de ajo y cebolla, por ejemplo, las etapas de la micropropagación incluyen tanto la multiplicación de yemas axilares por el cultivo de meristemas, la formación directa de yemas adventicias en explantos obtenidos a partir de placas basales o umbelas inmaduras y la formación indirecta de yemas adventicias y/o embriones somáticos obtenidos a partir de callos que provienen de distintos tipos de explantos (meristemas, brotes, placa basal ó raíces). En el caso de alfalfa y otras leguminosas como soja y maní la micropropagación es llevada a cabo por la vía de la embriogénesis somática, donde los embriones se obtienen utilizando tejidos juveniles (embriones, cotiledones y pecíolos) como explantos. En algunos casos como pasto llorón (*Eragrostis curvula*) es posible la regeneración de plantas mediante embriogénesis, organogénesis y regeneración directa a partir de los explantos.

5 Lecturas Recomendadas

- Caso, O. H. 1992. Juvenilidad, rejuvenecimiento y propagación vegetativa de las especies leñosas. *Agriscientia* 9 (1): 5-16.
- Chalupa, V. 1983. Micropropagation of conifer and broadleaved forest trees. *Communicationes Instituti Forestalis Cechosloveniae* 13: 7-39.

- Debergh PC; PE Read, 1993. Micropropagation. En Micropropagation. Debergh PC y Zimmerman RH eds, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands: 1-13.
- Evans, D.A.; Sharp, W.R.; Bravo, J.E. 1984. Cell culture methods for crop improvement. Handbook of Plant Cell Culture 2: 47-68.
- George, E.F.; Hall, M.A.; De Klerk, G.-J. 2008. Micropropagation: Uses and methods. In: Plant propagation by tissue culture, 3rd edition. George, E.F.; Hall, M.A. and De Klerk, G.E. (eds.) Springer, The Netherlands: 29-64.
- Gresshoff, P.M.; Doy, C.H. 1972. Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (Tomato). Planta 107:161-170.
- Klopfenstein, N.B.; Kerl, J.G. 1995. The potential of biotechnology in temperate agroforestry practices. In: Agroforestry systems 32. Kluwer Academic Publishers. Netherlands: 29-44.
- Lloyd, G.; B. McCown. 1981. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kolmia latifolia*, by use of shoot tip culture. Combined Proceedings International Plant Propagator Society 30: 421-427.
- Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- Olmos, S.E.; Lavia, G.; Di Renzo, M.; Mroginski, L., Echenique, V. 2002. Genetic analysis of variation in micropropagated plants of *Melia azedarach* L. In Vitro Cell Dev Biol Plant 38:617-622
- Périnet, P.; M. Lalonde. 1983. *In vitro* propagation and nodulation of the actinorhizal host plant *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. Plant Science Letters 29: 9-17.
- <http://www.redbio.org/protocolos/index.htm>
- Schenk, R.U.; Hildebrandt, A.C. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Can J Bot 50:199-204.
- Thorpe, T.A.; Harry, I.S.; Kumar, P.P. 1991. Application of micropropagation to forestry. En Micropropagation. Debergh PC y Zimmerman RH eds, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands: 311-336.
- Ziv M, 1993. Vitrification: morphological and physiological disorders of in vitro plants. En Micropropagation. Debergh PC y Zimmerman RH eds, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands: 45-92.

IV. CAPÍTULO 2

Semilla Sintética

Hebe Y. Rey y Luis A. Mroginski

Concepto:

Resulta difícil tratar de determinar el origen de la idea de la producción de semillas sintéticas o artificiales. Es uno de los resultados de la aplicación en la Agricultura de los embriones somáticos descritos por primera vez en 1958, por Jakob Reinert y por F.C. Steward y colaboradores. Sin embargo, un gran propulsor de su utilización para la propagación en gran escala de plantas fue Toshio Murashige quien en un Simposio realizado en 1977 en Ghent (Bélgica) presentó formalmente la idea de la producción de las semillas sintéticas, entendiendo como tal a un simple embrión somático encapsulado. Esta semilla se diferencia de la semilla verdadera en que el embrión es somático (producido por el fenómeno conocido como embriogénesis somática) y no cigótico y que si tiene endosperma y cubierta, éstos son artificiales (Fig. 1a y b). Esta semilla, puesta en condiciones adecuadas, germina (Fig. 1c) y se convierte en una planta (Fig. 1d). Muchos grupos de investigación han contribuido al desarrollo de las semillas sintéticas. Entre ellos se deben destacar el grupo liderado por Keith Walker de la Compañía Monsanto que a partir de mediados de la década del 70 trabajaron especialmente con alfalfa. También hay que mencionar la labor de Robert Lawrence de la Union Carbide quienes comenzaron los trabajos con especies forestales, lechuga y apio. Otros investigadores como Drew, Kitto y Janick realizaron sus trabajos con zanahoria. El aporte del grupo liderado por Keith Redenbaugh de la Plant Genetic Inc. fue muy importante, especialmente por su descubrimiento de que hidrogeles como el alginato de sodio podían ser utilizados para producir semillas artificiales que podían germinar en condiciones de invernadero.

Hay que aclarar que además del concepto de semilla sintética definido más arriba, también es factible que en lugar de encapsular embriones somáticos, se encapsulen yemas. Este

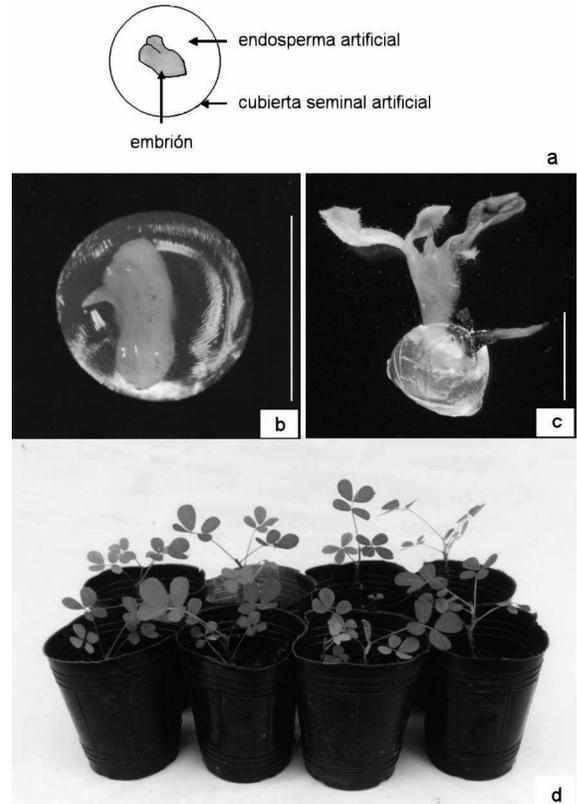


Fig. 1.- a) Partes de una semilla sintética .b,c y d) Obtención de plantas de *Arachis pinto* ($2n=3x=30$) mediante semillas sintéticas (las barras verticales indican 3 mm)

tipo de “semillas sintéticas” - de una utilización muy restringida- no será tratado en este capítulo.

Tipos de semillas sintéticas

Las semillas sintéticas pueden fabricarse de diferentes maneras (Fig.2). Básicamente se pueden usar embriones hidratados (tal como resultan de la embriogénesis somática) o bien pueden ser desecados. En algunos casos estos embriones están protegidos por cubiertas protectoras. De esta manera se pueden distinguir 5 tipos básicos de semillas sintéticas.

1) Semillas sintéticas con embriones desecados (Tipo 1 de la Fig. 2) sin cubierta: Es un sistema muy simple, los embriones son desecados hasta alcanzar porcentajes de humedad de 8- 20%. En este caso los embriones no están provistos de ningún tipo de cubierta protectora. Embriones de alfalfa sometidos al desecamiento mostraron porcentajes de con-

versión en plantas de hasta el 95% (Cuadro 1), además es posible mantenerlos viables por cerca de un año en condiciones de laboratorio.

Cuadro 1: Semillas sintéticas de algunas especies basadas en la desecación de embriones sin cubierta protectora

Especie	% humedad en la semilla	% conversión en plantas
<i>Apium graveolens</i>	10-13	35-85
<i>Dactylis glomerata</i>	13	5-30
<i>Medicago sativa</i>	8-20	33-95

2) Semillas sintéticas con embriones somáticos desecados y provistos de cubierta protectora (Tipo 2 de la Fig. 2). Los embriones de zanahoria y apio fueron recubiertos con polyoxietileno y luego desecados. Los resultados han mostrado que si bien es factible lograr que los mismos sobrevivan, la conversión en plantas es realmente baja.

3) Semillas sintéticas con embriones hidratados sin cubierta (Tipo 3 de la Fig. 2). Es el sistema más simple, consiste en utilizar los embriones somáticos tal como resultan del proceso de la embriogénesis somática sin ningún tipo de cubierta protectora. Este sistema ha sido desechado en la práctica por la escasa conversión de embriones en plantas.

4) Semillas sintéticas con embriones somáticos hidratados suspendidos en un gel viscoso ("fluid drilling") (Tipo 4 de la Fig. 2). Inicialmente fue desarrollado en zanahoria y más recientemente con batata.

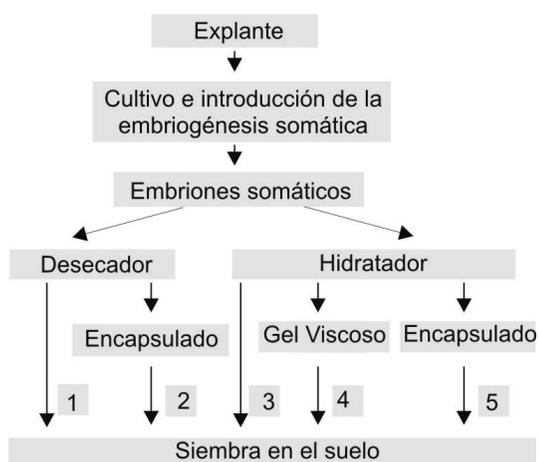


Fig.2.- Tipos de semillas sintéticas

5) Semillas sintéticas con embriones somáticos hidratados y provistos de una cubierta protectora (Tipo 5 de la Fig. 2). Es el sistema más usado.

Por esta razón, de aquí en adelante cuando se mencione "semilla sintética" se referirá a este tipo. Tiene la ventaja de que los embriones no están sujetos a la desecación que constituye la princi-

pal causa de los bajos valores de conversión en plantas. Si bien se han ensayado numerosas sustancias para encapsular a los embriones somáticos (agar, gelrite, gomas), una de la técnicas más usadas consiste en lograr la formación de una cubierta protectora de alginato de calcio que es un compuesto que además de no ser tóxico para el embrión permite una rápida formación de la cubierta. El proceso es muy simple (Fig. 3) y consiste básicamente en sumergir los embriones somáticos en una solución de alginato de sodio (2%) y luego sumergirlo en un agente acomplejante [por ejemplo 100 mM de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$]. Con esta técnica se genera una semilla sintética consistente de un embrión somático con una cubierta seminal y un endosperma artificial (Fig.1a y b). Eventualmente estas cápsulas pueden ser recubiertas por sustancias tales como el polioxietilenglicol que sirven para mantener una adecuada hidratación de las cápsulas y embriones. Este procedimiento ha posibilitado la obtención de semillas sintéticas de numerosas especies de interés económico entre los que se pueden mencionar la alfalfa, la zanahoria, el apio y especies forestales como *Picea abies*, *Pinus radiata*, *Santalum album* y *Pseudotsuga menziesii*.

Producción de semillas sintéticas

En la Fig.4 se esquematizan 6 aspectos que se deben tener en cuenta para la producción y manipulación de las semillas sintéticas.

En primera instancia es necesario contar con un eficiente sistema que asegure la inducción in vitro de la embriogénesis somática que brin-

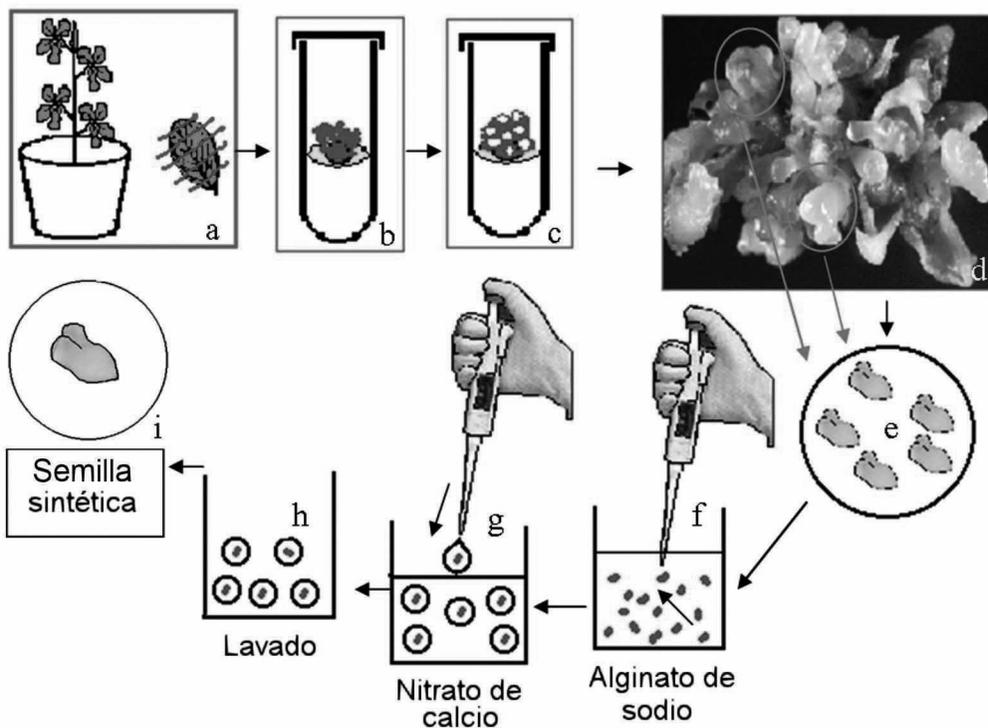


Fig.3.- Inducción de la embriogénesis somática (a-d); selección de embriones somáticos (e); inmersión de los embriones en alginato de sodio (f); acomplejamiento con nitrato de calcio (g); lavado (h); semilla sintética (i)

de la producción de embriones sin la necesidad de la fusión de gametas. Estos embriones deben ser estructuras bipolares perfectas (con un polo que genere el vástago y el otro la raíz) capaces de convertirse (“germinar”) en plantas enteras. Si bien la existencia de embriogénesis somática ha sido informada en centenares de especies de Angiospermas y Gimnospermas, en muchos casos no es de utilidad para iniciar la producción de semillas sintéticas debido a la baja tasa de producción de embriones aptos para la encapsulación.

En los últimos años se han hecho notables avances en el conocimiento de los factores que regulan la embriogénesis somática. Sin embargo aún se dista mucho de conocer las bases genéticas de este fenómeno cuya ocurrencia, *in vitro*, si bien ha sido descrita en centenares de especies de Angiospermas y casi otro tanto de Gimnospermas, en muchos casos no es de utilidad para iniciar la producción de las semi-

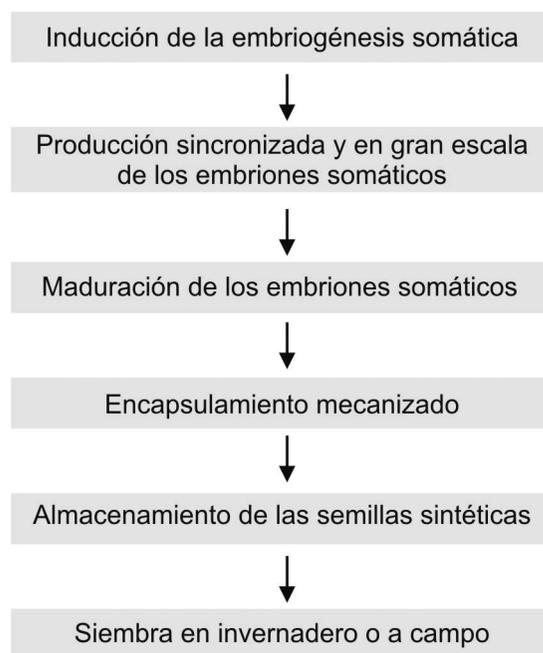


Fig. 4. Etapas en la producción de las semillas sintéticas

llas sintéticas, por su baja tasa de producción de embriones aptos para ser encapsulados.

El segundo paso consiste en lograr una producción sincronizada y en gran escala de los embriones. Es fundamental contar con embriones simples que no se fusionen entre sí y que en un momento determinado se encuentren en estado cotiledonar y que no generen embriones secundarios. Diferentes procedimientos (basados en filtros y equipos clasificadores automáticos) han sido desarrollados para seleccionar estos embriones. Para la producción en gran escala se han desarrollado varios diseños de biorreactores y sistemas mecanizados de encapsulamiento adaptados a las particularidades de cada especie.

Se trabaja mucho para lograr una adecuada maduración de los embriones que es un proceso esencial para la obtención de altos valores de conversión en el suelo. Investigaciones hechas con alfalfa han mostrado la utilidad del empleo de tratamientos con ácido abscísico, maltosa y del pretratamiento con temperaturas bajas (4°C).

El almacenamiento de las semillas sintéticas es otro aspecto importante a tener en cuenta. Lo ideal sería que las semillas sintéticas tuvieran un comportamiento similar al de la mayoría de las semillas verdaderas y permanecieran viables por mucho tiempo. Los resultados obtenidos con semillas sintéticas de muchas especies muestran que aún hay que trabajar arduamente para que ello ocurra. Las técnicas de la cryopreservación con nitrógeno líquido podrían resolver este punto.

Por último lo ideal es que la semilla sintética sea sembrada directamente al suelo con un alto porcentaje de conversión en plantas. Muchos factores inciden negativamente para que ello ocurra. Por ahora en la mayoría de los casos, las semillas sintéticas son sembradas primeramente en cámaras climatizadas o en invernaderos para luego ser llevadas al campo.

Calidad de la semilla sintética

Un aspecto de gran importancia tecnológica es el contar con semillas sintéticas que, además de no generar variantes somaclonales, tengan un alto porcentaje de conversión en plantas cuando las mismas son sembradas en

el suelo. Este aspecto está afectado por varios factores entre los que figuran, el tipo de embrión, la calidad del endosperma sintético, la dureza de la cápsula y la protección contra agentes patógenos.

El tipo de embrión es quizás el factor más importante que influye en la calidad de la semilla sintética. Deben poder generarse rápidamente, en grandes cantidades, no fusionarse entre sí, ni formar callos. Deben desarrollarse de manera sincronizada y convertirse rápidamente en plantas. Es altamente deseable que conserven su viabilidad por largo tiempo en condiciones de laboratorio o mantenidos en refrigeradores comerciales. Generalmente la falta de embriones de calidad es el factor limitante de la producción de semillas sintéticas.

El endosperma sintético tiene que proteger y nutrir al embrión hasta que germine y pueda crecer autotróficamente. En este punto es preciso recordar que si bien los embriones somáticos son muy similares a los embriones cigóticos, carecen de las sustancias de reserva necesarias para su conversión en plántulas. El endosperma sintético generalmente está compuesto de los mismos medios de cultivo que se usan para inducir la germinación *in vitro* de los embriones. Estos medios contienen macro y micronutrientes, vitaminas, sacarosa y sustancias reguladoras de crecimiento. La composición de este endosperma lo hace susceptible al ataque de patógenos, por lo que también se incorporan compuestos de acción fungicida y bactericida. Es común el agregado de 1-5 mg/L de benomyl y de algunos antibióticos como ceftoxina o ampicilina.

La dureza de la cápsula puede afectar, por acción mecánica o por dificultar la respiración, la conversión de los embriones en plantas. Es reconocido que la dureza debe ser del orden de 0,2 y 2 Kg/cm² de presión, la que puede obtenerse mediante una adecuada manipulación de la concentración del alginato y de los tiempos de la reacción del acomplejamiento.

Ventajas del empleo de semillas sintéticas

La mayoría de las plantas de interés económico son propagadas mediante semillas verdaderas. Éstas constituyen excelentes propágu-

los que pueden ser producidos a bajo costo, en forma rápida, y pueden ser sembrados mecánicamente. Además la mayoría de ellas pueden ser conservadas fácilmente por mucho tiempo. Sin embargo hay muchas plantas que no se propagan mediante las semillas verdaderas y lo hacen a través de partes vegetativas (Es el caso entre otras de la caña de azúcar, mandioca, ajo, frutilla, papa, batata, varios árboles y plantas ornamentales). Otras especies tienen semillas de poca calidad (Muchas coníferas). En algunos casos si bien las plantas pueden propagarse por semillas, presentan dificultades para su germinación (por ej. yerba mate) o bien debido al alto grado de heterocigosis las poblaciones derivadas de semillas son muy

heterogéneas (té, yerba mate, paraíso) y es recomendable su propagación asexual. También es el caso de muchos híbridos y de plantas que no producen semillas verdaderas o bien el caso de ciertas plantas transgénicas. En todas estas situaciones el uso de semillas sintéticas es ventajosa. Las plantas serán clonadas, es decir cada planta derivada de una semilla sintética será una copia fiel de la planta madre, utilizando sembradoras similares a las que hoy se emplean con las semillas verdaderas. Adicionalmente las semillas sintéticas podrán actuar como transportadoras de reguladores de crecimiento, microorganismos y pesticidas que se quieran incorporar durante la siembra, los costos de los trasplantes se verán redu-

Cuadro 2. Necesidad de contar con semillas sintéticas en algunas plantas leñosas subtropicales de interés para Argentina y Estado actual de su desarrollo.v

Especie	Interés en contar con semillas sintéticas	Estado de desarrollo de la inducción de la Embriogénesis Somática	Estado de desarrollo de la producción de la semilla sintética
Aguái (<i>Chrysophyllum gonocarpum</i>)	XXX	X	---
Araucarias (<i>Araucaria spp.</i>)	XXX	XX	---
Algarrobo (<i>Prosopis spp</i>)	XXX	---	---
Cítricos * (<i>Citrus spp.</i>)	XX	XXX	X
Eucaliptos* (<i>Eucalyptus spp.</i>)	XXX	X	---
Mango (<i>Mangifera indica</i>)	XX	X	---
Paraíso (<i>Melia azedarach</i>)	XXX	XX	X
Pinos* (<i>Pinus spp.</i>)	XXX	XX	X
Quebracho (<i>Schinopsis balansae</i>)	XX	---	---
Té (<i>Camellia sinensis</i>)	XXX	XXX	---
Toona (<i>Toona ciliata</i>)	XXX	---	---
Yerba mate (<i>Ilex paraguariensis</i>)	XXX	X	---

Ref.:

- * depende de la especie
- nulo
- X escaso
- XX regular
- XXX grande

cidos, las poblaciones serán genéticamente uniformes y podrán ser comercializadas ciertos híbridos de plantas resultantes de costosas manipulaciones manuales.

En el Cuadro 2 se señalan algunas especies para las cuales sería necesario contar con un sistema de semilla sintética.

La falta de una difusión más masiva de esta tecnología en la actualidad obedece por un lado a razones técnicas (En muchas especies aún no se ha logrado inducir eficientes sistemas que permitan la generación de grandes cantidades de embriones somáticos de calidad) y económicos (Cálculos hechos en alfalfa indican que su costo de producción supera en casi cien veces el costo de producción de la semilla verdadera. Sin embargo, este costo es casi similar o incluso inferior al de la producción de semillas verdaderas de algunos híbridos de alcaucil, geranio y gerbera.

CONCLUSIONES

Si bien aún el uso de la semilla sintética en la Agricultura es insignificante y sólo es utilizada en cierto grupos de árboles forestales, hay coincidencia en el mundo en que esta tecnología se va a convertir en un futuro cercano en el principal método de propagación de las plantas. Los progresos logrados en los últimos 20 años han sido notables. Sin embargo hay que incrementar las investigaciones básicas sobre embriogénesis somática para luego abordar los aspectos "industriales" de la producción en gran escala de las semillas sintéticas. En la Argentina, si bien esta tecnología podría ser usada teóricamente en todas las Angiospermas y Gimnospermas, en la actualidad la mayor demanda de su utilización proviene de productores de plantas leñosas, con los cuales un rápido diagnóstico de lo que sucede en el área subtropical (Cuadro 2) nos ubica a Argentina en un estado de desarrollo inicial, con capacidad técnica y humana para encarar la producción de las semillas sintéticas.

Lecturas recomendadas

- Cantliffe, D. J. (2001) Bioreactor technology in plant cloning, Proceedings of the Fourth International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding. *Acta Horticulturae*.560:345-351.
- Carlson, W. C. J. E. Hartle. (1995). Manufactured seeds of woody plants. In S.M. Jain , P KGupta, R.J. Newton (eds.) Somatic embryogenesis in woody plants. London, Kluwe Acad. Press. 1: 253-263.
- Gray, D. J. (1991). Somatic embryogenesis and development of synthetic seed technology. *Critical Reviews in Plant Sciences* 10: 33-61.
- Guerra, M. P. T., A.C. Teixeira, (1999). Embriogénesis somática e sementes sintéticas. In: A.C.Torres, L.S.Caldas, J.A.Busó (eds.) *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. CBAB. Embrapa. Brasília . 2: 533-568.
- Ibaraki, Y. K., (2001). Automation of somatic embryo production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 65: 179-199.
- Jiménez González.A., E.Q. Mendoza (1998) In :Pérez Ponce,J.N. (ed.) *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*. Instituto de Biología de Plantas.Santa Clara. Cuba. pp.225-240.
- McKersie,B.D., D.C.W.Brown (1996) Somatic embryogenesis and artificial seeds in forage legumes. *Seed Science Research* 6: 109-126.
- Mroginski, L. A. H.Rey ,S. Olmos, V. Gonzalez (1995). Semillas artificiales para la propagación de plantas. *Paradigmas* 1: 5-9.
- Timmis,R. (1998). Bioprocessing for tree production in the forest industry: Conifer somatic embryogenesis. *Biotechnol. Progress* 14:156-166.

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-desidratación (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-

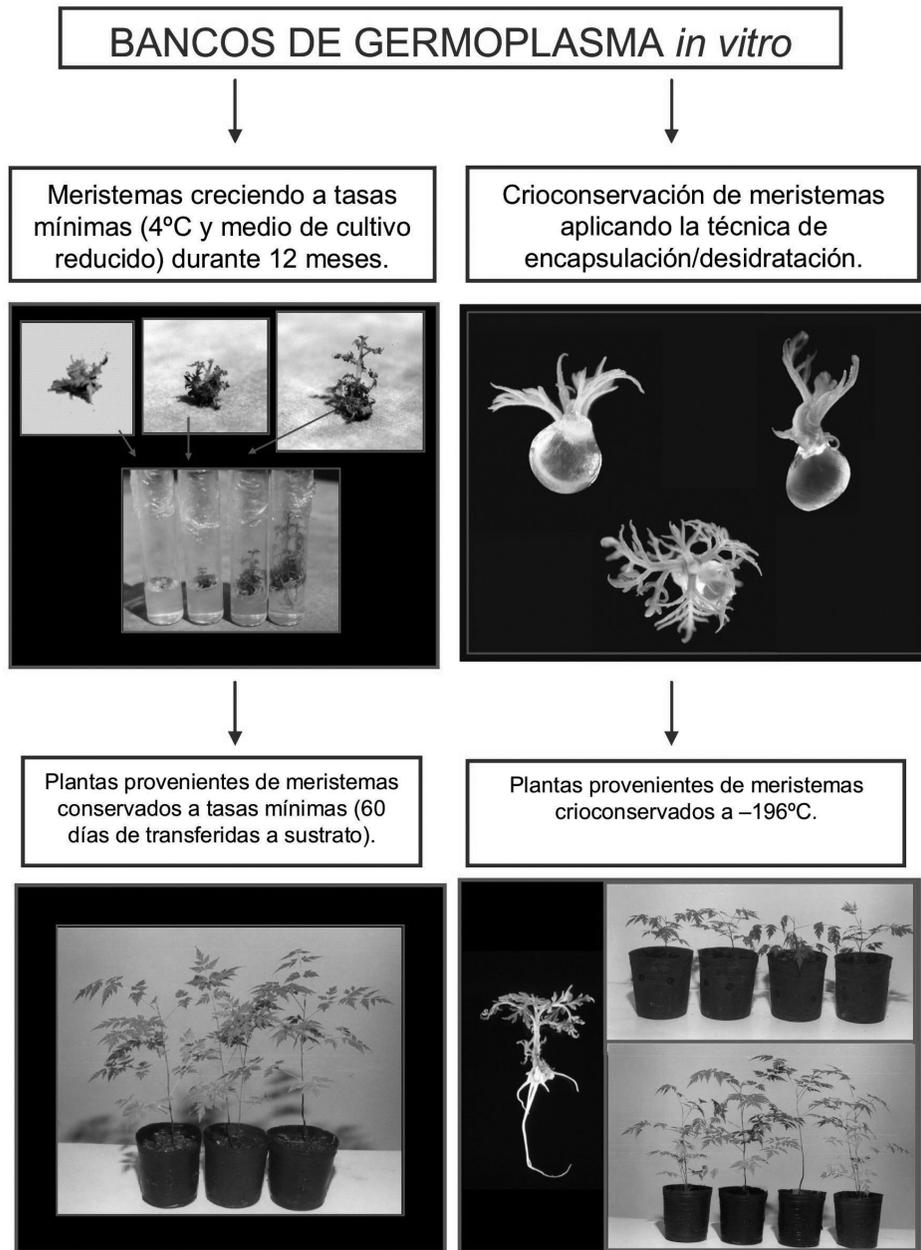


Figura 1: Estrategias para la conservación de germoplasma de paraíso (*Melia azedarach* L.), desarrolladas en el Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales. IBONE. Facultad de Ciencias Agrarias. UNNE

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	Explante 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>Armoracia 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.

