

# CRIOCONSERVACION DE SEMILLAS

Por: José Manuel Pita Villamil\*, César Pérez Ruiz\*

## NECESIDAD DE VARIABILIDAD GENETICA

Desde el comienzo de la Agricultura, el hombre de forma consciente o inconsciente ha ido adaptando las plantas que cultivaba a sus gustos y necesidades, obteniendo, progresivamente, cultivos cada vez más productivos, de mayor calidad y más resistentes a todo tipo de situaciones adversas, enfermedades, plagas, sequías, etc.

Para lograrlo, en un principio, utilizó especies o cultivares que de una forma natural presentaban esos caracteres y,

nutricionales tendrá la creciente población humana, ni si será necesario, en un futuro, la utilización de algunos cultivos como fuentes de energía o de materias primas.

En cualquier caso, será necesario incorporar a los futuros cultivos, nuevos caracteres morfológicos y fisiológicos que permitan su adaptación a las nuevas situaciones. Para ello los mejoradores necesitarán disponer de la mayor variabilidad genética posible, la cual se encuentra, hoy en día, en las miles de plantas (cultivos tradicionales, nuevas variedades, malas hierbas, progenitores silvestres de

Para evitar esta continuada desaparición de recursos fitogenéticos, son necesarias políticas de conservación cada vez más eficaces en las que la incorporación de las nuevas técnicas derivadas del desarrollo de la biotecnología pueden cumplir un papel esencial.

## MÉTODOS DE CONSERVACION

Los métodos de conservación se puede dividir en: métodos de conservación *in situ* y métodos de conservación *ex situ*. Los primeros se basan en la conservación de las plantas en sus hábitats naturales, y

**P**rolongación indefinida del tiempo de conservación

**U**na buena técnica de conservación para especies amenazadas

**C**ostes de mantenimiento asequibles



Contenedores de nitrógeno líquido utilizados en la crioconservación de semillas.

más recientemente, mediante el desarrollo de programas de mejora, en los que se incorporan a los nuevos cultivos las características más deseables.

Actualmente no podemos saber que nuevas enfermedades o plagas aparecerán y que efectos tendrán, sobre los modernos cultivos, los drásticos cambios que la actividad humana esta provocando en el suelo y en la atmósfera. Asimismo tampoco podemos predecir que necesidades

los cultivos, especies silvestres, etc) que, de una forma general, son denominados recursos fitogenéticos.

La agricultura moderna al poner énfasis en el logro de mayores producciones, ha originado la sustitución de las variedades locales, por monocultivos que por su mayor productividad son ampliamente utilizados. Si a esto unimos la desaparición y alteración de los hábitats naturales por la actividad humana (desarrollo urbano, deforestación, contaminación, etc), la consecuencia es una progresiva e irreparable pérdida de recursos biológicos y por tanto de variabilidad genética.

los segundos en el mantenimiento del material biológico en bancos de semillas, bancos de cultivos *in vitro*, colecciones de plantas (en campo, en invernadero, en jardines botánicos), etc.

Entre las medidas *ex situ*, el mantenimiento de colecciones de plantas requiere un considerable espacio y conlleva altos costes asociados a la necesidad de mano de obra y al control de enfermedades y de malas hierbas. Además, los materiales pueden perderse fácilmente por accidentes (heladas, incendios, etc). En cuanto a los bancos de cultivo *in vitro* presentan problemas derivados de la complejidad de

(\*) Dpto. Biología Vegetal  
E.T.S. Ingenieros Agrónomos  
Universidad Politécnica de Madrid

## SEMILLAS • CULTIVOS

su metodología y de los costes económicos debidos a las necesidades de infraestructuras específicas y de personal técnico cualificado. Además en el caso de especies en las que es necesario preservar los clones, el número de líneas mantenidas es casi siempre bajo y por tanto es poca la diversidad genética conservada.

En general los bancos de semillas son el modo más conveniente para la conservación *ex situ*, ya que permiten almacenar una gran variabilidad genética, de una forma económica y práctica, al ser las semillas, normalmente, de pequeño tamaño y permitir la fácil regeneración de la planta. Para la conservación de las semillas la International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR) recomienda su desecación hasta un 3-7% de humedad y su almacenamiento a bajas temperaturas -18 °C. Esto asegura el incremento de su longevidad a largos periodos de tiempo que, no obstante, varían en función de las especies.

En cualquier caso, las muestras conservadas en los bancos de semillas, disminuyen debido a tres causas: controles periódicos de germinación, pérdida de viabilidad e intercambio con otras instituciones e investigadores, siendo los dos primeros los factores que más influyen. Así, en última instancia, las muestras deben ser regeneradas ya sea por recolección o multiplicación, implicando, esto último, riesgos de pérdida de la muestra y de alteraciones genéticas. Además, este protocolo de conservación si bien, en general, es el más idóneo para la mayoría de la semillas, en ciertos casos no es aplicable, especialmente a semillas que no resisten la desecación (semillas recalcitrantes).

### CRIOCONSERVACION

Entre los métodos alternativos para la conservación de las semillas se encuentra

la criopreservación que consiste en su almacenamiento a muy bajas temperaturas, inferiores a -100 °C, aunque por razones prácticas se las suele introducir en nitrógeno líquido, lo que asegura una temperatura constante de -196 °C. En esta situación se logra la detención de los procesos metabólicos y con ello el bloqueo de los mecanismos fisiológicos responsables del envejecimiento de las semillas y por tanto la prolongación indefinida del período de conservación.

Además las técnicas de criopreservación ofrecen otras ventajas en relación a las técnicas tradicionales de conservación a largo plazo como son: los bajos costes de mantenimiento, la fácil manipulación de las muestras y la no dependencia del suministro eléctrico.

En un estudio para la conservación de semillas de cebolla (*Allium cepa*), para un período previsto de 100 años, en el que se consideraban los costes de los equipos y del nitrógeno líquido, de los controles periódicos de viabilidad y de la regeneración y/o recolección, el gasto sería un 75% menor que el correspondiente al método de conservación tradicional.

Al contrario que los métodos convencionales de almacenamiento, los protocolos de criopreservación son independientes de los sistemas de refrigeración eléctricos que, lógicamente, pueden fallar por problemas en el suministro de electricidad. Esto hace que la criopreservación sea una alternativa interesante para muchos países en desarrollo, ya que la disponibilidad de nitrógeno líquido está asegurada en la mayoría de los lugares del mundo.

No obstante, la criopreservación presenta una serie de problemas derivados, principalmente, de la humedad inicial de la muestra y de las alteraciones que sufre el material en los procesos de congelación/descongelación. Ambos factores deben ser detalladamente evaluados antes de

decidir si es adecuada la utilización de la criopreservación para un determinado tipo de semillas.

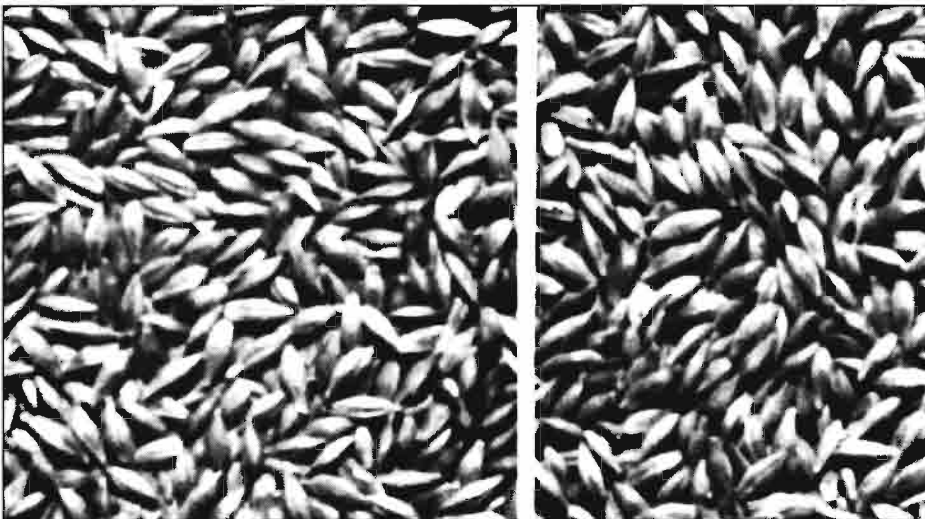
El contenido en humedad de la semilla es el factor más crítico para el éxito de la criopreservación, un rango óptimo de humedad debe ser determinado para poder asegurar que la criopreservación no va a afectar a las semillas. Si la humedad es elevada la semilla muere o no es capaz de producir plántulas normales tras el proceso de congelación/descongelación, debido a la existencia de procesos de cristalización y recristalización de hielo intracelular que son, invariablemente, letales. El contenido máximo de humedad para que esto no suceda varía según la especie, por ejemplo en judía (*Phaseolus vulgaris*) es del 28,5 % y en sésamo (*Sesamum indicum*) del 9,6%.

Este problema se presenta, principalmente, cuando se pretende criopreservar semillas que no toleran ser desecadas por debajo de unos determinados contenidos de humedad, lo que implica que la congelación sea letal. En estos casos, las alternativas son la criopreservación de los ejes embrionarios y/o el pretratamiento con crioprotectores como son el dimetilsulfóxido (DMSO), la sacarosa, el polietilenglicol (PEG) o la prolina.

La velocidad de congelación también es un factor a considerar, así hay semillas a las que una congelación rápida (200°C/min: inmersión directa en el nitrógeno líquido), provoca una importante pérdida de viabilidad, este es el caso de semillas de lechuga (*Lactuca sativa*), mientras que en semillas de sésamo (*Sesamum indicum*) este efecto lo provoca una congelación lenta (22.2 °C/min : inmersión gradual en vapor de nitrógeno líquido). Asimismo la velocidad de descongelación también puede afectar negativamente a las semillas, principalmente por los daños físicos que se originan, en judías (*Phaseolus vulgaris*) se observa la escisión de los cotiledones, lo que impide el normal desarrollo de las plántulas.

Todos estos factores deben ser evaluados antes de decidir si es factible criopreservar las semillas de una especie determinada (Tablas I-II). En la figura 1 se esquematiza un protocolo básico de evaluación del efecto de la criopreservación sobre un lote de semillas.

Los medios necesarios para establecer un sistema eficaz de criopreservación son, además de un suministro periódico de nitrógeno líquido, la disponibilidad de contenedores adecuados. Esta adecuación se debe evaluar en función de tres parámetros, eficiencia, accesibilidad, y seguridad. La eficiencia se mide en función del porcentaje de nitrógeno líquido evaporado por día, (un contenedor de 850 l, puede almacenar 50.000 viales de 1,2 ml durante 4 meses sin ser necesario reponer nitrógeno líquido). Una buena accesibili-



dad permitirá manipular fácilmente a las muestras y su almacenamiento en fase gaseosa (-150 °C) o fase líquida (-196 °C). Por último la seguridad dependerá del diseño del contenedor, se aconseja que esté construido en acero o aluminio, con doble pared, en la que se practicará el vacío para asegurar un mejor aislamiento térmico del interior. Los contenedores comerciales se ajustan a las anteriores especificaciones, siendo muy variados en cuanto a tamaño y métodos de disposición de las muestras en su interior. En la figura 2 se muestra un esquema de la sección de un contenedor de nitrógeno líquido, en la que se muestra la disposición de los cestillos en los que se sitúan las muestras para su almacenamiento.

### CONCLUSION

La crioconservación es una técnica aconsejable para semillas con longevidad

**Tabla I. – Géneros con semillas o frutos para los que se recomienda la crioconservación.**

Género	Género
<i>Triticum</i>	<i>Agropyron</i>
<i>Avena</i>	<i>Lactuca</i>
<i>Sorghum</i>	<i>Beta</i>
<i>Hordeum</i>	<i>Eragrostis</i>
<i>Oryza</i>	<i>Poa</i>
<i>Lycopersicon</i>	<i>Allium</i>
<i>Cucumis</i>	<i>Lotus</i>
<i>Festuca</i>	<i>Raphanus</i>
<i>Secale</i>	<i>Phleum</i>
<i>Nicotiana</i>	<i>Spinacia</i>
<i>Trifolium</i>	<i>Ononrychis</i>
<i>Cucurbita</i>	<i>Daucus</i>
<i>Dactylis</i>	<i>Petunia</i>
<i>Capsicum</i>	<i>Saccharum</i>

(Fuente: USDA-ARS. NATIONAL SEED STORAGE LABORATORY. USA)

**Tabla II. – Géneros con semillas o frutos para las que no se recomienda la crioconservación, por su gran tamaño (1) y/o por rotura (2) durante la congelación/descongelación.**

Género	
<i>Arachis</i>	1
<i>Linum</i>	2
<i>Phaseolus</i>	2
<i>Glycine</i>	1,2
<i>Medicago</i>	2
<i>Zea</i>	1

(Fuente: USDA-ARS. NATIONAL SEED STORAGE LABORATORY. USA)

des cortas y de especies amenazadas cuyas poblaciones han sido reducidas a tamaños críticos (cultivares en desuso, especies silvestres amenazadas). Sin embargo, no es posible recomendar la utilización generalizada de la crioconservación para semillas de especies con semillas tolerantes a la desecación (semillas ortodoxas), que admiten un almacenamiento a largo plazo según los métodos convencionales. No obstante la decisión final se debe tomar en relación a los riesgos de pérdida o alteración genética del material con las técnicas de conservación tradicionales y a los costes asociados con las diferentes metodologías de conservación.

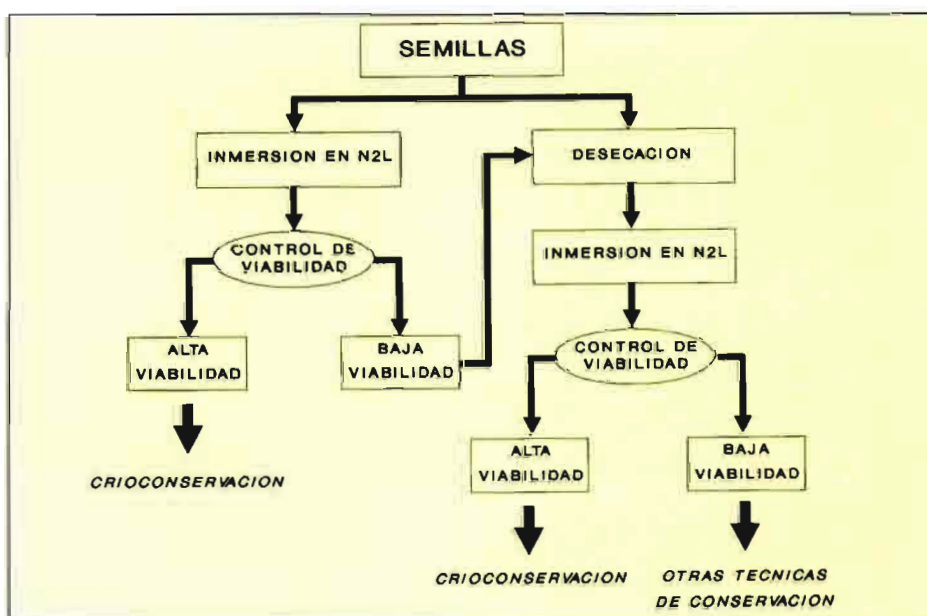
### BIBLIOGRAFIA

Chin, H.F. (1994). Seedbanks: conserving the past for the future. *Seed Science and Technology*. 22:385-400.

Hernández-Bermejo, J.E.; Clemente, M.; Heywood, V. (1990). Conservation techniques in Botanic Gardens. Ed. Koeltz Scientific Books. 205 p.

Ramanatha-Rao, V.; Riley, K.W. (1994). The use of biotechnology for conservation and utilization of plant genetic resources. *Plant Genetic Resources Newsletter*. 97:3-20.

**FIGURA 1. – Protocolo básico para la evaluación del efecto de la crioconservación sobre un lote de semillas.**



**FIGURA 2. – Esquema de la sección longitudinal (A) y de la sección transversal (B) de un contenedor de nitrógeno líquido utilizado en la crioconservación de semillas. 1, depósito de nitrógeno líquido 2, cestillo para el almacenamiento de las muestras.**

