

"Las técnicas de cultivo *in vitro* proporcionan un método alternativo para la conservación de recursos fitogenéticos."



# Bancos de cultivo IN VITRO

Por: José María Iriondo\* y José Manuel Pita\*

El almacenamiento de semillas a baja temperatura y con bajo contenido de humedad constituye un método relativamente simple y eficaz para la conservación de recursos fitogenéticos. De esta manera, resulta posible conservar una gran cantidad de especies cultivadas durante largos periodos de tiempo y con un mínimo riesgo de pérdidas genéticas (erosión genética).

No obstante existe también un número significativo de plantas de interés económico que presentan problemas a la hora de conservar sus semillas. Por un lado se encuentran las plantas de propagación vegetativa que, al ser heterocigotas para una elevada proporción de genes y/o no producir semilla, deben ser conservadas en estado vegetativo. En este caso se encuentran plantas de cultivo de gran importancia como la patata (*Solanum tuberosum*), el plátano (*Musa spp.*), el ñame (*Dioscorea spp.*) o la batata (*Ipomoea batatas*). Otro importante grupo de plantas incluye a aquellas que pueden propagarse por semilla pero sólo la producen cuando la planta alcanza una cierta edad. Este es el caso de las especies arbóreas forestales, las cuales a menudo requieren una propagación vegetativa para incrementar el número de determinados genotipos seleccionados. Finalmente, se encuentra el caso de las plantas con semillas recalcitrantes, es decir aquellas cuyas semillas pierden viabilidad cuando se desecan por debajo de un determinado contenido en humedad. En este grupo se encuentran diversas especies de importancia económica como el nogal (*Juglans spp.*), el roble (*Quercus spp.*), el árbol del caucho (*Hevea brasiliensis*) o la palmera de aceite (*Elaeis guineensis*).

Con objeto de afrontar los problemas derivados de la conservación de estos grupos de

especies, en los últimos años se ha desarrollado una intensa actividad investigadora encaminada a buscar métodos alternativos a la conservación en bancos de semillas. Entre estos métodos alternativos se encuentra la aplicación de las técnicas de cultivo *in vitro* a la conservación de los recursos fitogenéticos.

## CULTIVO IN VITRO Y CONSERVACIÓN

El término cultivo *in vitro* cubre un amplio espectro de técnicas que implican el cultivo, bajo condiciones de asepsia, de órganos o fragmentos de órganos (semillas, embriones, hojas, tallos, yemas, raíces), tejidos, células aisladas y protoplastos en un medio nutritivo sintético y definido, bajo condiciones ambientales controladas.

En un ciclo de conservación de recursos fitogenéticos mediante técnicas de cultivo *in*

vitro es particularmente útil cuando las técnicas de propagación convencionales no ofrecen buenos resultados o requieren material juvenil no disponible, y cuando se requiere una gran cantidad de material vegetal para distribución y uso. Las técnicas de micropropagación permiten la multiplicación de tallos a partir de meristemos preexistentes como yemas axilares y terminales, si bien los tallos también pueden obtenerse a partir de meristemos adventicios que se originan directamente de tejidos o indirectamente a partir de células desorganizadas en cultivo. La micropropagación también puede lograrse a través de la inducción de embriones somáticos y el posterior desarrollo de plántulas.

En los bancos de cultivo *in vitro* se pretende obtener métodos de micropropagación que resulten válidos para un amplio rango de accesiones dentro de una determinada especie cultivada. Así, por ejemplo, en el banco de germoplasma NCGR de Corvallis, Oregón, USA, se ha desarrollado un protocolo que permite la micropropagación de 256 accesiones de frambueso (*Rubus spp.*). También resulta interesante el desarrollo de protocolos de bajo coste como los desarrollados en la micropropagación del plátano (*Musa spp.*) en donde la sacarosa y el agua destilada necesarios para la elaboración del medio nutritivo han sido sustituidos por azúcar comercial y agua de grifo.

El almacenamiento *in vitro* consta básicamente de las siguientes etapas: 1) obtención del explanto o material de partida de la planta madre; 2) establecimiento en cultivo *in vitro* del explanto; 3) almacenamiento; 4) recuperación del cultivo a partir de la fase de almacenamiento y 5) regeneración de la planta completa.

Las técnicas de almacenamiento *in vitro* a medio plazo se basan en procedimientos de ralentización del crecimiento mientras que en el almacenamiento a largo plazo se utiliza la crioconservación. La ralentización del crecimiento del cultivo puede obtenerse de diver-

## Los beneficios de las técnicas *in vitro*

*in vitro* se pueden distinguir las siguientes etapas: 1) recolección; 2) cuarentena, diagnóstico de enfermedades y erradicación; 3) propagación; 4) almacenamiento; 5) recuperación; y 6) distribución.

Se han desarrollado sistemas de recolección *in vitro* para cultivos de cacao (*Theobroma cacao*), coco (*Cocos nucifera*) y algodón (*Gossypium spp.*) y se han erradicado virus de importantes colecciones de germoplasma de tapioca (*Manihot esculenta*), cítricos (*Citrus spp.*) y patata (*Solanum tuberosum*) mediante técnicas de cultivo *in vitro*. No obstante, la principal utilidad de las técnicas de cultivo *in vitro* radica en las etapas de propagación, almacenamiento y recuperación.

La propagación *in vitro* o micropropaga-

(\*) Dpto. Biología Vegetal  
E.U.I.T. Agrícola  
Universidad Politécnica de Madrid

sas formas, si bien la reducción de la temperatura ambiente junto con el uso de un medio pobre en nutrientes suele ser el sistema más utilizado. Estas técnicas permiten extender el intervalo entre subcultivos a periodos de 1 a 4 años para muchas especies. Por otra parte, la crioconservación consiste en el almacenamiento de germoplasma a muy bajas temperaturas (<-130°C) (Ver *Agricultura* 775, Febrero 1997). Normalmente, las temperaturas utilizadas son las del nitrógeno líquido (-196°C) o las de su fase de vapor (-150°C). La crioconservación de explantos cultivados *in vitro* se encuentra todavía en fase experimental existiendo diversas técnicas que tratan de evitar los daños a los tejidos originados por la formación de hielo intracelular durante las fases de enfriamiento y calentamiento de la muestra.

### BANCOS DE CULTIVO IN VITRO

De acuerdo con una encuesta realizada por la FAO en 1995, un 60% de los 107 países sondeados poseían infraestructura para conservación *in vitro*. En el caso de los países europeos encuestados este porcentaje ascendía al 73%.

En la actualidad existen más de 38.000 muestras de germoplasma conservadas *in vitro* en todo el mundo. La técnica de crecimiento reducido se utiliza rutinariamente para la conservación de determinadas especies en centros regionales e internacionales de conservación como la Red Internacional para la Mejora de la Banana y el Plátano (INIBAP) en Francia, el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) en Colombia, el Centro Internacional de la Papa (CIP) en Perú o el Instituto Internacional de Agricultura Tropical (IITA) en Nigeria. En la Tabla 1 se indican las especies en las que se encuentra más extendida esta práctica.

El uso habitual de las técnicas de crioconservación con material cultivado *in vitro* está mucho menos extendido. Sin embargo, ya existen experiencias en este sentido en pera (*Pyrus*), frambueso (*Rubus*) y avellano (*Cory-*

## Ventajas e inconvenientes de la variación somaclonal

*lus*) en el National Clonal Repository (NCGR) de Corvallis en Estados Unidos. También se han realizado ensayos a gran escala con la palmera de aceite (*Elaeis guineensis*) y la patata (*Solanum spp.*).

Las compañías privadas están utilizando la conservación *in vitro* para mantener híbridos propagados asexualmente que no pueden ser almacenados en forma de semilla. Los cultivares de crisantemo (*Dendranthema spp.*) se almacenan habitualmente en cultivo *in vitro*, efectuándose chequeos sanitarios para asegurar que los cultivos se encuentran libres de virus. Las petunias de doble floración (*Petunia spp.*) se manejan de manera similar. La industria del geranio (*Pelargonium spp.*) utiliza como procedimiento estándar el cultivo de meristemos para la producción de planta madre de élite, dada la elevada tasa de reinfección que sufren estas plantas, especialmente por *Xanthomonas*.

### VENTAJAS E INCONVENIENTES DE LA CONSERVACIÓN IN VITRO

La utilización de técnicas de cultivo *in vitro* en bancos de germoplasma puede aportar grandes beneficios entre los que se encuentran: 1) altas tasas de multiplicación; 2) naturaleza aséptica del cultivo donde las plantas pueden mantenerse fácilmente libres de hongos, bacterias, virus e insectos parásitos; 3) bajos requerimientos de espacio (800 cultivares con 6 réplicas por cultivar pueden almacenarse en un área de 2 m<sup>2</sup> mientras que la misma situación en una plantación en el campo

requiere 1 Ha) y 4) posibilidad de acceder a la producción de plantas haploides, el rescate de embriones inmaduros o híbridos, la transformación genética para la producción de plantas modificadas, la hibridación somática mediante fusión de protoplastos y la producción de semilla sintética utilizando embriones somáticos.

No obstante, la utilidad de estas técnicas ha sido cuestionada, principalmente debido a la posibilidad de inducción de alteraciones genéticas durante el proceso. Estas alteraciones genéticas reciben el nombre de variación somaclonal y pueden manifestarse como cambios en las secuencias de nucleótidos del ADN, en el número de cromosomas y su estructura, cambios bioquímicos o cambios en características como resistencia a enfermedades o altura de la planta. La variación somaclonal es más común en cultivos de tejidos desorganizados como callo o cultivo de suspensiones celulares, mientras que ocurre con menor frecuencia en estructuras vegetales organizadas. Por ello, las técnicas de conservación *in vitro* de germoplasma se basan en la utilización de meristemos preexistentes y evitan el crecimiento de callo desorganizado. La utilización del explanto, ciclo de micropropagación y tipos y concentraciones de reguladores de crecimiento adecuados contribuye a minimizar la aparición de variantes somaclonales, si bien no elimina los riesgos completamente. Por ello, resulta interesante realizar un seguimiento de las plantas regeneradas para eliminar variantes no deseadas. Unido a la simple apreciación de cambios fenotípicos, se utilizan en la actualidad técnicas bioquímicas que detectan variaciones en isoenzimas o en la propia composición del ADN.

En cualquier caso, la ocurrencia de variación somaclonal no es necesariamente negativa en este contexto. El éxito de cualquier programa de mejora depende de la variabilidad presente en el material de partida. Junto a la variabilidad natural presente en los distintos cultivares y especies emparentadas de un cultivo, la tecnología *in vitro* puede ser utilizada para inducir y seleccionar variantes adicionales que puedan reunir las características perseguidas.

Así, ya existen empresas que están aprovechando este fenómeno con especies que tienen mayor tendencia a producir variantes en cultivo. En la industria del crisantemo, partiendo de un cultivar de flor rosa se han obtenido toda una gama de colores de flor como amarillo, blanco y bronce, manteniendo el resto de las cualidades del cultivar original.

### BIBLIOGRAFÍA

-Ashmore, S.E. (1997) *Status Report on the Development and Application of In Vitro Techniques for the Conservation and Use of Plant Genetic Resources*. IPGRI, Rome. 67 pp.

-Dodds, J.H. (Ed.) (1991) *In Vitro Methods for Conservation in Plant Genetic Resources*. Chapman and Hall, London. 247 pp.

**TABLA 1. Especies cultivadas en las que se utilizan de forma rutinaria técnicas de crecimiento reducido para su conservación en bancos de cultivo *in vitro*.**

<i>Allium spp.</i>	ajo, cebolla, etc.
<i>Cocos nucifera</i>	cocotero
<i>Coffea spp.</i>	cafeto
<i>Colocasia esculenta</i>	colocasia
<i>Dioscorea spp.</i>	ñame
<i>Fragaria spp.</i>	fresa, fresón
<i>Ipomoea batatas</i>	batata
<i>Manihot esculenta</i>	tapioca
<i>Musa spp.</i>	plátano
<i>Prunus spp.</i>	ciruelo, cerezo, melocotonero, almendro, etc.
<i>Pyrus spp.</i>	peral
<i>Ribes spp.</i>	grosellero
<i>Rubus spp.</i>	frambueso
<i>Saccharum spp.</i>	caña de azúcar
<i>Solanum spp.</i>	patata
<i>Vitis spp.</i>	vid