

Capítulo 31

Métodos de conservación in vitro del germoplasma

W. M. Roca*

D. I. Arias*

R. Chávez**

Agradecimientos

Los autores manifiestan su gratitud a la Dra. L. Withers, del International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR), Roma, por la ayuda proporcionada de diversas maneras en la preparación de este trabajo.

* Unidad de Investigación en Biotecnología (UIB), Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia.

** Unidad de Investigación en Biotecnología (UIB), Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. Dirección actual: Agrupación Rosa Ara Ter., Tacna, Perú.

Introducción

La necesidad de mantener clones seleccionados e híbridos promisorios de especies vegetales para su distribución, en condición sana, a programas nacionales de investigación agrícola estimuló algunos de los primeros estudios sobre el mantenimiento in vitro del germoplasma de papa (*Solanum* spp.) en el Centro Internacional de la Papa (CIP), y de yuca (*Manihot* spp.) en el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).

El trabajo, realizado a principios y a finales de la década del setenta, mostró que los cultivos de yema de papa, mantenidos entre 9 y 10 °C, podían permanecer viables durante un año. Un resultado comparable se obtuvo aplicando estrés osmótico y añadiendo inhibidores del crecimiento al medio de cultivo (Schilde-Rentschler y Roca, 1987). Los cultivos de yuca, en cambio, se deterioraban a temperaturas inferiores a 18 °C, aunque su viabilidad se podía mantener aun durante 18 meses si los cultivos se mantuvieran entre 22 y 24 °C (Roca, 1985). La utilización inmediata del germoplasma mejorado era la fuerza que impulsaba estos esfuerzos tempranos de conservación in vitro.

Aproximadamente al mismo tiempo, Morel (1975) y Henshaw (1975) abogaron por la función que podían tener las técnicas de cultivo in vitro en la conservación de los recursos fitogenéticos como alternativa al mantenimiento de colecciones para uso inmediato en el mejoramiento de plantas. También en este período se realizó un trabajo exitoso en la conservación de tejidos vegetales por criopreservación en la Universidad de Nottingham, con el finado profesor Street (1973). Sólo en 1980 se reconoció el potencial de los métodos de cultivo in vitro para la conservación de especies de plantas 'difíciles' (Withers y Williams, 1985); este término se refería a especies propagadas vegetativamente cuya semilla no era sensible a las condiciones corrientes de conservación de semillas, es decir, a la temperatura baja y al contenido de agua reducido, como ocurre en numerosos frutales tropicales perennes y en diversas palmas.

Basada en un informe global de Withers (1979) sobre conservación in vitro, la Junta Internacional para Recursos Fitogenéticos (IBPGR, en inglés) estableció, a principios de la década del ochenta, un grupo científico de trabajo para que considerara todos los aspectos de la conservación in vitro de plantas. Como resultado de ese trabajo, se tomaron decisiones relevantes para esta actividad científica (Withers, 1980; Bajaj, 1977; IBPGR, 1983), a saber:

- a. se clarificó el marco conceptual básico de la conservación in vitro;
- b. se identificaron las especies que requieren atención prioritaria para su conservación in vitro;
- c. se identificaron las siguientes áreas críticas de investigación en la conservación in vitro: el problema de la estabilidad genética de los cultivos, la necesidad de parámetros para caracterizar las accesiones que entren a almacenamiento in vitro, la necesidad de técnicas de indización de enfermedades en el germoplasma conservado in vitro, el desarrollo de técnicas para la colección e intercambio de germoplasma in vitro, y el desarrollo de un sistema eficiente de documentación y manejo de datos para la conservación in vitro.

Desde el esfuerzo inicial de la década del setenta se ha logrado un notorio progreso. Sin embargo, sólo recientemente se acometió el estudio de varios temas importantes relacionados con la conservación in vitro de los recursos fitogenéticos.

Esta actividad facilita principalmente la conservación de los genes (en genotecas) y de los genotipos. Las genotecas pueden formarse dejando el DNA desnudo en los plásmidos o incorporándolo a ciertas bacterias. Los genotipos se conservarán mediante el cultivo de ápices, de nudos o de cualquier otro explante regenerativo.

La conservación in vitro tiene que considerarse como parte de la estrategia general de conservación de una especie vegetal; es más bien un auxiliar valioso y un suplemento de la conservación de los recursos genéticos. Sólo ocasionalmente, el almacenamiento in vitro sería la única estrategia para conservar una especie dada. Para algunos frutales tropicales como el cacao (*Theobroma*), la estrategia principal de conservación estaría probablemente en los bancos genéticos in vitro que utilizan las técnicas in vitro para evaluar la variabilidad genética de la especie, y para la colección e intercambio de ésta. Los cultivos de raíces y tubérculos, como papa, yuca y batata (*Ipomoea*), se almacenarían como semilla durante cortos períodos, de modo que, para ellos, los métodos in vitro serían complementarios para la conservación de genotipos específicos (cultivares, híbridos, clones elite) y para el traslado internacional de clones. Para otros cultivos de tubérculos y raíces tropicales y para especies de frutales como *Musa* sp., que rara vez producen semilla y son prácticamente estériles, el almacenamiento in vitro y los bancos genéticos ex situ en el campo estarían probablemente a la par. Por último, en las especies tropicales de semilla recalcitrante, la colección y el intercambio de materiales in vitro tendrán una función básica.

Estrategias para la Conservación in Vitro

Es grande el rango de especies vegetales cultivadas cuya conservación es accesible a las técnicas in vitro (Cuadro 31.1). La conservación de los recursos fitogenéticos mediante los métodos del cultivo in vitro se logra haciendo cambios en el ambiente de cultivo para desacelerar o suprimir totalmente el crecimiento de las células y de los tejidos; el objetivo es aumentar al máximo el período de transferencia del cultivo o extenderlo indefinidamente. No obstante, debe realizarse, como se indicó anteriormente, una evaluación científica cuidadosa de las ventajas y desventajas de una estrategia in vitro de la conservación de recursos genéticos para cada caso específico (Figura 31.1).

Cuadro 31.1. Géneros que pueden conservarse cultivados in vitro.

Cultivos	Géneros
Propagados vegetativamente	
<i>Solanum*</i>	<i>Vitis*</i>
<i>Manihot*</i>	<i>Olea</i>
<i>Musa*</i>	<i>Ananas</i>
<i>Ipomoea*</i>	<i>Ficus</i>
<i>Xanthosoma*</i>	<i>Agave</i>
<i>Colocasia*</i>	<i>Vanilla</i>
<i>Dioscorea*</i>	<i>Allium*</i>
<i>Canna*</i>	<i>Piper</i>
	<i>Saccharum*</i>
	Tubérculos andinos (Varios géneros)
Propagados sexualmente	
<i>Citrus*</i>	<i>Theobroma*</i>
<i>Elaeis*</i>	<i>Hevea</i>
<i>Coccus*</i>	<i>Chinchona</i>
<i>Malus*</i>	<i>Cinnamomum</i>
<i>Persea</i>	<i>Coffea</i>
<i>Mangifera</i>	<i>Camellia</i>
<i>Macadamia</i>	<i>Prunus*</i>
<i>Durio</i>	<i>Artocarpus</i>
<i>Anacardium</i>	

* Tienen prioridad para IBPGR respecto a su conservación in vitro.

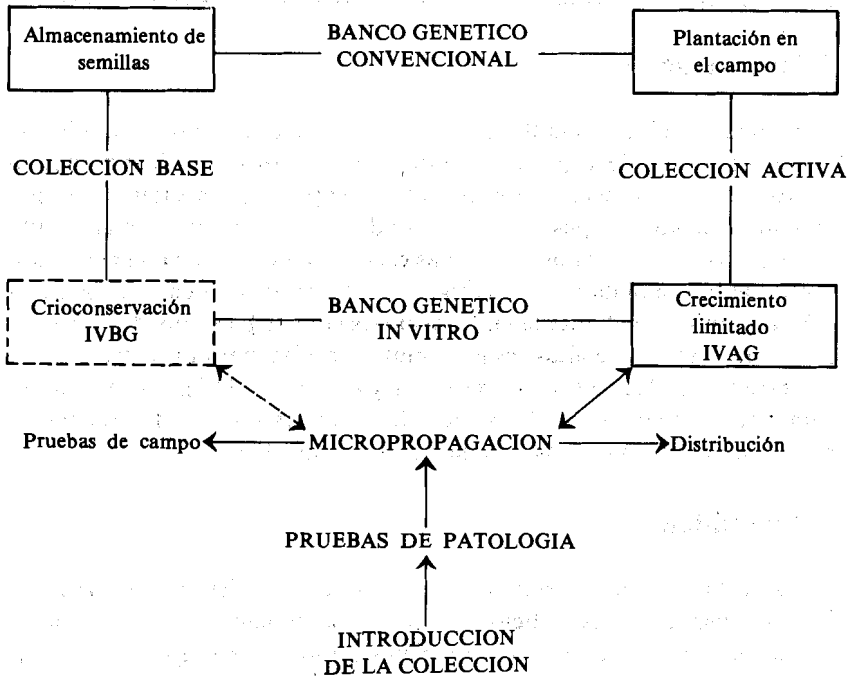


Figura 31.1. Integración de los métodos in vitro en las estrategias convencionales de conservación de germoplasma de yuca (*Manihot esculenta*).

Se han propuesto dos tipos de conservación in vitro de los bancos genéticos (Withers y Williams, 1985): a) el banco genético in vitro activo (IVAG, en inglés) donde los cultivos se mantienen en crecimiento lento, y b) el banco genético in vitro básico (IVBG, en inglés) donde los cultivos son crioconservados. El IVAG se está desarrollando, en alto grado, para las especies yuca, papa, batata, banano y caña de azúcar, y constituye una colección de trabajo; su contraparte estaría representada por la colección de campo y por la colección de semilla sexual almacenada a corto plazo. El IVBG constituye una colección básica —es decir, conservada en plazos largos y no activa o de trabajo— ya que la criopreservación no se ha desarrollado aún plenamente en ningún cultivo; este banco permite un mantenimiento total de la estabilidad genotípica del germoplasma, y su contraparte estaría representada por la colección de semilla sexual mantenida bajo almacenamiento a largo plazo.

Aspectos Importantes de la Conservación in Vitro

Regeneración

La regeneración de plantas enteras basada en los sistemas de cultivo de células es, a menudo, el paso que limita la aplicación de técnicas de cultivo in vitro a especies vegetales que no se pueden propagar mediante meristemas preformados. A pesar de la capacidad que tienen para iniciar callo diversos tejidos y órganos de muchas especies cultivadas, la regeneración reproducible de plantas enteras sigue siendo problemática. La regeneración adventicia mediante la embriogénesis somática es muy deseable, ya que el proceso ofrece altas tasas de multiplicación y produce propágulos que poseen ejes de raíz y de yema (Stamp y Henshaw, 1987). Los embriones somáticos pueden desarrollarse de células únicas y se pueden recuperar plantas con genotipos más estables (Evans et al., 1981).

Viabilidad

La evaluación de la viabilidad de los cultivos in vitro se debe realizar sistemáticamente. En condiciones de crecimiento lento, en que el período de transferencia se extiende durante meses o años, la frecuencia de evaluación de los cultivos aumenta en comparación con la evaluación que se haría al material conservado bajo nitrógeno líquido, por ejemplo. Las características más importantes que se evalúan en el almacenamiento de crecimiento lento de cultivos derivados del ápice de yemas son: contaminación, senescencia de la hoja (la razón hojas verdes/hojas muertas), número de brotes verdes (para micropropagación adicional), número de nudos viables (verdes) en relación con la longitud del tallo (verde), presencia o ausencia de raíces, y ocurrencia de callo.

Estabilidad genética

La estabilidad genética de los cultivos ha sido, durante mucho tiempo, un motivo de inquietud cuando se piensa aplicar las técnicas in vitro para la conservación del germoplasma. El material recuperado de la conservación in vitro debe representar genéticamente al material utilizado. Cualquier sistema de cultivo in vitro será inaceptable si introduce un alto riesgo de inestabilidad genética o de selección entre genotipos —o de ambas cosas (Withers, 1988).

En cultivos propagados vegetativamente se han aplicado criterios morfológicos para caracterizar los genotipos, diferencias que son difíciles de

detectar en los cultivos propagados in vitro. Se ha señalado que la variación genética causada por un reajuste cromosómico puede presentarse en el cultivo de tejidos (D'Amato, 1964). Existe también una correlación entre el tiempo en que el material vegetal se cultiva como callo y la probabilidad de que ocurran en él cambios cromosómicos; esto podría causar un cambio hacia un tipo variante en la propagación in vitro (Schilde-Rentschler y Roca, 1987).

Los sistemas de cultivo de tejidos presentan diferentes niveles de riesgo de variación genética. Así, por ejemplo, los sistemas más estables son los cultivos de meristemas y la micropropagación nodal; les siguen los embriones somáticos y las yemas adventicias; por último, los más inestables, en teoría, son los cultivos de células y protoplastos. Igualmente, entre las dos estrategias de conservación in vitro —el crecimiento lento y la criopreservación— hay posibilidades de variación debidas a la posible regeneración de yemas adventicias. Por otra parte, en los procesos de renovación de cultivos (subcultivos) del material conservado bajo crecimiento lento, hay posibilidades de seleccionar los explantes mejores o más vigorosos por parte de la persona que realiza estos procesos.

La monitoría de la estabilidad genética de los cultivos in vitro de las especies cultivadas está adquiriendo gran interés. Se han adelantado criterios morfológicos, bioquímicos y moleculares para la detección de los cambios genéticos (Withers y Williams, 1985). Se deben desarrollar, como complemento de la evaluación de la estabilidad, técnicas electroforéticas para evaluar la variabilidad de las isozimas en muestras pequeñas de tejido obtenidas de cultivos in vitro. Además, se debe probar la monitoría que se ha hecho a esa estabilidad genética mediante técnicas moleculares, para detectar la variación del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción de ADN (RFLPs).

Sistematización de la información

Un banco genético in vitro debe mantener y actualizar continuamente una base de datos computarizada que contenga información relacionada con todos los aspectos de la conservación in vitro y con las áreas de investigación asociadas. La base de datos contiene una gran cantidad de información relacionada con cada una de las accesiones, como datos de pasaporte, caracterización genotípica, indización de enfermedades, micropropagación, intercambio internacional, equipo y suministros, y otros aspectos logísticos de la operación de conservación in vitro.

Métodos de Conservación in Vitro

Hay dos sistemas básicos de conservación del germoplasma in vitro, uno mediante la limitación del crecimiento hasta tasas mínimas, y otro mediante la supresión total del crecimiento y del metabolismo celular.

Limitación del crecimiento

El crecimiento rápido de los cultivos a tasas normales exige más mano de obra y aumenta la posibilidad de pérdidas debidas a accidentes o a contaminación microbiana durante la repetición continua de los subcultivos; es necesario entonces reducir al mínimo la frecuencia de los subcultivos, con lo que se logra además minimizar la posibilidad de variación genética.

El método consiste en mantener los cultivos (yemas, plántulas derivadas de nudos o directamente de meristemas) en condiciones físicas (factores ambientales) o químicas (composición del medio de cultivo) que permitan extender al máximo el intervalo de trasferencia a los medios frescos, sin que ello afecte la viabilidad de los cultivos.

La tasa de crecimiento de los cultivos in vitro puede controlarse empleando, principalmente, los siguientes factores: temperatura, nutrientes inorgánicos y orgánicos, reguladores del crecimiento, y concentración osmótica del medio.

Otros factores, como el tamaño de los tubos de ensayo o de los frascos, la calidad y concentración del agente gelificante, la adición de carbón activado al medio, la limitación de la oxigenación, la intensidad de la luz y del fotoperíodo, entre otros, son también importantes en el control del crecimiento.

Temperatura. La reducción de la temperatura ha sido el recurso más comúnmente utilizado para disminuir el crecimiento de los cultivos. La mayoría de los cultivos in vitro son mantenidos a temperaturas entre 20 °C y 30 °C; a temperaturas más bajas la tasa de crecimiento disminuye, pero esta reducción depende de la especie en cuestión (Withers, 1980).

Concentración de nutrientes. La relación entre la concentración de carbohidratos y los componentes nitrogenados del medio nutritivo puede tener efectos sobre las tasas de crecimiento y la morfogénesis en los cultivos in vitro (Staritsky, 1980). La sacarosa tiene, igualmente, un efecto en la

viabilidad de los cultivos: concentraciones muy altas o muy bajas de ese azúcar resultan nocivas para la conservación de los tejidos in vitro.

Concentración de los reguladores del crecimiento. Los niveles de citoquininas y de inhibidores del crecimiento, como el ácido abscísico, interactúan con la concentración de sacarosa y con la temperatura de conservación y afectan así la viabilidad de los cultivos in vitro (Roca, 1985).

Entre los reguladores del crecimiento empleados por los investigadores figuran el ácido abscísico (ABA), el cloruro de fosfonio o clorfoniom (Phosphon-D), la hidrazida maleica o daminazida (B995), el cicocel o 2-cloroetil-cloruro de trimetil (CCC); el ácido N-dimetil succínico y el ancimidol (Nair et al., 1979); y el ácido acetyl salicílico, ASA (López, 1985).

Concentración osmótica. La limitación del crecimiento por causa de la concentración osmótica se debe, posiblemente, a la reducción de la absorción de agua y de nutrimentos del medio. Puesto que es altamente metabolizable, la sacarosa actúa osmóticamente en concentraciones altas. Otros agentes osmóticos difíciles de metabolizar, como el manitol y el sorbitol, son posiblemente más efectivos que la sacarosa en la limitación del crecimiento de los cultivos, pero se debe tener en cuenta que estas sustancias interactúan con el contenido de sacarosa y con la temperatura de conservación.

Supresión del crecimiento

Como se discutió antes, siempre existe un riesgo, mayor o menor, de inestabilidad citogenética cuando se conserva el germoplasma mediante el cultivo de tejidos in vitro a largo plazo. Este riesgo se puede minimizar utilizando tejidos organizados (meristemas, yemas y cultivos derivados) y reduciendo la tasa de crecimiento mediante la temperatura baja. Conforme se reduce la temperatura de un tejido, el metabolismo celular disminuye hasta llegar a un estado de 'suspensión animada' cuando la temperatura alcanza niveles inferiores a $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$; a esta temperatura, los procesos biológicos han cesado y las posibles causas de inestabilidad se habrán, por tanto, minimizado o eliminado. Este tema se trata con mayor detalle en el Capítulo 13 de esta obra.

Se han discutido hasta aquí los aspectos generales relacionados con la conservación in vitro; se discutirán ahora estos aspectos pero aplicándolos a la yuca (*Manihot esculenta* Crantz), cultivo que ha sido objeto de investigación profunda en la Unidad de Investigación en Biotecnología del CIAT.

Conservación in Vitro de la Yuca

La yuca es uno de los principales cultivos alimenticios de primera necesidad en las regiones tropicales bajas. Constituye una fuente principal de calorías para casi 500 millones de personas en más de 60 países. La producción mundial de yuca alcanza actualmente 130 millones de toneladas, distribuidas principalmente en el Sudeste Asiático, en Africa, y en América Latina tropical. La yuca se utiliza en gran parte para el consumo humano y está disponible en el mercado fresco o procesada como harina.

El peligro potencial de la erosión genética de los recursos cultivados y silvestres del germoplasma de *Manihot* y el requerimiento de variabilidad genética para usar en el mejoramiento del cultivo, justifican los esfuerzos de conservación del germoplasma de yuca.

El mantenimiento convencional de los bancos de germoplasma de yuca se hace mediante el cultivo continuo de campo. Las nuevas 'siembras' de germoplasma se hacen a menudo con estacas recientemente cortadas de campos viejos. Además de su costo alto, el mantenimiento del cultivo de campo expone muchas veces un germoplasma valioso al ataque de insectos, al contagio de enfermedades, y a los problemas del suelo o del clima. Las estacas recién cortadas sólo pueden guardarse durante un tiempo corto porque aparecen brotes prematuros y ocurren ataques de insectos o microbios.

La propagación vegetativa propicia la transmisión de plagas y enfermedades en las estacas a través de generaciones sucesivas. Enfermedades así transmitidas, como el añublo bacteriano de la yuca, la enfermedad del mosaico africano, la enfermedad del superalargamiento, y el cuero de sapo pueden producir pérdidas muy altas en el rendimiento.

Es posible hacer el mantenimiento del germoplasma de yuca por medio del cultivo de meristemas, empleando una combinación de técnicas criogénicas y de condiciones de almacenamiento de crecimiento mínimo.

Almacenamiento de crecimiento lento

Las investigaciones recientes hechas en el CIAT sobre conservación de la yuca han proporcionado medios para almacenar cultivos in vitro bajo condiciones de crecimiento mínimo; se ha conformado así un banco de genes in vitro activo (IVAG) que representa la colección de trabajo. Se ha indicado (Roca, 1984; 1985) que el almacenamiento a 22 °C reduce la tasa de crecimiento de las yemas o nudos con respecto a la de los cultivos

mantenidos entre 28 y 30 °C (Cuadro 31.2). Las temperaturas de almacenamiento inferiores a 18 °C fueron perjudiciales para algunas variedades de yuca cuando la iluminación permanecía alta. Sin embargo, la viabilidad del cultivo se podía mantener reduciendo la iluminación a menos de 500 lux.

El aumento de BA de 0.04 a 0.22 mM, y el de sacarosa de 0.05 a 0.12 M, redujo también el alargamiento de los brotes que tenían más de 90% de viabilidad. Sin embargo, si el almacenamiento de baja temperatura se combinaba con altos niveles de BA y de sacarosa, el crecimiento de los cultivos se detenía al grado de que la mayoría de ellos se deterioraba al cabo de tres meses. Los resultados recientes señalan que el crecimiento de los cultivos se reduce cuando el contenido total de nitrógeno del medio decrece hasta 20 mM a 27 ó 28 °C y hasta 40 mM si hay de 20 a 22 °C. La combinación de 1% de sacarosa y de 1% de manitol redujo la tasa de crecimiento de la yuca in vitro, pero al cabo de 12 meses se presentaron efectos nocivos. Cuando se usó sorbitol en vez de manitol, también se presentó un descenso en la tasa de crecimiento, pero no disminuyó la viabilidad y se logró un tiempo de conservación de más de 18 meses en algunas variedades.

Más de 4000 variedades del banco mundial de germoplasma de yuca reunido en el CIAT han sido puestas en almacenamiento in vitro bajo condiciones de crecimiento mínimo. Según la variedad, estos cultivos se pueden mantener de 18 a 24 meses sin necesidad de transferencia a medios

Cuadro 31.2. Efecto de la temperatura en la tasa de crecimiento y en la viabilidad de dos clones de yuca conservados in vitro.^a

Temperatura (°C)	Elongación de los tallos (cm/mes)	Viabilidad		
		Tallos por cultivo (no.)	Nudos por tallo (no.)	Nudos por cultivo (no.)
Clon M Col 22				
18	0.1	1.5	3.0	4.5
22	0.5	2.5	6.8	17.0
30	1.5	5.0	6.3	31.5
Clon M Col 1467				
18	0.6	2.0	12.0	24.0
22	1.2	3.0	15.0	45.0
30	1.5	6.5	10.5	68.2

a. Evaluación: 9 meses de conservación; iluminación: 1500 a 2000 lux; tubos de ensayo de 25 x 150 mm.

nuevos. Las variedades difieren en su tolerancia relativa a la temperatura baja y en su tasa relativa de crecimiento. Además, los cultivos viejos de ciertas variedades tienden a deteriorarse a causa de la oxidación de los exudados de tipo fenólico de las raíces. Durante todo el tiempo de almacenamiento, los cultivos producen yemas axilares cuyo número está directamente relacionado con la viabilidad del cultivo y, en consecuencia, con su potencial de micropropagación una vez que el cultivo ha sido recuperado del almacenamiento. Al final de cada ciclo de almacenamiento, las yemas axilares se transfieren a un medio recién preparado y se inicia así un nuevo ciclo. El banco de germoplasma *in vitro* es una habitación de 5 x 7.5 x 30 m que puede contener 5000 accesiones de yuca las cuales, si estuvieran en el campo, requerirían 6 ha de terreno. Dos técnicos de laboratorio, de tiempo completo, manejan el banco *in vitro*, y más de 10 personas, entre obreros y agrónomos, manejan el banco en el campo.

La evaluación de la estabilidad fenotípica es permanente en el CIAT, y emplea criterios morfoagronómicos y bioquímicos (Ramírez et al., 1987). Empleando los sistemas EST (α y β esterases) y DIAP (diaforasas) se ha hecho seguimiento de los posibles cambios en los patrones electroforéticos de 18 variedades de yuca, que fueron conservadas *in vitro* durante 0, 2, 4 y 6 años. Estos patrones, revelados por la actividad enzimática, han permanecido constantes en las 18 variedades a lo largo de los seis años de conservación. La Figura 31.2 presenta estos resultados en una variedad de yuca y para ambas enzimas.

Se ha observado una reducción de los lóbulos de la hoja en unas pocas variedades después de que han sido recuperadas del almacenamiento y han crecido en el campo, aunque la reversión al tipo de lóbulo amplio empezó después del segundo ciclo de crecimiento vegetativo. En general, las plantas no han manifestado cambios mayores.

Crioconservación

Después de los resultados promisorios que obtuvieron Kartha et al. (1982) en el Instituto de Biotecnología de Plantas, en Saskatoon, Canadá, se iniciaron en 1985 algunas investigaciones colaborativas entre el CIAT y el IBPGR para desarrollar más esta técnica con meristemas de yuca y con otros tejidos, y para constituir una colección a largo plazo, es decir, un banco genético *in vitro* básico (IVBG).

En trabajos anteriores hechos en Saskatoon, se demostró la supervivencia de los meristemas cuando se usaba el método del enfriamiento lento (0.5 °C/min) con una temperatura terminal de -25 a -30 °C y agregando

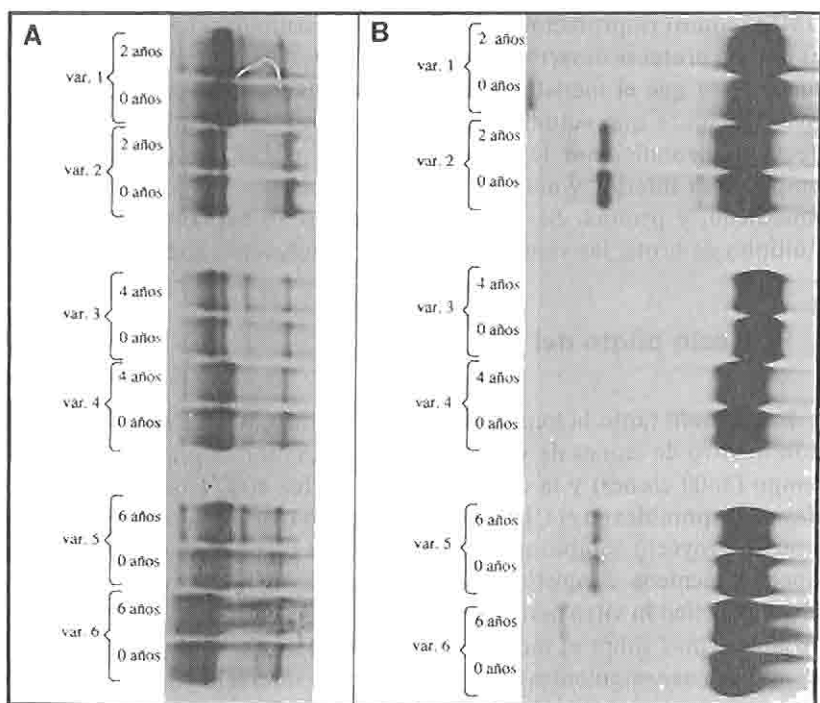


Figura 31.2. Estabilidad de los patrones electroforéticos de las isoenzimas esterasa (A) y diaforasa (B) de seis variedades de yuca recuperadas de un almacenamiento in vitro que duró 2, 4 ó 6 años, según el caso. Se usaron raíces del cultivo in vitro para la electroforesis. El testigo (la variedad sin almacenar) está representado por 0 años.

DMSO y sorbitol como crioprotectantes. El proyecto actual ensayó, desde un principio, la supervivencia de ápices de cinco variedades de yuca empleando combinaciones de métodos de enfriamiento lento y rápido con diversos tipos de frascos y con varios crioprotectores. El enfriamiento rápido produjo una tasa mucho mayor de supervivencia de los tejidos que el enfriamiento lento, aunque los ápices desarrollaron callo después de su recuperación del nitrógeno líquido. El crioprotector DMSO permitió un nivel más alto de supervivencia en todas las variedades cuando se usaron ampollas plásticas para contener el espécimen durante el enfriamiento y el almacenamiento por congelación. En la mayoría de los casos, sólo se desarrolló una masa de callo del segmento, y en muy pocos casos el callo

estaba acompañado por un brote. Una vez más, el uso de ampollas y de DMSO como crioprotector produjo mejores resultados. En la congelación lenta, más brotes se desarrollaron en los flancos del brote apical original, lo que sugiere que el meristema apical del explante original se dañó. Las investigaciones que actualmente hace el CIAT se orientan a probar el efecto de acondicionar los explantes en un precultivo, es decir, a una temperatura inferior y añadiendo al medio sacarosa, manitol, glicol de polietileno, y prolina. Se usarán, además, como explantes los cultivos múltiples de brote, las yemas latentes, y los embriones somáticos.

Proyecto piloto del IVAG

Empleando tanto la experiencia adquirida en el CIAT en la conservación *in vitro* de clones de yuca (4000 clones), como la gran colección de campo (4600 clones) y la colección *in vitro* (los 4000 clones) de germoplasma disponibles en el CIAT, este Centro y el IBPGR acordaron llevar a cabo un proyecto colaborativo para estimar la viabilidad y demostrar los aspectos técnicos y logísticos del establecimiento y la operación de un banco genético *in vitro* activo (P-IVAG) de yuca. Al final del proyecto se darían normas sobre el modo de operar un IVAG. Este proyecto comprende los pasos siguientes: 1) selección y caracterización de 100 clones de yuca para usar en el P-IVAG; 2) cultivo *in vitro* de clones, micropropagación, e introducción al almacenamiento bajo condiciones de crecimiento mínimo; 3) monitoría de la estabilidad genética, de la viabilidad de los cultivos, de la indización de enfermedades, y de otros aspectos logísticos (laboratorio, instalaciones, equipo); 4) desarrollo de una base de datos computarizada para administrar todos los aspectos del P-IVAG.

De los factores que probablemente afectan la estabilidad de los cultivos durante el almacenamiento de crecimiento lento, la tasa de subcultivo es uno de los que requiere consideración. Tres genotipos de yuca, con notorias diferencias morfológicas y electroforéticas, han sido seleccionados para este fin. La frecuencia de subcultivo de estos clones será de tres meses, momento en que se hará también una evaluación morfológica y otra electroforética de isozimas. El grueso de los clones contenidos en el P-IVAG, en cambio, se someterá a subcultivo cada 18 meses.

Se ha desarrollado una base de datos computarizada para el manejo de toda la información recogida en el P-IVAG. Los datos de pasaporte, los morfoagronómicos de campo, la caracterización morfológica *in vitro*, la indización de enfermedades, los datos electroforéticos, la micropropagación y el subcultivo, la viabilidad, y otros datos como la localización física

de los cultivos, el equipo, los requisitos de suministro y de mano de obra se están incorporando a la base de datos.

Intercambio Internacional de Germoplasma de Yuca

La reglamentación cuarentenaria de la yuca varía de un país a otro; sin embargo, la metodología del cultivo *in vitro* ha sido aceptada por diversos países como uno de los medios más seguros para recibir el material vegetativo de yuca. Entre 1979 y 1988, más de 800 materiales de yuca, entre variedades e híbridos, libres de organismos patógenos fueron distribuidos por el CIAT como cultivos *in vitro* a 34 países de América Latina y Asia, principalmente. El sistema *in vitro* se ha utilizado también para introducir al CIAT germoplasma nuevo de yuca desde los países de América Latina; entre 1980 y 1988, se introdujeron a este Centro, como cultivos de meristema, casi 2000 accesiones de cultivares de yuca nativos.

Conclusión

El almacenamiento de germoplasma en crecimiento lento es ahora un método viable para mantener grandes colecciones en poco espacio, libres de los riesgos que causan plagas y enfermedades. Actualmente existen bancos genéticos *in vitro* activos (IVAG) para *Manihot* y *Solanum*, y se adelanta ese trabajo con *Ipomoea*, *Colocasia*, *Xanthosoma*, *Musa*, *Saccharum*, *Theobroma* y *Citrus*. El futuro de la crioconservación de los recursos genéticos es promisorio, y en esa labor se trabaja actualmente en yuca, papa y plátano.

El establecimiento de bancos de germoplasma *in vitro* se ha convertido en una contribución importante al mantenimiento convencional, en el campo, de grandes colecciones. El proyecto piloto del IVAG proporciona normas para la adopción de la conservación *in vitro* de la yuca por las instituciones nacionales de la zona tórrida, o para la extrapolación de esas normas a otros cultivos propagados vegetativamente.

Las investigaciones recientes sobre el cultivo de tejidos de yuca señalan que la regeneración de plantas de varios cultivares de esa especie es posible por embriogénesis somática. Se ha establecido la embriogénesis secundaria que permite la regeneración de plantas derivadas de cultivos embriogénicos de largo plazo (Szabados et al., 1987). Este logro ayudará el desarrollo futuro de métodos genéticos celulares y moleculares que mejorarán el cultivo de la yuca. La disponibilidad de bancos de germoplasma *in vitro*,

integrales y fácilmente accesibles, tanto en condiciones de crecimiento lento como de carácter criogénico, será crucial para ese esfuerzo.

Referencias

- Bajaj, Y. P. S. 1977. Clonal multiplication and cryopreservation of cassava through tissue culture. *Crop Improvement* 4:198-204.
- D'Amato, F. 1964. Endopolyploidy as a factor in plant tissue development. *Caryologia* 17:41-51.
- Evans, D. A.; Sharp, W. R. y Flick, C. E. 1981. Growth and behavior of cell cultures: Embryogenesis and organogenesis. En: Thorpe, T. A. (ed.). *Plant tissue culture: Methods and applications in agriculture*. Academic Press, Nueva York. p. 45-113.
- Henshaw, G. G. 1975. Technical aspects of tissue culture storage for genetic conservation. En: Frankel, O. H. y Hawks, J. G. (eds.). *Crop genetic resources for today and tomorrow*. Cambridge University Press, Cambridge, Inglaterra. p. 349-358.
- IBPGR (International Board for Plant Genetic Resources). 1983. IBPGR Advisory Committee on *in vitro* storage: Report of the first meeting. Roma, Italia. 11 p.
- Kartha, K. K.; Leung, N. L. y Mroginski, L. A. 1982. *In vitro* growth responses and plant regeneration from cryopreserved meristems of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Z. Pflanzenphysiol.* 107:133-140.
- López, H. A. 1985. Efecto del ácido acetilsalicílico en el crecimiento de yemas de *Solanum cardiophyllum* (Lindl.) cultivadas *in vitro*. Tesis (M.S.). Colegio de Posgraduados, Chapingo, México.
- Morel, G. 1975. Meristem culture techniques for the long-term storage of cultivated plants. En: Frankel, O. H. y Hawkes, J. G. (eds.). *Crop genetic resources for today and tomorrow*. Cambridge University Press, Cambridge, Inglaterra. p. 327-332.
- Nair, N. G.; Kartha, K. K. y Gamborg, O. L. 1979. Effect of growth regulators on plant regeneration from shoot apical meristems of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and on the culture of internodes *in vitro*. *Z. Pflanzenphysiol.* 95:51-56.
- Ramírez, H.; Hussain, A.; Roca, W. y Bushuk, W. 1987. Isozyme electrophoregrams of sixteen enzymes in five tissues of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) varieties. *Euphytica* 36:39-48.

- Roca, W. M. 1984. Cassava. En: Sharp, W. R.; Evans, D. A.; Amirato, R. V. y Yamada, Y. (eds.). Handbook of plant cell culture. v. 2, p. 269-301.
- . 1985. Cassava tissue culture. En: Cock, J. H. y Reyes, J. A. (eds.). Cassava: Research, production and utilization. United Nations Development Programme-Centro Internacional de Agricultura Tropical (UNDP-CIAT), Cali, Colombia.
- Schilde-Rentschler, L. y Roca, W. 1987. Tissue culture for the international exchange of potato and cassava germplasm. En: Bajaj, Y. P. S. (ed.). Biotechnology in agriculture and forestry. Springer-Verlag, Berlín. v. 3, p. 453-465.
- Stamp, J. A. y Henshaw, G. G. 1987. Secondary somatic embryogenesis and plant regeneration in cassava. *Plant Cell Tissue & Organ Culture* 10:227-233.
- Staritsky, G. 1980. Growth inhibition and dormancy. En: Crop genetic resources: The conservation of difficult material. Proceedings of an international workshop. University of Reading, Reino Unido.
- Street, H. E. (ed.). 1973. Plant tissue and cell culture. Blackwell Sci. Publ., Oxford.
- Szabados, L.; Hoyos, R. y Roca, W. 1987. *In vitro* somatic embryogenesis and plant regeneration of cassava. *Plant Cell Reports* 6:248-251.
- Withers, L. A. 1979. Freeze-preservation of somatic embryos and clonal plantlets of *Daucus carota*. *Plant Physiol.* 68:460-467.
- . 1980. Tissue culture storage for genetic conservation. IBPGR Technical Report. Roma, Italia.
- . 1988. *In vitro* conservation and germplasm utilization. En: Brown, A. D. H.; Frankel, O. H.; Marshall, D. R. y Williams, J. T. (eds.). The use of crop genetic resources collection. Cambridge University Press.
- y Williams, J. T. 1985. *In vitro* conservation. IBPGR Research Highlights. Roma, Italia.