

GESTIÓN DE ESPECIES AMENAZADAS

BIOTECNOLOGÍA Y CONSERVACIÓN DE GERMOPLASMA VEGETAL

Candela Cuesta Moliner

cuestacandela@uniovi.es / Tfno: 985458107

GESTIÓN DE ESPECIES AMENAZADAS

CONSERVACIÓN DE GERMOPLASMA VEGETAL

- Conservación de semillas
- Conservación *in vitro* de plantas propagadas vegetativamente
- Crioconservación

GESTIÓN DE ESPECIES AMENAZADAS

CONSERVACIÓN DE GERMOPLASMA VEGETAL

- Conservación de semillas
- Conservación *in vitro* de plantas propagadas vegetativamente
- Crioconservación

Biodiversidad y conservación

La **biodiversidad** o **diversidad biológica** se refiere a la amplia variedad de seres vivos sobre la Tierra, resultado de miles de millones de años de evolución.



La **biodiversidad** mundial disminuye a una velocidad sin precedentes:

- 1996-2004:
 - 8321 especies vegetales incorporadas a la Lista Roja de Especies Amenazadas.
 - El número de plantas consideradas en peligro crítico aumentó un 60%

Biodiversidad y conservación

Se requieren medidas inmediatas de conservación:

i) Conservación *in situ*: conservación de especies a través del manejo de las poblaciones silvestres y sus hábitats naturales. Esto incluye protección de ecosistemas, lo que implica una correcta ordenación del territorio y declaración de espacios naturales protegidos.



ii) Conservación *ex situ*: conservación de cualquier componente de la diversidad biológica fuera de sus hábitats. Este tipo de conservación incluye tanto el almacenamiento de los recursos genéticos en banco de germoplasma, como el establecimiento de colecciones de campo.



Germoplasma y recursos genéticos

GERMOPLASMA: cualquier material capaz de transmitir los caracteres hereditarios de una generación a otra. Se puede afirmar que el germoplasma representa la base física de la transmisión genética, o bien la suma de los genes y de los factores citoplasmáticos que rigen la herencia.



GERMOPLASMA VEGETAL: distintas estructuras vegetales (esporas, tejidos o partes de plantas), incluyendo sus células y compuestos con información genética (ADN, ARN, etc.) y, de especial modo, las semillas. Estas constituyen la estructura mas representativa y evolucionada de las plantas superiores para su perpetuación, siendo además el agente de dispersión mas frecuente, eficaz y con mayor capacidad de regenerar una planta vascular completa a largo plazo.

Germoplasma y recursos genéticos

El termino **GERMOPLASMA** hace referencia a cualquier forma de vida, pudiendo referirse, en virtud de diferentes rangos taxonómicos:

- i) a un género (ej. germoplasma de *Olea*)
- ii) a una especie (ej. germoplasma de *Olea europaea* L.)
- iii) a alguna categoría taxonómica de rango inferior, como subespecie o variedad (ej. *O. europaea* L. var. *sylvestris* Brot.).



La expresión **RECURSOS GENÉTICOS** sustituye a menudo el concepto de germoplasma, refiriéndose contextualmente a un conjunto de especies o géneros (recursos genéticos vegetales, recursos genéticos microbianos, etc.) que ofrecen una utilidad económica, ambiental o de otro tipo.

GESTIÓN DE ESPECIES AMENAZADAS

CONSERVACIÓN DE GERMOPLASMA VEGETAL

- Conservación de semillas
- Conservación *in vitro* de plantas propagadas vegetativamente
- Crioconservación

Bancos de germoplasma: conservación de semillas

BANCOS DE GERMOPLASMA: centros encargados de la conservación de la biodiversidad contenida en el germoplasma. si el material conservado se basa principalmente en semillas se denomina **BANCO DE SEMILLAS**.



International Maize and Wheat Improvement Center

Inicio...

Asociado al desarrollo de la agricultura, ya que era una actividad necesaria para mantener los ciclos de recolección y siembra.

En infraestructuras...

Años 20-30 del siglo XX en Rusia, aumentar los suministros de germoplasma de las especies de uso alimenticio e industrial, y a la par proceder a su mejoramiento genético.

Bancos de germoplasma: tipos de semillas

Principal método de conservación: desecado y almacenamiento a bajas temperaturas.

Las semillas se secan y luego se depositan en un contenedor adecuado para su almacenaje a medio o largo plazo (si tenemos suficiente cantidad podremos dividir en sublotes o réplicas nuestra muestra original). Por encima de ellas se colocará el gel de sílice. Si aún queda espacio libre hasta la abertura se puede colocar algodón a papel para disminuir en lo posible la cantidad de aire. Luego se cierran herméticamente y se llevan a una cámara fría (4-5 °C).



- Ensayos iniciales de germinación
- Secado de las semillas
- Colocación en contenedores a salvo de la humedad
- Colocación de estos contenedores en cámaras frías
- Ensayos periódicos de germinación



Ventajas del gel de sílice

- Puede reducir la humedad hasta un 2-3 %
- Mantiene indefinidamente estos niveles dentro de contenedores sellados
- Avisa de la entrada de humedad gracias a unos marcadores adicionales de color
- Se puede regenerar calentándolo

Bancos de germoplasma: tipos de semillas

Semillas ortodoxas: tolerantes a la deshidratación. Pertenecen a este grupo la mayor parte de las semillas de climas templados y mediterráneos.

Contenido de humedad	Posibles alteraciones durante la conservación
Inferior al 5%	Oxidación de lípidos
Entre 5 y 6%	Prácticamente ninguna (nivel óptimo para la conservación de semillas de numerosas especies)
Entre 10 y 18%	Marcado desarrollo de la actividad de criptógamas
Superior al 18%	Aumento de la respiración
Superior al 30%	Germinación de semillas no durmientes

Tabla 7. Comportamientos de las semillas ortodoxas durante la conservación a bajas temperaturas, en función del contenido de humedad.

Bacchetta *et al.* 2008

La tolerancia a la desecación esta ligada a las propiedades del protoplasma celular. Para poder afrontar la **deshidratación**, los tejidos celulares deben ser capaces de limitar o reparar los daños sufridos y mantener su integridad fisiológica durante el periodo en el que el tejido está seco. Además, deben poner en marcha, durante la fase de **rehidratación**, los mecanismos necesarios para la posible reparación de los tejidos.

Bancos de germoplasma: tipos de semillas

Semillas recalcitrantes: sensibles a la deshidratación, no toleran una deshidratación significativa respecto al contenido de humedad presente en el momento de la dispersión. Son recalcitrantes las semillas de muchas plantas tropicales (coco, mango, aguacate, cacao, etc.) e importantes especies arbóreas de regiones templadas y mediterráneas (ej. *Quercus*, *Castanea*).

Estas semillas no pueden conservarse con altos niveles de humedad porque tienden a germinar en poco tiempo, ni pueden mantenerse a temperaturas inferiores a 0° C, ya que los tejidos sufrirían daños por congelación del agua contenida en ellas.

El **porcentaje de agua** en el momento de la dispersión es un buen **índice de la aptitud para la conservación**: un valor elevado caracteriza las semillas de difícil conservación.

El 7% de las casi 7000 especies estudiadas hasta la actualidad, pertenecientes a 65 familias, presentan semillas recalcitrantes.

Bancos de germoplasma: tipos de semillas

Semillas intermedias: semillas que soportan mejor la deshidratación que las recalcitrantes, pero peor en comparación con las ortodoxas.

Otros casos particulares:



- Plantas que no producen semillas y se propagan vegetativamente (banana, plátano).

$$\begin{array}{ccccc} \textit{Musa acuminata} & \times & \textit{Musa balbisiana} & = & \textit{Musa X paradisiaca} \\ \text{(Asian Banana)} & & \text{(Asian Banana)} & & \text{(Hybrid Banana)} \\ \text{AA} & & \text{BB} & & \text{AAB or ABB (etc.)} \\ \text{(fertile)} & & \text{(fertile)} & & \text{(sterile)} \end{array}$$

Origin Of Triploid Banana From Asian Parents

A = one haploid set of chromosomes from *M. acuminata*

B = one haploid set of chromosomes from *M. balbisiana*

Bancos de germoplasma: tipos de semillas

Semillas intermedias: semillas que soportan mejor la deshidratación que las recalcitrantes, pero peor en comparación con las ortodoxas.

Otros casos particulares:



- Especies que no producen semilla, con baja o nula fertilidad o con producción reducida de semillas o de polen (patata, caña de azúcar, yam, casava, ...).

Bancos de germoplasma: tipos de semillas

Semillas intermedias: semillas que soportan mejor la deshidratación que las recalcitrantes, pero peor en comparación con las ortodoxas.

Otros casos particulares:

- Clones con elevado grado de heterocigosis que han sido seleccionados por sus características en una población natural y que deben ser mantenidos mediante propagación vegetativa.

*Para la conservación de este tipo de semillas: **técnicas alternativas** como las colecciones in vitro o la crioconservación en nitrógeno líquido de embriones*

SVALBARD GLOBAL SEED VAULT (la bóveda del fin del mundo)



Almacén de semillas más grande del mundo, creado para conservar la biodiversidad de las especies de cultivos que sirven como alimentos en caso de una catástrofe mundial. Es resistente a la actividad volcánica, terremotos, radiación y crecida del nivel del mar.

En funcionamiento desde 2008.

En 2015: 1/3 de las variedades de cultivo más empleadas.

En caso de fallo eléctrico el permafrost que rodea las instalaciones mantendría la temperatura baja que requiere el almacenamiento de semillas.



SVALBARD GLOBAL SEED VAULT (la bóveda del fin del mundo)

La "bóveda del fin del mundo"

La Bóveda Global de Semillas de Svalbard, también conocida como la "bóveda del fin del mundo", acaba de lograr la marca de medio millón de muestras, convirtiéndose en el depósito de semillas más diverso del planeta.

Banco de semillas

Tiene por objetivo preservar la diversidad de sabores de los cultivos del planeta, además de la resistencia a enfermedades, valor nutricional y habilidad para crecer en distintos climas.

Capacidad: 4,5 millones de muestras de distintas semillas (cada muestra contiene unas 500 semillas).

Procedencia: 1.400 bancos de más de 100 países.



Está construido a 120 metros de profundidad en la gélida montaña.

Almacenamiento de semillas

1



Paquetes de aluminio con unas 500 semillas son sellados con calor.

2



Una caja de almacenamiento guarda entre 400 y 500 envoltorios.

3



Cientos de cajas son archivadas y almacenadas en la bóveda.

Puertas de acero a prueba de explosiones

Puertas en cámara de aire

Manga: protege el túnel de condiciones climáticas severas.

Zona de control y oficina.

El permahielo, o capa subterránea del hielo de los alrededores, mantiene la refrigeración natural y garantiza que la temperatura no suba de -4°C y -6°C si el sistema eléctrico fallara.

24 m

15 m

Algunas semillas prioritarias



- Banana
- Frijol
- Garbanzo
- Arroz
- Papa
- Trigo



Fuente: Reuters y MCT / Infografía: La Tercera

Bancos de germoplasma: plantas silvestres

Genus *Oryza*: 12 representative species



IRRI Rice Gene Bank and The National Institute of Genetics' *Oryza* base, combined, maintain >4,000 acc. of wild *Oryza* species and 1,500 cultivated *O. glaberrima* acc.

25

Hasta hace poco las colecciones se centraban en especies de interés agronómico y en sus antecesores silvestres (trigo, maíz, arroz, alubias,...).

Primer banco de germoplasma del mundo especializado en **conservación de plantas silvestres**:
Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de la Universidad Politécnica de Madrid

Recoge principalmente endemismos ibéricos y macaronésicos; es especialmente rico en Crucíferas.

Banco de germoplasma de la UPM

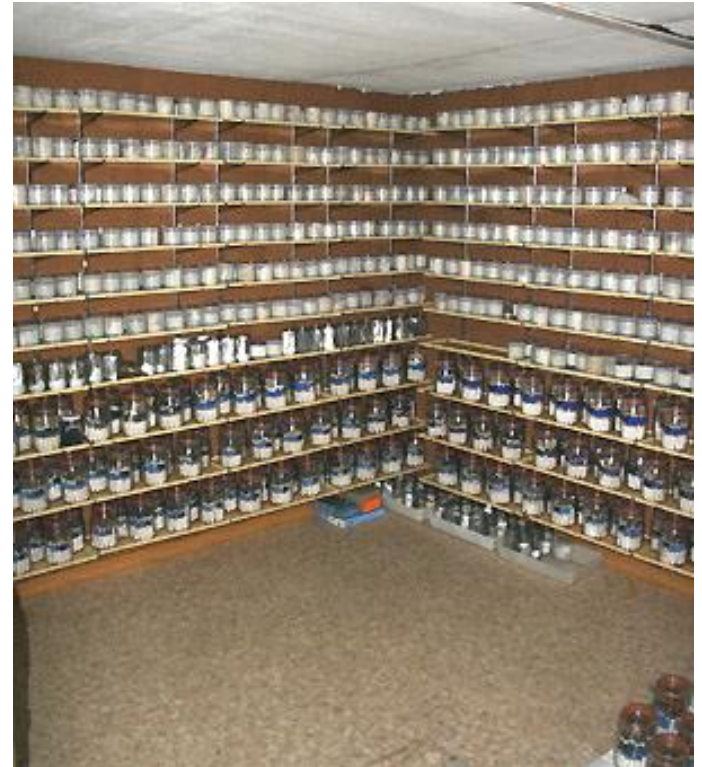
El banco está organizado en dos grandes colecciones:

- colección base: conservación a largo plazo
- colección activa: para el trabajo cotidiano del banco

Las semillas de la **colección base** son conservadas en ampollas de cristal, conservadas junto a silicagel, que asegura una óptima deshidratación del medio.

Se mantienen a una temperatura comprendida entre -10° y -5° C.

La encapsulación se realiza entre cuatro y seis meses después de la recolección, tras haber sido sometidas a valoraciones sobre su capacidad de germinación, destinados a eliminar las muestras no viables por envejecimiento.



Colección base del Banco de semillas

Banco de germoplasma de la UPM

La **Colección activa** está dedicada a la preparación de semillas para la colección base, el intercambio y la investigación, especialmente la mejora genética. Las muestras que la componen se conservan a una temperatura de 5º C, en condiciones de deshidratación no severas.

El Banco conserva más de 10.000 muestras, en las que se encuentran representadas más de 3.500 especies. Su formación, iniciativa del Profesor Gómez-Campo, se inició en la década de 1960, y desde entonces se ha erigido en elemento de referencia para el estudio de biodiversidad de Crucíferas.



Colección activa del Banco de Semillas

MILLENIUM SEED BANK PARTNERSHIP



Coordinado por los Jardines Botánicos de Kew (Reino Unido) desde 1995.

Próposito: “póliza de seguro” contra la extinción de plantas en su **medio silvestre**, almacenando las semillas para su uso futuro.

En 2007> 1 billón de semillas

En 2015> representación del 13% de la diversidad

Para 2020: 25% de la flora conocida

Al conservarlas incluyen un espécimen tipo para identificar a la planta.

Se organizan expediciones por todo el mundo para recolectar semillas, manteniéndose una copia en origen y otra se envía a Millenium.

Se hacen test de viabilidad de semillas, que se repiten cada 10 años.



MILLENIUM SEED BANK PARTNERSHIP

Etapas:

1. RECOLECCIÓN DE SEMILLAS

1. Obtención de permisos
2. Expediciones para recolectar semillas
3. Identificación y evaluación de semillas
4. Técnicas de recolección de semillas
5. Toma de datos en campo
6. Transporte de las colecciones de semillas
7. Envío de semillas

2. ALMACENAMIENTO DE SEMILLAS

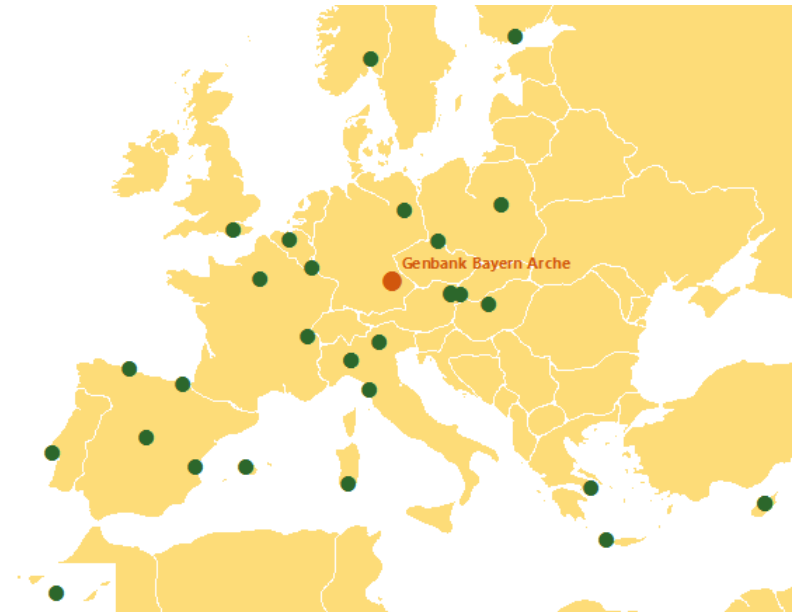
1. Desempaquetado de semillas
2. Identificación de semillas
3. Toma de datos
4. Evaluación de necesidades de almacenamiento
5. Limpieza de semillas
6. Control de calidad de las semillas
7. Análisis de rayos X
8. Estimación de la cantidad de semillas
9. Empaquetado de semillas
10. Secado de semillas
11. Almacenamiento en frío
12. Evaluación de la germinación
13. Test de germinación

Particularidades en los bancos de germoplasma de plantas silvestres

- A la hora de seleccionar el material se emplean criterios como rareza, amenaza, vulnerabilidad o endemismo.
- Gran parte de los bancos de germoplasma de plantas silvestres están alojados en los jardines botánicos.
- Importancia de la **representatividad genética** (intra e interpoblacional)



Red Española de Bancos de Germoplasma de Plantas Silvestres y Fitorrecursos Autóctonos (REDBAG)



European Native Seed Conservation Network (ENSCONET) Consortium

GESTIÓN DE ESPECIES AMENAZADAS

CONSERVACIÓN DE GERMOPLASMA VEGETAL

- Conservación de semillas
- Conservación *in vitro* de plantas propagadas vegetativamente
- Crioconservación

Conservación *in vitro*

Los bancos de semillas resultan de gran utilidad en especies que se propagan sexualmente y cuyas semillas son ortodoxas (se mantienen viables durante un largo período de almacenamiento), pero no deben aplicarse para conservar especies de plantas con semillas recalcitrantes, o plantas de propagación vegetativa obligada.

Integración de la biotecnología vegetal en los programas de conservación

La biotecnología moderna ofrece el potencial de extender estos métodos tradicionales de preservación *ex situ* y propagación a un rango mucho mas amplio de taxones y también de tipos de tejidos vegetales, no solo semillas.

En estos casos, la diversidad genética de estas especies se puede conservar mediante bancos de plantas en campo o mediante técnicas de **conservación *in vitro***.

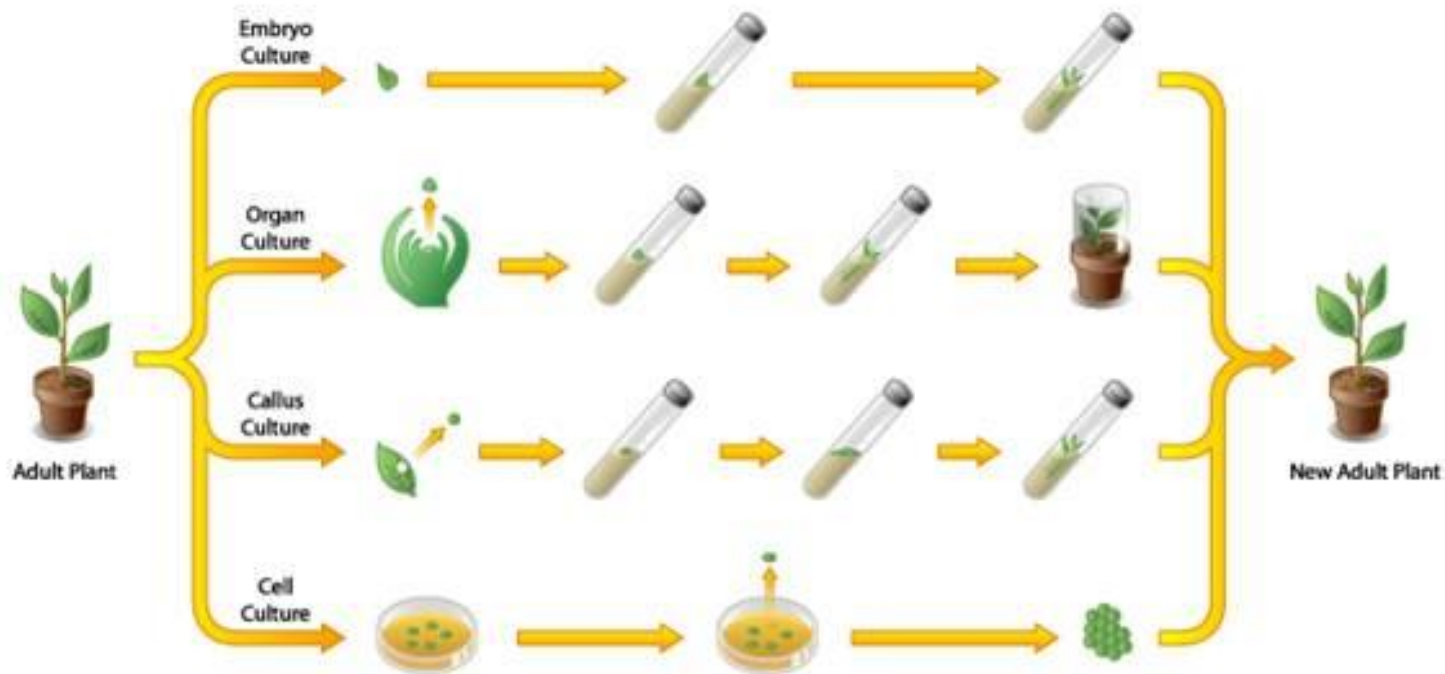
La conservación *in vitro*, combinando técnicas de cultivo de tejidos y criopreservación, surge para estos casos problemáticos como la única formula fiable para la **conservación a largo plazo**.



Fundamentos del cultivo *in vitro*

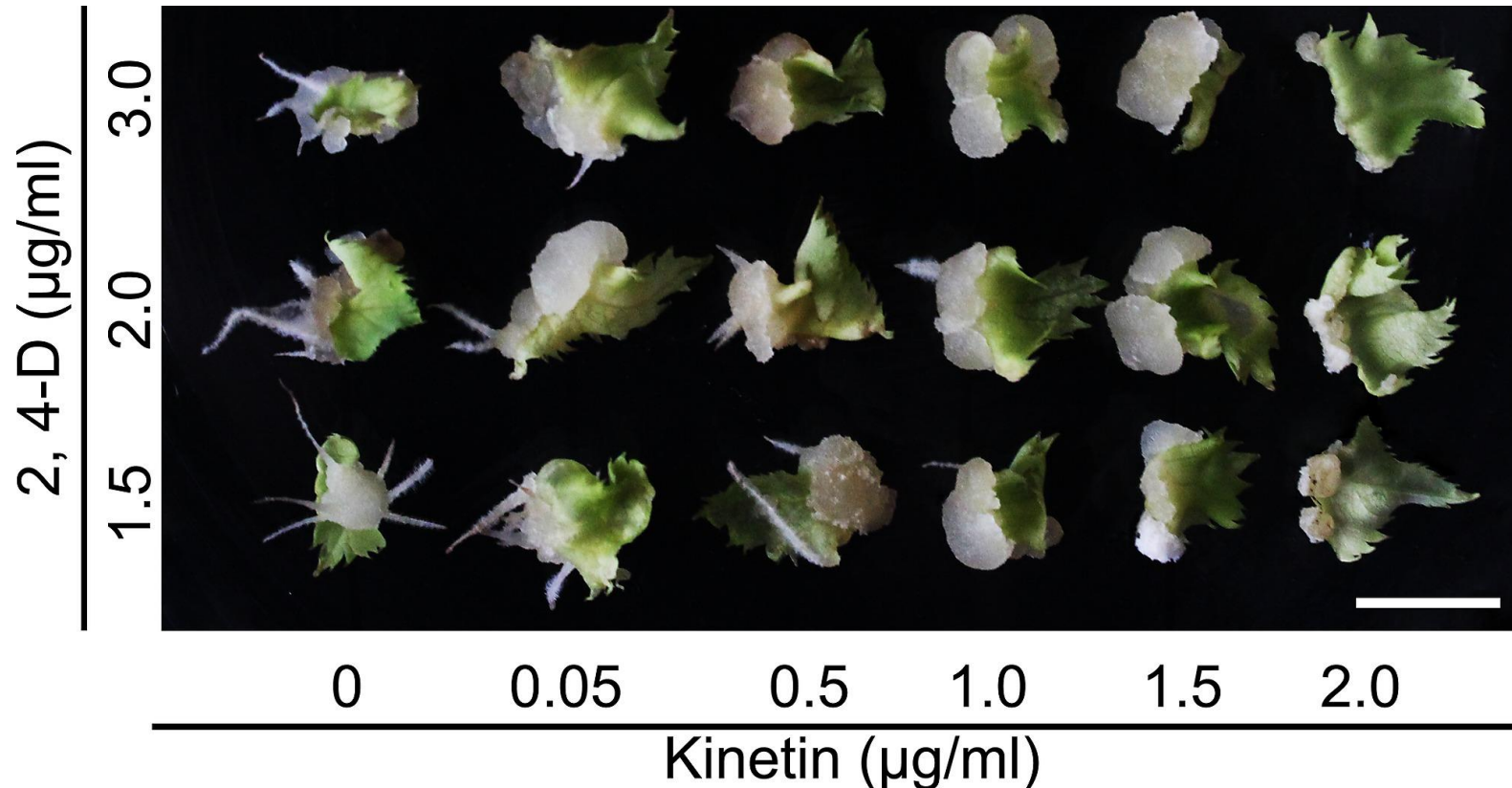
El cultivo *in vitro* esta basado principalmente en tres fundamentos principales:

- a) El concepto de **totipotencia celular**. La regeneración de individuos completos a partir de células ya diferenciadas demuestra que las células vegetales son totipotentes, es decir, retienen la totalidad de su información genética, de manera que bajo determinadas influencias externas esa célula ya diferenciada puede desdiferenciarse y reiniciar los procesos de división celular y ser conducida hasta la obtención de una planta completa.



Fundamentos del cultivo *in vitro*

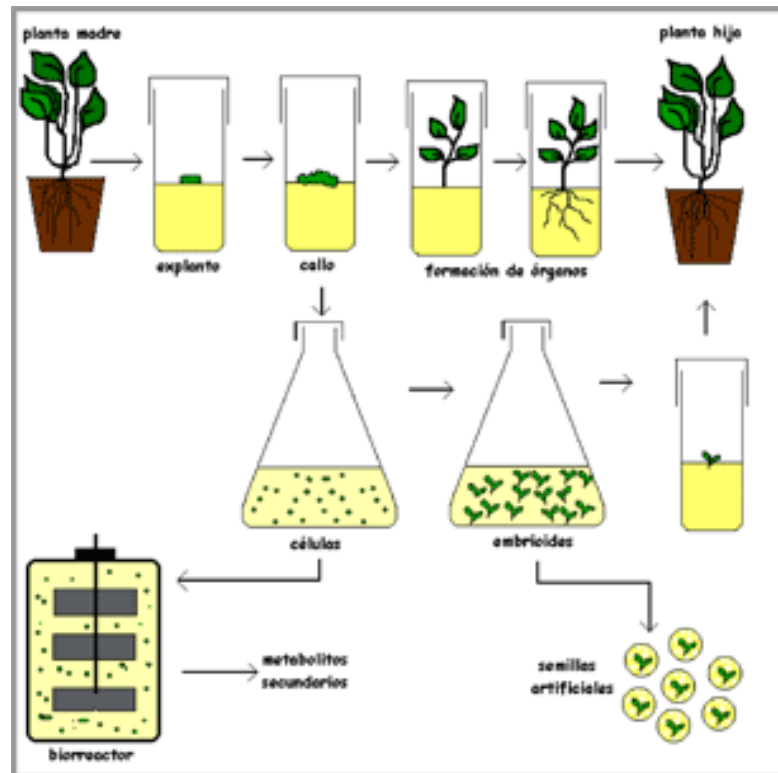
b) El control de la promoción de raíces y tallos por la aplicación de reguladores del crecimiento. Muchos aspectos de la diferenciación celular y la organogénesis en cultivo de tejidos están controlados por la interacción entre citoquininas y auxinas, de manera que el balance entre estos dos tipos de reguladores conduce a la diferenciación *in vitro* de raíces o tallos dependiendo de su proporción relativa.



Rhizoids and callus induced by cytokinin and auxin. Effect of various combinations of 2, 4-D and kinetin on the formation of rhizoids and callus from primary leaf explants of *Rosa canina*. Scale bar, 1 cm.

Fundamentos del cultivo *in vitro*

c) La **sucesión morfogénica**. Aunque en algunas especies cultivadas *in vitro* el desarrollo de tallos y raíces se produce de manera prácticamente simultánea, el uso de reguladores del crecimiento permite que la secuencia de acontecimientos sea usualmente la siguiente: proliferación de tallos, elongación y enraizamiento. No obstante, el orden de esta sucesión morfogénica también dependerá de la estrategia de regeneración seleccionada.

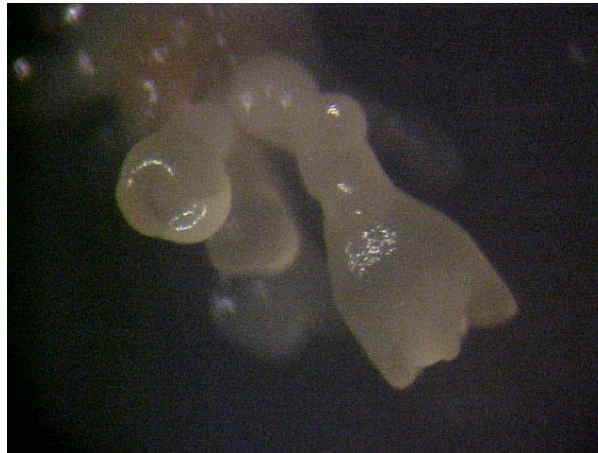


Técnicas biotecnológicas de cultivo *in vitro*

Organogénesis: Formación o desarrollo de primordios caulinares y, posteriormente diferenciación de raíces, que constituirán una nueva planta clonal.



Embriogénesis somática: Formación de un embrión bipolar, aislado del tejido materno por una epidermis y sin conexión vascular con el mismo, capaz de germinar y originar una nueva planta clonal.



Técnicas biotecnológicas de cultivo *in vitro*

ORGANOGENÉISIS A PARTIR DE YEMAS AXILARES



**Establecimiento
del cultivo**



Multiplicación



Enraizamiento



Establecimiento en campo

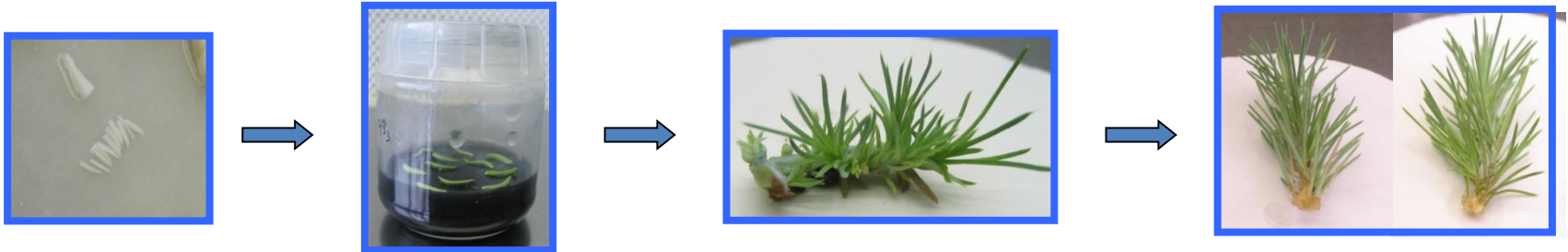


Aclimatación

Técnicas biotecnológicas de cultivo *in vitro*

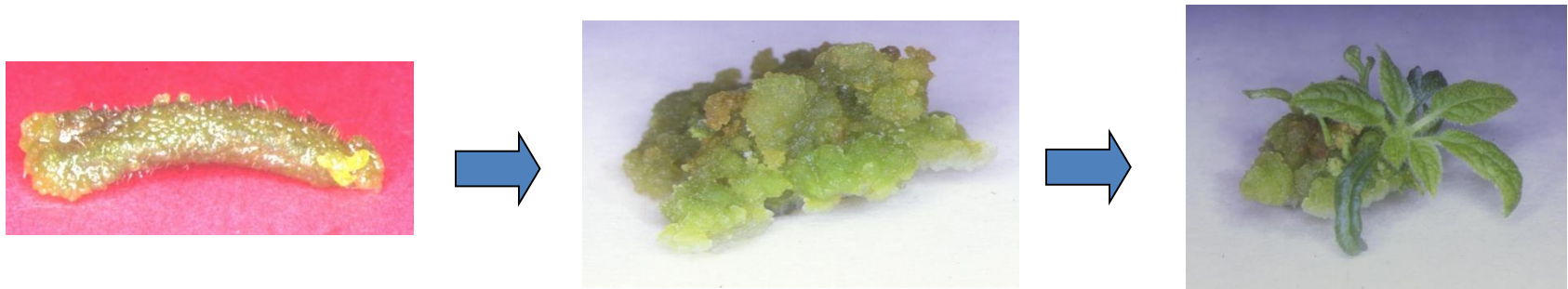
ORGANOGENÉISIS A PARTIR DE YEMAS ADVENTICIAS

MORFOGÉNESIS DIRECTA



Diferenciación
yemas adventicias

MORFOGÉNESIS INDIRECTA

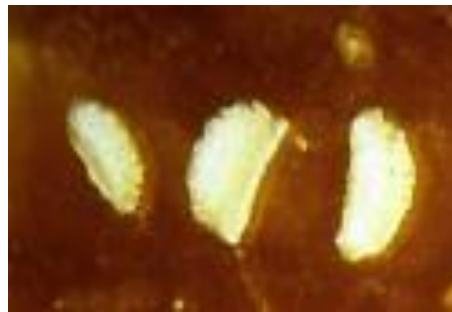


Diferenciación yemas
adventicias

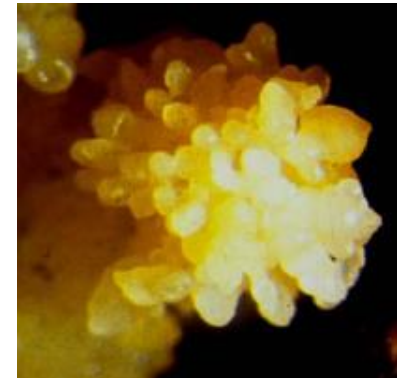
Técnicas biotecnológicas de cultivo *in vitro*

EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

DIRECTA



Cultivo de inflorescencias masculinas



Diferenciación embriones somáticos

INDIRECTA



Formación de callo



Cultivo de callos embriogénicos



Diferenciación embriones somáticos

Ventajas e inconvenientes del cultivo *in vitro*

Ventajas:

- Disponibilidad de planta independientemente de la estación del año
- Producción de planta saneada
- Propagación rápida y en poco espacio
- Propagación de especies difíciles de multiplicar
- Alta calidad de planta
- Mecanización parcial

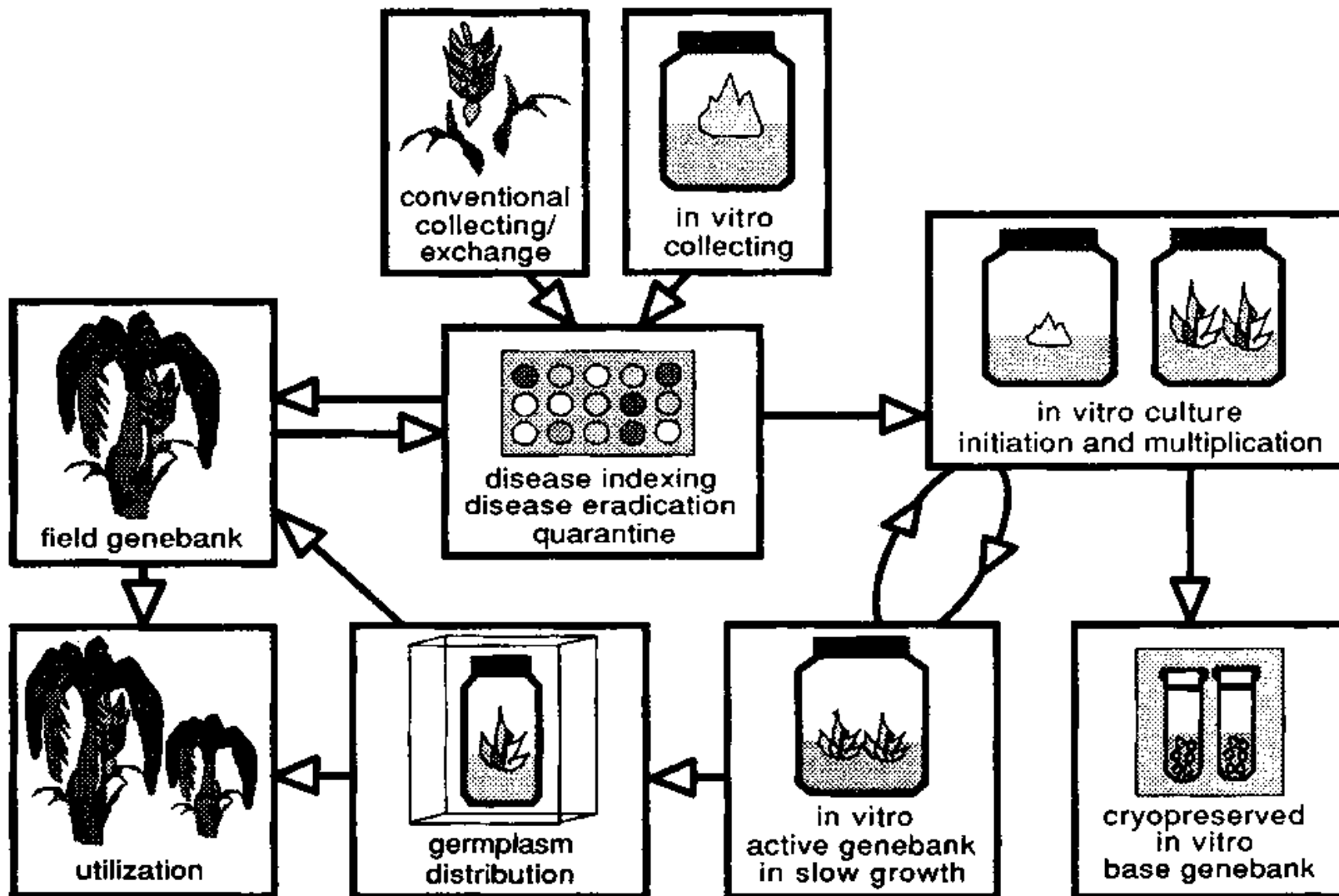
Inconvenientes:

- Alto coste
- Tecnología compleja (diferentes procedimientos para cada especie)
- Controles periódicos de viabilidad y crecimiento.
- Inestabilidad genética

Métodos del cultivo *in vitro* para conservación de germoplasma:

- A. Crecimiento continuo
- B. Crecimiento limitado
- C. Crecimiento suprimido (crioconservación)

Cultivo *in vitro*: estrategias de conservación



Cultivo *in vitro*: crecimiento continuo

- Ventajas:
 - Disponibilidad rápida de plantas
 - Tasas muy altas de multiplicación
- Desventajas:
 - Necesidad de equipamiento costoso (fitotrones)
 - Aparición de cambios en el genoma (variabilidad somaclonal)
 - Mucho tiempo para transferir los cultivos cada 4 o 8 semanas a medio fresco.



Cultivo *in vitro*: crecimiento limitado

El **crecimiento limitado o mínimo** es el más empleado, consiste en disminuir la velocidad de crecimiento normal de la especie objeto de estudio, con lo cual se reduce la frecuencia de transferencia de las plantas a medio de cultivo fresco.

Mediante la disminución de la división celular y el metabolismo de la planta, se incrementa la longevidad *in vitro* de los cultivos sin que se produzcan cambios genéticos, por tanto, no hay una detención total de los procesos celulares sino una disminución en la velocidad con que ocurren los mismos.



CIP: Centro Internacional de la Patata (Perú)

Cultivo *in vitro*: crecimiento limitado

Estrategias para reducir el crecimiento:

i) Limitación del crecimiento físico:

- a. Baja temperatura
- b. Baja luz/restricción de fotoperiodo
- c. Estrés osmótico (agua)

ii) Limitación del crecimiento químico:

- a. Inhibidores de crecimiento
- b. Aplicación de reguladores que retrasan el crecimiento

iii) Nutrición mínima:

- a. Modificación en la composición de los medios de cultivo: contenido de nitrógeno total del medio de cultivo (efectivo para plantas de yuca); reducción de las sales del medio (exitoso en plantas de caña de azúcar).
- b. Aumento de la concentración osmótica del medio de cultivo, limitando así la absorción de agua y nutrientes del medio de cultivo: pueden ser agentes metabolizables como la sacarosa, o no metabolizables, como el manitol y el sorbitol.

CIAT: Centro Internacional de Agricultura Tropical (Colombia)

Conservación de germoplasma de yuca

Tubérculo nativo del trópico americano, la yuca (*Manihot esculenta* Crantz), en las últimas décadas se ha convertido en la tercera fuente más importante de energía alimentaria del mundo después del arroz y el maíz.



El laboratorio de conservación *in vitro* establecido en 1979 tiene como objetivo principal conservar y distribuir el germoplasma del género *Manihot* a partir de una colección constituida en la actualidad por 6,467 materiales. Estos materiales se encuentran agrupados en tres categorías: 5,184 materiales de yuca cultivada (*Manihot esculenta*) procedentes de 28 países, 883 materiales de las especies silvestres del género *Manihot* (33 especies), y 400 materiales de yuca mejorados por el CIAT.

Un total de 6.592 materiales procedentes de 28 países, discriminados en 5.709 clones de *M. esculenta* y 883 genotipos de las especies silvestres se conservan empleando técnicas *in vitro* para la conservación y distribución segura del germoplasma.

Esta colección es conservada bajo condiciones de crecimiento lento a una temperatura de 23-24 °C, iluminación de 18.5 $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y fotoperíodo de 12 horas. Por cada accesión son mantenidos cinco tubos con plantas *in vitro*. La renovación o subcultivo de los materiales se realiza aproximadamente una vez al año.

GESTIÓN DE ESPECIES AMENAZADAS

CONSERVACIÓN DE GERMOPLASMA VEGETAL

- Conservación de semillas
- Conservación *in vitro* de plantas propagadas vegetativamente
- Crioconservación

Crioconservación

Crioconservación: mantenimiento de células, tejidos y órganos vegetales a temperaturas extremadamente bajas (-196°C , correspondiente a la temperatura del nitrógeno líquido).

En tales condiciones la dinámica celular progresa a una velocidad que es virtualmente cero. Si las células soportan la transición hasta las temperaturas criogénicas sin daño, entonces es ya poco probable que sufran algún problema, siempre que la temperatura se mantenga estable durante todo el periodo de almacenamiento.

La crioconservación esta indicada para las semillas recalcitrantes de especies raras, amenazadas o en peligro de extinción, para la conservación de germoplasma de especies que se propagan vegetativamente.



Ventajas e inconvenientes de la crioconservación

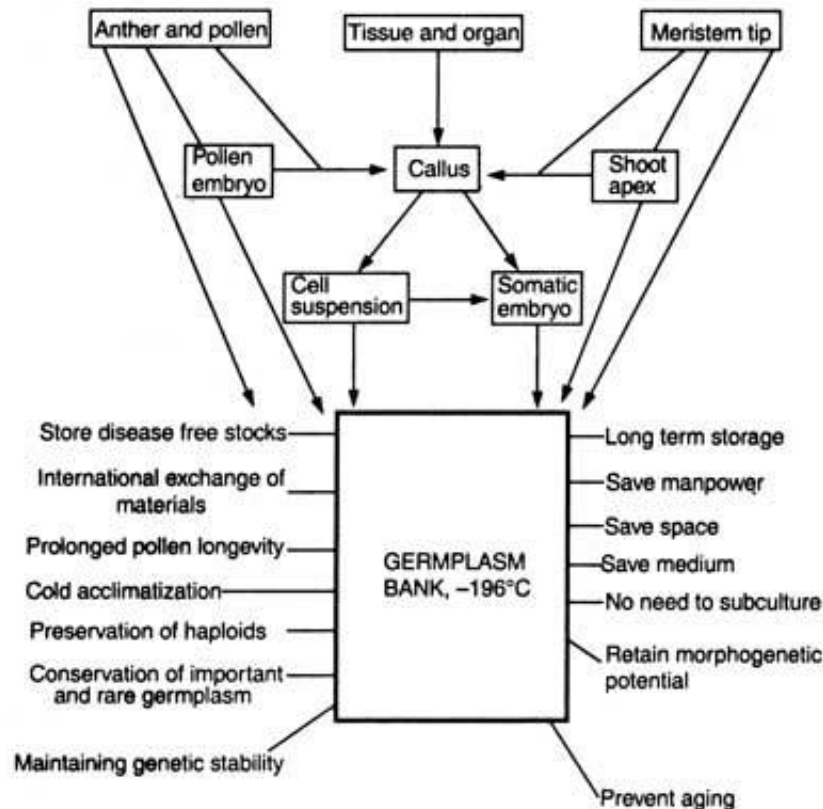
Ventajas:

Bajo coste

Almacenamiento por periodo de tiempo indefinido

Inconvenientes:

Protocolos específicos para cada especie y tasas de viabilidad bajas

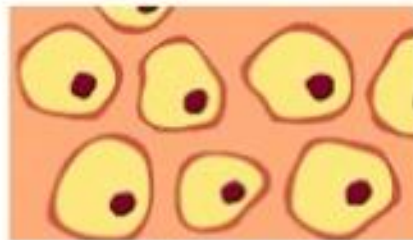


Bases de la crioconservación

El objetivo de cualquier protocolo de crioconservación es **evitar la formación de hielo intracelular**: el 95% del agua de células y tejidos vegetales es agua “libre” susceptible de sufrir congelación y por tanto provocar daños intracelulares.

Danger of Freezing

Rupturing of cell membranes by intracellular ice crystals



Normal tissue



Ice formation inside cells



Intracellular ice crystals

Bases de la crioconservación

Peligros de la congelación de las células y tejidos:

- **Daños físicos directos** ocasionados sobre la estructura celular por los cristales de hielo (rotura de uniones celulares, incremento de la permeabilidad celular, cambios de pH intracelular, rotura de orgánulos, ...).
- **Daños mecánicos directos** que se provocan por la expansión volumétrica de las células que acompaña a la congelación.
- Al congelarse, el agua líquida restante queda como único disolvente para todos los solutos celulares. Esto hace que la **concentración** de estos **solutos** aumente según desciende la temperatura, alcanzando niveles que pueden resultar tóxicos: las altas concentraciones de electrolitos afectan a las interacciones iónicas incluyendo aquellas que ayuda a estabilizar los enzimas, provocando por ejemplo la desnaturalización de las proteínas.

El control del estado del agua durante el descenso de temperatura se convierte, entonces, en uno de los factores clave a la hora de implementar cualquier técnica de criopreservación.

Etapas en un protocolo de crioconservación

❖ **Pretratamiento:** Manipulaciones del germoplasma antes de proceder a la crioconservación, incrementando la supervivencia del material después del enfriamiento.

Los pretratamientos mas comunes son:

- (1) exposición de los tejidos de plantas de climas templados a un régimen de aclimatación a bajas temperaturas;
- (2) aplicación de agentes osmóticos que reducen el contenido en agua antes de la congelación;
- (3) precultivo de los tejidos en sustratos que contienen compuestos antiestrés como, por ejemplo, la prolina o el ácido abscísico.

Etapas en un protocolo de crioconservación

❖ **Crioconservación:** Estrategias para reducir al mínimo el contenido de humedad de los tejidos o hacer que el agua tenga menos tendencia a formar cristales antes de realizar la inmersión en nitrógeno líquido. La elección de una determinada estrategia estará condicionada fundamentalmente por el tipo de material que se debe crioconservar (células, callos, ápices meristemáticos, embriones tanto somáticos como zigóticos, o semillas).

Los tratamientos más comunes son:

(1) Congelación lenta

(2) Vitrificación

(3) Encapsulación/deshidratación

Etapas en un protocolo de crioconservación

- ❖ **Recuperación post-congelación:** presenta pocas exigencias. . Generalmente el germoplasma se extrae del contenedor criogénico donde ha sido conservado en nitrógeno líquido y se introduce en un baño a 25-30 °C, o simplemente se deja a temperatura ambiente.

Etapas en un protocolo de crioconservación

Etapa	Comentario/ejemplo
Selección del material vegetal/explantos	Preferentemente han de ser meristemos procedentes de cultivo <i>in vitro</i> por tanto ya adaptados a este tipo de ambiente
Precultivo/adaptación metabólica	Cultivo en un medio nutritivo enriquecido con sacarosa 0.4 M durante dos semanas
Deshidratación	Vitrificación o encapsulación/deshidratación (ver texto)
Congelación	Generalmente ultra-rápida (inmersión directa en nitrógeno líquido)
Descongelación	Generalmente a temperatura ambiente o en un baño a 35-40°C
Recuperación postcongelación y valoración de la viabilidad y potencial morfogénico	Cultivo en medio nutritivo y oscuridad (opcional) durante 1-2 semanas
Transferencia a un medio de multiplicación previamente optimizado para continuar con la regeneración <i>in vitro</i>	-

Tabla 12. Resumen de las principales etapas en el desarrollo de un protocolo de criopreservación.

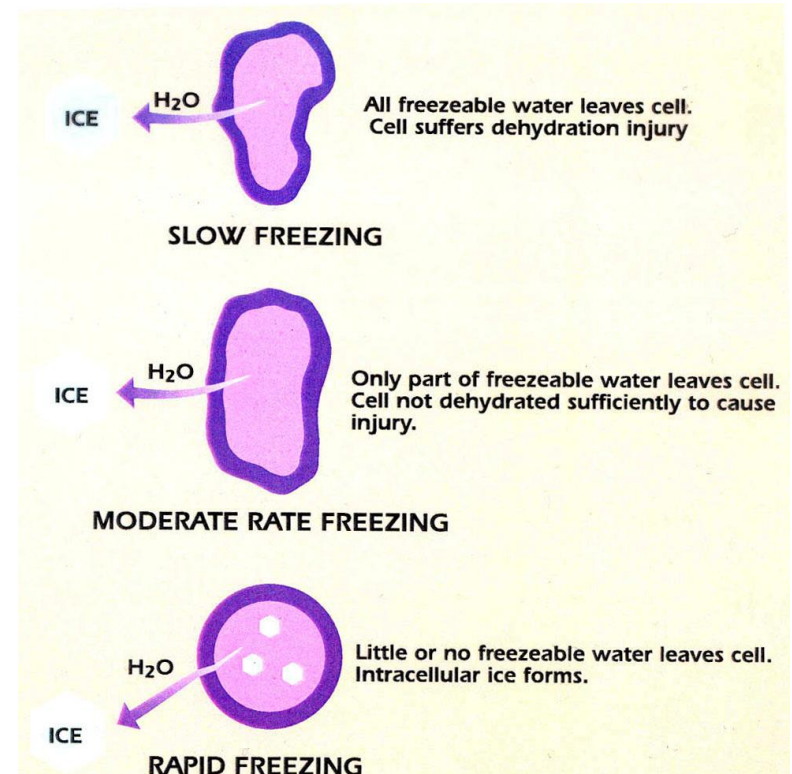
Tratamientos de crioconservación

(1) Congelación lenta:

El tejido se congela lentamente (descensos de -0.1 a $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$).

Este enfriamiento progresivo permite el flujo de agua desde las células al exterior, promoviendo la formación de hielo extracelular en lugar del letal congelado intracelular.

Tratamiento exitoso en crioconservación de meristemos de patatas y fresas.



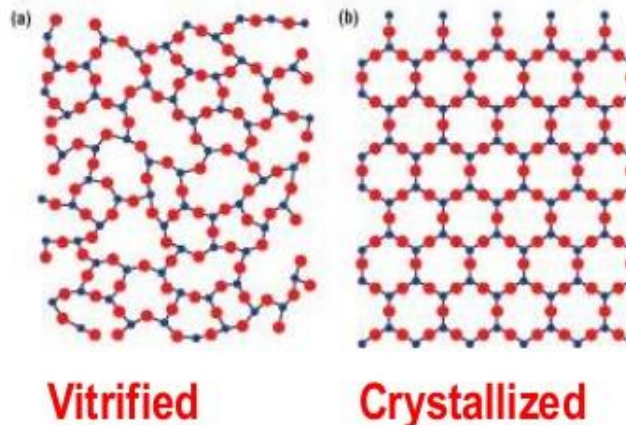
Tratamientos de crioconservación

(2) Vitricificación:

La vitricificación es la conversión de un líquido en un sólido amorfo, no cristalino, mediante el aumento de su viscosidad. En esta forma el agua no posee una estructura cristalina y por lo tanto no forma cristales de hielo. La vitricificación ocurre cuando la concentración de solutos de un sistema biológico se hace tan alta que su viscosidad evita la formación y posterior crecimiento de cristales de hielo.

Freezing induced injury

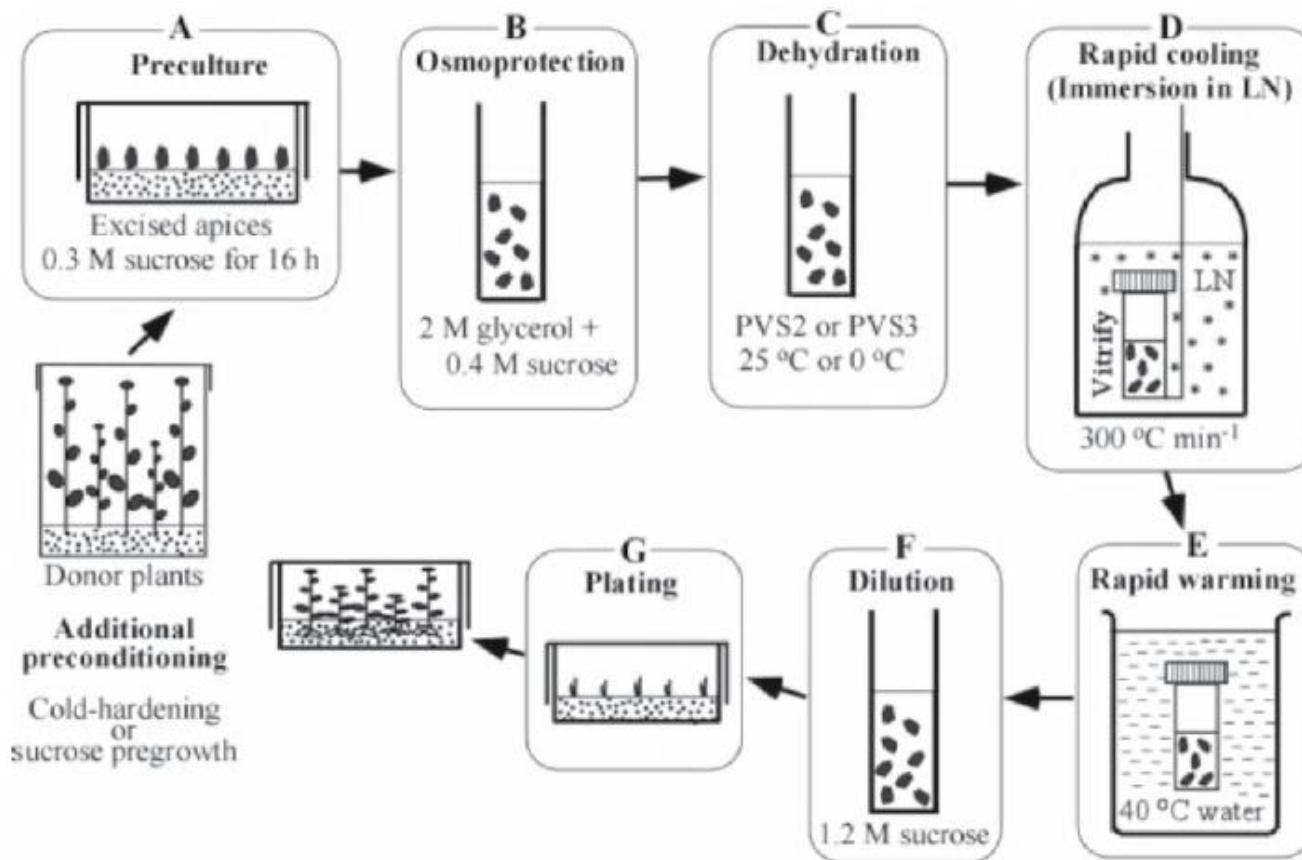
Almost all cryogenic strategies rely on the prevention of intracellular ice crystal formation. The only way to prevent ice crystal formation at ultra-low temperatures without an extreme reduction of water content is through 'vitrification' (solidification of a solution without ice-crystals).



Tratamientos de crioconservación

(2) Vitrificación:

Las soluciones vitrificantes son soluciones concentradas de sustancias como etilenglicol, DMSO, polietilenglicol, generalmente combinadas con una alta concentración de sacarosa.



Plant Vitrification Solution 2 (PVS2) chemicals: 30% glycerol, 15% ethylene glycol, 15% dimethyl sulfoxide, and 0.4 M sucrose.

Fig. 3.1 Vitrification procedure for *in-vitro* grown meristems

Tratamientos de crioconservación

Para que las células vitrifiquen es preciso cumplir dos requisitos:

i) una tasa de enfriamiento muy alta: inmersión directa en nitrógeno líquido

ii) Conseguir una solución intracelular altamente concentrada

a) **deshidratación por aire**: las muestras se secan bajo un flujo de aire estéril en una cabina de flujo laminar, o más accesible, desecación del material vegetal con una determinada cantidad de gel de sílice.

b) **deshidratación por congelación**: descenso programado de temperatura (usualmente de 0,5 a 2°C/min) que va a provocar la formación de hielo en los espacios extracelulares.

Tratamientos de crioconservación

c) **aplicación de sustancias crioprotectoras.** Existen dos tipos de sustancias crioprotectoras: *penetrantes* y *no penetrantes*. Las penetrantes son compuestos de bajo peso molecular, solubles en agua, de baja o nula toxicidad, capaces de entrar y salir fácilmente de la célula. Por ejemplo dimetilsulfoxido (DMSO) o glicerol. Los crioprotectores no penetrantes son sustancias ejercen los efectos osmóticos desde fuera de las células. Por ejemplo el polietilenglicol (PEG), manitol o sorbitol.

d) **adaptación metabólica al frío:** tratamiento para aumentar la capacidad de los tejidos de sobrevivir a un estrés ambiental desfavorable, en este caso la congelación o la deshidratación previa necesaria para soportar la congelación. Esta adaptación se puede conseguir de múltiples: el cultivo durante semanas previas a la congelación a temperaturas mas bajas de lo normal, o bajo unas condiciones de menor duración de las horas de luz, o en presencia de algunos compuestos osmóticos a concentración moderada, o bien con la aplicación de inhibidores del crecimiento como el ácido abscísico (ABA).

Tratamientos de crioconservación

(3) Encapsulación/deshidratación:

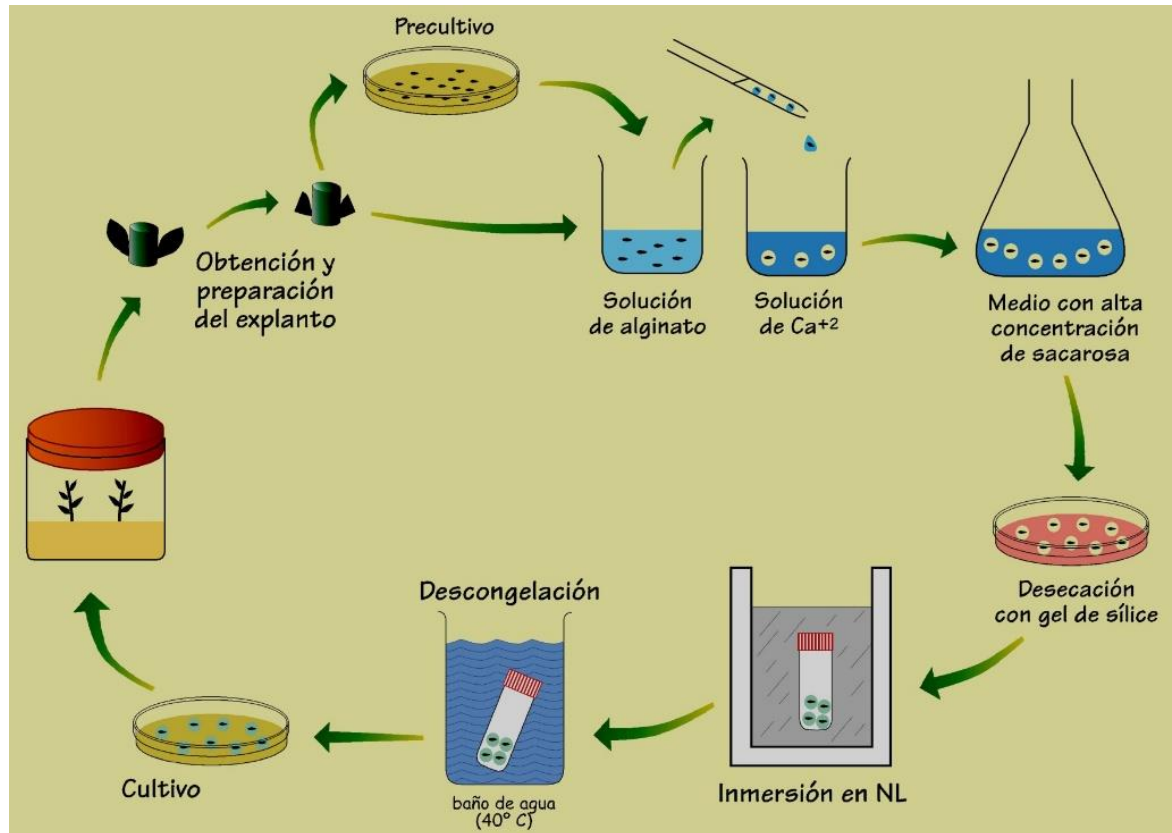
Representa una variante del método de deshidratación al aire pensado fundamentalmente para ser aplicado a ápices meristemáticos o a embriones zigóticos y somáticos.

La técnica consiste en la generación de una “semilla artificial” (con un embrión zigótico o somático o con un apice caulinar) mediante su encapsulación en esferas de alginato cálcico.



Tratamientos de crioconservación

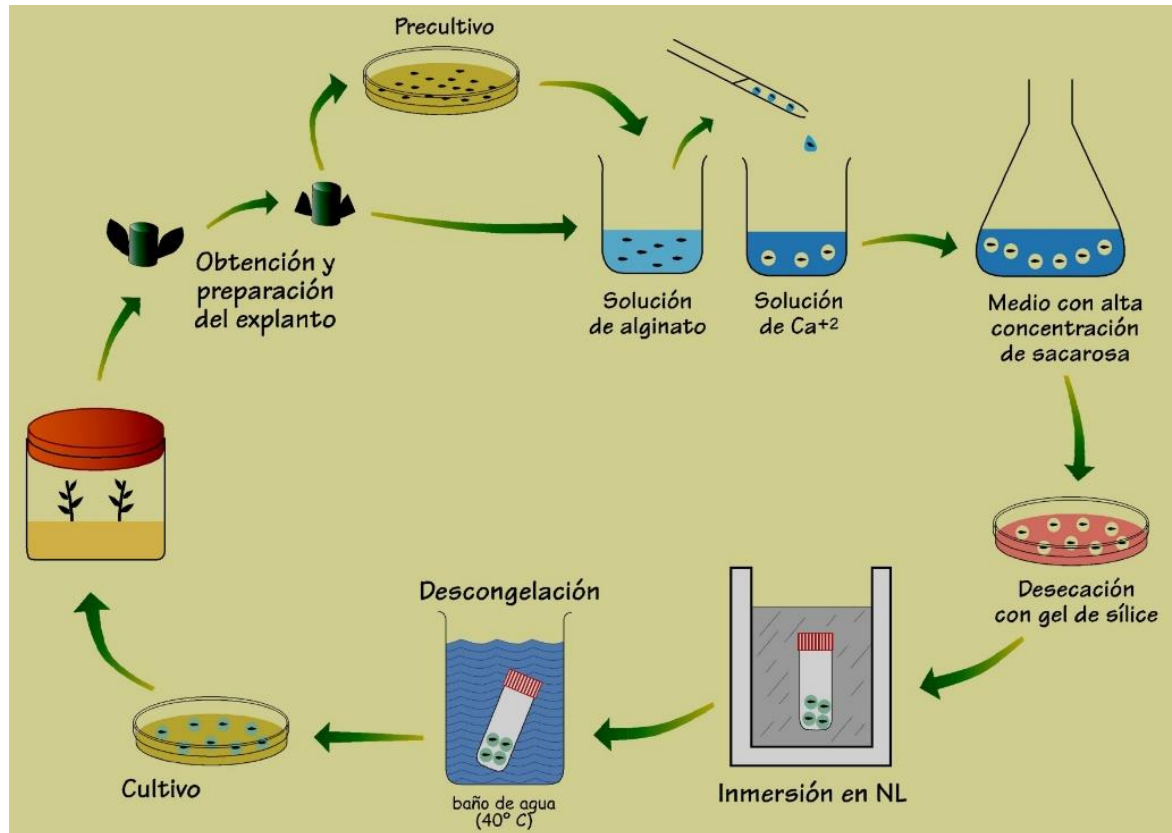
(3) Encapsulación/deshidratación:



Se obtiene sumergiendo el material vegetal en una solución de alginato libre de calcio; después, el material y la solución se aspiran y se dejan caer sobre una solución de Ca_{2+} 100 mM. El calcio provoca la polimerización del alginato alrededor del material vegetal y la consiguiente formación de la capsula.

Tratamientos de crioconservación

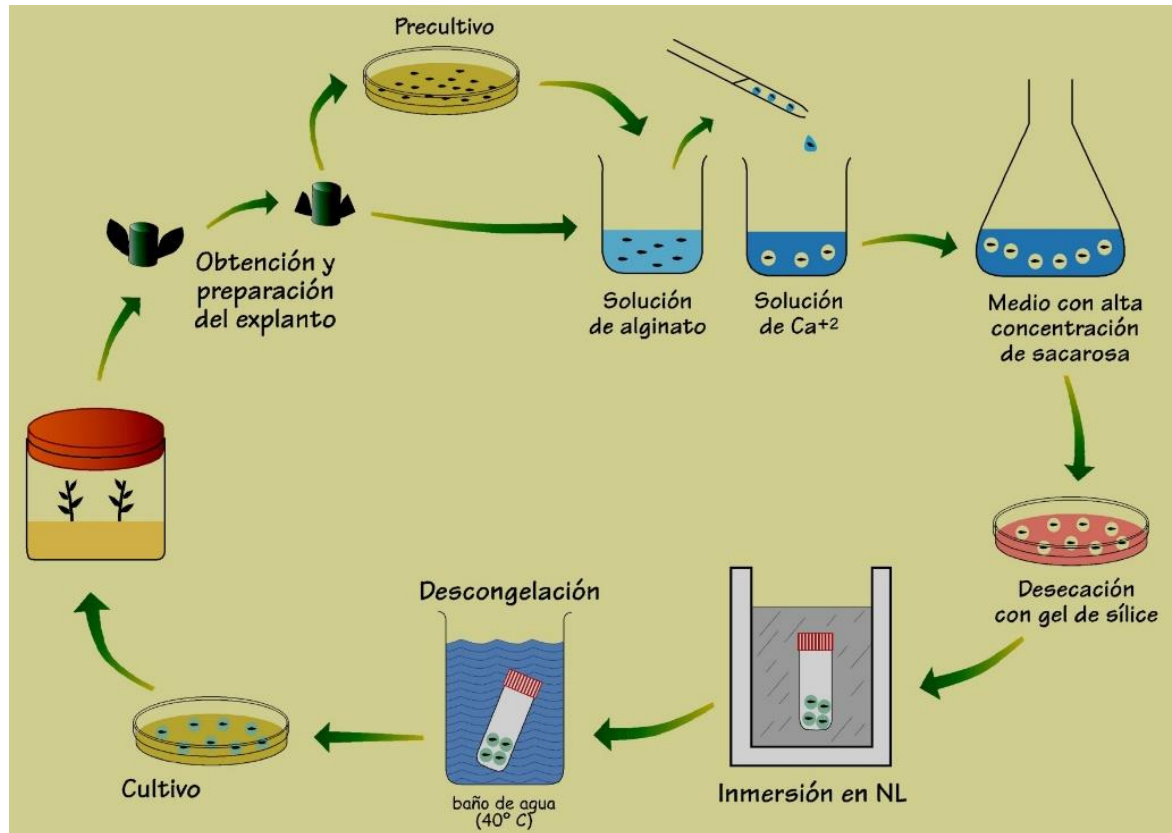
(3) Encapsulación/deshidratación:



A continuación se procede a una deshidratación osmótica mediante el cultivo de las capsulas de alginato en una solución de sacarosa, y posteriormente se desecan con el fin de reducir su contenido de humedad.

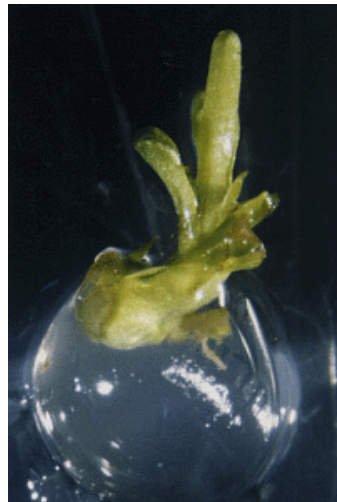
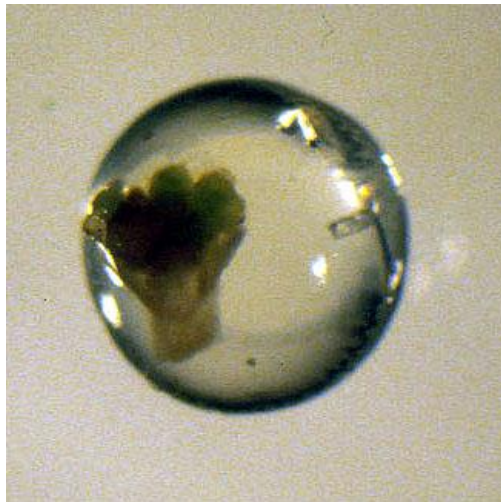
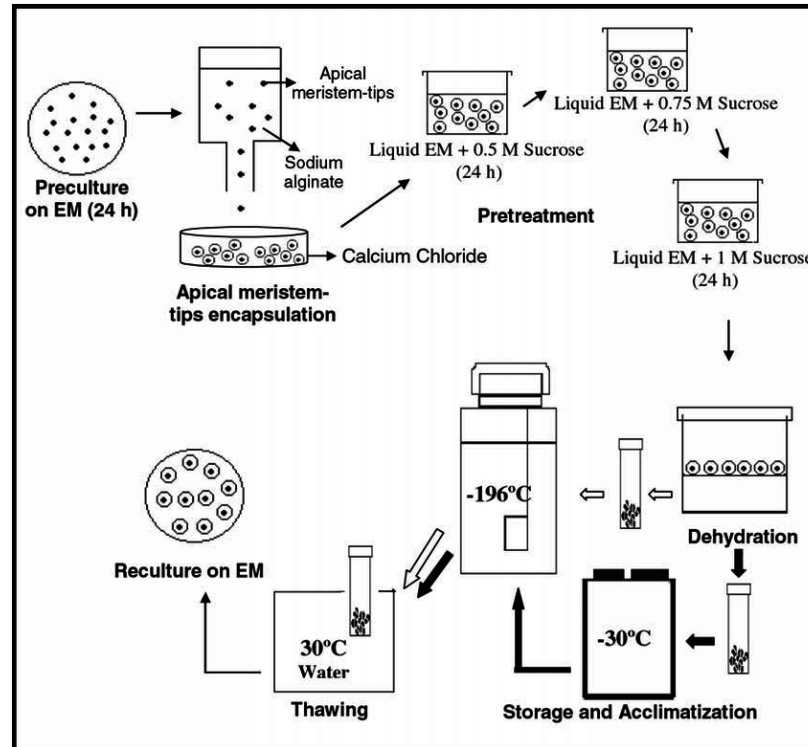
Tratamientos de crioconservación

(3) Encapsulación/deshidratación:



La encapsulación cuenta con la ventaja de poder incluir en la matriz de alginato compuestos nutritivos o reguladores de crecimiento que ayuden a mejorar la tasa de recuperación postcongelación.

Tratamientos de crioconservación



Ejemplo especie amenazada

La implementación de las técnicas de criopreservación ha tenido un papel fundamental en el progreso de la conservación del germoplasma de plantas raras o amenazadas.

Bletilla striata Rchbf.: orquídea en riesgo de extinción.



Se criopreservaron semillas inmaduras de *Bletilla*, recogidas 4 meses después de la polinización, con un porcentaje medio de humedad del 33%. Este procedimiento se realizó con un protocolo de pretratamiento y vitrificación:

Pretratamiento: mantenimiento de las semillas en un medio enriquecido con sacarosa.

Vitrificación: introducción en crioviales con la solución crioprotectora (glicerol y sacarosa) durante 15 minutos a 25°C. Pasado este tiempo se elimina la solución y se deshidratan las semillas a 0°C durante 2 horas con solución vitrificante PVS2.

A continuación, los crioviales con las semillas se introducen directamente en el nitrógeno líquido.

GESTIÓN DE ESPECIES AMENAZADAS

Introducción a marcadores moleculares para la
evaluación de amenaza y estrategias de conservación

MARCADORES MOLECULARES

Un marcador molecular es un segmento de ADN con una ubicación física identificable (locus) en un cromosoma y cuya herencia genética se puede rastrear. Un marcador puede ser un gen, o puede ser alguna sección del ADN sin función conocida.

Cada marcador molecular difiere en las diferencias genéticas que puede detectar, el tipo de datos que genera y el grupo taxonómico al que puede aplicarse.

CARACTERÍSTICAS IDEALES DE UN MARCADOR

- Alto polimorfismo
- Herencia codominante (diferencia entre homocigoto/heterocigoto en organismos diploides)
- Carácter selectivo neutral (la secuencia de ADN es neutral a las condiciones climáticas o gestión de la especie)
- Disponibilidad
- Sencillez y rapidez
- Alta reproducibilidad
- Fácil intercambio de datos entre laboratorios

TIPOS DE MARCADORES BIOQUÍMICOS

- i) Variantes de proteínas (isoenzimas/aloenzimas)

TIPOS DE MARCADORES MOLECULARES

- i) Polimorfismos de ADN inespecíficos (RFLP, RAPD, ISSR, AFLP)
- ii) Polimorfismos de ADN específicos (SSR)
- iii) Secuenciación de ADN (determinación del orden de los nucleótidos)
 - i) Secuenciación convencional (basada en secuenciación tipo Sanger)
 - ii) NGS (con o sin amplificación)

TIPOS DE MARCADORES BIOQUÍMICOS

- i) Variantes de proteínas (isoenzimas/aloenzimas)

TIPOS DE MARCADORES MOLECULARES

- i) Polimorfismos de ADN inespecíficos (RFLP, RAPD, ISSR, AFLP)
- ii) Polimorfismos de ADN específicos (SSR)
- iii) Secuenciación de ADN (determinación del orden de los nucleótidos)
 - i) Secuenciación convencional (basada en secuenciación tipo Sanger)
 - ii) NGS (con o sin amplificación)

Aplicaciones:

cuantificación de heterocigosis, diversidad genética, diferenciación genética y otras medidas de variación genética intra e interpoblacional.

Capparis spinosa L.



El alcaparro, debido a su uso medicinal, presenta una sobreexplotación, destrucción de hábitat y fragmentación de poblaciones

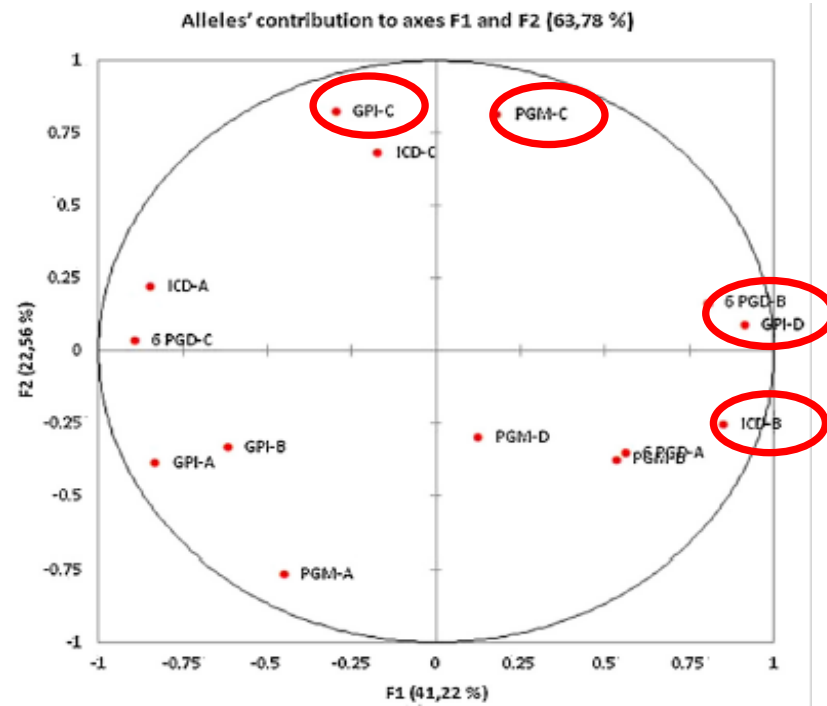


Necesidad de estrategia de conservación *in situ*
y/o *ex situ*



Evaluación de las poblaciones (diversidad genética,
priorizar)

Evaluación de **7 sistemas enzimáticos**: ICD, 6-PGD, PGI, PGM, MDH, GOT, SKDH.



Principal Component Analysis (PCA)

Estrategias de conservación



1: Matmata; 2: Khecham; 3: Bou Hedma; 4: Nahli; 5: Nebeur; 6: Dyr; 7: Melh; 8: Sidi Bouzid.

- *in situ*: poblaciones que presentan la mayor diversidad alélica (5.Nebeur, 4.Nahli y 6.Dyr) y las que tienen alelos únicos (1.Matmata y 2.Khecham).
- *ex situ*: colecciones naturales de las poblaciones más representativas.

TIPOS DE MARCADORES BIOQUÍMICOS

- i) Variantes de proteínas (isoenzimas/aloenzimas)

TIPOS DE MARCADORES MOLECULARES

- i) Polimorfismos de ADN inespecíficos (RFLP, RAPD, ISSR, AFLP)
- ii) Polimorfismos de ADN específicos (SSR)
- iii) Secuenciación de ADN (determinación del orden de los nucleótidos)
 - i) Secuenciación convencional (basada en secuenciación tipo Sanger)
 - ii) NGS (con o sin amplificación)

Comparación de 3 marcadores moleculares no específicos (RAPD, ISSR, AFLP)



Dactylis glomerata L.

Planta forrajera cultivada perenne



Estudio de variabilidad genética en especies cultivadas y silvestres



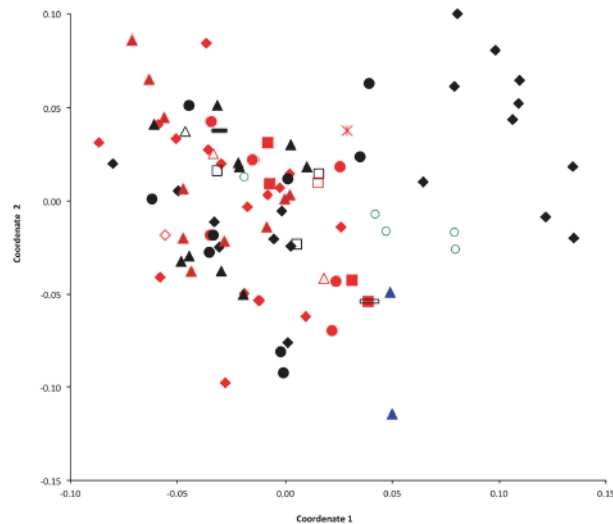
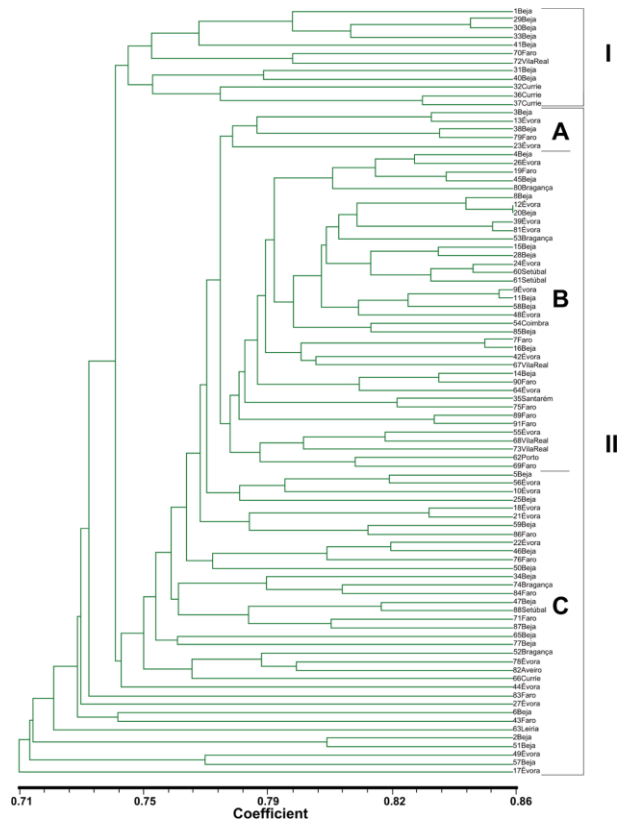
Garantizar disponibilidad de material para producción

Comparativa de los marcadores moleculares empleados

Marker	Number of assay units	Total no. of loci/bands	No. of polymorphic loci/bands	% of Polymorphism (P)	No. of loci/bands per assay unit
RAPD	26 primers	97	40	41.2%	3.73
ISSR	22 primers	91	54	59.3%	4.14
AFLP	4 primers combinations	100	92	92.0%	25.00

Comparación de 3 marcadores moleculares no específicos (RAPD, ISSR, AFLP)

- Cada color es una subespecie distinta, y cada símbolo un área de recogida de material.
- 3 marcadores diferentes permitieron diferenciar entre genotipos.



TIPOS DE MARCADORES BIOQUÍMICOS

- i) Variantes de proteínas (isoenzimas/aloenzimas)

TIPOS DE MARCADORES MOLECULARES

- i) Polimorfismos de ADN inespecíficos (RFLP, RAPD, ISSR, AFLP)
- ii) Polimorfismos de ADN específicos (SSR)
- iii) Secuenciación de ADN (determinación del orden de los nucleótidos)
 - i) Secuenciación convencional (basada en secuenciación tipo Sanger)
 - ii) NGS (con o sin amplificación)

Aplicaciones:
variación genética intra e interespecífica.

- Nuevo género en 2005
- Especie rara y endémica de Brasil

Petunia secreta Stehmann & Semir



Table 3. Genetic diversity indices based on the microsatellite profile in *P. secreta*. ¹Including all individuals and loci; Chr, microsatellite location (chromosome number); SR, size range; A, number of alleles per locus; PIC, polymorphic index content; AR, allele richness; GD, gene diversity; H_o , observed heterozygosity; H_e , expected heterozygosity; F_{is} , inbreeding coefficient; NUL, frequency of null alleles. Bold values represent HWE deviation, significance after Bonferroni correction at $P = 0.05$.

Loci	Chr	SR	A	PIC	AR	GD	H_o	H_e	F_{is}	NUL (%)
PM188	I	100–145	11	0.83	9.38	0.85	0.27	0.85	0.68	0.52
PM195	I	184–214	7	0.57	5.12	0.65	0.30	0.64	0.54	0.36
PM101	I	237–270	7	0.59	6.41	0.63	0.21	0.62	0.67	0.50
PM21	II	89–128	3	0.38	2.56	0.50	0.03	0.49	0.94	0.88
PM88	II	142–170	7	0.64	5.77	0.70	0.19	0.70	0.72	0.56
PM183	III	102–174	11	0.65	7.42	0.70	0.69	0.70	0.02	0.01
PM191	III	164–170	3	0.44	2.98	0.53	0.24	0.53	0.55	0.38
PM8	IV	163–187	7	0.66	5.87	0.72	0.24	0.71	0.67	0.50
PM173	IV	157–187	5	0.56	4.47	0.62	0.31	0.62	0.51	0.34
PM74	IV	186–192	2	0.06	1.81	0.06	0.03	0.06	0.49	0.27
PM177	V	202–258	20	0.89	14.61	0.91	0.32	0.90	0.65	0.48
PM167	V	273–312	11	0.78	8.11	0.82	0.33	0.82	0.60	0.43
PM192	V	236–257	7	0.68	6.09	0.73	0.27	0.73	0.62	0.46
PM184	VII	90–108	7	0.45	5.06	0.51	0.16	0.51	0.69	0.53
PM206	IV	128–132	3	0.40	2.98	0.52	0.06	0.51	0.89	0.79
Average ¹			7.4	0.57	5.91	0.63	0.24	0.63	0.62	0.47
Pop1–12			6.2	0.51	5.19	0.55	0.08	0.55	0.56	0.40
Pop13			3.5	0.35	3.38	0.41	0.19	0.40	0.47	0.35

Aplicaciones:

variación genética intra e interespecífica.

- Nuevo género en 2005
- Especie rara y endémica de Brasil

Petunia secreta Stehmann & Semir



Categoría IUCN: “en peligro crítico de extinción”

TIPOS DE MARCADORES BIOQUÍMICOS

- i) Variantes de proteínas (isoenzimas/aloenzimas)

TIPOS DE MARCADORES MOLECULARES

- i) Polimorfismos de ADN inespecíficos (RFLP, RAPD, ISSR, AFLP)
- ii) Polimorfismos de ADN específicos (SSR)
- iii) Secuenciación de ADN (determinación del orden de los nucleótidos)
 - i) Secuenciación convencional (basada en secuenciación tipo Sanger)
 - ii) NGS (con o sin amplificación)

TIPOS DE MARCADORES BIOQUÍMICOS

- i) Variantes de proteínas (isoenzimas/aloenzimas)

TIPOS DE MARCADORES MOLECULARES

- i) Polimorfismos de ADN inespecíficos (RFLP, RAPD, ISSR, AFLP)
- ii) Polimorfismos de ADN específicos (SSR)
- iii) Secuenciación de ADN (determinación del orden de los nucleótidos)
 - i) Secuenciación convencional (basada en secuenciación tipo Sanger)
 - ii) NGS (con o sin amplificación)

MARCADORES MOLECULARES Y CONSERVACIÓN

