

CRIOCONSERVACIÓN DE SEMILLAS

*Dr. José Manuel Pita Villamil
Dpto. Biología Vegetal
E.U.I. Técnica Agrícola
Universidad Politécnica de Madrid (ESPAÑA)*

Entre los posibles métodos de conservación *ex situ* de recursos fitogenéticos, la conservación de semillas en Bancos de Germoplasma es el más eficaz y económico. Las semillas de numerosas especies pueden mantenerse viables por largos períodos de tiempo si, tras ser desecadas, se las almacena a bajas temperaturas, son las denominadas semillas ortodoxas.

No obstante, a lo largo del tiempo la capacidad de germinación de este tipo de semillas decrece por múltiples causas: disminución de reservas, acumulación de compuestos tóxicos, degradación e inactivación de enzimas, alteraciones cromosómicas, etc. Por ello, en última instancia, las muestras almacenadas en los bancos de germoplasma deben ser, sistemáticamente, regeneradas mediante nuevas recolecciones o multiplicadas a partir de las semillas que se mantienen viables. La regeneración en muchos casos no es posible al haber desaparecido las poblaciones naturales o haber caído en desuso los cultivos originales y la multiplicación inevitablemente conlleva alteraciones en la composición genética de las muestras, produciéndose, generalmente, una disminución de la variabilidad genética y, en cualquier caso, pérdida de genotipos que pueden ser de interés (erosión genética).

Una alternativa a los métodos tradicionales de conservación de semillas es la criopreservación: conservación a muy bajas temperaturas, generalmente por inmersión en nitrógeno líquido (-196 °C). A esta temperatura, teóricamente, el metabolismo de las semillas se detiene, impidiendo la actuación de los mecanismos bioquímicos responsables del su deterioro y por tanto prolongando, indefinidamente, su longevidad.

Esta técnica de conservación se ha ensayado desde finales del siglo XIX con numerosas especies, pudiéndose afirmar que las semillas ortodoxas, en general, son un material idóneo para ser criopreservado. No obstante, para cada material deben ser previamente evaluados una serie de factores que aseguren de los que dependerá el éxito de la criopreservación: contenido de humedad, velocidad de congelación/descongelación y potenciales daños físicos a las semillas.

El contenido en humedad de las semillas, antes de su inmersión en nitrógeno líquido, es probablemente el factor más crítico para su criopreservación. Tanto contenidos de humedad elevados como bajos, pueden implicar una pérdida de viabilidad durante los procesos de congelación/descongelación. Por tanto el rango adecuado de humedad debe ser establecido experimentalmente para cada especie antes de proceder a la criopreservación de sus semillas.

La velocidad de congelación/descongelación es otro factor que puede influir

negativamente en la supervivencia de las semillas crioconservadas, si bien existen datos contradictorios. Los datos obtenidos en algunos trabajos sugieren que este factor no tiene especial significación en la supervivencia de las semillas de la mayoría de las especies. No obstante en otros estudios, en concreto con semillas de *Lactuca sativa* y *Sesamum indicum*, se indica un claro efecto de la velocidad de congelación sobre la viabilidad de las semillas.

Los daños físicos que los cambios extremos de temperatura pueden producir a las semillas impiden, a veces, tanto su germinación como el desarrollo normal de las plántulas. Este efecto negativo de la crioconservación se da principalmente en semillas de gran tamaño, como es el caso de las semillas *Phaseolus vulgaris*, en las que se produce el desprendimiento de los cotiledones. Una reducción de los daños físicos se puede lograr transfiriendo las semillas desde el nitrógeno líquido (-196 °C) a la fase gaseosa (-150 °C), antes de su total descongelación a temperatura ambiente.

Otro tipo de semillas, las denominadas recalcitrantes, son aquellas que, al contrario de las semillas ortodoxas, al ser desecadas pierden su viabilidad. Ello impide conservarlas a bajas temperaturas (< 0° C) por los daños que ocasiona la cristalización del agua en sus tejidos. Por ello, para la conservación de germoplasma de especies con este tipo de semillas se ha recurrido, habitualmente, a la conservación de material vegetativo (colecciones de plantas en campo, cultivo *in vitro*). No obstante, en los últimos años, el esfuerzo para comprender los efectos de la desecación y las bajas temperaturas sobre las semillas, ha permitido la crioconservación con éxito de diferentes especies, *Carica papaya*, *Coffea iberica*, *Zizania palustris*, *Salix nigra*, cuyas semillas se consideran recalcitrantes. En otros casos, la crioconservación de las semillas completas no ha sido posible, *Acer saccharinum*, *Fagus sylvatica*, *Quercus* spp, aunque la crioconservación de sus embriones parece ser una alternativa eficaz.

La crioconservación de embriones implica la puesta a punto de protocolos más complejos que los utilizados para la crioconservación de semillas completas. Básicamente se pueden estructurar en las siguientes etapas: excisión del embrión, desecación o pretratamiento con crioprotectores, crioconservación, descongelación y germinación mediante técnicas de cultivo *in vitro*.

La excisión del embrión es, en la mayoría de las ocasiones, un proceso delicado, dado que el embrión puede sufrir daños, que afecten a su ulterior desarrollo. Además los embriones deben ser aislados asepticamente, de semillas o frutos previamente esterilizados, o bien ser esterilizados después de su excisión de la semilla. Una adecuada desecación puede ser crítica para asegurar la supervivencia del material; para cada especie el contenido de humedad adecuado debe establecerse experimentalmente. Tras la desecación, a veces se procede a la encapsulación de los embriones en alginato. Los pretratamientos con crioprotectores químicos como el dimetilsulfóxido (DMSO), aisladamente, o en combinación con otros compuestos: sacarosa, glucosa, polietilenglicol (PEG), prolina, glicerol, etc, impiden, en algunos casos, la cristalización del agua de los tejidos, al promover su vitrificación (estado no cristalino). Los embriones pueden

sumergirse en el nitrógeno líquido dentro de crioviales o bien directamente, en este último caso la velocidad de congelación es mucho mayor. El protocolo debe, por último, contemplar las condiciones más idóneas para la descongelación de los embriones y su desarrollo en condiciones de cultivo *in vitro*. En algunos casos una descongelación rápida por inmersión de los embriones en agua a 30-40 °C ha dado mejores resultados que si se utilizan temperaturas inferiores. En cuanto, a las condiciones para el desarrollo de los embriones, en muchos casos no están puestas a punto, lo que además de enmascarar el efecto real de la crioconservación, puede ocasionar pérdidas irreparables de material.

Todo esto destaca la complejidad de los protocolos asociados a la crioconservación de embriones, que obligan a disponer de una serie de medios (personal especializado, instalaciones de cultivo *in vitro*) que incrementan los costes asociados a la conservación de cada una de las muestras, con respecto a otros medios de conservación de semillas.

Las infraestructuras necesarias para la puesta en marcha de un sistema de crioconservación, son mucho más simples que para un sistema convencional de conservación a bajas temperaturas. Básicamente se reducen a la disponibilidad de contenedores adecuados y un suministro seguro de nitrógeno líquido. Los contenedores para el almacenamiento de las muestras deben estar diseñados para acceder con facilidad a las muestras y no permitir la evaporación de más del 1% de nitrógeno líquido por día. Actualmente existen diferentes modelos de contenedores comerciales que cumplen dichos requerimientos. En cuanto al suministro de nitrógeno líquido está asegurado prácticamente en todos los lugares del mundo.

Los costes de mantenimiento de una muestra en crioconservación son menores que en un sistema de conservación convencional. Un estudio realizado para el almacenamiento de semillas de *Allium cepa* durante un período teórico de 100 años, concluyo que su crioconservación sería un 75% más barata que los métodos convencionales, al evitarse los costes asociados a la regeneración/multiplicación de las muestras y los debidos a los controles periódicos de viabilidad.

Todo lo anterior pone de manifiesto que la crioconservación puede ser un método eficaz y práctico para la conservación de recursos fitogenéticos. No obstante aún debe hacerse un gran esfuerzo para evaluar que materiales pueden ser crioconservados, que materiales deben ser crioconservados y sobre todo para comprender los mecanismos fisiológicos que actúan durante la crioconservación.

BIBLIOGRAFÍA

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

Kharta, K.K. (ed.) (1985). Cryopreservation of Plant Cells and Organs. CRC, Press, Inc. Boca Raton, Florida.

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