

# Tema 9: Técnicas de conservación *in vitro* del material vegetal

## Conservación de germoplasma

- Conservación *in situ*
  - Protección de áreas de gran biodiversidad
- Conservación *ex situ*
  - Colecciones de plantas
  - Bancos de semillas
    - Secar las semillas (contenido H<sub>2</sub>O= 5-8%).
    - Almacenar -18°C y baja humedad
  - Conservación *in vitro*
    - Técnicas de crecimiento lento
    - Crioconservación
    - Técnicas basadas en la vitrificación



26 Feb 2008  
1,5 millones semillas  
Financiación. Gobierno de Noruega.  
En su gestión participa la ONG Bill y Melinda Gates

[www.cbsnews.com/news/a-visit-to-the-doomsday-vault](http://www.cbsnews.com/news/a-visit-to-the-doomsday-vault)



# Conservación *ex situ*. Bancos de semillas: Limitaciones

## · Plantas que no forman semillas

(plátano, banana, etc.)

producen semillas viables periodo limitado

semillas se deterioran rápidamente por patógenos

## · Semillas con alta heterocigosidad

(manzano, patata, caña, etc.)

no son adecuadas para el mantenimiento de genotipos “verdaderos”

## · Semillas recalcitrantes

(mango, cacao, aguacate, etc.)

- semillas ortodoxas: sobreviven a periodos de deshidratación (5-8%) y congelación (-20°C) y baja humedad
- semillas recalcitrantes (no ortodoxas): no se pueden desecar (pérdida de viabilidad).  
Especies tropicales

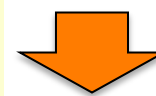
# Conservación *ex situ*. Conservación *in vitro* de germoplasma

## • Ventajas sobre conservación *in vivo*

- conservación de especies en peligro de extinción
- almacenamiento de propágulos vegetativos *in vitro*: ahorro en espacio y tiempo
- plantas estériles pueden conservarse *in vitro*
- el cultivo *in vitro* puede reducir el crecimiento, reducir el número de subcultivos



**Germoplasma:** suma total de todos los genes y alelos de un cultivo y el de sus especies relacionadas



fuelle de germoplasma  
**erosión genética** prácticas agrícolas modernas (baja variabilidad génica)

**Programas de mejora** se basan en variedades adaptadas y especies silvestres (resistentes a plagas, patógenos)

# Conservación *ex situ*. Conservación *in vitro* de germoplasma dos aproximaciones:

- **Técnicas de crecimiento lento**

- Temperatura de almacenamiento: no congelación



H<sub>2</sub>O en tejidos → líquida



- **Crioconservación (conservación en estado congelado)**

- CO<sub>2</sub> sólido -79°C; congelador -80°C, fase vapor de N<sub>2</sub> (-150°C), N<sub>2</sub> líquido -196°C
- Consideraciones.
  - Grado de tolerancia a la congelación del genotipo
  - La formación intracelular de cristales



baja cantidad H<sub>2</sub>O en tejidos → reducir formación hielo  
Células inactivas



## Técnicas de crecimiento lento

Se han usado para la conservación de cultivares como:

- Banana, plátano (*Musa* sp.) a 15°C
- Yuca (*Manihot esculenta*) a 20°C
- Patata (amplia gama de condiciones)
- Café a 27°C
- Manzana (*Malus domestica*), ciruela (*Prunus domestica*), fresa (*Fragaria x ananassa*) 0-5 °C
- Kiwi 8°C
- Taro (*Colocasia esculenta*), 9°C

Wheelans, S.K. And Withers, L.A. 1984. The IBPGR International Database on in vitro Conservation. Plant Genetic Resources Newsletter 60:33-38.

# Conservación *ex situ*. Conservación *in vitro* de germoplasma dos aproximaciones:

## • Técnicas de crecimiento lento

- Temperatura de almacenamiento: no congelación
- Procesos de crecimiento se reducen al mínimo mediante una combinación de factores:
  - Temperatura (Amplio rango)
  - Luz
  - Composición del medio
    - Bajar nutrientes  $\frac{1}{2}$  -  $\frac{1}{4}$
    - Alta concentración de osmótico (3-6%)
  - Inhibidores del crecimiento 10-20 mg/l
    - ácido succínico, dimetil hidrazida (inhiben la oxidación de triptamina a indolacetaldehído), cycocel (inhibidor de la síntesis de GAs), ABA, daminozide (inhibe las 2-oxoglutarato dioxigenasas y bloquea la formación de GAs) , tri-iodobenzoico (TIBA, inhibe el transporte polar de auxinas)
  - Otras técnicas
    - Atmósferas modificadas
    - Encapsulación



H<sub>2</sub>O en tejidos  
líquida

# Conservación *in vitro* de germoplasma. Crecimiento lento

T<sup>a</sup>C óptima 20-25°C 30°C  
T<sup>o</sup> crec lento 1-4°C 4-10°C

1<sup>o</sup> crecimiento condiciones estándar  
Crecimiento a bajas temperaturas

## ▪ Efecto de la temperatura

Cuadro 31.2. Efecto de la temperatura en la tasa de crecimiento y en la viabilidad de dos clones de yuca conservados *in vitro*.<sup>a</sup>

Temperatura (°C)	Elongación de los tallos (cm/mes)	Viabilidad		
		Tallos por cultivo (no.)	Nudos por tallo (no.)	Nudos por cultivo (no.)
<b>Clon M Col 22</b>				
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
<b>Clon M Col 1467</b>				
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

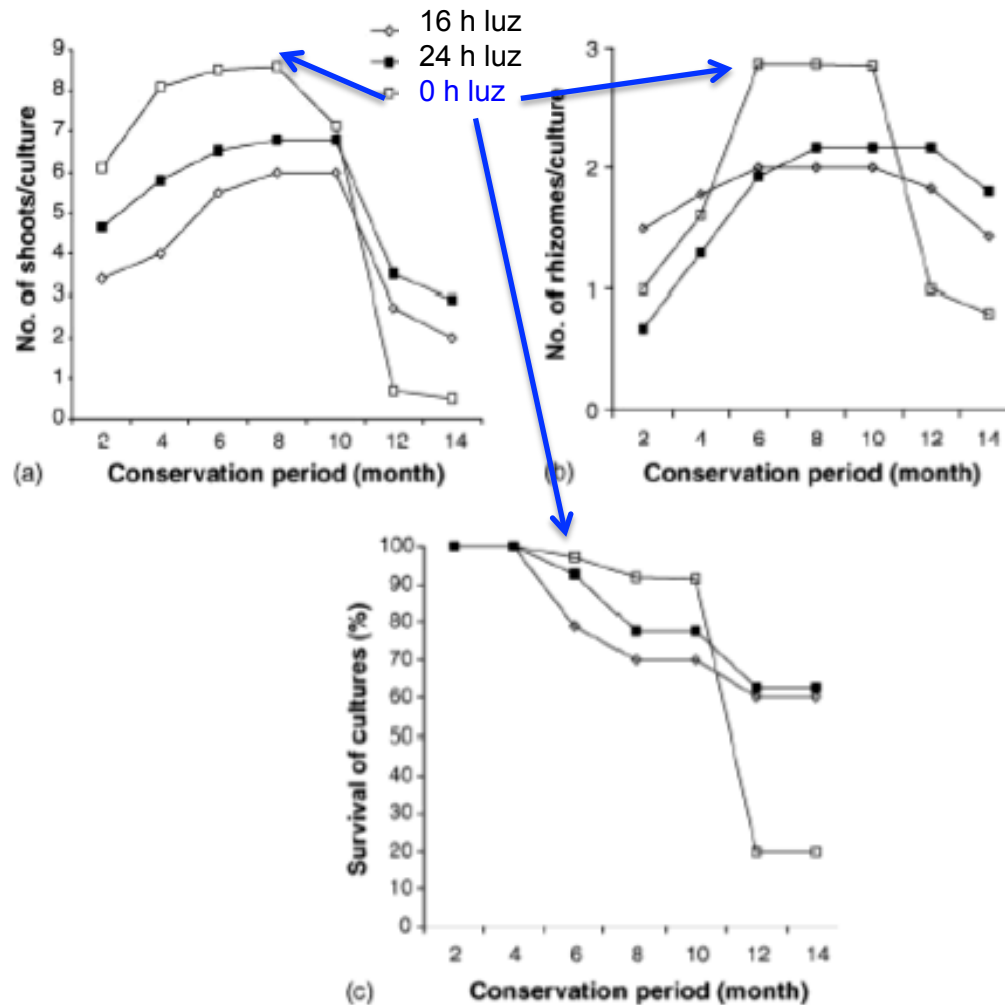
Éxito limitado en cultivo de células.  
*Musa* y *Lolium* 9-17 meses

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

# Conservación *in vitro* de germoplasma. Técnicas de crecimiento lento

## ▪ Efecto de la luz

En general luz muy baja (50 lux)  
fotoperiodo 16 h



Rizomas de jengibre  
(*Zingiber officinale*)

Fig. 2. Effects of photoperiods on (a) number of shoots/culture, (b) number of rhizomes/culture and (c) survival of cultures (%) of *Z. officinale* cv. Rio de Jai



# Conservación *in vitro* de germoplasma. Técnicas de crecimiento lento

## ▪ **Composición del medio de cultivo**

### • **Concentración de nutrientes**

- Bajar la concentración de “todos”
- Bajar la concentración de un elemento
  - Ápices de *Vitis sp.*: MS con 6% nitrato amónico
  - 70-80% supervivencia, reducción crecimiento

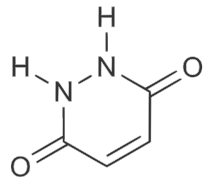
### • **Disponibilidad de agua**

- Adición de osmóticos
  - Manitol, sorbitol, sacarosa
  - Plantas de fresa libres de virus almacenadas > 15 años a 9°C/1 subcultivo anual

### • **Reguladores del crecimiento**

# Conservación *in vitro* de germoplasma. Técnicas de crecimiento lento

## ▪ Efecto de inhibidores del crecimiento



### Hidrazida maleica

Patata: no causa síntomas de toxicidad, incrementa el rendimiento, reduce la brotación "sprouting".  
Inhibe la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas

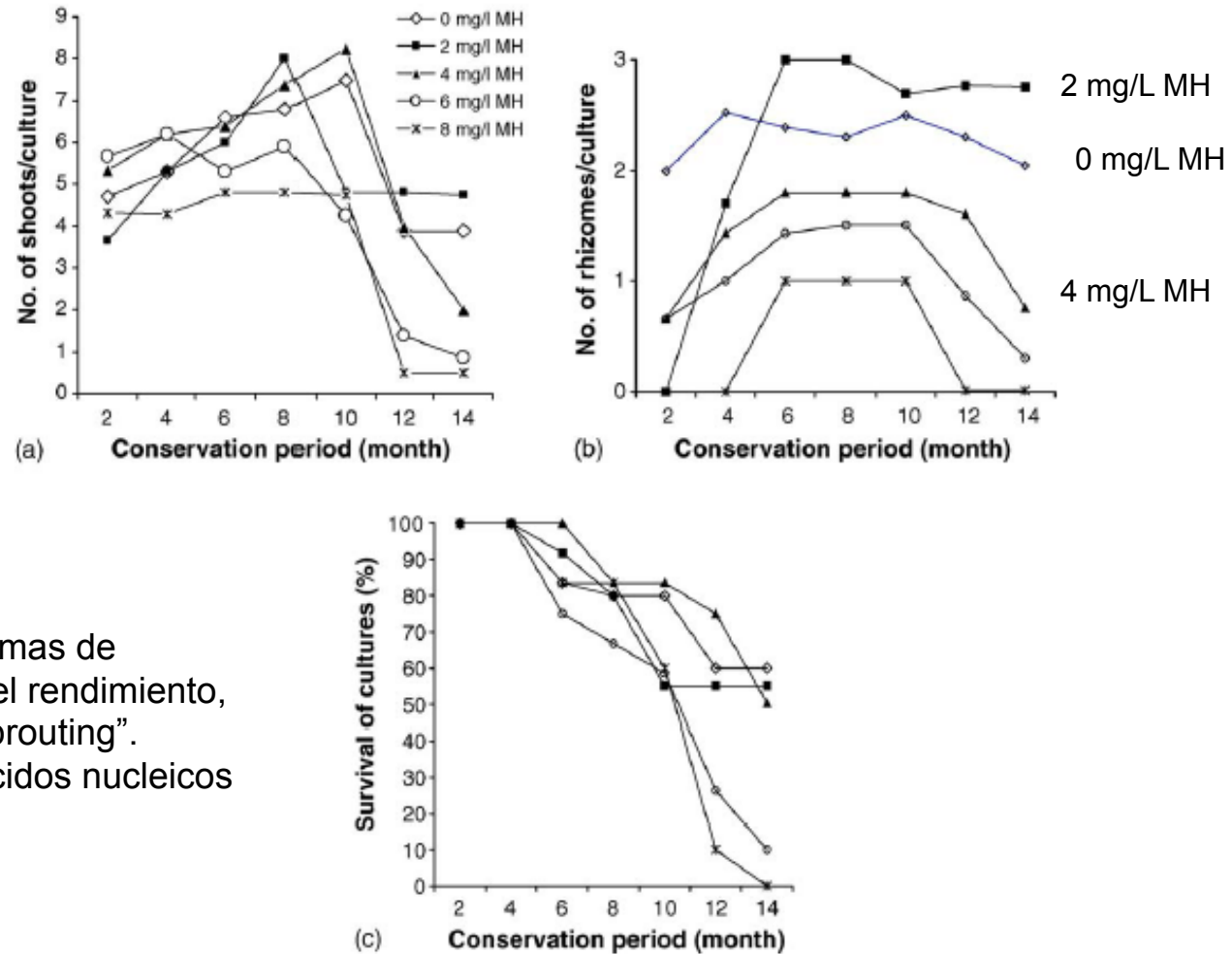


Fig. 1. Effects of MH on (a) number of shoots, (b) number of rhizomes and (c) survival of cultures (%) of *Z. officinale* cv. Rio de Janeiro



## ▪ Otras técnicas:

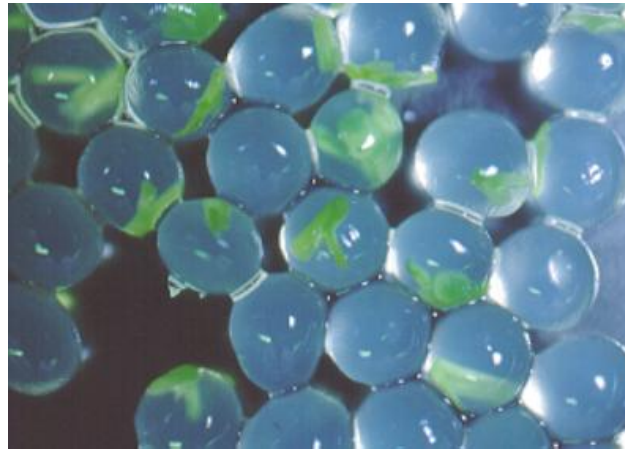
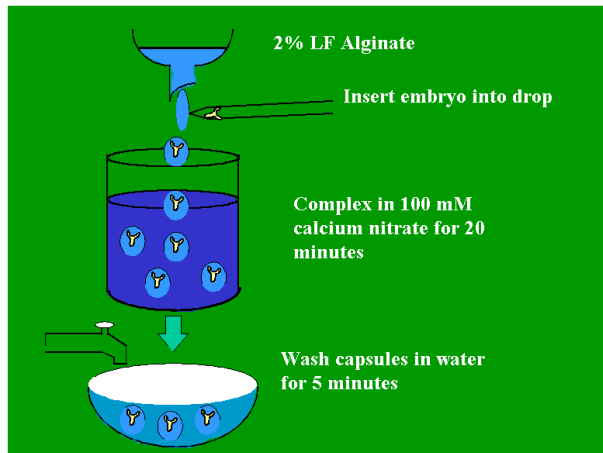
### • Atmósferas modificadas

- Bajar la presión parcial del O<sub>2</sub>
  - Adición de aceite minera
  - Parafina
  - Añadir medio líquido

**Limitaciones:** efectos a largo plazo en plantas.  
Ej. crisantemo y tabaco: *gran diferencia en el crecimiento* del material cultivado a baja presión de O<sub>2</sub>  
*Desección del medio:* limita el tiempo de almacenamiento

### • Encapsulación

- Explantos en alginato (3-5%) y se “dejan gotear” en CaCl<sub>2</sub> 100 mM
  - 10-20 min esferas perfectas que engloban al tejido. Deshidratar en un medio rico en azúcar durante mínimo 17 h. Secar las esferas en cabina de flujo. Congelar en nitrógeno líquido



# Conservación *in vitro* de germoplasma. Crioconservación

Preparar el tejido para la crioconservación

Etapas proceso:

- Cultivo *in vitro* del material
- Pretratamiento del material
- Crioprotección
- Congelación lenta
- Almacenamiento
- Descongelación rápida
- Recuperación del material

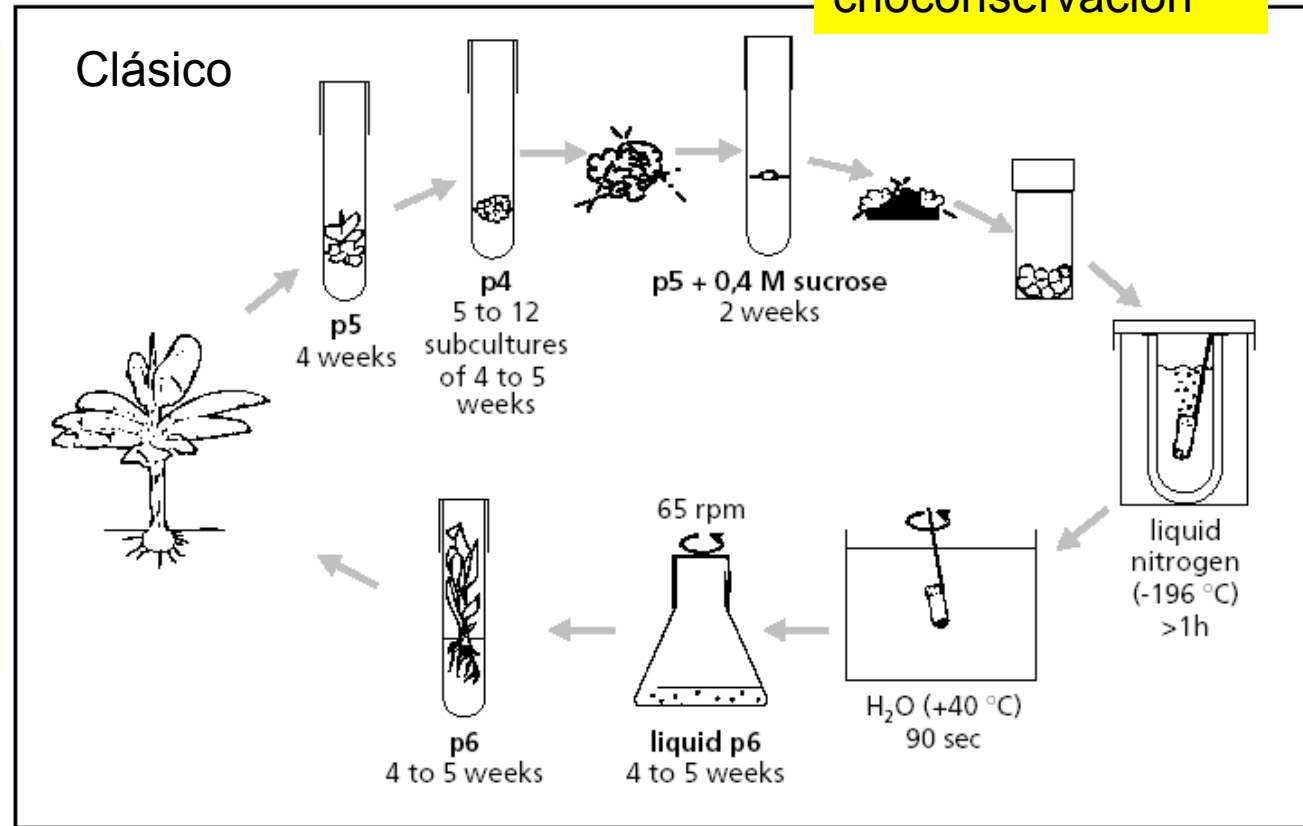


Figure 8. Simple freezing.

## Daño celular durante la crioconservación:

- formación de grandes cristales dentro de la célula (ruptura de orgánulos)
- concentración intracelular de solutos aumente a niveles tóxicos, antes o durante el proceso, como resultado de la deshidratación

## ▪ Células deben deshidratarse artificialmente para protegerlas del daño provocado por la congelación

- **Técnicas clásicas**
  - Congelación lenta (Deshidratación inducida por la congelación)
  - Crioprotección química
- **Nuevas técnicas**
  - **Vitrificación**

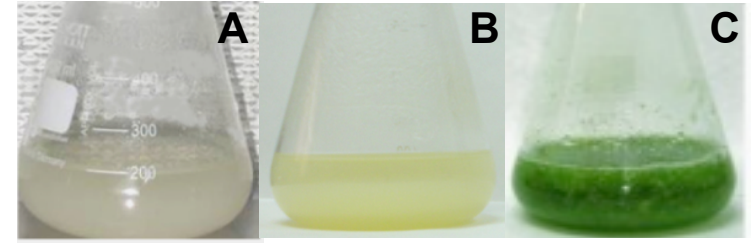
# Conservación *in vitro* de germoplasma. Crioconservación

## ▪ Método clásico

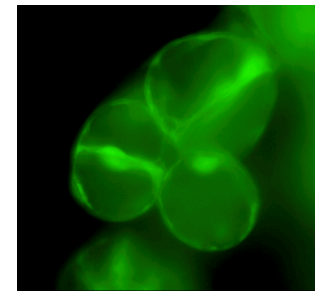
la morfología y las condiciones fisiológicas el material vegetal influyen en la capacidad del explanto para sobrevivir a  $-196^{\circ}\text{C}$

### •Material empleado:

- Meristemos apicales y laterales
  - Muy utilizados en crioconservación
- Órganos (embriones, óvulos, anteras/polen)
- Células, callos, embriones somáticos
  - Suspensiones celulares: Éxito en fase exponencial
  - Evitar las células viejas (parte superior) y áreas blanquecinas en el callo



A) Suspensión celular de *V. vinifera*; (B) de *C. roseus*; (C) y de *N. tabacum*



Cualquier etapa del proceso de crioconservación: VERIFICAR viabilidad del material

Células de *Monastrell* teñidas con el marcador fluorescente 3',6'-diacetil-fluoresceína (DAF). Esterasas intracelulares liberan la fluoresceína

Técnicas clásicas, cultivos células indiferenciado (suspensiones celulares y callos). En estructuras más diferenciadas, estas técnicas se han empleado para la congelación de ápices de especies tolerantes.

# Conservación *in vitro* de germoplasma. Crioconservación

## ▪ Crioprotección

### • Agentes crioprotectores:

#### • Permeantes/**no permeantes**

- Ej: Glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), etileno, dietileno, propileno, acetamidas, sacarosa, manosa, ribosa, glucosa, polivinilpirolidona, prolina, **sorbitol**
- Más usados: **DMSO (5-10%)**, sacarosa, **glicerol (10-20%)**, prolina

#### • Osmóticos

- Pretratamiento con 0.75 M sacarosa (16-18 h o días)
- 0.8 M sacarosa y 1 M glicerol

#### • Permeabilizantes

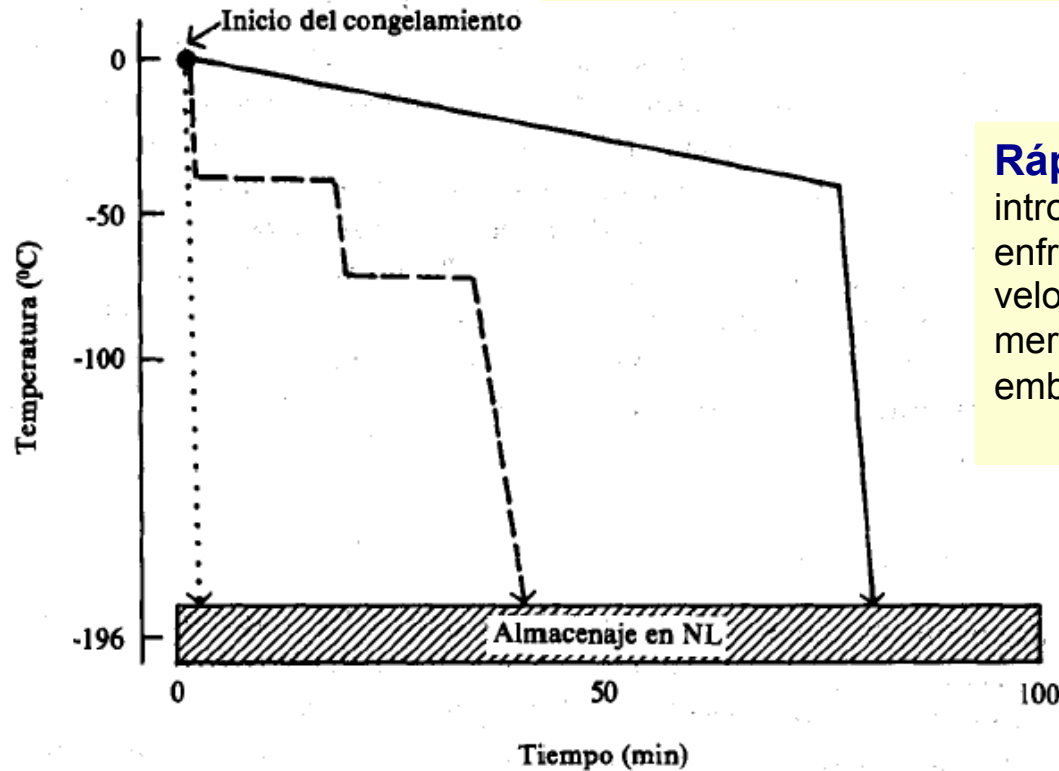
- para permitir la entrada de crioprotectores a todos los compartimentos y evitar la formación de cristales de hielo



## ▪ Congelación

Tres tipos de procesos de congelación:

**Lenta (proceso clásico):** Velocidad 0,1-10°C/min desde 0°C a -40°C y luego a N<sub>2</sub> líquido. Permite el flujo de agua de las células al exterior (promueve la formación de hielo en espacio apoplástico, no intracelular). Ej. guisante, yuca, fresa, patata. Proceso programado



**Rápida:** material vegetal en un vial y se introduce en N<sub>2</sub> líquido (velocidad de enfriamiento -300 a -1000°C/min) a mayor velocidad menor tamaño del hielo. Ej. meristemos de clavel, patata, fresa, colza y embriones somáticos

**Escalonada:** combina las ventajas de los dos anteriores. Proceso de congelación lento -20 a -40°C, protección a deshidratación), parada (30 min), un rápido proceso de congelación en N<sub>2</sub> líquido (no formación cristales de hielo grandes). Buenos resultado en suspensiones y fresas

Figura 32.1. Procedimientos para lograr la congelación rápida ( . . . . ), escalonada ( — — ) y lenta ( — ) del material vegetal. NL = nitrógeno líquido.



# Conservación *in vitro* de germoplasma. Crioconservación

## ▪ Almacenamiento a la correcta temperatura

- -20°C
- -80°C
- -140°C
- -196°C

### Periodo de almacenamiento largo

Temperatura baja para que cesen todas las actividades metabólicas y prevenir daño bioquímico.

Mejor -196°C

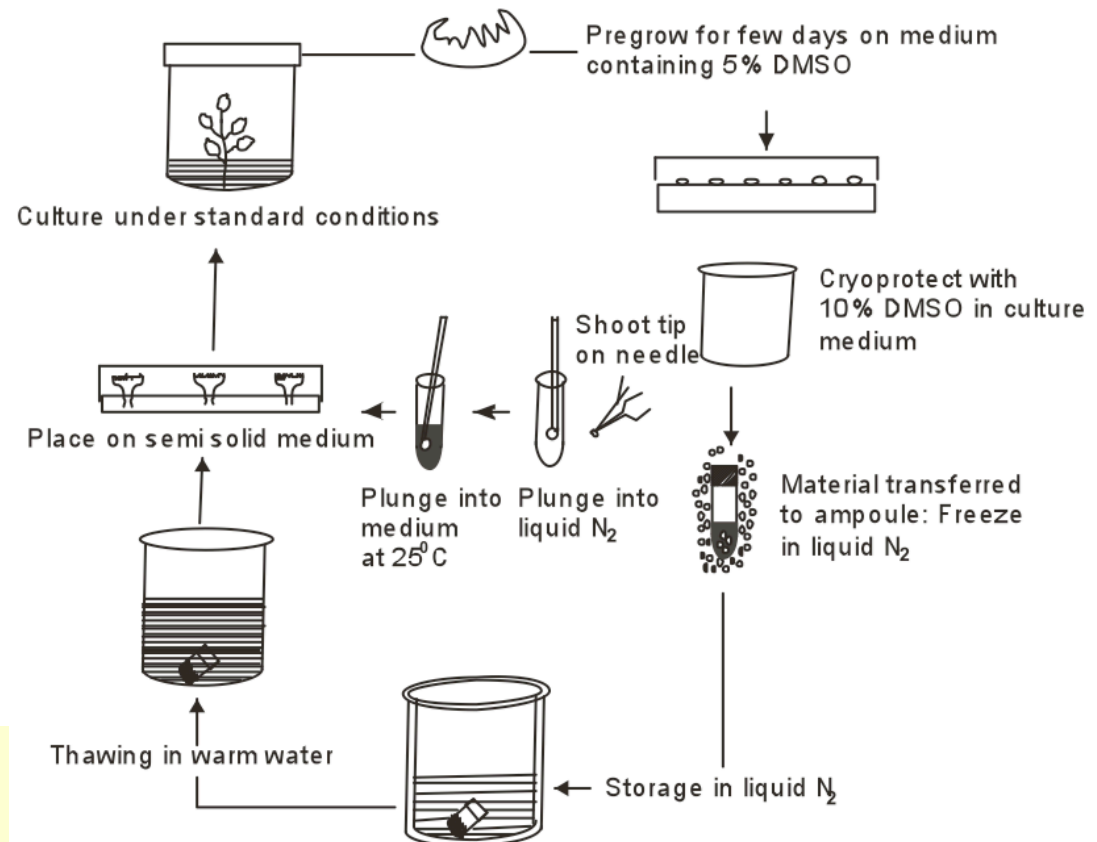


# Conservación *in vitro* de germoplasma. Crioconservación

## Etapas del proceso clásico

Descongelación

Recuperación del material



**Rápida descongelación:**  
necesario para evitar procesos de  
recristalización.

Transferencia a medio fresco  
después de un día de cultivo  
(efecto tóxico de la mezcla de  
crioconservantes)

Tomar la ampolla que contiene el material y se pone en un baño 35-45°C. Giros vigorosos de muñeca hasta la desaparición del hielo. Justo en el punto de descongelación, pasar rápidamente el tubo a un baño temperatura 20-25°C . Seguir agitando (15'')

# Conservación *in vitro* de germoplasma. Crioconservación

## ▪ Recuperación del material

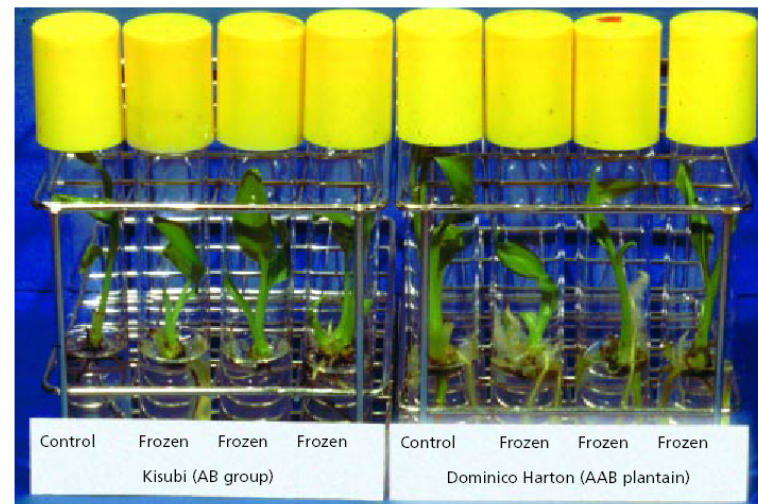
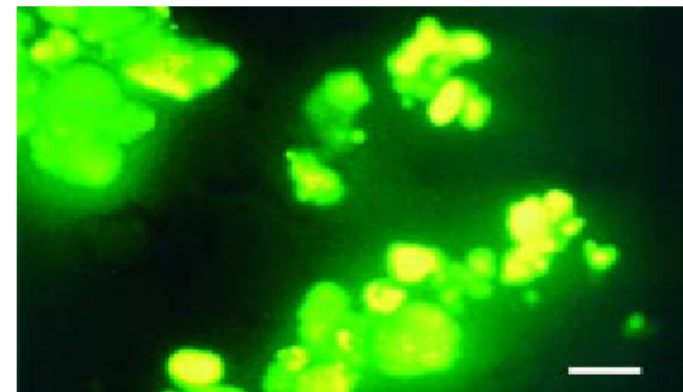


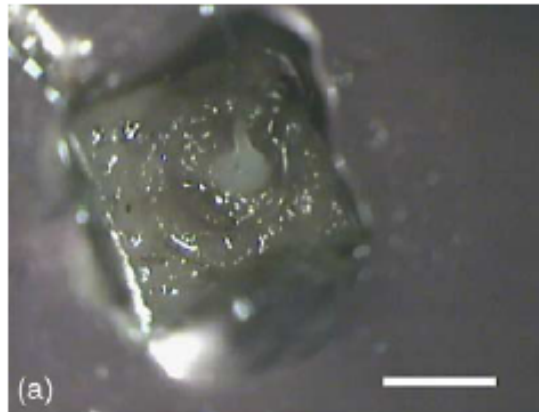
Figure 11. Regenerating shoots from 1 control and 3 frozen proliferating meristems of cultivars 'Kisubi' (AB group) and 'Dominico Harton' (AAB plantain), 3 months after cryopreservation.

Figure 14. Embryogenic cell suspension of the cv. 'Bluggoe' (ABB group), cryoprotected with 5% DMSO, frozen in liquid nitrogen, stained with FDA and observed with ultra violet light. The small surviving embryogenic cells fluoresce very brightly while larger structures show more diffuse fluorescence (bar = 100  $\mu$ m).

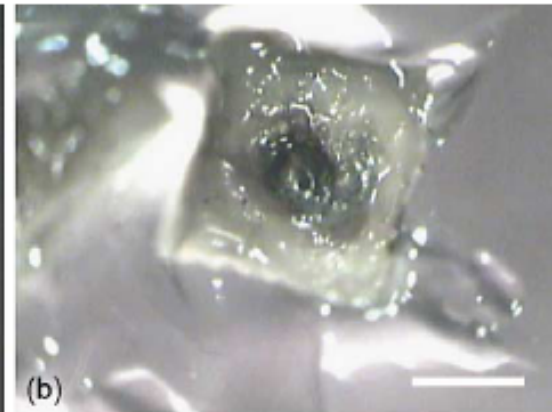


# Conservación *in vitro* de germoplasma. Crioconservación

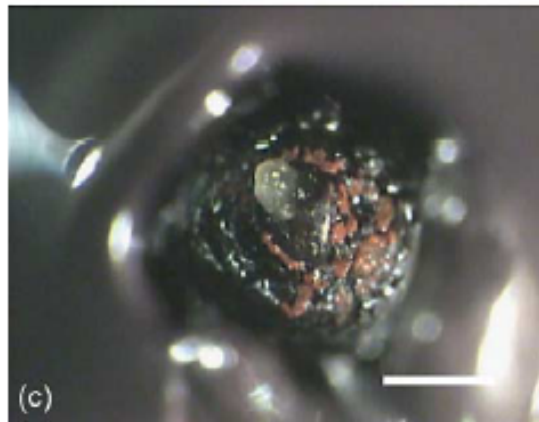
No crecimiento,  
si viable  
(blanco)



Ennegrecimiento,  
no crecimiento.  
fenoles



Formación de  
callo, callos no  
morfo genético



Regeneración  
del vástago



Fig. 1. Reaction of apical meristems towards cryopreservation: (a) no growth; the meristem remains white; (b) blackening without further growth; apical dome reacts by formation of polyphenolic compounds that oxidize; (c) callus formation; watery, non-morphogenic callus; and (d) shoot regeneration (bar = 600  $\mu\text{m}$ ).

# Conservación *in vitro* de germoplasma. Crioconservación

## ▪ Plantas tropicales crioconservadas

### **Suspensiones celulares**

*Berberis dictyophylla*  
*Capsicum annum*  
*Glycine max*  
*Nicotiana plumbaginifolia*

*Nicotiana tabacum*  
*Oryza sativa*  
*Zea mays*

### **Protoplastos**

*Glycine max*  
*Nicotiana tabacum*  
*Zea mays*  
*Callus*  
*Gossypium arboreum*  
*Oryza sativa*  
*Saccharum spp.*  
*Capsicum annum*

### **Meristemos**

*Arachis hypogea*  
*Cicer arietinum*  
*Solanum tuberosum*

### **Embriones somáticos**

*Citrus sinensis*  
*Coffea arabica*  
*Daucus carota*

### **Embriones polen**

*Arachis hypogea*  
*Citrus spp.*  
*Nicotiana tabacum*  
*Atropa belladonna*

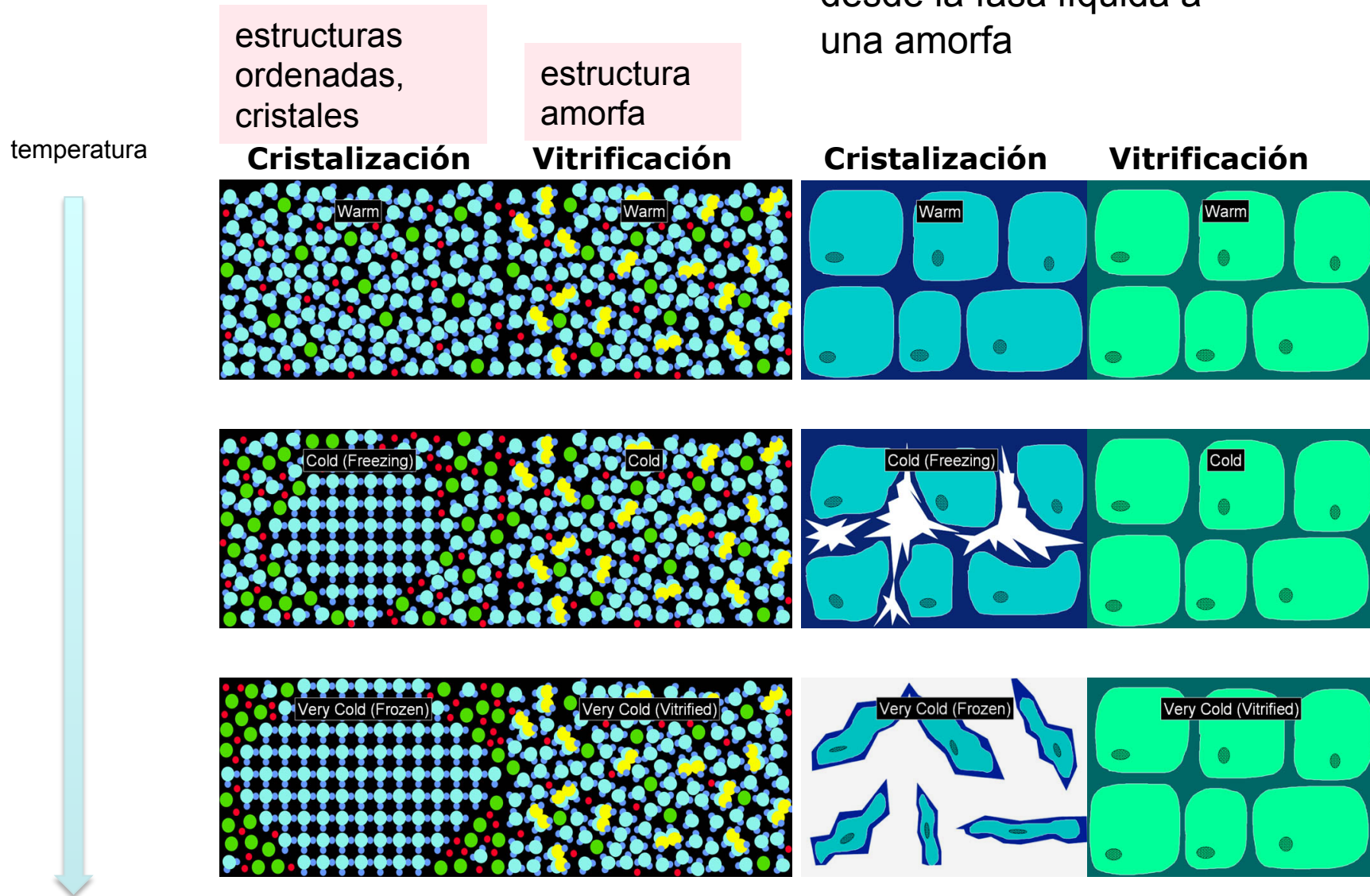
### **Embriones cigóticos**

*Camellia sinensis*  
*Manihot esculenta*  
*Zea mays*  
*Hordeum vulgare*  
*Triticum aestivum*



# Vitrificación

Transición del agua desde la fase líquida a una amorfa

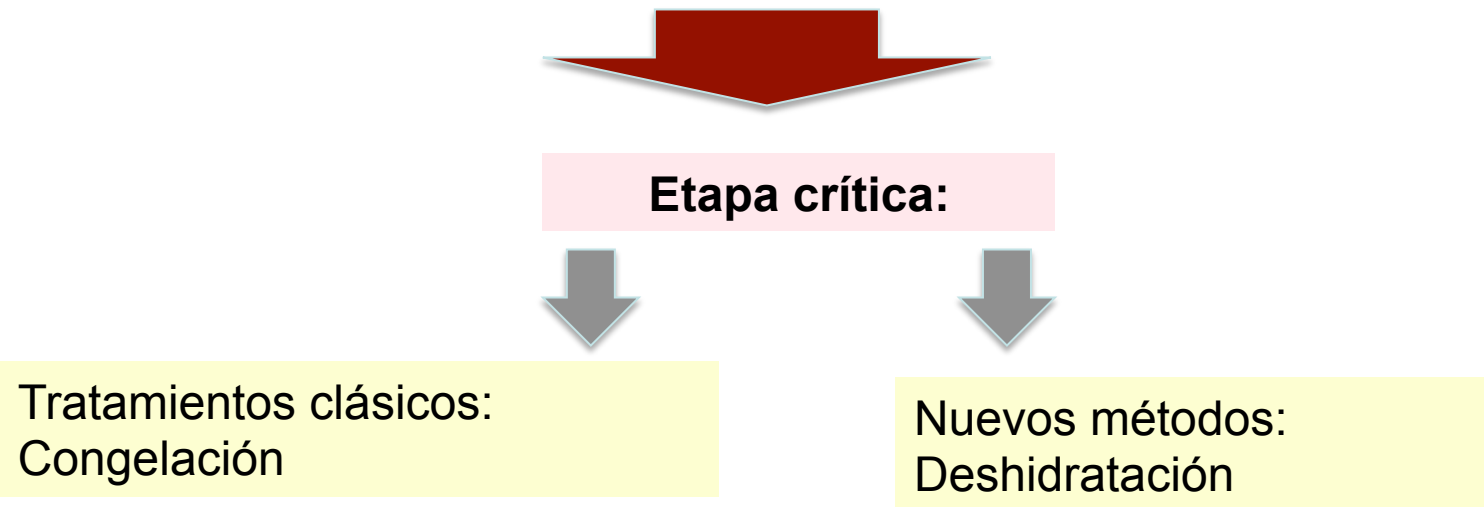


# Conservación *in vitro* de germoplasma. Técnicas basadas en la vitrificación

## •Vitrificación

solidificación amorfa del agua

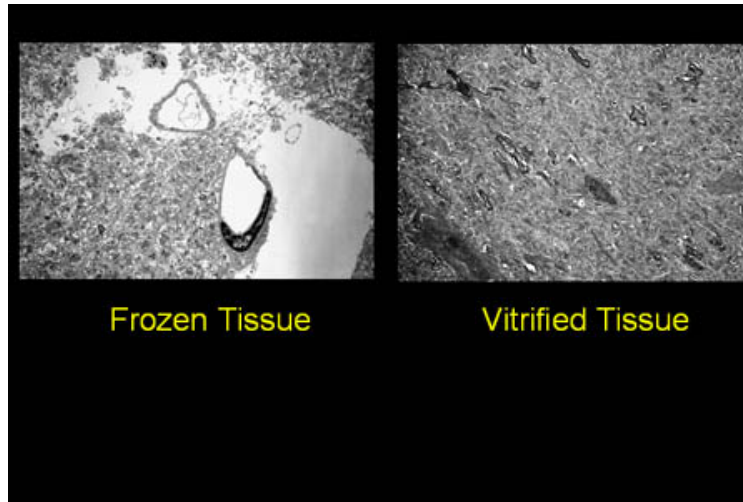
La deshidratación se realiza antes de la congelación.  
Tratamiento con crioprotectores a elevada concentración y/o desecación con aire



# Vitrificación

## Tejido animal

mantiene la integridad de:



Tejidos



Órganos



# Conservación *in vitro* de germoplasma. Técnicas basadas en la vitrificación

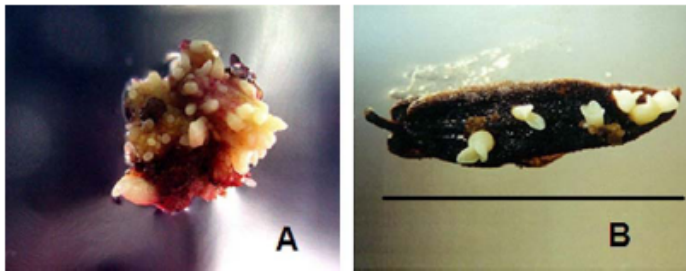
## •Procesos basados en la vitrificación:

- Desecación (deshidratación)
- Encapsulación-Deshidratación
- Vitrificación
- Encapsulación-Vitrificación
- Precrecimiento
- Precrecimiento-Desecación
- Droplet freezing
  - Ápices se pretratan con medido crioprotectivo
  - Papel de aluminio con pequeñas gotas de crioprotectores
  - Congelación lenta (manzana) o rápidamente (patata)

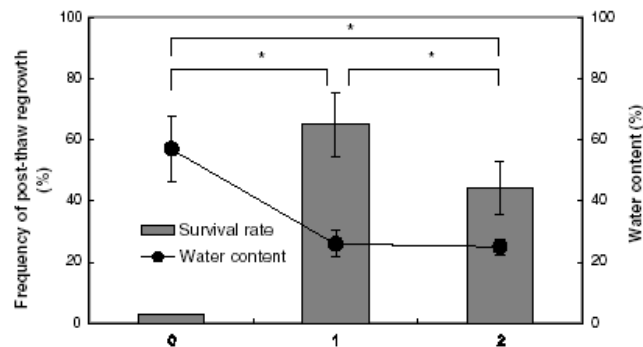
# Deshidratación

## Método más simple:

Deshidratación del explanto  
Congelación en nitrógeno líquido



Embriones somáticos de *Paeonia lactiflora* del cotiledón (A) y de la antera (B)



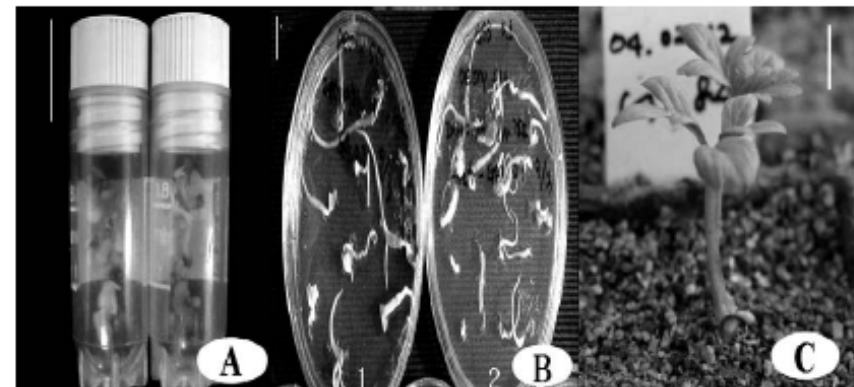
Cambios en el contenido de agua y en el crecimiento después de la congelación de embriones somáticos de *Paeonia lactiflora*

## Usos:

Embriones zigóticos de gran número de especies recalcitrantes y otras especies intermedias

## Cabina de flujo

Más preciso y más reproducible flujo de aire estéril compressed o silica gel



Regeneración de embriones somáticos de *Paeonia lactiflora* después de la crioconservación. A) Embriones somáticos en un criovial. Regeneración de plantas de un embriones no crioconservados (B1) y crioconservados (B2). Planta de dos meses después de transplante a maceta



# Deshidratación

óptimo de deshidratación para que el material sea viable antes de congelar en LN (N<sub>2</sub> líquido)

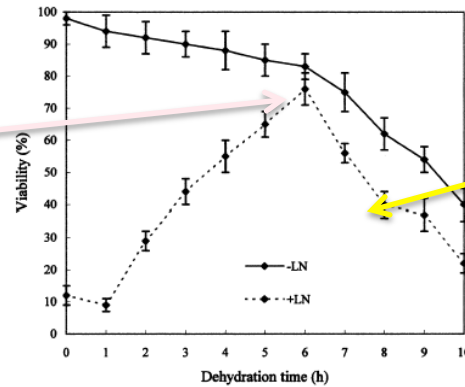


Fig. 2. Effect of dehydration on the viability of encapsulated cells following dehydration alone (-LN) and freezing in liquid nitrogen (+LN). Embryogenic cell suspensions were first-step precultured for 2 days on increasing concentrations of 0.25, 0.5, 0.75 and 1 M sucrose, with 12 h for each concentration. Precultured cells were encapsulated and second-step precultured on 1 M sucrose for 3 days. Viability was measured by the TTC test 3 days after post-culture and expressed as the percentage reduction in TTC activity over control (immediately after encapsulation, without preculture and dehydration). Bars represent S.E.

Alta deshidratación, pérdida de viabilidad

## Aparato de desecación

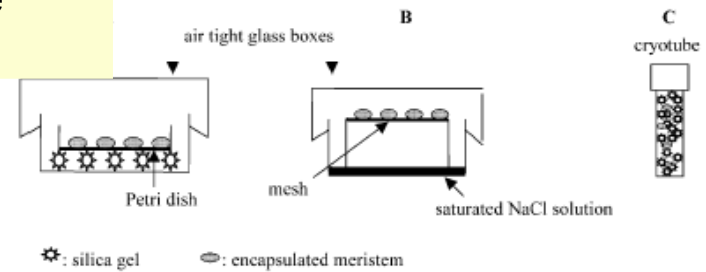


Fig. 1. A schematic representation of desiccation apparatus. Desiccation 'over' silica gel (A), desiccation 'over' saturated NaCl solution (B) and desiccation 'in' silica gel (C).

Embriones encapsulados en alginato.  
Deshidratación  
Deshidratación + LN



Fig. 6. Embryo development of encapsulated cells following encapsulation (control), dehydration alone (-LN) and freezing in (+LN) 4 weeks after post-culture on MG solid medium.

## Encapsulación-Deshidratación

Inclusión muestra en perlas de alginato  
Cultivo en alta concentración de sacarosa (0.3-0.7 M)  
Deshidratación física  
Nitrógeno líquido

# Conservación *in vitro* de germoplasma. Técnicas basadas en la vitrificación

## •Encapsulación-Deshidratación

### (basada formación de semillas artificiales)

- Explantos se encapsulan en perlas de alginato
- Precrecimiento en medio líquido rico en sacarosa durante 1-7 d
- Desecación parcial en cabina de flujo o con silicagel
  - Contenido de agua 20% (en base al peso fresco)
- Congelación

Éxito: ápices de gran número de especies de zonas templadas y tropicales  
Suspensiones celulares  
Embriones somáticos

# Vitrificación

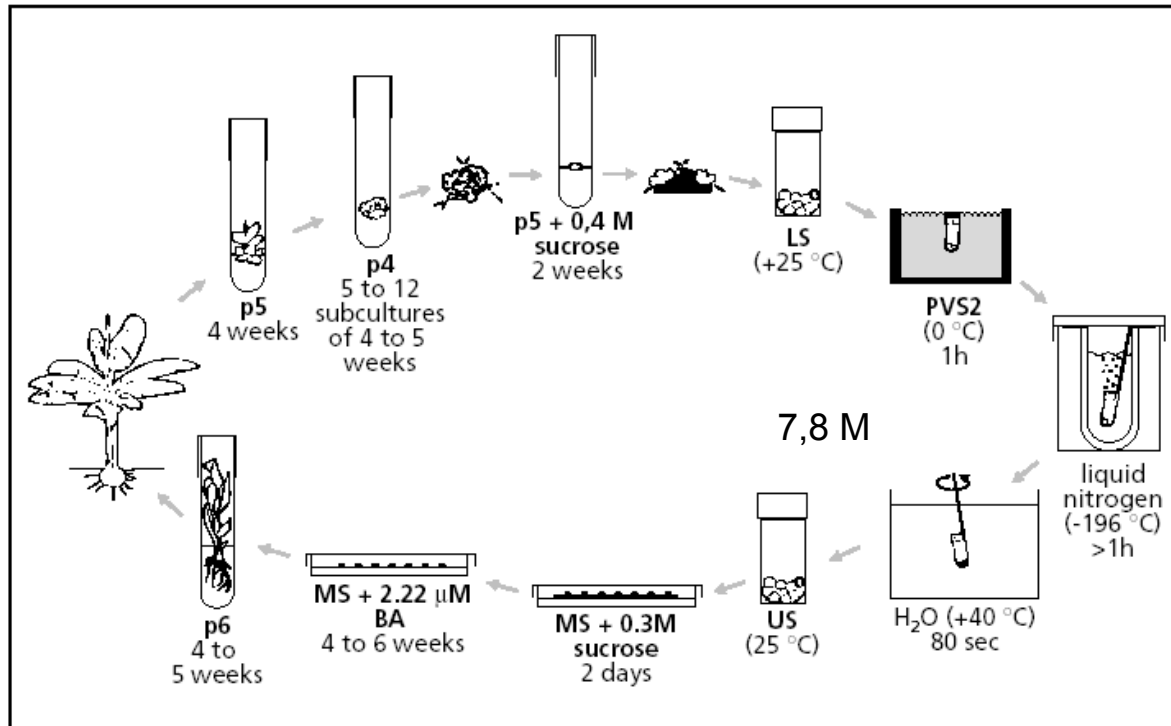


Figure 10. Vitrification of proliferating material.

Reducir la toxicidad de la solución de vitrificación:

- 1) solución vitrificación ½ ,
- 2) solución vitrificación 1X.

Incluye:

Precultivo de muestras en medio rico en sustancias crioprotectoras

## •Pretratamiento

- Medio con una concentración de sacarosa elevada 0.4M (15 d)

## •LS (solución de carga).

- Osmoprotección (aumentar osmótico)
- 2 M glicerol + 0.4 M sacarosa. 20-30 min 20-30°C

## •PVS2 (Plant Vitrification Solution)

- Deshidratación
- PVS2: glicerol 30%, DMSO 15% y etilen glicol 15% en medio líquido con 0.4 M sacarosa.
- Quitar la LS, añadir PVS2, 5 min, eliminar, añadir otra vez PVS2 e incubar 25°C ó 0°C

## •US (unloading solution)

- Añadir medio de cultivo alta concentración de sacarosa (1.2 M), 20 min.
- Plaqueo con sacarosa 0.3 M (2 d)

# Encapsulación-Vitrificación

Efecto del tiempo de exposición a PVS2 (Plant Vitrification Solution) (deshidratación) antes de la congelación con nitrógeno líquido

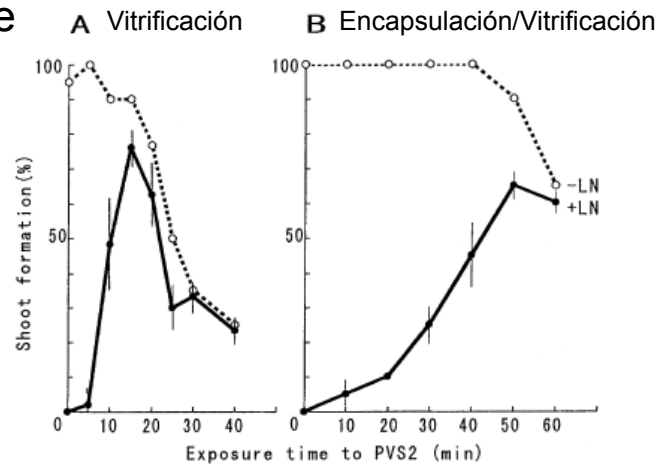


Fig. 1. Effect of exposure time to PVS2 at 25°C on the shoot formation of meristems cooled to -196°C by (A) vitrification and (B) encapsulation/vitrification. Meristems were dehydrated with PVS2 solution at 25°C for various lengths of time prior to cooling (+LN) or without cooling to -196°C (-LN). Excised meristems were precultured with 0.3 M sucrose and then (A) loaded with 2.0 M glycerol plus 0.4 M sucrose for 20 min at 25°C or (B) encapsulated with alginate beads including 2.0 M glycerol plus 0.4 M sucrose for 30 min at 25°C before dehydration with PVS2 solution. Approximately 10 meristems were tested for each of three to four replicates. Vertical bars represent standard error.

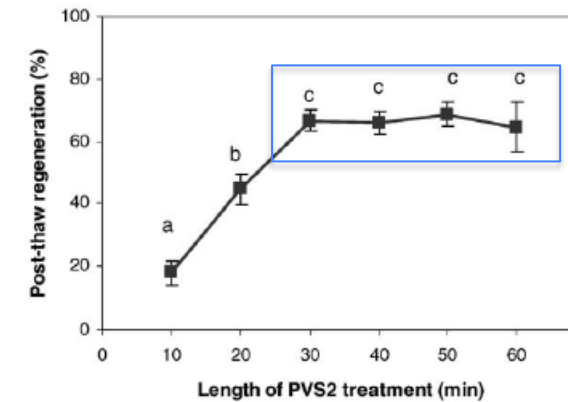


Fig. 5. Mean post-thaw regeneration of banana accessions listed in Table 2. Error bars represent the standard errors of regenerable regrowth. PVS2 treatments marked by the same letter are not significantly different for post-thaw regeneration according to Duncan's test after arcsin transformation ( $P < 0.05$ ).

## Proceso combinado:

1. Perlas de alginato
2. Solución de carga (2 M glicerol + 0,4 M sacarosa)
3. Tratamiento con la solución de vitrificación PVS2

# Precrecimiento-Desecación

- **Etapas:**

- Pretratamiento con crioprotectores
- Desecación
- Enfriamiento rápido
- Almacenamiento
- Calentamiento rápido

## - Estabilidad del material vegetal



Fig. 5. Renewal of carrot cells growth on agar medium after 25 years of storage in liquid nitrogen.

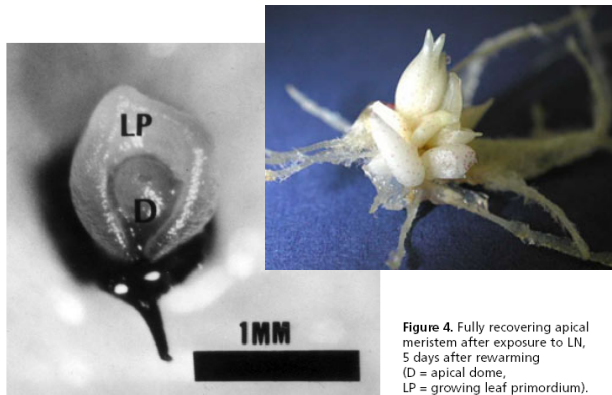
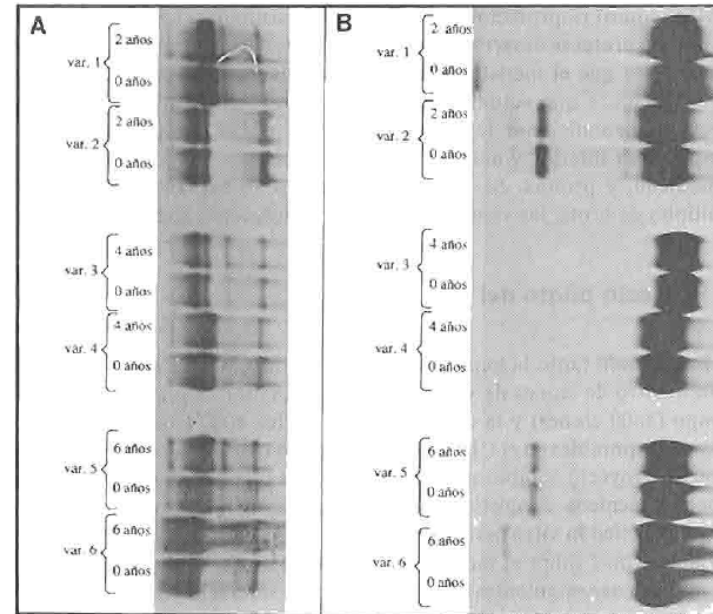


Figure 4. Fully recovering apical meristem after exposure to LN, 5 days after rewarming (D = apical dome, LP = growing leaf primordium).

## Marcadores moleculares

### 1. Enzimáticos (1970's)



**Limitación:** no es capaz de detectar suficiente polimorfismo entre variedades o especies próximas debido a que las proteínas son el resultado de la expresión génica, que puede ser distinta de unos tejidos a otros, de una etapa de desarrollo a otra, de un medio ambiente a otro, y de una época del año a otra.



## 2. Marcadores moleculares basados en el DNA

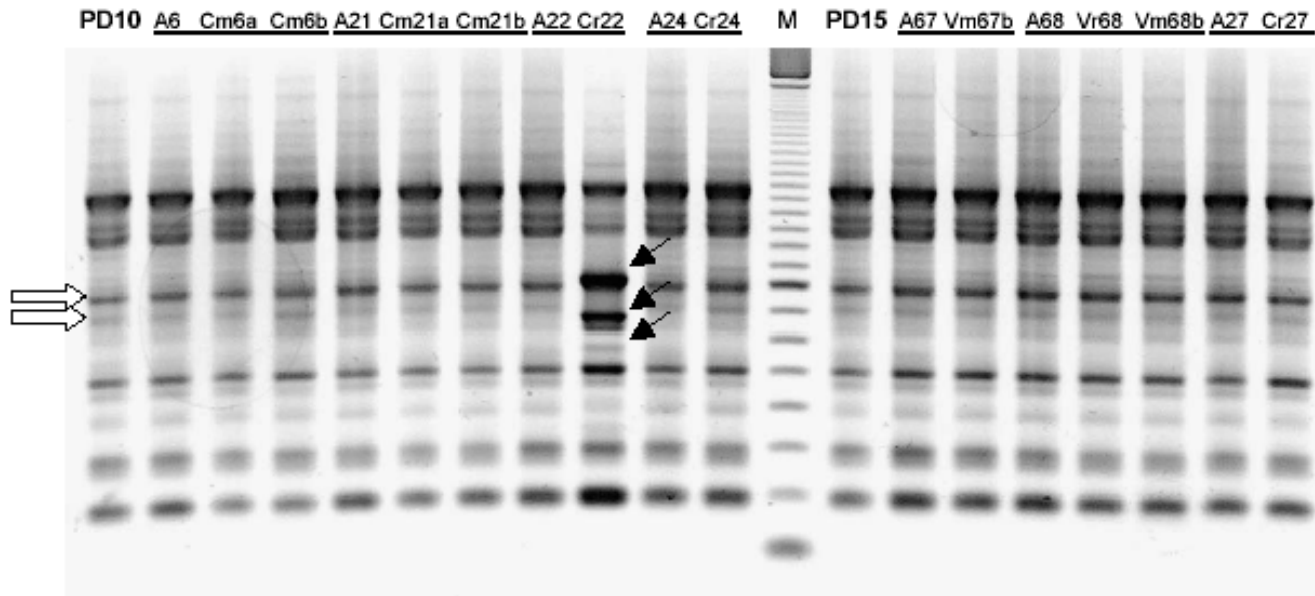


Fig. 2. RAPD banding profiles of DNA samples from the control and cryopreserved material of *D. grandiflora* cv. 'Pasodoble.' Amplification products were generated by primer OPO-15. M: 100 Base-Pair Ladder marker; PD10 and PD15 mother plants; A6, A21, A22, A24, A67, A68, and A27 prior-cryopreservation material of the corresponding line; Cr and Vr material after 30 days recovery subsequent to cryopreservation by encapsulation-dehydration or by vitrification, respectively; Cm and Vm cryopreserved material after further three more months culture on multiplication medium. From shoot no. 68 there was enough growth after 30 days recovery to continue growth and isolate DNA after further 3 months in culture. Those samples in which DNA was isolated from two types of plant material are represented by "a" (cluster of adventitious shoots) and "b" (normal shoot development). Black arrows show new bands in Cr22 at 600, 650, and 825 bp. White arrows show the absent bands in the same sample.

Técnicas que emplean oligonucleótidos arbitrarios para generar huellas dactilares complejas **RAPD** (DNA polimórfico amplificado al azar): Es una de las técnicas más versátiles desde que se desarrolló en el año 1990. Se usa una colección de decanucleótidos para amplificar por PCR áreas específicas distribuidas al azar por el genoma. Su pequeño tamaño y la baja temperatura de alineamiento (36°C) aseguran que se unen a infinidad de secuencias en el genoma para conseguir amplificar muchos fragmentos de DNA.

# Limitaciones

- Expertos: mantenimiento y manejo de los cultivos
- Instalaciones
- Las plantas pueden mostrar inestabilidad genética
- Las células/tejidos puede dañarse durante la crioconservación
- Los procedimientos de crioconservación dependen del genotipo
- El coste del mantenimiento es alto
- Los cultivos de crecimiento lento son vulnerables a la contaminación
- Se requiere bastante “espacio” sobre todo en los cultivos de crecimiento lento