



# Guías para la regeneración de germoplasma: lineamientos generales y principios orientadores

# Introducción

**M.E. Dulloo<sup>1</sup>, J. Hanson<sup>2</sup>, M.A. Jorge<sup>1,2</sup> e I. Thormann<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Bioversity International, Roma, Italia

<sup>2</sup>International Livestock Research Institute (ILRI), Addis Abeba, Etiopía

## Antecedentes

Los bancos de germoplasma deben garantizar que las accesiones que mantienen se conserven viables y en excelentes condiciones durante el mayor tiempo posible. Sin embargo, aún siguiendo los más altos estándares de manejo, el germoplasma se deteriora con el tiempo y hay que regenerarlo. Mantener las colecciones en condiciones aceptables de viabilidad y calidad es difícil para muchos bancos de germoplasma debido a los costos que esto implica y a las limitaciones de los bancos en cuanto a capacidad y pericia técnica —especialmente cuando hay que seguir procedimientos complejos para regenerar algunas especies vegetales (FAO 1998). Esta situación ha resultado en retrasos en la regeneración, lo cual pone en peligro materiales únicos importantes. El Informe de la FAO sobre el Estado Mundial de los Recursos Fitogenéticos y las estrategias para la conservación de cultivos, desarrolladas en los últimos años por el Global Crop Diversity Trust (Fondo Mundial para la Diversidad de los Cultivos —en adelante el Fondo), con apoyo de los centros del Grupo Consultivo para la Investigación Agrícola Internacional (GCAI), han resaltado esta situación. Por tanto el Fondo está apoyando la regeneración de dichos materiales amenazados en todo el mundo.

Aunque existe una herramienta genérica para la toma de decisiones en el proceso de regeneración (Sackville Hamilton y Chorlton 1997), se necesitan conocimientos y destrezas específicas para cada cultivo. Aunque existe este conocimiento en los bancos de germoplasma de todo el mundo, incluyendo los bancos de los Centros del GCAI, desafortunadamente hasta ahora no se ha hecho ningún intento para identificar, recopilar y publicar las mejores prácticas que permitan a los curadores mantener la integridad

genética de las colecciones y optimizar la viabilidad del material de siembra a la hora de emprender un proceso de regeneración. Por tanto, el Fondo solicitó a Bioversity que, actuando en nombre del Programa de Recursos Genéticos del GCIAI (SGRP, de su sigla en inglés), desarrollara guías específicas para la regeneración de los 21 principales cultivos alimenticios (banano, frijol, árbol del pan, yuca, garbanzo, coco, caupí, haba, millo africano, alverjón, maíz, aróideas importantes, lenteja, millo perla, guandul, papa, arroz, sorgo, camote, trigo y ñame), objetivo de la iniciativa de regeneración del Fondo.

## **Definición**

En estas guías, el término regeneración se define como el restablecimiento de muestras genéticamente similares a las de la colección original, cuando la viabilidad o el número de muestras conservadas se han reducido. La regeneración también es necesaria en el caso de nuevas accesiones que se van a conservar a largo plazo si se tiene muy poca cantidad o por razones sanitarias para eliminar enfermedades. Los cultivos de propagación por clones, conservados en bancos de germoplasma en campo, se pueden restablecer en el mismo sitio o en uno diferente, por seguridad o para evitar plagas y enfermedades.

## **Principios orientadores**

### **Garantizar integridad genética**

La regeneración del germoplasma es una operación crítica en el manejo de un banco que involucra riesgos considerables para la integridad del germoplasma, debidos a selección, cruzamientos exogámicos o mezclas mecánicas. El riesgo de perder la integridad genética es particularmente alto cuando se regeneran accesiones genéticamente heterogéneas de cultivos exogámicos. El objetivo de la regeneración es mantener la diversidad y estructura genéticas originales de la accesión o de la colección (ver recomendaciones más abajo, en la sección titulada Lineamientos Generales para la Regeneración).

### **Garantizar eficiencia**

Para producir suficiente semilla o material de siembra, hay que tener en cuenta la tasa reproductiva de la especie y la variedad en el sitio en que se está regenerando. Se debe calcular cuidadosamente el número de semillas, de estacas o de otros materiales de siembra que se requieren para la regeneración, teniendo en cuenta el número de plantas que se desea obtener para la regeneración, la tasa de germinación y de establecimiento de la accesión en el campo, la cantidad de semilla requerida después de la regeneración, y si las accesiones se van a caracterizar y evaluar durante el proceso de regeneración.

### **Garantizar calidad**

El objetivo de regenerar un cultivo es producir suficiente cantidad de semillas, tubérculos u otros propágulos vegetativos sanos y viables. Antes de distribuir el germoplasma, y con el fin de evitar la propagación de plagas y enfermedades, los bancos deben revisarlo para detectar la presencia de plagas o patógenos transmitidos por la semilla o por el material vegetal. Este germoplasma debe servir de base o de reserva no contaminada para los programas de fitomejoramiento, para multiplicación o para otros proyectos.

## Lineamientos generales para la regeneración

### Tipo de colección

Los dos tipos de colección de germoplasma reconocidos para cultivos de semilla son la colección activa y la colección base. Las colecciones activas se deben regenerar preferiblemente a partir de semillas originales tomadas de una colección base. Sin embargo, se pueden usar semillas de una colección activa hasta por un máximo de tres ciclos de regeneración antes de retornar a las semillas originales (la colección base) (FAO/IPGRI 1994). Las colecciones base se regeneran solamente a partir de semilla residual de la muestra más original de la colección base.

En los cultivos propagados por clones, los materiales por lo general se mantienen en una colección en campo (Engels y Visser 2003). Mientras que algunas especies de árboles tropicales sólo necesitan sembrarse cada 15 o más años, otras especies necesitan reemplazarse cada pocos meses. En los cultivos propagados por semilla, es una buena práctica establecer un duplicado de la colección puesto que, si fallan algunas plantas, habrá un remanente de semilla al cual recurrir. Los cultivos propagados por clones también se pueden conservar *in vitro* o criopreservarse cuando se ha desarrollado la tecnología específica para ellos; estos materiales también sirven como duplicados de seguridad de los bancos en campo. Estas guías no tratan la regeneración de colecciones *in vitro* o criopreservadas [para mayor información consultar Reed *et al* (2004)].

### Cuándo regenerar

La regeneración es un proceso costoso y sólo se debe realizar cuando sea necesario para garantizar una cantidad suficiente de accesiones de adecuada calidad. En la mayoría de los cultivos de semilla, las accesiones se regeneran cuando:

- la viabilidad de las semillas de la colección activa desciende por debajo del 85% del porcentaje inicial de germinación, valor que se determina monitoreando la viabilidad (para mayores detalles, consultar FAO/IPGRI 1994; Rao *et al.* 2006; ISTA 2008). La viabilidad inicial previa al almacenamiento no debe ser inferior al 85%, aunque en algunos bancos se trabaja con un porcentaje inferior (<75%), especialmente si se trabaja con especies silvestres.
- el número de semillas viables por accesión es <1500 en las colecciones activas o base de las poblaciones y <250 semillas en líneas endogámicas.

A la hora de decidir, es más importante regenerar accesiones de mala calidad (con baja viabilidad) que aquellas con un número inadecuado de semillas. Asimismo, las accesiones de una colección base tienen prioridad para regeneración sobre las de una colección activa.

Para los cultivos propagados por clones, la decisión de regenerar dependerá de:

- la maduración y el deterioro de los materiales vegetativos conservados
- el nivel de plagas y enfermedades presente en la colección en campo
- la necesidad de reemplazar la colección debido a riesgos externos (sequía, inundación, ciclones)
- la necesidad de incrementar la disponibilidad de material para propagación.

### Tamaño de la muestra

La muestra tomada de una accesión de semilla para la regeneración se debe seleccionar al azar para que represente la diversidad dentro de la accesión o colección y para incrementar la probabilidad de retener los alelos de baja frecuencia. Crossa *et al.* (1993) estimaron, como

regla general, que se necesitan de 90 a 210 semillas para para retener, con una probabilidad de entre 90 y 95%, alelos con una frecuencia génica de 0.003 a 0.05 y un número de loci entre 10 y 150. Para mantener la variación genética existente dentro de la población, las especies de polinización cruzada (alógamas) por lo general requieren un mayor número de plantas en comparación con las autopolinizadoras (autógamas) [para mayores detalles, consultar Crossa (1995)]. Sin embargo, éste no es siempre el caso, y puede depender del grado de variación dentro de las accesiones en subpoblaciones de especies autógamas.

El número mínimo de semillas requerido para la regeneración se puede estimar a partir del tamaño de muestra estándar utilizado para la regeneración y de la viabilidad de la muestra, de acuerdo con la siguiente ecuación:

Número de semillas requerido para la regeneración = Población de plantas deseada para la regeneración / (porcentaje de germinación<sup>1</sup> × porcentaje de establecimiento en campo esperado<sup>2</sup>) (ver Rao *et al.* 2006)

En los cultivos propagados por clones, cuyas plantas deben ser genéticamente idénticas dentro de la accesión, la decisión sobre el tamaño de la muestra se relaciona principalmente con la probabilidad de supervivencia de la planta en el campo, para garantizar que por lo menos algunas plantas sobrevivan hasta la cosecha y permitan volver a regenerar las accesiones. Frecuentemente se requieren sólo de 5 a 10 plantas por accesión, o más si se requieren propágulos para otros propósitos.

### **Preparación de la semilla o del material de siembra**

Cuando se preparan semillas almacenadas en un banco de germoplasma para el proceso de regeneración, hay que retirar los recipientes de las cámaras de almacenamiento los recipientes con las semillas y dejarlos a temperatura ambiente durante la noche antes de abrirlos, para evitar que en el momento en que se abran, las semillas absorban humedad de forma abrupta.

En los cultivos propagados por clones, la regeneración puede requerir diferentes partes de la planta como raíces tuberosas, lianas, tallos o retoños, entre otros. En cada caso, se aplicarán diferentes métodos de selección, corte, limpieza y almacenamiento a corto plazo o acondicionamiento antes de la siembra.

### **Cómo mantener un tamaño de población efectivo**

Uno de los principales objetivos de la regeneración es mantener un tamaño de población efectivo ( $N_e$ ) dentro de la accesión. Los métodos para calcular la desviación de  $N_e$  para (1) la colecta y la regeneración de germoplasma de especies diploides monóicas, (2) especies de polinización cruzada y (3) especies tanto autopolinizadoras como de fecundación aleatoria, han sido desarrollados por Crossa y Vencovsky (1994); Crossa y Vencovsky (1997), y Vencovsky y Crossa (1999), respectivamente.

De acuerdo con Crossa y Vencovsky (1994) y con Vencovsky y Crossa (1999), la mejor estrategia para mantener un  $N_e$  alto es tomar un número igual de semillas del mayor número posible de plantas progenitoras hembras. Colectar especies autopolinizadoras es más difícil que colectar especies de polinización cruzada. Si dentro de la accesión existen

1 El porcentaje de germinación y establecimiento en campo se debe expresar con decimales: i.e., 95% expresado como 0.95

2 El establecimiento de las plantas es por lo general 5% menor que el porcentaje de germinación en condiciones desfavorables y 1% menos en condiciones favorables

diferencias en madurez a la floración y madurez entre plantas, es mejor cosechar plantas individuales y mezclar una proporción igual de semillas de diferentes plantas progenitoras hembras para evitar los efectos maternos.

Para los cultivos propagados por medio de clones, el tamaño de la población no es tan importante porque las plantas de una misma accesión son por lo general genéticamente idénticas. Sin embargo, muchos cultivos propagados por clones tienen una cantidad importante de heterozigocidad debido a cierto nivel de exogamia natural y a la perpetuación posterior por medios vegetativos, lo cual se puede reflejar como variación entre plantas de una accesión (Vasil *et al.* 1994; Lebot y Aradhya 1992). Por tanto, se recomienda utilizar 5 a 10 plantas por accesión. Si se comprueba que son genéticamente idénticas, es más importante seleccionar el material a partir de unas pocas plantas progenitoras hembras sanas y vigorosas que a partir de un gran número de plantas de inferior calidad. El número que se siembre dependerá entonces del nivel de heterozigocidad, de la diversidad dentro de la especie, del costo de la conservación, y de las necesidades de caracterización y evaluación.

### **Selección del ambiente**

En lo posible, las accesiones de germoplasma se deben regenerar en la misma región ecológica donde se originaron. Otra alternativa es seleccionar un sitio que minimice las presiones de selección sobre los genotipos o las poblaciones. Si no se encuentran sitios apropiados, será necesario buscar la colaboración de otras instituciones que puedan proveer sitios adecuados o las instalaciones para regenerar. Es importante tener cuidado durante la regeneración y el manejo de las semillas o de los propágulos vegetativos para evitar que se contaminen con parcelas adyacentes, para minimizar el flujo de genes y para prevenir la introducción involuntaria de transgenes. Las plantas que se identifiquen como contaminantes evidentes y que no pertenezcan a la población se deben eliminar. No se deben sembrar accesiones en parcelas donde se haya sembrado anteriormente el mismo cultivo para reducir el riesgo de plantas voluntarias, así como la acumulación de plagas y enfermedades en el suelo.

Las parcelas de regeneración deben ser lo más uniforme posible y el campo debe estar bien drenado. Se debe contar siempre con un buen sistema de riego, aún para cultivos de secano, para evitar que la sequía ejerza una presión de selección y para garantizar buenos rendimientos. Se recomienda también un análisis de suelo para determinar los requerimientos de fertilización.

### **Aislamiento**

El sistema de reproducción de cada cultivo es importante. En el caso de las especies alógamas, se deben usar distancias de aislamiento adecuadas, aislamiento temporal, bolsas, jaulas y otros mecanismos. Puesto que el grado de exogamia en un número de especies vegetales está relacionado con la localidad, una buena práctica es estimar la tasa de exogamia en el lugar en que se van a regenerar las plantas para usar la técnica de polinización adecuada.

### **Manejo del cultivo**

En lo posible, se deben mantener los cultivos limpios y libres de plagas, enfermedades del suelo y malezas invasoras. Durante la preparación de las parcelas de regeneración se deben utilizar tratamientos de control apropiados, como la deshierba regular, la aspersión de herbicidas, la esterilización del suelo y el arado seguido por la aplicación de de herbicida o el arado profundo.

### **Monitoreo de la identidad de la accesión**

Todas las accesiones se deben rotular individualmente con etiquetas durables o con tinta permanente, y se deben hacer mapas de campo para poder monitorear la identidad de las accesiones durante todo el ciclo de cultivo. Para los cultivos de semilla, se recomienda mantener como referencia una muestra original de semillas en una bolsa plástica en un ambiente seco y a una temperatura de 15°C. Cuando se haya regenerado la accesión, la semilla recién cosechada se comparará con la semilla de la muestra para verificar que la accesión sea genuina al tipo. También se puede comprobar la identidad de las semillas o los propágulos regenerados comparando los datos de la caracterización original —si existen— en busca de caracteres específicos de las accesiones.

### **Cosecha**

Generalmente se cosecha en el momento de madurez óptima de la planta (posterior al de madurez fisiológica), cuando el mayor número de semillas ha alcanzado la madurez, tolera la desecación, se puede trillar con un mínimo daño mecánico, y antes de que las semillas se deterioren y se dispersen por vías naturales. [Para mayor información, consultar Rao *et al.* (2006)].

En los cultivos propagados por clones, la madurez fisiológica de la planta progenitora femenina es el criterio más importante a la hora de coleccionar propágulos para una regeneración exitosa o para conservación a corto plazo. La madurez de la parte comestible de la planta generalmente es irrelevante, cuando no coincide con la parte que se está propagando.

### **Plagas y enfermedades comunes**

Las guías proporcionan una lista de las plagas y enfermedades comunes a cada cultivo pero no incluyen todos los síntomas ni las prácticas de control. Durante la regeneración (incluyendo la cosecha y la poscosecha), el cultivo debe ser inspeccionado por un servicio de sanidad vegetal para que detecte la presencia de enfermedades transmitidas por la semilla o vegetativamente, y garantice que el material regenerado se encuentra sano y tiene la mayor viabilidad posible.

## **Referencias y lecturas adicionales**

- Crossa J. 1995. Sample size and effective population size in seed regeneration of monoecious plants. En: Engels JMM, Ramanatha RR, editores. Regeneration of seed crops and their wild relatives. Memorias de una reunión de consulta 4-7 diciembre de 1995, ICRISAT, Hyderabad, India. International Plant Genetic Resources Institute, Roma, Italia. pp.140–143.
- Crossa J, Hernández CM, Bretting P, Eberhart SA, Taba S. 1993. Practical considerations for maintaining germplasm in maize. *Theoretical and Applied Genetics* 86:673–678.
- Crossa J, Vencovsky R. 1994. Implications of the variance effective population size on the genetic conservation of monoecious species. *Theoretical and Applied Genetics* 89:936–942.
- Crossa J, Vencovsky R. 1997. Variance Effective Population Size for Two-Stage Sampling of Monoecious Species. *Crop Science* 37:14–26.
- Engels JMM, Visser L, editores. 2007. Guía para el manejo eficaz de un banco de germoplasma. Manuales para Bancos de Germoplasma No. 6. Bioversity International, Roma, Italia. Disponible en <http://www.bioversityinternational.org/fileadmin/bioversity/publications/pdfs/1280.pdf>.

- FAO/IPGRI. 1994. Normas para Bancos de Genes. FAO e IPGRI, Roma, Italia. 13p. Disponible en <http://www.biodiversityinternational.org/fileadmin/biodiversity/publications/pdfs/1250.pdf>.
- FAO. 1998. The state of the world's plant genetic resources for food and agriculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma, Italia.
- Hanson J. 1985. Practical Manuals for Genebanks: Procedures for Handling Seeds in Genebanks. International Board for Plant Genetic Resources, Roma, Italia.
- ISTA. 2008 International rules for seed testing. International Seed Testing Association. ISTA Secretariat, CH-Suiza.
- Lebot V, Aradhya KM. 1992. Collecting and evaluating taro *Colocasia esculenta* for isozyme variation. FAO/IBPGR Plant Genetic Resources Newsletter 90:47–49.
- Rao NK, Hanson J, Dulloo ME, Ghosh K, Nowell D y Larinde M. 2007. Manual para el manejo de semillas en bancos de germoplasma. Manuales para Bancos de Germoplasma No. 8. Biodiversity International, Roma, Italia. Disponible en <http://www.biodiversityinternational.org/fileadmin/biodiversity/publications/pdfs/1261.pdf>.
- Reed BM, Engelmann F, Dulloo ME, Engels JMM. 2004. Technical guidelines for the management of field and *in vitro* germplasm collections. Handbook for Genebanks No 7. International Plant Genetics Resources Institute, Roma, Italia.
- Sackville Hamilton NR, Chorlton KH. 1997. Regeneration of accessions in seed collections: a decision guide. Handbook for Genebanks No. 5. International Plant Genetic Resources Institute, Roma, Italia.
- Soest LJM van. 1990. Plant Genetic Resources: Safe for the future in genebanks. Impact of Science on Society 158:107–120.
- Vasil IK, Thorpe TA, editores. 1994. Plant Cell and Tissue Culture. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht and Boston (Massachusetts). 604pp.
- Vencovsky R, Crossa J. 1999. Variance Effective Population Size under Mixed Self and Random Mating with Applications to Genetic Conservation of Species. Crop Science 39:1282–1294.

### Citación correcta

Dulloo M.E., Hanson J., Jorge M.A., and Thormann I. 2008. Guías para la regeneración de germoplasma: lineamientos generales y principios orientadores. En: Dulloo M.E., Thormann I., Jorge M.A. and Hanson J., editors. Crop specific regeneration guidelines [CD-ROM]. CGIAR System-wide Genetic Resource Programme (SGRP), Rome, Italy. 7 pp.