

Normas para bancos de germoplasma

de recursos fitogenéticos para
la alimentación y la agricultura



COMISIÓN DE
RECURSOS GENÉTICOS
PARA LA ALIMENTACIÓN Y
LA AGRICULTURA



Normas para bancos de germoplasma

de recursos fitogenéticos para
la alimentación y la agricultura

Las denominaciones empleadas en este producto informativo y la forma en que aparecen presentados los datos que contiene no implican, por parte de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), juicio alguno sobre la condición jurídica o nivel de desarrollo de países, territorios, ciudades o zonas, o de sus autoridades, ni respecto de la delimitación de sus fronteras o límites. La mención de empresas o productos de fabricantes en particular, estén o no patentados, no implica que la FAO los apruebe o recomiende de preferencia a otros de naturaleza similar que no se mencionan.

Las opiniones expresadas en este producto informativo son las de su(s) autor(es), y no reflejan necesariamente los puntos de vista o políticas de la FAO.

ISBN 978-92-5-307855-4 (edición impresa)

E-ISBN 978-92-5-307856-1 (PDF)

© FAO, 2013

La FAO fomenta el uso, la reproducción y la difusión del material contenido en este producto informativo. Salvo que se indique lo contrario, se podrá copiar, imprimir y descargar el material con fines de estudio privado, investigación y docencia, o para su uso en productos o servicios no comerciales, siempre que se reconozca de forma adecuada a la FAO como la fuente y titular de los derechos de autor y que ello no implique en modo alguno que la FAO aprueba los puntos de vista, productos o servicios de los usuarios.

Todas las solicitudes relativas a la traducción y los derechos de adaptación así como a la reventa y otros derechos de uso comercial deberán dirigirse a www.fao.org/contact-us/licence-request o a copyright@fao.org.

Los productos de información de la FAO están disponibles en el sitio web de la Organización (www.fao.org/publications) y pueden adquirirse mediante solicitud por correo electrónico a publications-sales@fao.org.

Citación: FAO. 2013. *Normas para bancos de germoplasma de recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura*. Roma.

Cubierta:

Triticum spp.

Capsicum annuum

Anacardium occidentale

Carica papaya

Zea mays

Oryza sativa

Punica granatum

Colocasia esculenta

Phaseolus vulgaris

Araucaria angustifolia

Chenopodium quinoa

Cucurbita maxima

Brachycton populneus

Phaseolus vulgaris

ÍNDICE

Agradecimientos.....	vi
Prólogo	viii
Prefacio	x
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. PRINCIPIOS FUNDAMENTALES.....	7
3. NORMAS: ESTRUCTURA Y DEFINICIONES.....	15
4. NORMAS PARA BANCOS DE GERMOPLASMA DE SEMILLAS ORTODOXAS.....	17
4.1 Normas para la adquisición de germoplasma.....	18
4.2 Normas para el secado y el almacenamiento	24
4.3 Normas para el control de la viabilidad de las semillas	30
4.4 Normas para la regeneración.....	36
4.5 Normas para la caracterización	41
4.6 Normas para la evaluación	45
4.7 Normas para la documentación.....	50
4.8 Normas para la distribución y el intercambio.....	53
4.9 Normas para la duplicación de seguridad.....	57
4.10 Normas para la seguridad y el personal.....	61
5. NORMAS PARA BANCOS DE GERMOPLASMA DE CAMPO	65
5.1 Normas para la elección de la ubicación del banco de germoplasma de campo	66
5.2 Normas para la adquisición de germoplasma.....	70
5.3 Normas para el establecimiento de colecciones de campo.....	76
5.4 Normas para el manejo en campo	82
5.5 Normas para la regeneración y la propagación	87
5.6 Normas para la caracterización	91
5.7 Normas para la evaluación	96
5.8 Normas para la documentación.....	101
5.9 Normas para la distribución	105
5.10 Normas para la seguridad y la duplicación de seguridad	109

6. NORMAS PARA BANCOS DE GERMOPLASMA DE CULTIVO <i>IN VITRO</i> Y CRIOPRESERVACIÓN	115
6.1 Normas para la adquisición de germoplasma.....	121
6.2 Normas para las pruebas de comportamiento no ortodoxo y valoración del contenido hídrico, el vigor y la viabilidad	126
6.3 Normas para el almacenamiento hidratado de semillas recalcitrantes	130
6.4 Normas para el cultivo <i>in vitro</i> y el almacenamiento en crecimiento lento.....	134
6.5 Normas para la criopreservación	139
6.6 Normas para la documentación.....	149
6.7 Normas para la distribución y el intercambio.....	152
6.8 Normas para la seguridad y la duplicación de seguridad	155
ANEXO 1. LISTA DE SIGLAS Y ABREVIATURAS	160
ANEXO 2. GLOSARIO	162



Agradecimientos

La preparación y publicación de *Las Normas para bancos de germoplasma de recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura* ha sido posible gracias a la contribución de muchas personas. Este proceso ha involucrado la contribución de los puntos focales nacionales para los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura, así como científicos de las organizaciones nacionales e internacionales. La FAO aprovecha esta oportunidad para agradecerles sinceramente por el tiempo, el compromiso y la pericia.

Las Normas de los bancos de germoplasma fueron preparadas por la División de Producción y Protección Vegetal de la FAO y bajo la supervisión de Kakoli Ghosh. Durante su preparación, el equipo de la FAO - Kakoli Ghosh, Arshiyah Noorani y Chikelu Mba - colaboró estrechamente con Ehsan Dulloo, Imke Thormann y Jan Engels de Bioversity International, quienes merecen una mención especial. Se le agradece también a Jane Toll del Global Crop Diversity Trust, y a Patricia Berjak y Norman Pammenter de la Universidad de KwaZulu-Natal por sus excelentes contribuciones. Muchos funcionarios de la FAO aportaron valiosas contribuciones incluyendo: Linn Borgen-Nilsen, Stefano Diulgheroff, Alison Hodder, Dan Leskien, NeBambi Lutaladio, Dave Nowell, Michela Paganini y Álvaro Toledo.

Nos gustaría reconocer y agradecer a los científicos que revisaron *Las Normas de los bancos de germoplasma*:

Ananda Aguiar, Adriana Alercia, Nadiya AlSaadi, Ahmed Amri, Catalina Anderson, Miriam Andonie, Åsmund Asdal, Sarah Ashmore, Araceli Barceló, Maria Bassols, M. Elena González Benito, Erica E. Benson, Benoit Bizimungu, Peter Bretting, Zofia Bulinska, Marilia Burle, Patrícia Bustamante, Emilia Caboni, Lamis Chalak, Rekha Chaudhury, Xiaoling Chen, Andrea M. Clausen, Carmine Damiano, Hadyatou Dantsey-Barry, Maria Teresa Merino De Hart, Axel Diederichsen, Carmen del Río, Ariana Digilio, Sally Dillon, Andreas W. Ebert, David Ellis, Richard Ellis, Florent Engelmann, Epp Espenberg, Francisco Ricardo Ferreira, Brad Fraleigh, R. Jean Gapusi, Massimo Gardiman, Tatjana Gavrilenko, Daniela Giovannini, Agnes Grapin, Badara Gueye, Eva Hain, Magda-Viola Hanke, Jean Hanson, Keith Harding, Siegfried Harrer, Ir Haryono, Fiona R. Hay, Monika Höfer, Kim Ethel Hummer, Salma Idris, Brian M. Irish, Joseph Kalders, Joachim Keller, Maurizio Lambardi, Ulrike Lohwasser, Judy Loo, Xinxiong Lu, Carmen Martín, Rusudan Mdivani, Carlos Miranda, Javad Mozafari, Gregorio Muñoz, Godfrey Mwila, Fawzy Nawar, Normah M. Noor, Dorota Nowosielska, Anna Nukari, Sushil Pandey, Maria Papaefthimiou, Wiesław Podyma, Lerotholi Qhobela, Robin Probert, Alain Ramanantsoanirina, Morten Rasmussen, B.M.C. Reddy, Bob Redden, Barbara M. Reed, Harriet Falck Rehn, Ken Richards, Maria Victoria Rivero, Jonathan Robinson, Manuel Sigüeñas Saavedra, Izulmé Rita Santos, Viswambharan Sarasan, Sarah Sensen, Fabiano Soares, Artem Sorokin, Chisato Takashina, Ayfer Tan, Mary Taylor, Mohammed Tazi, Bradley J. Till, Roberto Tuberosa, Rishi Kumar Tyagi, Theo van Hintum, Nguyen Van Kien, Bert Visser, Juan Fajardo Vizcayno, Christina Walters, Wei Wei, Fumiko Yagihashi, y Francis Zee.

Deseamos expresar un especial agradecimiento a Petra Staberg y a Pietro Bartoleschi y a su equipo por el diseño de la publicación. También deseamos dar las gracias a Munnavara Khamidova, Sitora Khakimova, Diana Gutierrez Mendez y Suzanne Redfern por la contribución aportada.

Ciertamente hay muchos otros que merecen una mención. Nuestras disculpas y agradecimiento a todas aquellas personas que proporcionaron asistencia y apoyo a la preparación de *Las Normas de los bancos de germoplasma* cuyos nombres han sido omitidos inadvertidamente.



Prólogo

Los recursos fitogenéticos son un recurso estratégico en el corazón de la producción agrícola sostenible. Su conservación y uso eficientes son fundamentales para salvaguardar la seguridad alimentaria y nutricional, ahora y en el futuro. Para cumplir este desafío se requerirá un flujo continuo de cultivos mejorados y variedades adaptadas a condiciones de agro-ecosistemas particulares. La pérdida de la diversidad genética reduce las opciones para la gestión sostenible de la agricultura resistente, ante entornos adversos, y condiciones meteorológicas que fluctúan rápidamente.

La buena gestión de los bancos de germoplasma salvaguardan la diversidad genética y la ponen a disposición de los mejoradores. Las *Normas para bancos de germoplasma de recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura*, preparadas bajo la dirección de la Comisión de la FAO de Recursos Genéticos para la Alimentación y la Agricultura, y aprobadas en su decimocuarto período de sesiones de 2013, establecen las normas que deben seguirse para la conservación de los recursos fitogenéticos. La Comisión las reconoce como un valor universal en la conservación de germoplasma en todo el mundo.

Las *Normas* voluntarias abarcan tanto las semillas en bancos de germoplasma como la multiplicación vegetativa del material de siembra, incluso en los bancos de germoplasma de campo. Ellas constituyen el punto de referencia para las mejores prácticas científicas y técnicas actuales, y reflejan los instrumentos internacionales claves de política para la conservación y utilización de los recursos fitogenéticos. Son una herramienta importante en la ejecución del *Tratado Internacional sobre los Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura*, y un componente de apoyo del *Segundo Plan de acción mundial para los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura*. La gran parte de las 7,5 millones de accesiones de banco de germoplasma del mundo son de los cultivos de los cuales los seres humanos y el ganado más dependen como alimentos y piensos, que incluyen las especies silvestres y variedades locales importantes, pero también otra parte son de los cultivos de importancia local y las especies infrautilizadas.

Las *Normas* fomentan la gestión activa de los bancos de germoplasma, y proporcionan un conjunto de enfoques complementarios. Reconociendo que en el mundo más de 1.750 bancos de germoplasma que difieren en el tamaño de sus colecciones y de recursos humanos y financieros disponibles, estas les ayudarán a los encargados de los bancos de germoplasma lograr un equilibrio entre los objetivos científicos, los recursos disponibles y las condiciones objetivas bajo las que trabajan. Ante la limitada capacidad y la infraestructura inadecuada, el reto al que se enfrentan muchos países en desarrollo para garantizar la conservación segura a largo plazo, hace de ella un desafío difícil.

El valor de la conservación de los recursos genéticos de los cultivos se realiza sólo a través de su uso eficaz. Esto requiere fuertes vínculos a lo largo de la cadena de la conservación y colección *in situ* de recursos, a través del almacenamiento en bancos de germoplasma, mediante la investigación y el mejoramiento, entre los agricultores y a sus comunidades, y en última instancia, a los consumidores. Los responsables de los

bancos de germoplasma, los mejoradores, y los programas nacionales deben trabajar conjuntamente para asegurar la conservación eficaz y sostenible de los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura de los cuales la humanidad depende. Se debe realizar una debida ejecución a nivel nacional y regional, a fin de que estas *Normas* internacionales cruciales puedan cumplir el objetivo de garantizar la seguridad alimentaria.



Ren Wang

Subdirector General

Departamento de Agricultura y Protección del Consumidor



Prefacio

Los bancos de germoplasma desempeñan un papel clave en la conservación, la disponibilidad y el uso de una amplia gama de diversidad fitogenética para la mejora de los cultivos para la seguridad alimentaria y nutricional. Sirven de puente entre el pasado y el futuro, asegurando la disponibilidad continua de los recursos genéticos para la investigación, la reproducción y la mejora de suministro de semillas para un sistema agrícola sostenible y resiliente. Una gestión eficaz de los bancos de germoplasma, aplicando las *normas* y procedimientos, es esencial para la conservación y el uso sostenible de los recursos fitogenéticos.

Las *Normas para bancos de germoplasma de recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura* (Normas relativas a los bancos de germoplasma) proporcionan las normas internacionales para la conservación *ex situ* en bancos de semillas, bancos de germoplasma de campo y de *in vitro* y crioconservación. El Equipo de Recursos Fitogenéticos y Semillas prepararon las Normas bajo la dirección de la Comisión de Recursos Genéticos para la Alimentación y la Agricultura. Durante la fase preparatoria, se actualizaron las normas para las semillas ortodoxas y se desarrollaron otras para los bancos de germoplasma de campo y de *in vitro* y crioconservación en consulta con el GICIAI, en particular, Bioversity International. Los responsables de los bancos de germoplasma, instituciones académicas y de investigación pertinentes, los puntos focales nacionales de recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura han contribuido a proporcionar información valiosa. Esto también es cierto para las Secretarías del Tratado Internacional sobre los Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura y la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria. En su decimocuarto período de sesiones de 2013, la Comisión aprobó las *Normas relativas a los bancos de germoplasma* e instó a su adopción universal.

El objetivo de las Normas relativas a los bancos de germoplasma es la conservación de los recursos fitogenéticos bajo condiciones que cumplan con las normas reconocidas y apropiadas basadas en el conocimiento científico y tecnológico actual y disponible. Todas las normas se basan en principios básicos que acomunan todos los diferentes tipos de bancos de germoplasma. También se toman en cuenta los cambios en el manejo de semillas y las técnicas debido a los avances en biología molecular y bioinformática. Para la mejora de la gestión de los bancos de germoplasma y la optimización de los recursos se incorporan los avances en el campo de la documentación y los sistemas de información que se están volviendo cada vez más importantes. Una narrativa que describe el contexto, los aspectos técnicos, las contingencias y las referencias seleccionadas de manuales técnicos y protocolos, apoya cada norma en el documento cuando es pertinente.

Las *Normas* relativas a los bancos de germoplasma son lo suficientemente genéricas de manera que se pueden aplicar a todos los bancos de germoplasma y deberán ser utilizadas conjuntamente con la información específica de la especie. Esto es particularmente válido para las plantas que producen semillas no ortodoxas y/o que se

propagan de forma vegetativa, ya que es difícil establecer normas específicas que sean válidas para todas aquellas especies ya que presentan diferentes comportamientos de almacenamiento de semillas, diferentes formas biológicas y diferentes ciclos de vida. Las Normas son voluntarias y no vinculantes, y hacen hincapié en la importancia de obtener y compartir el material junto con la documentación relacionada en consonancia con las normas nacionales e internacionales. Será de gran utilidad que las normas se revisen periódicamente tomando en cuenta las políticas y los paisajes técnicos cambiantes.

La conservación y el aumento de la utilización sostenible de los recursos fitogenéticos son necesarios para lograr la seguridad alimentaria y hacer frente a las necesidades nutricionales de las generaciones presentes y futuras. Por lo tanto, es necesario conservar la diversidad de los recursos fitogenéticos para que estén disponibles para la comunidad global.

Sin embargo, el mantenimiento de los bancos de germoplasma puede ser costoso. Muchos de los avances científicos, como la crioconservación, tienen un costo, especialmente cuando se utilizan para realizar pruebas a gran escala. El mantenimiento de los bancos de germoplasma de campo es exigente sea en términos de mano de obra como en el costo. Por lo tanto, se debe hacer hincapié en una gestión proactiva de los bancos de germoplasma adoptando un enfoque complementario, y lograr un óptimo equilibrio entre las consideraciones científicas, el personal disponible, la infraestructura y los recursos financieros bajo las condiciones actuales. En muchos países, siguen siendo un desafío la disponibilidad de personal capacitado y de suficientes recursos para mantener las colecciones de los bancos de germoplasma de manera sostenible. Para aplicar las normas serán necesarias asociaciones a largo plazo a nivel nacional, regional y mundial, junto con los recursos para el desarrollo de capacidades.



112

600148

600148

112
600148

600148

600148



Capítulo 1

Introducción





Los bancos de germoplasma de todo el mundo poseen colecciones muy diversas de recursos fitogenéticos, y su objetivo general es la conservación a largo plazo y la accesibilidad del germoplasma vegetal para los fitomejoradores, investigadores y otros usuarios. Los recursos fitogenéticos constituyen el material de partida para el mejoramiento de cultivos, y su conservación y uso es esencial para la seguridad alimentaria y nutricional mundial. La conservación sostenible de estos recursos fitogenéticos depende de una gestión eficaz y eficiente de los bancos de germoplasma mediante la aplicación de normas y procedimientos que aseguren la continua supervivencia y disponibilidad de los recursos fitogenéticos.

Las *Normas para bancos de germoplasma de recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura* tienen su origen en la revisión de las *Normas para bancos de genes* de la FAO/IPGRI, publicadas en 1994. Esta revisión se llevó a cabo a petición de la Comisión de Recursos Genéticos para la Alimentación y la Agricultura (CRGAA) a la luz de los cambios acaecidos en el panorama de las políticas a nivel mundial y los avances realizados en el campo de la ciencia y la tecnología. Los principales cambios en las políticas que inciden en la conservación de los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura (RFAA) en bancos de germoplasma se enmarcan en el contexto de la disponibilidad y distribución de germoplasma a raíz de la aprobación de varios instrumentos internacionales, como el Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB), el Tratado Internacional sobre los Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura (TIRFAA), la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (CIPF) y el Acuerdo sobre la Aplicación de Medidas Sanitarias y Fitosanitarias de la OMC. En 2010, el CDB adoptó el Protocolo de Nagoya sobre Acceso a los Recursos Genéticos y Participación Justa y Equitativa en los Beneficios que se deriven de su Utilización, que podría incidir en el intercambio de germoplasma. En el ámbito científico, los progresos en la tecnología de almacenamiento de semillas, la biotecnología y la tecnología de la información y la comunicación han añadido una nueva dimensión a la conservación del germoplasma vegetal.

El propósito de las *Normas para bancos de germoplasma de recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura* es servir como directrices para los bancos de germoplasma que conservan colecciones vegetales (semillas, plantas vivas o explantos). La base de su elaboración fue un conjunto de consultas con un gran número de expertos de todo el mundo en conservación de semillas, criopreservación, conservación *in vitro* y colecciones de campo. Las *Normas* son voluntarias y no vinculantes, y no se han elaborado a través de un procedimiento formal de establecimiento de normas. Deben considerarse como objetivos para una conservación *ex situ* eficiente, eficaz y racional que permita un mantenimiento óptimo de la viabilidad y la integridad genética de las semillas en bancos de germoplasma, y garantice así el acceso a semillas de alta calidad de los recursos fitogenéticos conservados así como el uso de las mismas.

Es importante que estas *Normas* no se utilicen sin sentido crítico, porque hay continuos avances tecnológicos en los métodos de conservación, muchos de ellos específicos para especies particulares, así como en el contexto del objetivo y el período de conservación y uso de germoplasma. Por ello se recomienda que las *Normas* se utilicen conjuntamente con otras fuentes de referencia, en particular en lo relativo a la información sobre especies concretas. Esto es especialmente cierto para las plantas que producen semillas no ortodoxas y/o que se propagan de forma vegetativa, las cuales presentan diferentes comportamientos en la conservación de semillas, diferentes formas biológicas (herbáceas, arbustivas, arbóreas, trepadoras) y diferentes ciclos de vida (anual, bienal, perenne) por lo que resulta difícil establecer normas específicas que sean válidas para todas las especies.

El presente documento se divide en dos partes. En la primera parte se describen los principios fundamentales en los que se sustentan las *Normas* y que proporcionan el marco general para una gestión eficaz y eficiente de bancos de germoplasma. Los principios fundamentales que constituyen el núcleo de las actividades de un banco de germoplasma son la preservación de la identidad del germoplasma, el mantenimiento de la viabilidad y la integridad genética, y el fomento del acceso. Esto incluye la información correspondiente para facilitar el uso del material vegetal almacenado de conformidad con los instrumentos normativos nacionales e internacionales pertinentes. Los principios fundamentales son comunes a todos los tipos de bancos de germoplasma.

La segunda parte presenta las normas detalladas para tres tipos de bancos de germoplasma: bancos de semillas, bancos de campo y bancos de conservación *in vitro* y de criopreservación. Estas normas abarcan las principales operaciones que se llevan a cabo en el banco de germoplasma e incluyen una bibliografía seleccionada. Si bien se ofrece la información técnica relevante para cada una de las normas, es importante destacar que para desarrollar procedimientos y protocolos se deben consultar los manuales técnicos apropiados. Las normas para bancos de semillas (Capítulo 4) tratan la conservación de semillas ortodoxas que toleran la desecación, es decir que pueden ser sometidas a una deshidratación a niveles bajos de contenido hídrico y que responden a las bajas temperaturas. La reducción de la humedad y de la temperatura disminuye el ritmo de los procesos metabólicos, aumentando así la longevidad de las semillas. Algunos ejemplos de plantas con semillas ortodoxas son el maíz (*Zea mays* L.), el

trigo (*Triticum* spp.), el arroz (*Oryza* spp.), el garbanzo (*Cicer arietinum*), el algodón (*Gossypium* spp.) y el girasol (*Helianthus annuus*).

En los capítulos 5 y 6 se presentan respectivamente las normas para bancos de germoplasma de campo y para bancos de conservación *in vitro* o de criopreservación, las cuales están dirigidas a la conservación de plantas que producen semillas no ortodoxas, también conocidas como semillas recalcitrantes o intermedias, y/o que se propagan de forma vegetativa. Dichas plantas no pueden ser conservadas de la misma manera que las semillas ortodoxas a baja temperatura y baja humedad, sino que requieren otros métodos de conservación *ex situ*.

La conservación en bancos de germoplasma de campo es el método que se usa con mayor frecuencia para las plantas que producen semillas no ortodoxas. También es el utilizado para plantas que producen muy pocas semillas, que se propagan de forma vegetativa y/o que requieren un ciclo de vida largo para generar material de mejora y/o de plantación. Aunque el término utilizado es “banco de germoplasma de campo”, este método también incluye el mantenimiento de plantas vivas en macetas o bandejas dentro de invernaderos o umbráculos. Existen directrices técnicas y manuales de formación disponibles para el manejo de colecciones de germoplasma en bancos de campo (por ejemplo Bioversity International *et al.*, 2011; Reed *et al.*, 2004; Said Saad y Rao, 2001; Engelmann, 1999; Engelmann y Takagi, 2000; Geburek y Turok, 2005).

La conservación *in vitro* y la criopreservación de germoplasma vegetal pueden ser mediante crecimiento lento (*in vitro*) para almacenamiento a corto o medio plazo, o criopreservación para conservación a largo plazo. El primer método consiste en cultivos (principalmente yemas terminales, meristemos, embriones somáticos, suspensiones celulares o callos embriogénicos) mantenidos bajo condiciones que limitan el crecimiento y sobre medios de cultivo artificiales. El ritmo de crecimiento de los cultivos se puede restringir por distintos métodos como la reducción de la temperatura, la disminución de la intensidad de luz o la manipulación del medio de cultivo mediante la adición de agentes osmóticos o retardantes del crecimiento (Engelmann, 1999).

La criopreservación es el almacenamiento de materiales biológicos (semillas, embriones vegetales, yemas terminales o meristemos y/o polen) a una temperatura ultra baja, normalmente la del nitrógeno líquido a -196 °C (Engelmann y Tagaki, 2000; Reed, 2010). En estas condiciones se detienen los procesos bioquímicos y la mayoría de los físicos, y los materiales pueden ser conservados durante largos periodos. Estos modos de conservación constituyen un enfoque complementario a otros métodos y son necesarios para una conservación segura, eficaz y rentable (Reed, 2010). Por ejemplo, se pueden mantener líneas criopreservadas como duplicados de colecciones de campo, como colecciones de referencia de la diversidad genética disponible de una población, y como fuente de nuevos alelos en el futuro.

Para los mencionados tipos de bancos de germoplasma se presentan las siguientes normas:

- **Normas para bancos de germoplasma de semillas ortodoxas:** adquisición de germoplasma, secado y almacenamiento de semillas, control de la viabilidad, regeneración, caracterización, evaluación, documentación, distribución, duplicación de seguridad y seguridad/personal.

- **Normas para bancos de germoplasma de campo:** elección de la ubicación, adquisición de germoplasma, establecimiento de colecciones de campo, manejo en campo, regeneración y propagación, caracterización, evaluación, documentación, distribución, seguridad y duplicación de seguridad.
- **Normas para bancos de germoplasma de cultivo *in vitro* y criopreservación:** adquisición de germoplasma, análisis del comportamiento no ortodoxo y cálculo del contenido hídrico, vigor y viabilidad, almacenamiento hidratado de semillas recalcitrantes, cultivo *in vitro* y almacenamiento en crecimiento lento, criopreservación, documentación, distribución e intercambio, seguridad y duplicación de seguridad.

BIBLIOGRAFÍA

Bioversity International, Food and Fertilizer Technology Center, Taiwan Agricultural Research Institute-Council of Agriculture. 2011. *A training module for the international course on the management and utilisation of field genebanks and in vitro collections*. TARI, Fengshan, Taiwan.

Crop genebank knowledge base: http://cropgenebank.sgrp.cgiar.org/index.php?option=com_content&view=article&id=97&Itemid=203&lang=english

Engelmann, F., eds. 1999. *Management of field and in vitro germplasm collections*. Proceedings of a Consultation Meeting, 15-20 January 1996. CIAT, Cali, Colombia and International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.

Engelmann, F. & Takagi, H., eds. 2000. *Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application*. Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Tsukuba, Japan, and International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.

Geburek, T. & Turok, J., eds. 2005. *Conservation and management of forest genetic resources in Europe*. Arbora Publishers, Zvolen, 693p.

Reed, B.M. 2010. *Plant cryopreservation. A practical guide*. Springer, New York, USA.

Reed, B.M., Engelmann, F., Dulloo, M.E. & Engels, J.M.M. 2004. *Technical guidelines for the management of field and in vitro germplasm collections*. IPGRI Handbooks for Genebanks No. 7, International Plant Genetic Resources Institute, Rome.

Said Saad, M. & Ramanatha Rao, V. 2001. *Establishment and management of a field genebank training manual*. IPGR-APO, Serdang.





Capítulo 2

Principios fundamentales





Los bancos de germoplasma que existen en todo el mundo tienen muchos objetivos básicos en común, pero sus misiones, recursos y los sistemas bajo los que operan suelen ser diferentes. Debido a ello, los encargados han de optimizar su propio sistema de funcionamiento del banco de germoplasma lo cual exige soluciones de gestión que pueden diferir sustancialmente de una institución a otra, pero que aun así están encaminadas a alcanzar los mismos objetivos. Estos principios fundamentales explican por qué razón y para qué propósito se conservan los recursos fitogenéticos, y constituyen la base para establecer las normas y los criterios esenciales para una buena gestión de un banco de germoplasma. A continuación se exponen los principales principios fundamentales de la conservación.

Identidad de las accesiones

Se debe velar para que la identidad de las accesiones de semillas conservadas en bancos de germoplasma se mantenga a lo largo de los distintos procesos, desde la adquisición hasta el almacenamiento y la distribución. La correcta identificación de las muestras de semillas conservadas en bancos de germoplasma exige una documentación cuidadosa de los datos e información relativos al material. Este proceso comenzará con el registro de los datos de pasaporte y de la información de la recolección o del donante, si procede. Cuando sea posible también deberá registrarse esta información para las colecciones más antiguas de los bancos de germoplasma cuyos datos de pasaporte no se hayan registrado anteriormente o estén incompletos. A menudo las fichas de herbarios y las colecciones de semillas de referencia pueden desempeñar un papel importante en la correcta identificación de muestras de semillas. La identificación de accesiones en el campo es especialmente importante ya que un etiquetado inadecuado puede ser causa de una importante erosión genética. El etiquetado de campo debe también complementarse con planos de distribución de campo adecuadamente documentados para garantizar la apropiada identificación de las accesiones en los bancos de campo. Las etiquetas de campo son susceptibles a pérdidas

por distintos factores externos como los fenómenos climatológicos adversos. Las técnicas modernas, como las etiquetas de accesiones con códigos de barras impresos, las etiquetas de identificación por radiofrecuencia y los marcadores moleculares, pueden facilitar enormemente la gestión del germoplasma al reducir la posibilidad de errores, garantizando así la identidad de las accesiones en cuestión.

Mantenimiento de la viabilidad

El mantenimiento de la viabilidad, la integridad genética y la calidad de las muestras de semillas en los bancos de germoplasma, así como su puesta a disposición para su uso, es el fin último de la gestión de los bancos de germoplasma. Es, por tanto, de suma importancia que todos los procesos de los bancos de germoplasma observen las normas necesarias para garantizar que se mantengan niveles aceptables de viabilidad. Para cumplir estos objetivos, debe prestarse especial atención a las normas sobre adquisición, procesamiento y almacenamiento de germoplasma. En semillas recalcitrantes y otros tipos de semillas no ortodoxas, la valoración de la viabilidad se realiza inspeccionando visualmente la falta de daños, y estimando la tasa y los niveles totales de germinación. Sin embargo, la ocurrencia de hongos y bacterias macroscópicamente indetectables dentro de las semillas puede suponer un peligro para la calidad de la semilla. En los bancos de germoplasma de semillas, las muestras de semillas aceptadas en los bancos en el momento de la adquisición deberán tener en términos generales una alta viabilidad y, cumplir en la medida de lo posible, con las normas para la adquisición de germoplasma. La recolección de las semillas en el momento más próximo a la maduración y antes de la diseminación natural, evitando la recolección de semillas diseminadas en el suelo o que estén dañadas y puedan tener hongos o bacterias saprófitos o patógenos, puede asegurar la máxima calidad fisiológica de la semilla. Los bancos de germoplasma también deben garantizar que el germoplasma recolectado sea representativo a nivel genético de la población original y tener en cuenta el número de propágulos vivos, de modo que la calidad de la muestra no se vea afectada. Deberá haber un sistema de control para comprobar el estado de viabilidad de las muestras almacenadas a intervalos apropiados en función de la longevidad prevista de las semillas. Podrá reducirse la frecuencia de la regeneración si se presta la debida atención a la manipulación, el secado y el almacenamiento después de la recolección. En el contexto de la conservación en colecciones de campo el término propagabilidad (es decir, la cualidad o facultad de poder ser propagado) es más apropiado que el término viabilidad, el cual se refiere específicamente a la capacidad que tienen las semillas de germinar y producir una plántula. Los bancos de germoplasma de campo son vulnerables al impacto de factores ambientales como las condiciones climáticas o la incidencia de plagas, y los efectos pueden ser distintos según el tipo de especie y el ciclo de crecimiento (anual, bienal o perenne). En el caso de especies con semillas cuyo comportamiento en el almacenamiento (recalcitrante, no ortodoxa u ortodoxa) se desconoce, un factor adicional es el requisito previo de conocer la respuesta de la semilla (generalmente a la deshidratación lenta) antes de poner en marcha cualquier estrategia de conservación de germoplasma.

Mantenimiento de la integridad genética

La necesidad de mantener la integridad genética está estrechamente relacionada con el mantenimiento de la viabilidad y la diversidad de la muestra original recolectada. Todos los procesos de los bancos de germoplasma, desde la recolección y adquisición hasta el almacenamiento, la regeneración y la distribución, son importantes para el mantenimiento de la integridad genética. Asegurar el mantenimiento de la viabilidad en cumplimiento de las Normas contribuye al mantenimiento de la integridad genética. Para evaluar si la estabilidad genómica se ha mantenido, especialmente cuando las muestras son recuperadas de criopreservación, es necesario aplicar diversas técnicas moleculares, incluyendo estudios sobre los posibles cambios epigenéticos reversibles o irreversibles. En los casos de plantas que necesitan largos períodos entre la siembra y la madurez reproductiva, la regeneración de semillas en el campo podría resultar muy poco práctica. Cuando aparecen señales de disminución del vigor y la viabilidad se debe llevar a cabo la repetición del muestreo de la población original. El mantenimiento de la integridad genética es igualmente importante para el germoplasma conservado *in vitro*, especialmente de cara al riesgo de variación somaclonal. Esta es la principal razón por la cual se debe evitar la embriogénesis somática indirecta (por ejemplo mediante una fase de callo) en la generación de formas de germoplasma para su conservación, excepto cuando no exista otra alternativa. Durante la adquisición, y en la medida de lo posible, deberán obtenerse muestras de semillas suficientemente representativas, de buena calidad y en cantidad suficiente. Sin embargo, se admite que cuando el objetivo es recolectar caracteres específicos, no es necesario que la muestra sea representativa de la población original. Para reducir al mínimo la erosión genética es importante seguir los protocolos recomendados¹ para la regeneración de las accesiones de semillas, con el menor número posible de ciclos de regeneración, tamaños efectivos de poblaciones suficientemente grandes, muestreos equilibrados, así como control de la polinización. Debe hacerse especial mención aquí a la importancia de la duplicación por razones de seguridad para hacer frente a los riesgos que pueda haber en las instalaciones de los bancos de germoplasma.

Mantenimiento de la sanidad del germoplasma

Los bancos de germoplasma deben esforzarse por garantizar que las semillas que conservan y distribuyen están libres de enfermedades transmitidas por semillas y plagas reglamentadas (bacterias, virus, hongos e insectos). Normalmente las superficies externas pueden eliminarse de forma eficaz mediante procedimientos de

1 Dulloo, M.E., Hanson, J., Jorge, M.A. y Thormann, I. 2008. Regeneration guidelines: general guiding principles. In: M.E. Dulloo, I. Thormann, M.A. Jorge y J. Hanson, eds. *Crop specific regeneration guidelines. CGIAR System-wide Genetic Resource Programme (SGRP)*, Roma, Italia. 6 pp. Ver también <http://cropgenebank.sgrp.cgiar.org/>

desinfección superficial. A menudo, los bancos de germoplasma carecen de la capacidad y los recursos necesarios para estudiar si las muestras recolectadas o adquiridas y las muestras recolectadas en las parcelas de regeneración/multiplicación están libres de enfermedades transmitidas por semillas y plagas. Esto ocurre de forma especial con el germoplasma recibido de terceros. En la conservación de especies de semillas recalcitrantes estos problemas se acentúan. Los contaminantes que portan las semillas recalcitrantes en su interior solamente se manifiestan cuando las semillas se mantienen en condiciones de almacenamiento hidratado a corto o medio plazo, o cuando los explantos derivados de semillas se llevan a cultivo de tejidos. La solución, si bien poco satisfactoria, consiste en descartar cualquier semilla o explanto contaminado, ya que es la única manera de asegurar que el germoplasma no está contaminado. Por lo tanto, cuando se lleve a cabo el intercambio de germoplasma es importante que los materiales de semillas vayan acompañados de los certificados de importación y fitosanitarios correspondientes para garantizar el estado sanitario de las muestras recibidas. La limpieza de algunas muestras infectadas o infestadas puede ser fácil, mientras que otras pueden requerir de métodos de limpieza más sofisticados.

Seguridad física de las colecciones

Un principio fundamental de la conservación de germoplasma es que las estructuras físicas de las instalaciones del banco de germoplasma en el que se conserve el germoplasma permitan proteger los materiales contra factores externos, como los desastres naturales y los daños causados por humanos. Se precisan asimismo sistemas adecuados de seguridad para garantizar que los equipos de refrigeración de los bancos de germoplasma así como los generadores de seguridad y los equipos de control del suministro eléctrico se encuentren en buenas condiciones de funcionamiento y se disponga de dispositivos de control para realizar un seguimiento a lo largo del tiempo de los parámetros esenciales. Dado que el almacenamiento criogénico requiere nitrógeno líquido, siempre debe haber suficientes suministros disponibles de este producto. Además resulta vital mantener los niveles necesarios de nitrógeno líquido de forma manual o automática, tanto si se realiza recarga de los tanques especiales de almacenamiento como si se utilizan refrigeradores de nitrógeno líquido. Otra cuestión de seguridad importante para los bancos de germoplasma es asegurar que los materiales estén duplicados de manera segura en otros lugares, de modo que si por cualquier motivo se produce una pérdida en la colección, el material pueda reconstituirse a partir de los conjuntos duplicados.

Disponibilidad y uso del germoplasma

El material conservado deberá estar disponible para su uso en el momento de que se trate y en el futuro. Por lo tanto, es importante que todos los procesos en las operaciones y gestión de los bancos de germoplasma contribuyan a este objetivo. Será necesario mantener

cantidades suficientes de semillas e información relacionada sobre las accesiones. En el caso de los bancos de germoplasma de campo, a pesar de que el número de individuos por accesión es bajo y por lo tanto la capacidad de distribución a los usuarios es limitada, el banco de germoplasma debe tener preparada una estrategia de multiplicación rápida de cualquier germoplasma para su distribución.

Disponibilidad de la información

Con el fin de garantizar la comunicación de la información y la justificación de las decisiones, deberá registrarse en bases de datos electrónicas toda información esencial, detallada, exacta y actualizada, tanto actual como histórica, especialmente en relación con la gestión de las accesiones individuales, con posterioridad a su adquisición. Se deberá asignar una prioridad elevada al acceso a esta información, a su disponibilidad y al intercambio de esta, ya que permite una conservación mejor y más racional. Las bases de datos interactivas con funciones de consulta y búsqueda, y con datos de evaluación fenotípica, pueden ayudar a los usuarios del germoplasma a orientar sus solicitudes, y a su vez la información que éstos aportan con datos de evaluaciones posteriores incrementan el valor y la utilidad de la colección. Si se puede disponer de información sobre el germoplasma conservado y acceder con facilidad a esta, se mejorará el uso del germoplasma. Además ello ayudará a los encargados de las colecciones a planificar mejor sus actividades de multiplicación y regeneración con el fin de mantener reservas adecuadas de sus accesiones. Como sistemas de información para bancos de germoplasma se recomiendan las bases de datos interactivas con funciones de búsqueda y consulta. La base de datos SID² (por las siglas en inglés de *Seed Information Database*, Base de datos de Información de Semillas) del Banco de Semillas del Milenio de Kew ofrece un buen ejemplo del valor de este tipo de bases de datos. El sistema BRAHMS³ (por las siglas en inglés de *Botanical Research and Herbarium Management System*, Sistema de Gestión de la Investigación Botánica y Herbario) es un sistema desarrollado con el propósito de manejar datos de colecciones de germoplasma, y EURISCO⁴ es un catálogo publicado en la web que ofrece información sobre las colecciones vegetales *ex situ* de Europa.

Gestión proactiva de los bancos de germoplasma

La conservación sostenible y eficaz de recursos genéticos depende de una gestión activa del material de germoplasma conservado. Una gestión proactiva es fundamental para garantizar que el germoplasma se conserve de manera eficiente y se ponga a disposición en tiempo oportuno y en cantidad suficiente para su uso posterior por parte

2 <http://data.kew.org/sid/>

3 <http://dps.plants.ox.ac.uk/bol>

4 <http://eurisco.ecpgr.org>

de fitomejoradores, agricultores, investigadores y otros usuarios. Hace hincapié en la importancia de proteger y compartir el material y su información correspondiente, y pone en marcha una estrategia funcional para la gestión de los recursos humanos y financieros de un sistema racional. Incluye una estrategia de gestión de riesgos y fomenta las colaboraciones con terceros en la provisión de servicios a los bancos de germoplasma en los esfuerzos para conservar la biodiversidad. Debe señalarse que el mantenimiento de colecciones de campo es costoso, por lo que se deben hacer todos los esfuerzos posibles para establecer colecciones complementarias *in vitro* o en criopreservación. Es necesario observar los marcos jurídicos y normativos a nivel nacional e internacional, en particular en lo relativo al acceso, la disponibilidad y la distribución de materiales y al estado sanitario de plantas y semillas. Cuando corresponda, se deberá usar el Acuerdo normalizado de transferencia de material (ANTM) para las especies incluidas en el marco del sistema multilateral del TIRFAA. La normativa de la CIPF proporciona el marco para que las normas cuarentenarias y sanitarias eviten la introducción y propagación de plagas y enfermedades. Ante todo, se requiere un compromiso a largo plazo y continuo de las instituciones que albergan los bancos de germoplasma con respecto a la disponibilidad de recursos humanos y financieros.

Además, una gestión proactiva fomentaría la aplicación de experiencias y conocimientos prácticos al germoplasma que se incorpora al banco y trataría de aplicar las normas para los bancos de germoplasma en la medida de lo posible en las condiciones imperantes en el lugar donde radique. A veces, ello podría significar que a pesar de no cumplirse íntegramente una determinada norma, se adoptan medidas de precaución para respetar los principios fundamentales de la gestión de los bancos de germoplasma.







Capítulo 3

Normas: estructura y definiciones

Las Normas descritas en este documento definen el nivel de eficacia de la gestión ordinaria de los bancos de germoplasma por debajo del cual existe un riesgo elevado de pérdida de integridad genética (por ejemplo, una probabilidad del 5 por ciento o más de pérdida de un alelo en una accesión a lo largo del período de almacenamiento). Cada sección se divide en:

- Normas
- Contexto
- Aspectos técnicos
- Disposiciones particulares
- Bibliografía

*El **CONTEXTO** proporciona la información básica necesaria para la aplicación de las Normas. Presenta una breve descripción de la operación rutinaria de los bancos de germoplasma para la cual se definen las normas y los principios fundamentales correspondientes.*

*Los **ASPECTOS TÉCNICOS** explican los principios técnicos y científicos importantes que permiten entender y sustentan las Normas. Las **DISPOSICIONES PARTICULARES** formulan medidas para los casos en que las Normas no puedan aplicarse, por ejemplo a especies concretas. Contienen excepciones, métodos alternativos y opciones de gestión de riesgos. Se proporcionan fuentes de **INFORMACIÓN Y BIBLIOGRAFÍA** en todas las secciones.*







Capítulo 4

Normas para bancos de germoplasma de semillas ortodoxas



4.1 Normas para la adquisición de germoplasma

Normas

- 4.1.1 Todas las muestras de semillas que se incorporen a la colección del banco de germoplasma deberán haber sido adquiridas legalmente con la documentación técnica pertinente.
- 4.1.2 La recolección de semillas se deberá realizar en el momento más próximo posible a la época de maduración y antes de la diseminación natural de las semillas, evitando la posible contaminación genética, a fin de garantizar la máxima calidad de las semillas.
- 4.1.3 Para maximizar la calidad de las semillas, el plazo que mediará entre la recolección de las semillas y su traslado a un lugar de secado controlado deberá estar entre 3 y 5 días, o lo más corto posible, teniendo en cuenta que las semillas no deberán exponerse a altas temperaturas ni a una luz intensa y que algunas especies pueden tener semillas inmaduras que requieren tiempo después de la recolección para alcanzar la maduración del embrión.
- 4.1.4 Todas las muestras de semillas deberán ir acompañadas de por lo menos los datos asociados que se enumeran en los descriptores de pasaporte para cultivos múltiples de la FAO/IPGRI.
- 4.1.5 El número mínimo de plantas de las cuales se debe recolectar semilla estará entre 30 y 60, dependiendo del sistema de reproducción de las especies objetivo.

Contexto

La adquisición es el proceso de recolección o solicitud de semillas para su inclusión en el banco de germoplasma, junto con información relacionada. El material deberá adquirirse legalmente, las semillas deberán ser de alta calidad y la documentación deberá ser la apropiada.

La adquisición se realizará de conformidad con las normas internacionales y nacionales pertinentes, tales como las normas fitosanitarias y cuarentenarias, las normas de acceso del TIRFAA y el CDB, y las leyes nacionales relativas al acceso a los recursos genéticos. La observancia de la norma 4.1.1 permitirá la exportación de semillas del país de origen o del donante y la importación al país del banco de germoplasma, y determinará el régimen de gestión y distribución (por ejemplo, ANTM o acuerdos bilaterales de transferencia de material - ATM).

Se deberá asegurar la máxima calidad de las semillas y evitar la conservación de semillas inmaduras y semillas que hayan estado expuestas durante mucho tiempo a condiciones climáticas adversas. La forma en que las semillas se manipulan después de la recolección y antes de ser trasladadas a entornos controlados es fundamental para la calidad de la semilla. Unas condiciones de temperatura extremas y adversas durante el período posterior a la recolección y el transporte al banco de germoplasma pueden menoscabar rápidamente la viabilidad y reducir la longevidad durante el almacenamiento. Lo mismo ocurre con la manipulación después de la recolección en el banco de germoplasma. La calidad y la longevidad de las semillas se ven afectadas por las condiciones a las que hayan estado expuestas antes de su almacenamiento en el banco de germoplasma. Se recomienda realizar una prueba de germinación inmediatamente después de la recolección como forma de determinar la calidad de las semillas recolectadas.

Durante la fase de adquisición, es importante asegurar que los datos de pasaporte de cada accesión sean tan completos como sea posible y estén plenamente documentados, especialmente los datos de georreferenciación ya que pueden ayudar a localizar los sitios de recolección originales. Los datos de pasaporte son cruciales para identificar y clasificar la accesión y servirán de punto de partida para la selección y el uso de la accesión.

Aspectos técnicos

El acceso a los RFAA que se encuentren dentro del sistema multilateral del TIRFAA tendrá que ir acompañado de un ANTM. Los adquirentes deberán cumplir con las disposiciones pertinentes del TIRFAA o el CDB, es decir, se deberá contar con un acuerdo de transferencia de material firmado por la persona autorizada en el país de la recolección, de conformidad con las leyes nacionales de acceso a los recursos genéticos del país donde la recolección se vaya a llevar a cabo (ENSCONET, 2009). Además, cuando así lo exija el país proveedor, el acceso requerirá el consentimiento fundamentado previo del país. Las normas fitosanitarias y cualesquiera otras disposiciones relativas a la importación se deben solicitar a la autoridad nacional competente del país receptor.

Las semillas recién recolectadas del campo pueden tener alto contenido hídrico y deberán ser ventiladas para evitar que fermenten. Se deberán colocar en recipientes adecuados en los que el aire pueda circular bien, y asegurar que no se acumula agua en su interior debido a un intercambio de aire inadecuado y que no se mezclen o estropeen durante la recolección y el transporte. Para mantener la calidad de la semilla

será de utilidad el control de la temperatura y la humedad relativa para asegurar que las semillas no están expuestas a temperaturas que superen los 30°C o a una humedad relativa que exceda del 85 por ciento después de la recolección y el transporte, así como durante el procesamiento postrecolección. Si las semillas plenamente maduras necesitan ser procesadas y secadas en el campo, deberán aplicarse las recomendaciones técnicas para la especie de que se trate o especies similares a fin de reducir el riesgo de deterioro.

Deberán utilizarse formularios apropiados para registrar los datos de la recolección. La información incluida en dichos formularios deberá incluir la clasificación taxonómica inicial de la muestra, las coordenadas del lugar de recolección tomadas mediante un sistema de posicionamiento global, una descripción del hábitat de las plantas recolectadas, el número de plantas muestreadas y otros datos pertinentes que se consideren importantes para una conservación adecuada. Siempre que sea posible, deberán utilizarse los descriptores de pasaporte para cultivos múltiples de la FAO/IPGRI (Alercia *et al.*, 2001). Podrá obtenerse información adicional de gran utilidad, como las prácticas culturales, la historia de la semilla a lo largo de generaciones anteriores y su origen, usos, etc., mediante entrevistas con los agricultores cuando se recolecten las semillas en los campos o almacenes de los mismos. Durante la recolección, el recolector también deberá estar atento al posible agotamiento de la población natural objetivo de la recolección. También podrá ser útil repetir el muestreo de un sitio en particular para capturar la máxima variabilidad genética que pueda estar presente en distintos momentos a lo largo del tiempo.

La muestra recolectada deberá ser suficiente para incluir al menos una copia del 95 por ciento de los alelos existentes en la población objetivo con una frecuencia superior al 0,05 (Brown y Marshall, 1975). Una muestra aleatoria de 59 gametos no emparentados será suficiente para lograr este objetivo, y en especies con cruzamiento completamente al azar, ello equivaldrá a 30 individuos, mientras que en especies que se reproduzcan totalmente por autocruzamiento, este objetivo requerirá de 60 individuos (Brown y Hardner, 2000). Así, el tamaño de la muestra para obtener el 95 por ciento de los alelos podrá variar entre 30 y 60 plantas en función del sistema de reproducción de las especies objetivo. En la práctica, se deben recolectar cantidades de semillas adecuadas para la distribución con el fin de evitar regeneraciones frecuentes. No obstante es necesario reconocer que este objetivo puede no cumplirse siempre dependiendo del número de semillas disponibles para la recolección.

En caso de donación de las semillas (por parte de una empresa de semillas, un programa de investigación o un banco de germoplasma), además de los datos de pasaporte disponibles se deberá aportar la clasificación taxonómica y el nombre y número de identificación del donante. Deberá recabarse del donante información adecuada sobre cómo se conservó el germoplasma recibido, además de la información del pedigrí o relaciones genealógicas y de la cadena de custodia, cuando se disponga de dicha información. Las semillas deberán tener asignado un número único de identificación (ya sea temporal o permanente, de acuerdo con la práctica seguida en el banco de germoplasma) que acompañará a las semillas en todo momento y



establecerá la relación de las semillas con sus datos de pasaporte y cualquier otra información recopilada, garantizando así la autenticidad de la muestra de semillas. Siempre que sea posible, deberá tomarse un espécimen de referencia de herbario de la misma población que las muestras de semillas, y deberá hacerse constar el método y la razón de la adquisición.

Disposiciones particulares

Las semillas recolectadas en el campo rara vez están en condiciones (estado fisiológico y fitosanitario) y cantidades tales que garanticen automáticamente su conservación a largo plazo. En estos casos se recomienda la multiplicación en condiciones controladas con la finalidad específica de la conservación a largo plazo.

Cuando las colecciones contengan una proporción significativa (> 10 por ciento) de semillas o frutas inmaduras, se deberán tomar medidas para fomentar la maduración después de la recolección. Normalmente esto se puede lograr manteniendo el material en un lugar bien ventilado, en condiciones ambientales y protegido de la lluvia. Deberán seguirse los progresos visibles en la maduración y el material deberá colocarse en condiciones de secado controladas en cuanto se considere que las semillas recolectadas están más maduras.

Deberán hacerse salvedades a las normas anteriores (por ejemplo, tamaño de la muestra) para las especies silvestres y raras cuando no se disponga de semillas en condiciones o cantidades óptimas.

BIBLIOGRAFÍA

Alercia, A., Diulgheroff, S. & Metz, T. 2001. *FAO/IPGRI. Multi-Crop Passport Descriptors*. (available at [http://www.bioversityinternational.org/index.php?id=19&user_bioversitypublications_pii\[showUId\]=2192](http://www.bioversityinternational.org/index.php?id=19&user_bioversitypublications_pii[showUId]=2192)).

Brown, A.H.D. & Hardner. 2000. *Sampling the gene pools of forest trees for ex situ conservation*. In A. Young, D. Boshier and T. Boyle. *Forest conservation genetics. Principles and practice*, pp.185-196. CSIRO publishing and CABI.

Engels, J.M.M. & Visser, L., eds. 2003. *A guide to effective management of germplasm collections*. IPGRI Handbooks for Genebanks, No. 6. IPGRI, Rome, Italy.

ENSCONET. 2009. *Seed collecting manual for wild species*. ISBN: 978-84-692-3926-1 (www.ensconet.eu).

Eymann, J., Degreef, J., HŠuser, C., Monje, J.C., Samyn, Y. & VandenSpiegel, D., eds. 2010. *Manual on Field Recording Techniques and Protocols for All Taxa Biodiversity Inventories and Monitoring*, Vol. 8. (available at <http://www.abetaxa.be/volumes/volume-8-manual-atbi>).

FAO/IPGRI. 1994. *Genebank standards*. FAO and IPGRI, Rome, Italy (available at <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/meeting/015/aj680e.pdf>).

Guarino, L., Rao R., V. & Reid, R., eds. 1995. *Collecting plant genetic diversity: technical guidelines*, Wallingford, UK, CAB International on behalf of IPGRI. In association with FAO, IUCN and UNEP. 748 p.

Guerrant, E.O., Havens, K. & Maunder, M., eds. 2004. *Ex situ plant conservation: supporting species survival in the wild*. Washington, DC, Island Press.

Lockwood, D.R., Richards, C.M. & Volk, G.M. 2007. Probabilistic models for collecting genetic diversity: comparisons, caveats and limitations. *Crop Science*, 47: 859-866.

Marshall, D.R. & Brown, A.H.D. 1975. *Optimum sampling strategies in genetic resources conservation*. pp. 3-80. In O.H. Frankel & J.H. Hawkes, eds. *Crop genetic resources for today and tomorrow*. Cambridge, Cambridge University Press.

Probert, R.J. 2003. Seed viability under ambient conditions and the importance of drying. In R.D. Smith, J.D. Dickie, S.H. Linington, H.W. Pritchard & R.J. Probert, eds. *Seed conservation: turning science into practice*, pp 337-365. Kew, UK, Royal Botanic Gardens.

Probert, R., Adams, J., Coneybeer, J., Crawford, A. & Hay, F. 2007. Seed quality for conservation is critically affected by pre-storage factors. *Australian Journal of Botany*, 55: 326-335.

RBG Kew. *Millennium Seed Bank technical information sheet 04: post-harvest handling of seed collections* (available at <http://www.kew.org/msbp/scitech/publications/04-Post%20harvest%20handling.pdf>).

SGRP. *Crop genebank knowledge base* (available at <http://croptgenebank.sgrp.cgiar.org>).

Smith, R.D., Dickie, J.D., Linington, S.L., Pritchard, H.W. & Probert, R.J. 2003. *Seed conservation: turning science into practice: Royal Botanic Gardens, Kew* (chapters can be downloaded from <http://www.kew.org/msbp/scitech/publications/sctsip.htm>).

Upadhyaya, H.D. & Gowda, C.L.L. 2009. *Managing and enhancing the use of germplasm -strategies and methodologies*. Technical Manual No. 10. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. 236 p. Patancheru, India.

4.2 Normas para el secado y el almacenamiento

Normas

- 4.2.1 Todas las muestras de semillas se deberán secar hasta el punto de equilibrio en un ambiente controlado entre 5 y 20 °C y con una humedad relativa de 10-25 por ciento, según la especie.
- 4.2.2 Después del secado, todas las muestras de semillas deberán encerrarse en un recipiente hermético adecuado para el almacenamiento a largo plazo; en los casos de colecciones a cuyas semillas se deba acceder con frecuencia o que probablemente se vayan a agotar mucho antes del tiempo previsto para la pérdida de la viabilidad, se podrán almacenar las semillas en recipientes no herméticos.
- 4.2.3 Las muestras más originales y las muestras duplicadas de seguridad se deberán almacenar en condiciones a largo plazo (colecciones base) a una temperatura de -18 ± 3 °C y una humedad relativa del 15 ± 3 por ciento.
- 4.2.4 En condiciones a medio plazo (colecciones activas) las muestras se almacenarán refrigeradas entre 5 y 10 °C y con una humedad relativa del 15 ± 3 por ciento.

Contexto

El mantenimiento de la viabilidad de las semillas es una función esencial de los bancos de germoplasma que asegura que el germoplasma esté disponible para los usuarios y sea representativo desde el punto de vista genético de la población de la cual proceda (es decir, la muestra más original). Un objetivo fundamental de las normas para el secado y el almacenamiento de semillas es reducir la frecuencia de regeneración de la muestra más original, mediante la maximización de la longevidad de las semillas, con la consiguiente reducción de los costos de los bancos de germoplasma y los riesgos de erosión genética.

Para ello, el almacenamiento a largo plazo es obligatorio para todas las muestras más originales y para la duplicación de seguridad de la colección (ver Normas para la duplicación de seguridad). Además también se necesitan normas de almacenamiento para aquellas situaciones en que el objetivo es almacenar semillas a medio o corto plazo para mantenerlas con vida el tiempo suficiente para su distribución a los usuarios y la evaluación del germoplasma. En estos casos, no es preciso que la norma sea tan estricta como en el caso de la conservación a largo plazo.

Antes de su almacenamiento, las muestras de semillas deben secarse hasta el contenido de humedad apropiado. Pueden utilizarse distintos métodos para el secado de las semillas, siendo el más común el uso de un desecante o una cámara de secado deshumidificada. Los métodos elegidos dependerán de los equipos disponibles, el tamaño y el número de las muestras a secar, las condiciones climáticas locales y el factor costo. Sin embargo, el aumento de la longevidad mediante el secado tiene un límite. La máxima longevidad para la temperatura de almacenamiento se alcanza a un nivel crítico de humedad, por debajo del cual el secado no incrementa la longevidad de las semillas. Para aprovechar plenamente todos los beneficios del almacenamiento en refrigerador o congelador, se recomienda que los bancos de germoplasma sequen las semillas hasta alcanzar el nivel crítico de humedad. Se pueden utilizar diferentes combinaciones de temperatura-humedad relativa durante el secado, con la posibilidad de un secado más rápido a temperaturas más altas, pero reduciendo el potencial de envejecimiento fisiológico mediante la disminución de la temperatura de secado.

Se considera que las condiciones de almacenamiento a largo plazo descritas anteriormente conseguirán que las semillas mantengan una alta calidad durante largos períodos de tiempo, cuya duración concreta dependerá de cada especie. Las condiciones de almacenamiento a medio plazo permiten una conservación durante 30 años y requieren generalmente de almacenamiento refrigerado. El almacenamiento a corto plazo debería proporcionar semillas de alta calidad durante ocho años por lo menos y se puede realizar a temperatura ambiente (a la temperatura más baja y estable posible, pero siempre por debajo de 25 °C) para algunas especies más longevas si se controla la humedad relativa de conformidad con la norma 4.2.2. Cabe señalar que la longevidad de las semillas maduras y de alta calidad puede variar según las especies e incluso según los lotes de semillas de la misma especie (Probert *et al.*, 2009; Nagel y Börner 2009; Crawford *et al.*, 2007; Walters *et al.*, 2005). Las diferencias entre especies y entre lotes de semillas de la misma especie, especialmente si la madurez de las semillas recolectadas es variable, requiere que el encargado del banco de germoplasma vigile y controle la viabilidad (ver Normas para el control de la viabilidad).

Dado que el contenido de humedad de equilibrio de las semillas varía según su contenido graso, la mejor medida para el nivel de secado es la humedad relativa de equilibrio, que es constante en función de la temperatura y la humedad relativa del ambiente de secado. Sin embargo, cabe señalar que, durante el almacenamiento en recipientes cerrados, la humedad relativa de equilibrio de las semillas disminuirá o aumentará si la temperatura de almacenamiento es superior o inferior a la temperatura de secado.



Aspectos técnicos

La longevidad de las semillas está determinada por la interacción de factores biológicos inherentes a estas y la calidad y la uniformidad en el tiempo del entorno de almacenamiento, es decir, la temperatura de almacenamiento y el control del contenido de humedad (humedad relativa de equilibrio) de las semillas, y depende de la especie. Es bien sabido que la longevidad de las semillas aumenta conforme disminuyen el contenido de humedad y la temperatura de almacenamiento de las semillas, dentro de unos límites (Ellis y Roberts, 1980; Harrington, 1972). Los estudios realizados han demostrado que el secado de semillas más allá de un cierto contenido crítico de humedad incrementa poco o nada su longevidad (Ellis *et al.*, 1995; Ellis y Hong, 2006) y puede incluso acelerar el ritmo de envejecimiento de las semillas (Vertucci y Roos 1990; Walters, 1998). Las normas para el almacenamiento presentadas tienen por objeto garantizar que las semillas se almacenen con dicho contenido óptimo de humedad. Sin embargo, se ha demostrado

que la disminución de la temperatura de almacenamiento aumenta el nivel de contenido óptimo de humedad de las semillas (Walters y Engels, 1998; Ellis y Hong, 2006), lo que hace presuponer que un secado excesivo de semillas podría ser peligroso.

Las condiciones de secado que permiten alcanzar el nivel crítico de humedad a la temperatura de almacenamiento deberán determinarse utilizando las isotermas de adsorción de agua que muestran la relación entre la cantidad de agua en las semillas, generalmente expresada como porcentaje del peso total de la semilla, y su humedad relativa. Puede haber diferentes combinaciones de temperatura de secado y humedad relativa para determinadas especies. Las relaciones isotérmicas, predichas en base al contenido graso de las semillas, están disponibles en línea en el sitio web de la Base de datos de información sobre semillas (SID) de Kew (ver Bibliografía). Los operadores de los bancos de germoplasma deben entender claramente la relación entre humedad relativa y temperatura de almacenamiento para poder decidir sobre la mejor combinación para el ambiente de secado de sus semillas.

Deberán envasarse y almacenarse las semillas en cuanto hayan alcanzado el contenido de humedad deseado. Después del secado, deberá mantenerse la humedad de la semilla mediante el uso de recipientes herméticos. Pueden utilizarse contenedores de distintos materiales, como vidrio, hojalata o plástico, así como papel de aluminio, cada uno con sus ventajas y desventajas (Gómez-Campo, 2006). En cualquier caso, se usarán o bien recipientes de vidrio que sean lo suficientemente gruesos para evitar la rotura, o bien envases laminados con papel metálico de un espesor suficiente para mantener los niveles deseados de humedad durante hasta 40 años, dependiendo de la humedad relativa ambiental en el lugar del banco de germoplasma y de la calidad del cierre. Por ejemplo, en Alemania, el banco de germoplasma utiliza sobres de aluminio laminado de 11 μm de espesor, mientras que las accesiones depositadas en Svalbard se conservan en sobres de aluminio laminado de 20 μm . El contenido de humedad de las semillas o la humedad relativa de equilibrio deberán medirse periódicamente para confirmar que la humedad de almacenamiento se mantenga adecuadamente.

La temperatura de almacenamiento define la longevidad máxima posible para una muestra de semillas, y para mantener la viabilidad de las semillas es fundamental contar con un entorno de almacenamiento estable. Sin embargo, existen pocos datos sobre el almacenamiento a largo plazo a distintas bajas temperaturas. Desde hace tiempo se ha venido recomendando la temperatura de $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ para el almacenamiento a largo plazo, ya que es la temperatura más baja que se puede alcanzar con un compresor de una etapa estándar de congelador. Para las semillas almacenadas a largo plazo, deberá tratarse por todos los medios de mantener la temperatura de almacenamiento dentro de un rango de $\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ respecto de la temperatura fijada y de impedir que las fluctuaciones fuera de estos márgenes tengan una duración total de más de una semana al año. Los bancos de germoplasma deberán llevar registros de las desviaciones de la temperatura de almacenamiento, así como de los periodos en los cuales las semillas se retiran del lugar donde se encuentran almacenadas. Para el almacenamiento a corto plazo, las semillas deberán secarse a la temperatura a la que se hayan almacenado, por ejemplo, si la temperatura ambiental es de $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, las semillas se deberán secar a esa temperatura.

Disposiciones particulares

Las semillas almacenadas a largo plazo no deberán sacarse de sus condiciones de almacenamiento a menos que sea imprescindible y sólo cuando se hayan agotado las muestras almacenadas a medio plazo. No se dan las condiciones de almacenamiento deseables cuando fallan los controles ambientales mecánicos o cuando las semillas se sacan repetidamente de un entorno de almacenamiento controlado. Se deberá contar con generadores de emergencia dotados con una cantidad suficiente de combustible.

Todos los recipientes dejan pasar algo de humedad por lo que la humedad de las semillas se termina adaptando a las condiciones ambientales dentro de la cámara de almacenamiento. Esto ocurre más rápido cuando los recipientes utilizan plásticos térmicos como barrera contra la humedad o si los recipientes de vidrio o papel laminado tienen cierres defectuosos o imperfecciones. En ocasiones puede ser necesario secar de nuevo las semillas y sustituir los recipientes o las juntas de estanqueidad cada 20-40 años.

Si se utilizan recipientes transparentes, podrán utilizarse bolsitas de plástico transparente perforadas con gel de sílice a modo de indicador, equilibrado al entorno de secado, para controlar el estado del recipiente durante el almacenamiento a largo plazo. Un cambio en el color del gel de sílice en el interior de la bolsa (colocado junto a las semillas) indicará la entrada de humedad si falla el cierre del recipiente. Las semillas ortodoxas de corta longevidad o las semillas con una calidad inicial baja pueden deteriorarse más rápidamente en su almacenamiento y no cumplir las Normas para el almacenamiento a largo plazo a menos que se utilicen condiciones criogénicas.



BIBLIOGRAFÍA

- Dickie, J.B., Ellis, R.H., Kraak, H.L., Ryder, K. & Tompsett, P.B. 1990. Temperature and seed storage longevity. *Annals of Botany*, 65: 197-204.
- Ellis, R.H. & Roberts, E.H. 1980. Improved equations for the prediction of seed longevity. *Annals of Botany*, 45: 13-30.
- Ellis, R.H. & Hong, T.D. 2006. Temperature sensitivity of the low-moisture-content limit to negative seed longevity-moisture content relationships in hermetic storage. *Annals of Botany*, 97: 785-91.
- Engels, J.M.M. & Visser, L. 2003. *A guide to effective management of germplasm collections*. IPGRI Handbooks for Genebanks No. 6. IPGRI, Rome, Italy.
- Gomez-Campo, C. 2006. Erosion of genetic resources within seedbanks: the role of seed containers. *Seed Science Research*, 16: 291-294.
- Harrington, J.F. 1972. Seed storage longevity. In T.T. Kozłowski, ed. *Seed biology*, Vol. III. pp. 145-245. New York, USA, Academic Press.
- Kew Seed Information Database.** *Predict seed viability module* (available at <http://data.kew.org/sid/viability/percent1.jsp>). *Convert RH to water content* (available at <http://data.kew.org/sid/viability/mc1.jsp>). *Convert water content to RH* (available at <http://data.kew.org/sid/viability/rh.jsp>).
- Nagel, M. & Börner, A. 2010. The longevity of crop seeds stored under ambient conditions. *Seed Science Research*, 20: 1-12. doi: 10.1017/S0960258509990213.
- Pérez-García, F., Gómez-Campo, C. & Ellis, R.H. 2009. Successful long-term ultra dry storage of seed of 15 species of Brassicaceae in a genebank: variation in ability to germinate over 40 years and dormancy. *Seed Science and Technology*, 37(3): 640-649.
- Probert, R.J., Daws, M.I. & Hay, F.R. 2009. Ecological Correlates of Ex Situ Seed Longevity: a Comparative Study on 195 Species. *Annals of Botany*, 104 (1): 57-69.
- Smith, R.D., Dickie, J.D., Linington, S.L., Pritchard, H.W. & Probert, R.J. 2003. *Seed conservation: turning science into practice: Royal Botanic Gardens, Kew* (available at: <http://www.kew.org/msbp/scitech/publications/sctsip.htm> [see chapters 17 and 24]).
- Vertucci, C.W. & Roos, E.E. 1990. Theoretical basis of protocols for seed storage. *Plant Physiology*, 94: 1019-1023.
- Walters, C. 1998. Understanding the mechanisms and kinetics of seed aging. *Seed Science Research*, 8: 223-244.
- Walters, C. 2007. Materials used for seed storage containers. *Seed Science Research*, 17: 233-242.
- Walters, C. & Engels, J. 1998. The effect of storing seeds under extremely dry conditions. *Seed Science Research*, 8, Supplement 1, pp 3-8.
- Walters, C., Wheeler, L.J. & Grotenhuis, J. 2005. Longevity of seeds stored in a genebank: species characteristics. *Seed Science Research*, 15: 1-20.
- Walters, C., Wheeler, L.J. & Stanwood, P.C. 2004. Longevity of cryogenically-stored seeds. *Cryobiology*, 48: 229-244.

4.3 Normas para el control de la viabilidad de las semillas

Normas

- 4.3.1 La prueba inicial de viabilidad de las semillas se debe llevar a cabo después de la limpieza y el secado de la accesión o, a más tardar en un plazo de 12 meses a contar de la recepción de la muestra en el banco de germoplasma.
- 4.3.2 El valor inicial de germinación deberá exceder del 85 por ciento para la mayoría de las semillas de las especies cultivadas. Para algunas accesiones específicas y especies silvestres y forestales que normalmente no alcanzan altos niveles de germinación, pueda aceptarse un porcentaje menor.
- 4.3.3 Los intervalos para las pruebas de control de la viabilidad deberán fijarse en un tercio del lapso de tiempo en que se prevea que la viabilidad va a reducirse al 85 por ciento¹ de la viabilidad inicial o un porcentaje menor dependiendo de la especie o las accesiones específicas, pero no deberán exceder de 40 años. Si este período de deterioro no se puede estimar y las accesiones se encuentran almacenadas a largo plazo a -18 °C en recipientes herméticamente cerrados, el intervalo deberá ser de diez años para las especies longevas y de cinco años o menos para las especies poco longevas.
- 4.3.4 El umbral de viabilidad para la regeneración u otras decisiones de gestión, tales como una nueva recolección, deberá ser del 85 por ciento de la viabilidad inicial o un porcentaje menor dependiendo de la especie o las accesiones específicas.

¹ El momento de caída de la viabilidad se puede predecir para una amplia gama de especies de cultivos mediante una aplicación online basada en las ecuaciones de viabilidad de Ellis/Roberts (ver <http://data.kew.org/sid/viability/>)

Contexto

Unas buenas condiciones de almacenamiento de las semillas permiten mantener la viabilidad del germoplasma, pero incluso en condiciones excelentes la viabilidad disminuye cuanto mayor es el periodo de almacenamiento. Por tanto, será necesario evaluar la viabilidad de forma periódica. La prueba de viabilidad inicial deberá llevarse a cabo tan pronto como sea posible antes de que se empaquen y almacenen las semillas, y se realizarán pruebas posteriores a intervalos durante el almacenamiento. Si por razones prácticas ligadas a la eficiencia y el flujo de trabajo la prueba de viabilidad inicial no se puede realizar antes del almacenamiento, deberá llevarse a cabo lo antes posible y, a más tardar, 12 meses después de momento de la recepción. Este podrá ser el caso de los bancos de germoplasma que conservan varias especies, en los que es necesaria una amplia gama de regímenes de germinación y las muestras de una misma especie se someten a prueba conjuntamente una vez al año.

El objetivo del control de la viabilidad es detectar la pérdida de viabilidad durante el almacenamiento a largo plazo antes de que la viabilidad se reduzca por debajo del umbral para la regeneración. El principio rector más importante aquí es la gestión activa de la colección. Un control demasiado frecuente se traducirá en un gasto innecesario de recursos y semillas. Por otro lado, si el control se retrasa o se realiza con poca frecuencia es posible no detectar una disminución significativa de la viabilidad. El envejecimiento avanzado de la muestra puede dar lugar a cambios genéticos (selección aleatoria o dirigida), a la fijación de mutaciones no reparadas en la muestra, o a la pérdida definitiva de la accesión.

Cuando se prevea que la viabilidad se va a reducir al 85 por ciento antes de la siguiente prueba programada, deberá adelantarse el momento de la nueva prueba o deberá programarse directamente la regeneración de la accesión.

El riesgo de erosión genética durante el almacenamiento es menor para las muestras homogéneas y se podrá aceptar una reducción de la germinación por debajo del 85 por ciento, siempre y cuando el periodo de establecimiento durante la regeneración siga siendo adecuado. Para las muestras heterogéneas, tales como las especies silvestres y las variedades locales, deberá observarse la norma del 85 por ciento. Para algunas accesiones específicas, variedades locales, especies silvestres y forestales, raras veces se puede lograr una viabilidad del 85 por ciento en semillas recién repuestas. En estos casos, el encargado podrá establecer un umbral más bajo para la norma sobre la viabilidad en relación con determinadas especies, como el 70 por ciento o menos.

Existen modelos disponibles para predecir la longevidad de las semillas de diversas especies agrícolas en condiciones ambientales y de refrigeración. El personal del banco de germoplasma deberá utilizar las herramientas de predicción disponibles documentadas para especies específicas y las condiciones de almacenamiento necesarias para prever el tiempo durante el cual las semillas van a mantener una viabilidad alta, así como para guiar otras operaciones de los bancos de germoplasma, como el control de la viabilidad y la frecuencia de la regeneración (ver Normas para el control de la viabilidad y la regeneración). Las predicciones de longevidad basadas en

las características generales de la especie deberán ser tomadas como estimaciones con intervalos de confianza amplios. Se alienta a los bancos de germoplasma a elaborar y comunicar cualquier información nueva que describa y actualice las respuestas de las especies a las condiciones de almacenamiento.

Aspectos técnicos

Los intervalos de control de la viabilidad deberán ajustarse de acuerdo con los datos recibidos de las pruebas de germinación. Tan pronto como se detecte una disminución significativa, deberán reducirse los intervalos de control con el fin de “afinar” la predicción del tiempo necesario para alcanzar el estándar de viabilidad.

Las accesiones con una viabilidad inicial muy elevada (por encima del 98 por ciento) pueden sufrir una disminución estadísticamente significativa de la viabilidad mucho antes del tiempo previsto para que se reduzca al 85 por ciento, cuando la germinación se sitúa todavía muy por encima del 90 por ciento. En ese momento probablemente sea demasiado pronto e innecesario llevar a cabo una regeneración o una nueva recolección. Sin embargo, más adelante deberán reducirse los intervalos entre pruebas (por ejemplo, de diez a cinco años) con el fin de realizar un seguimiento más preciso de dicha disminución.

Para las accesiones de menor calidad, cuando la viabilidad disminuye de forma relativamente rápida es posible que la accesión esté cerca de un peligroso punto de inflexión. Tales accesiones deberán gestionarse cuidadosamente y las primeras pruebas para controlar la viabilidad deberán realizarse después de 3-5 años de almacenamiento. Si los controles son poco frecuentes (por ejemplo, cada diez años) podría no detectarse un deterioro rápido y superarse el umbral de viabilidad del 85 por ciento, con consecuencias negativas para la integridad genética de la colección. En este sentido, el uso de modelos estadísticos podrá ayudar a prever el punto de inflexión y el momento adecuado para una regeneración adecuada.

La prueba de viabilidad deberá dar al responsable del banco de germoplasma una aproximación a la viabilidad de la muestra. El objetivo deberá ser detectar diferencias del orden de +5 por ciento, más que diferencias del +0,1 por ciento. Inevitablemente, el tamaño de la muestra a efectos del control de la viabilidad dependerá del tamaño de la accesión, pero deberá ser lo más grande posible para lograr una certeza estadística. Sin embargo, el tamaño de la muestra deberá reducirse al mínimo para evitar el desperdicio de semillas. Las semillas de los bancos de germoplasma son un recurso valioso que no se debe desperdiciar.

Es difícil establecer un criterio estricto en relación con el número de semillas para las pruebas de germinación en los bancos de germoplasma; sin embargo, a menudo se utilizan de manera general los protocolos normalizados delineados por la Asociación Internacional de Análisis de Semillas (ISTA). Como pauta general se recomienda el uso de 200 semillas para las pruebas de germinación inicial (ISTA, 2008). Si la germinación inicial no alcanza el 90 por ciento, el procedimiento de pruebas secuenciales propuesto por Ellis *et al.*, (1985) puede ayudar a economizar las semillas existentes en las siguientes

pruebas de germinación durante el almacenamiento. Sin embargo, en el caso de que no haya suficientes semillas, también serán válidas las muestras de 100 o incluso menos semillas, las cuales deberán llevarse a cabo con réplicas. La prueba de germinación es un indicador de la viabilidad e incluso las muestras pequeñas de semillas pueden ofrecer información útil al administrador. Pero en la práctica el tamaño real de la muestra para la germinación dependerá del tamaño de la accesión, que en general es muy limitado en los bancos de germoplasma (el tamaño mínimo ideal recomendado es de 1500 semillas para las especies autógamas y de 3000 semillas para las especies exógamas de 3000 semillas). Es importante reducir al mínimo el uso de semillas valiosas que son necesarias para las pruebas de germinación. Para las accesiones pequeñas (como suele ser el caso de las especies silvestres) se podrían aceptar muestras de 50 semillas o menos. Sin embargo, deberá tenerse en cuenta entonces que podrá haber una mayor probabilidad de que la germinación esté por debajo del umbral. El encargado del banco de germoplasma deberá evaluar el riesgo de que esto ocurra.

La prueba de germinación se deberá utilizar siempre con preferencia a otras alternativas como la prueba del tetrazolio. Sin embargo, en circunstancias en que no sea posible eliminar la dormancia de las semillas, se podrán realizar pruebas alternativas. Se recomienda tomar medidas de la germinación en dos momentos diferentes con el fin de tener una idea de si las semillas germinan rápido o despacio. También se deberán llevar registros de la cantidad de semillas que germinan de manera anormal. Una germinación más lenta o un aumento de las semillas anormales suelen ser los primeros indicadores de que se está produciendo un deterioro.

Deberá hacerse todo lo posible para hacer germinar todas las semillas viables en una colección ofreciendo las condiciones óptimas y los tratamientos adecuados para interrumpir la dormancia cuando sea necesario. A las semillas que queden sin germinar al final de una prueba de germinación se les deberán realizar un corte de prueba para determinar si están muertas o bajo dormancia. Las semillas con un tejido firme y fresco probablemente estén bajo dormancia y deberán considerarse semillas viables.

Toda la información y los datos generados durante el control de la viabilidad deberán ser registrados e introducidos en el sistema de documentación.

Disposiciones particulares

Es sabido que el control de la viabilidad es una actividad costosa y que los bancos de germoplasma siempre persiguen la aplicación de procedimientos económicos. Uno de estos procedimientos podría implicar la medición de la calidad de las semillas en una submuestra de accesiones de la misma especie cultivada el mismo año de la recolección. Esta práctica podría revelar tendencias generales sobre el efecto del año de recolección en la calidad de las semillas, pero no tomará en cuenta las interacciones genotipo -año de recolección cuya importancia para la calidad de las semillas es conocida.

Cuando concurren condiciones de recolección diferentes y el grado de madurez sea muy distinto dentro de las accesiones, podrá elaborarse una estrategia de muestreo

a partir de subgrupos de recolección distintos. Otra estrategia consistiría en centrar las nuevas pruebas en las accesiones que en las pruebas iniciales hayan arrojado los resultados de viabilidad más bajos. Los datos obtenidos con las nuevas pruebas para estas accesiones deberán constituir una alerta temprana sobre el estado del lote en su conjunto.

En especies y accesiones de semillas duras, como las que se encuentran con frecuencia en algunas especies de leguminosas forrajeras y plantas silvestres emparentadas con las cultivadas, la prueba inicial de germinación en el momento de la recolección puede arrojar un resultado bajo, hasta del 45 por ciento, aumentar después de 10-15 años hasta el 95 por ciento o más, y mantenerse a dicho nivel durante largos períodos de tiempo. Si la germinación inicial no alcanzase el 90 por ciento, deberá llevarse a cabo una regeneración o nueva recolección ante el primer descenso significativo detectable, determinado mediante un estudio estadístico apropiado.

Sin embargo, se ha observado en muchos tipos distintos de accesiones una variación intraespecífica dentro de las accesiones, por lo que se deben tomar en consideración los riesgos asociados con las estrategias anteriormente indicadas. El control de la viabilidad de las accesiones de especies silvestres en términos generales es más problemático que en especies cultivadas. Las semillas tienen muchas más probabilidades de presentar dormancia y el tamaño de las accesiones suele ser pequeño, lo que implica que para las pruebas de germinación se deben tomar muestras de tamaño aun menor, ya que esto afectará inevitablemente a la capacidad de detectar el comienzo del deterioro de las semillas.

Con respecto a la prueba inicial de viabilidad de la semilla, también es posible que los bancos de germoplasma reciban pequeñas cantidades de semillas. En este caso no será necesario llevar a cabo las pruebas iniciales de viabilidad de las semillas ya que las muestras se llevan a regeneración. No obstante, una vez regeneradas las semillas deberán someterse a pruebas de viabilidad antes de su almacenamiento.

Las diferencias en la longevidad propia de las especies también son mayores en las silvestres, siendo muy larga la esperanza de vida para algunas especies de hábitats mediterráneos y de trópico seco y por el contrario corta para algunas especies de regiones frías o templadas. En este último caso, deberá considerarse la posibilidad de que los intervalos de repetición de pruebas sean de tan solo tres años así como de realizar un duplicado y criopreservarlo como medida de precaución. En el caso de que no se cumplan las condiciones de almacenamiento (como sucedería si se produjera un corte de corriente eléctrica prolongado cuando las semillas se almacenan en unidades de refrigeración), la viabilidad se verá afectada negativamente dependiendo de la especie, la duración de la interrupción y las condiciones durante esta. En tal caso, deberá activarse un plan de gestión de desastres. Por ejemplo, puede que sea necesario someter a prueba a algunas muestras representativas inmediatamente después de la reanudación de las condiciones de almacenamiento adecuadas.

BIBLIOGRAFÍA

Association of Official Seed Analysts (AOSA). 2005. Page 113 in Capashew, ed. *Rules for testing seeds*, 4-0, 4-11. Las Cruces, New Mexico, USA.

Dickie, J.B., Ellis, R.H., Kraak, H.L., Ryder, K. & Tompsett, P.B. 1990. Temperature and seed storage longevity. *Annals of Botany*, 65: 197-204.

Ellis, R.H. & Roberts, E.H. 1980 Improved equations for the prediction of seed longevity. *Annals of Botany*, 45: 13-30.

Ellis, R.H., Hong, T.D. & Roberts, E.H. 1985. Sequential germination test plans and summary of preferred germination test procedures. *Handbook of seed technology for genebanks: Vol I. Principles and methodology*, Chapter 15, pp 179-206. Rome, Italy, International Board for Plant Genetic Resources.

Engels, J.M.M. & Visser, L. eds. 2003 *A guide to effective management of germplasm collections*. IPGRI Handbooks for Genebanks No. 6. Rome, Italy, IPGRI.

ENSCONET Manuals (available at <http://ensconet.maich.gr/Download.htm>).

Harrington, J.F. 1972. Seed storage longevity. In T.T. Kozłowski, ed. *Seed biology*, Vol III, pp. 145-245, New York, USA, Academic Press.

International Seed Testing Association (ISTA). 2008. *International rules for seed testing*. Bassersdorf, Switzerland.

Nagel, M. & Börner, A. 2010. The longevity of crop seeds stored under ambient conditions. *Seed Science Research*, 20: 1-12.

Nagel, M., Rehman Arif, M.A., Rosenhauer, M. & Börner, A. 2010. *Longevity of seeds - intraspecific differences in the Gatersleben genebank collections*. Tagungsband der 60. Jahrestagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs 2009, 179-181.

Royal Botanical Gardens, Kew. *Seed information database (SID)* (available at <http://data.kew.org/sid/>).

Smith, R.D., Dickie, J.D., Linington, S.L., Pritchard, H.W. & Probert, R.J. 2003. *Seed conservation: turning science into practice*. Royal Botanic Gardens, Kew (available at <http://www.kew.org/msbp/scitech/publications/sctsip.htm> [see chapters 17 and 24]).



4.4 Normas para la regeneración

Normas

- 4.4.1 Deberá realizarse una regeneración cuando la viabilidad caiga por debajo del 85 por ciento de la viabilidad inicial o cuando la cantidad de semillas restante sea inferior a la necesaria para tres siembras de una población representativa de la accesión. Deberá utilizarse la muestra más original para regenerar dichas accesiones.
- 4.4.2 La regeneración deberá llevarse a cabo de tal manera que se mantenga la integridad genética de una determinada accesión. Se deberán tomar las medidas de regeneración específicas de cada especie a fin de evitar las mezclas y la contaminación genética derivada del flujo de genes a partir del polen originado en otras accesiones de la misma u otras especies en entornos cercanos a los campos de regeneración.
- 4.4.3 Cuando sea posible deberá conservarse en condiciones a largo plazo un mínimo de 50 semillas de la muestra original y de la inmediatamente posterior a la original, con fines de referencia.

Contexto

La regeneración es una operación clave y forma parte integrante de las responsabilidades de todos los bancos de germoplasma que mantienen semillas ortodoxas. Es un proceso que produce un aumento de las semillas almacenadas (también llamado “multiplicación”) en el banco de germoplasma y/o un aumento de la viabilidad de las semillas hasta un nivel igual o superior al mínimo acordado denominado umbral de regeneración. La accesión se regenerará cuando no se disponga de suficientes semillas para su almacenamiento a largo plazo (esto es, 1 500 semillas para las especies autógamas y 3 000 para las especies alógamas), o cuando su viabilidad se haya reducido por debajo de un umbral mínimo

establecido (es decir, por debajo del 85 por ciento de la viabilidad inicial de las semillas almacenadas). También deberá llevarse a cabo una regeneración cuando se hayan agotado las semillas por causa del uso frecuente de la accesión. Si la accesión se usa con poca frecuencia y la viabilidad de la semilla es buena, el número de semillas podrá ser inferior a 1 000 antes de la regeneración. Cada regeneración de especies, especialmente de las alógamas, implica un riesgo de pérdida de alelos raros de alteración del perfil genético de la muestra. Deberá reducirse al mínimo la frecuencia de regeneración. No se necesita un gran número de semillas para las accesiones o especies raramente solicitadas.

La regeneración es una actividad que con cierta probabilidad puede afectar a la composición genética de una accesión (y por lo tanto a su integridad genética), por lo que se requiere el máximo cuidado. En consecuencia, los operadores de los bancos de germoplasma tendrán que mantener un delicado equilibrio entre evitar o retrasar la regeneración en la medida de lo posible y la pérdida potencial de viabilidad, con el consiguiente riesgo de menoscabo de la integridad genética de una accesión. La gestión activa de las colecciones será de gran ayuda para decidir sobre el mejor momento para regenerar.

La regeneración deberá realizarse modificando lo menos posible la integridad genética de la accesión en cuestión. Esto significa que además de las consideraciones relativas al muestreo (ver párrafo siguiente) de la accesión, se deberá prestar la debida atención a las condiciones ambientales en las cuales se vaya a llevar a cabo la actividad, para evitar que se ejerza una presión de selección importante sobre la accesión. Se ha sugerido que el ambiente de la regeneración debe ser lo más parecido posible al del lugar de recolección, especialmente cuando se regenera una población silvestre, con el fin de minimizar la deriva genética y los cambios genéticos, así como de producir semillas de la mejor calidad posible. A menudo puede ser difícil recolectar una cantidad suficiente de semillas de especies silvestres debido al menor número de semillas/plantas en comparación con otras especies, o a los mecanismos de dispersión de plantas, como el desgrane de semillas. Por tanto, es necesario garantizar el uso de prácticas técnicas apropiadas para recolectar el mayor número posible de semillas (usando redes para recoger las semillas caídas). También puede ser necesario repetir los ciclos de regeneración para asegurar que se conserva un número suficiente de semillas. En la regeneración, lo mejor es crear las condiciones ambientales favorables para la producción de semillas y para minimizar la competencia entre las plantas. Las condiciones de los sitios de recolección original suelen ser desfavorables por una u otra razón para la máxima producción de semillas. Por lo tanto, deberá procurarse un equilibrio entre las condiciones generalizadas y favorables y las señales especiales (ya sean de tipo fotoperiódico, nutricional o climático) que son propias de la adaptación local de las distintas accesiones. Esto forma parte del arte de la gestión de colecciones. Si el lugar donde radican los bancos de germoplasma no ofrece condiciones favorables a nivel local, el encargado deberá buscar los medios para regenerar la colección en un ambiente favorable. La replicación del ambiente de la colección no debe ser necesariamente el objetivo del encargado.

Para preservar la integridad genética de las colecciones de los bancos de germoplasma durante la regeneración de semillas, es importante que el muestreo de las accesiones se lleve a cabo correctamente. Las muestras de semillas que se vayan a utilizar para

el proceso de regeneración deberán tener un tamaño suficiente para representar la diversidad genética que existe en la accesión y para que haya una cierta probabilidad de que el conjunto posea uno o más alelos raros.

La metodología que se utilice para la regeneración podrá variar de una especie a otra y dependerá, entre otros factores, del tamaño de la población, el sistema de reproducción y la eficacia de la polinización. Por lo tanto, es de gran importancia reunir la mayor cantidad posible de información biológica pertinente en relación con la especie en cuestión. Además, cuando sea posible y útil, se recomienda que la regeneración se utilice también para la caracterización de las accesiones regeneradas (ver Normas para la caracterización). Sin embargo, para las especies de polinización cruzada, suele ser difícil utilizar el proceso de regeneración para llevar a cabo la caracterización por razones logísticas.

Aspectos técnicos

Con el fin de mantener la integridad genética de las accesiones durante la regeneración se recomienda usar semillas de la muestra más original. Para la multiplicación, se recomienda utilizar semillas de la colección de trabajo durante un máximo de cinco ciclos de multiplicación sin volver a la muestra más original.

Cabe señalar que en los casos en que la muestra original procedente de la recolección o de la donación sea de tamaño pequeño, será necesario llevar a cabo una generación inmediatamente después de la recepción del material con el fin de obtener una cantidad suficiente de semillas para su almacenamiento a largo plazo. Es importante registrar el número del ciclo de regeneración e introducir la información en el sistema de documentación. Se recomienda que el banco receptor conserve siempre algunas semillas de la muestra inicial con fines de referencia en el futuro. Incluso si estas semillas originales perdieran su viabilidad, podrán ser útiles para confirmar la morfología o el genotipo de las generaciones posteriores de la accesión correspondiente.

El tamaño de la muestra de semillas que se utilice en la actividad de regeneración tendrá que reflejar la composición genética de la accesión. Para ello, el tamaño efectivo de la población (N_e) es un parámetro clave que influye en el grado de deriva genética que se asocia con la regeneración de la accesión. Este tamaño mínimo de N_e para reducir al mínimo la pérdida de alelos puede calcularse para las accesiones individuales sobre la base de la biología de la polinización y las condiciones de cultivo. Se deben utilizar las mejores prácticas para la recolección a fin de evitar la mezcla de semillas durante la siembra, la cosecha y el procesamiento. Las investigaciones llevadas a cabo por Johnson *et al.* (2002, 2004) sobre la regeneración de las especies perennes alógamas (por ejemplo las gramíneas) indicaron que el número mínimo necesario para la preservación del acervo genético del taxón es de 100 plantas. Se recomienda el principio de recolección de 3 a 5 inflorescencias de cada planta.

Para evitar el flujo de genes y la contaminación es sumamente importante utilizar métodos apropiados de aislamiento entre parcelas de accesiones de especies alógamas que estén en curso de regeneración. Esto también se aplica a las especies autóгамas, en

función del ambiente de regeneración. Para las especies que dependen de polinizadores específicos, se deberán utilizar jaulas de aislamiento y los polinizadores correspondientes (Dulloo, M.E. *et al.*, 2008). La contaminación y la deriva genética / cambio genético pueden estimarse mediante los caracteres morfológicos, enzimáticos u otros rasgos distintivos que puedan servir como marcadores (por ejemplo, el color de las flores o de las semillas, etc.), o con marcadores moleculares.

Las colecciones de referencia (especímenes de herbario, fotografías o descripciones de las accesiones originales) son esenciales para llevar a cabo la verificación de la conformidad al tipo (Lehmann y Mansfeld, 1957). Se deberán realizar inspecciones minuciosas de las semillas obtenidas en la primera regeneración de una nueva accesión de un banco de germoplasma para recoger información de referencia importante. Con el fin de evitar diferencias de madurez en las semillas de una muestra, deberán llevarse a cabo varias recolecciones durante la temporada de fructificación.

Disposiciones particulares

Siempre existirá una dimensión de gestión de riesgos vinculada a la función del responsable de la colección. La posesión de sólidos conocimientos de la biología de la especie en cuestión es un factor clave para poder tomar las mejores decisiones posibles en relación con la regeneración, en condiciones limitadas. En el momento de planificar la actividad de regeneración se deberá prestar la debida atención a aspectos como el tamaño de la muestra, la distancia entre las distintas accesiones y otras formas de aislar las mismas, el respeto de los umbrales establecidos para la pérdida de la viabilidad, las condiciones de cultivo, y otros.

Habida cuenta de esta complejidad no tiene sentido examinar posibles disposiciones particulares. En caso de emergencia, será conveniente recabar asesoramiento de expertos o la colaboración de otros bancos que puedan prestar asistencia.

BIBLIOGRAFÍA

Breese, E.L. 1989. *Regeneration and multiplication of germplasm resources in seed genebanks: the scientific background* (available at http://www2.bioversityinternational.org/publications/Web_version/209/).

Crossa, J. 1995. Sample size and effective population size in seed regeneration of monocious species. In J.M.M. Engels & R. Rao, eds. *Regeneration of seed crops and their wild relatives*, pp.140-143. Proceedings of a consultation meeting, 4-7 December 1995. Hyderabad, India, ICRISAT, and Rome, Italy. International Plant Genetic Resources Institute.

Dulloo, M.E., Hanson, J., Jorge, M.A. & Thormann, I. 2008. Regeneration guidelines: general guiding principles. In M.E. Dulloo, I. Thormann, M.A. Jorge & J. Hanson, eds. *Crop specific regeneration guidelines*. Rome, Italy, CGIAR System-wide Genetic Resource Programme (SGRP). 6 p.

Engels, J.M.M. & Rao, R., eds. 1995. *Regeneration of seed crops and their wild relatives*, pp. 140-143. Proceedings of a consultation meeting, 4-7 December 1995. Hyderabad, India, ICRISAT, and Rome, Italy, International Plant Genetic Resources Institute.

Engels, J.M.M. & Visser, L. 2003. *A guide to effective management of germplasm collections*. IPGRI Handbooks for Genebanks No. 6. Rome, Italy, IPGRI.

Johnson, R.C., Bradley, V.L., & Evans, M.A. 2002. Effective population size during grass germplasm seed regeneration. *Crop Science*, 42: 286-290.

Johnson, R.C., Bradley, V.L., & Evans, M.A. 2004. Inflorescence sampling improves effective population size of grasses. *Crop Science*, 44: 1450-1455.

Lawrence, L. 2002. A comprehensive collection and regeneration strategy for ex situ conservation. *Genetic resources and crop evolution*, 49(2): 199-209.

Lehmann, C.O. & Mansfeld, R. 1957. Zur Technik der Sortimentserhaltung. *Kulturpflanze*, 5: 108-138.

Rao, N.K., Hanson, J., Dulloo, M.E., Ghosh, K., Nowell, D. & Larinde, M. 2006. *Manual of seed handling in genebanks*. Handbooks for Genebanks No. 8. Rome, Italy, Bioversity International.

Sackville Hamilton, N.R. & Chorlton, K.H. 1997. *Regeneration of accessions in seed collections: a decision guide*. J. Engels, ed. Handbook for Genebanks No. 5. Rome, Italy, IPGRI.

SGRP. *Crop genebank knowledge base* (available at: <http://cropgenebank.sgrp.cgiar.org>).

4.5 Normas para la caracterización

Normas

- 4.5.1 Alrededor del 60 por ciento de las accesiones se deberán caracterizar en un plazo de cinco a siete años a contar desde la adquisición o durante el primer ciclo de regeneración.
- 4.5.2 La caracterización se debe basar en formatos de medición normalizados y calibrados, y los datos de caracterización se ajustarán a listas de descriptores acordados internacionalmente y se harán públicos.

Contexto

Por caracterización se entiende la descripción del germoplasma vegetal. La caracterización determina la expresión de caracteres altamente heredables que van desde las características morfológicas, fisiológicas o agronómicas hasta el contenido en proteínas y aceite de las semillas, pasando por los marcadores moleculares.

La caracterización se puede realizar en cualquier etapa del proceso de conservación, siempre y cuando el número de semillas sea suficiente para tomar la muestra. Conocer y describir lo mejor posible el germoplasma que se conserva es esencial para asegurar su máxima utilización por los fitomejoradores. Por lo tanto, la caracterización deberá llevarse a cabo tan pronto como sea posible para agregar valor a la colección. El uso de un conjunto mínimo de caracteres fenotípicos, fisiológicos y cualitativos de las semillas, de descriptores morfológicos y de información sobre el sistema reproductivo, tales como los que publica Bioversity International, es útil para la caracterización. También se pueden encontrar descriptores útiles en las publicaciones de la Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV) y del Sistema nacional de germoplasma vegetal (NPGS) del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA). El uso de estándares acordados internacionalmente para los datos de caracterización aumenta la utilidad de los datos publicados.

La caracterización permite detectar la diversidad que existe entre varias accesiones y dentro de las accesiones. Puede ser necesario adoptar las medidas adecuadas para asegurar la preservación de los alelos raros o para mejorar el acceso a alelos determinados. La documentación de las observaciones y las medidas adoptadas es de gran importancia.

Aspectos técnicos

La caracterización es un proceso largo y costoso. Se puede tratar de conjugar la caracterización con la multiplicación o la regeneración en la medida de lo posible. Los encargados de los bancos de germoplasma deberán hacer todo lo posible para registrar los datos de caracterización. Sin embargo, es recomendable fomentar el uso de la replicación para la caracterización de los caracteres altamente heredables.

Los atributos y características de las especies cultivadas están determinadas por los expertos en las especies o por los encargados de las colecciones, en consulta con los administradores de los bancos de germoplasma. Se ha elaborado una amplia gama de listas de descriptores de cultivos, por ejemplo los de Bioversity International, y a partir de algunos de ellos también se han generado conjuntos mínimos de descriptores clave para su utilización. Además, se han publicado listas de descriptores a niveles regional y nacional, como los descriptores del NPGS del USDA. El registro de datos deberá ser realizado por personal capacitado, utilizando formatos de medición normalizados y calibrados tal como se indica en las listas de descriptores de los cultivos publicadas y acordadas a nivel internacional. Los datos deberán ser validados por el encargado y los oficiales encargados de la documentación antes de ser volcados en la base de datos del banco de germoplasma y puestos a disposición del público. También se reconoce que las colecciones de referencia (especímenes de herbario, herbario de semillas, fotografías) desempeñan un papel esencial en la identificación de la conformidad al tipo.

Gracias a los progresos de la biotecnología, cada vez se utilizan más en caracterización las tecnologías de marcadores moleculares y genómicas (de Vicente *et al.*, 2004) en combinación con las observaciones fenotípicas, ya que tienen ventajas en la estimación de la singularidad de una fuente de variación entre accesiones y dentro de ellas. Los datos genotípicos obtenidos en la caracterización de germoplasma mediante técnicas moleculares tienen la ventaja respecto a los datos fenotípicos de que las variaciones detectadas están mucho más desprovistas de influencias ambientales (Bretting y Widrechner 1995). Sin embargo, el uso de la tecnología molecular sigue estando fuera del alcance de algunas instituciones ya que requiere avanzadas instalaciones de laboratorio y capacidad técnica, y además puede ser costosa (Karp *et al.*, 1997), especialmente en países en desarrollo y también en situaciones donde se deben elaborar desde el principio las herramientas moleculares específicas del genoma como los marcadores SSR (*Simple Sequence Repeat*). Existen muchos marcadores y técnicas disponibles (por ejemplo los SSR, EST-SSR, AFLP) pero para los fines de caracterización solamente se deben utilizar marcadores bien establecidos y repetibles como los SSR. Se ha diseñado una amplia serie de cebadores de marcadores apropiados para su utilización en la caracterización de

muchas especies cultivadas, así como conjuntos mínimos de marcadores clave. Con el fin de asegurar que se puedan comparar los resultados de distintos lotes de análisis, en cada lote se deben incluir algunas accesiones del banco de germoplasma como testigos. La inclusión de testigos en la caracterización molecular juega también un papel esencial para poder comparar entre bancos de germoplasma distintos.

Disposiciones particulares

La fiabilidad de los datos puede variar en función de quienes los recojan si estos no están bien capacitados o no tienen suficiente experiencia. Por lo tanto, deberá disponerse de personal técnico capacitado en el campo de los recursos fitogenéticos durante todo el ciclo de crecimiento para registrar y documentar los datos de caracterización. Es conveniente poder contar con conocimientos especializados en taxonomía, biología de semillas y fitopatología (ya sea en la propia institución o mediante colaboración con otras instituciones) durante el proceso de caracterización.

La caracterización requiere mucho personal y una financiación suficiente para que los datos sean de buena calidad. La realización de una caracterización completa de las accesiones durante los ciclos de regeneración puede reducir el número de accesiones que se pueden regenerar en cada ciclo.

La incidencia de plagas y enfermedades puede suponer un problema para la recogida de datos de calidad. La determinación de algunos caracteres, como el contenido oleico o proteico, requiere pruebas de laboratorio que no siempre están disponibles o pueden ser costosas.

BIBLIOGRAFÍA

Alercia, A., Diulgheroff, S. & Metz, T. 2001. FAO/IPGRI. *Multi-croppassport descriptors* (available at [http://www.bioversityinternational.org/index.php?id=19&user_bioversitypublications_pi1\[showUid\]=2192](http://www.bioversityinternational.org/index.php?id=19&user_bioversitypublications_pi1[showUid]=2192)).

Bioversity International. *Crop descriptor lists* (available at http://www.bioversityinternational.org/research/conservation/sharing_information/descriptor_listshtml).

Bioversity International. 2007. *Developing crop descriptor lists. Guidelines for developers.* Bioversity Technical Bulletin No. 13. Rome, Italy, Bioversity International. 71 p. (available at [http://www.bioversityinternational.org/index.php?id=19&user_bioversitypublications_pi1\[showUid\]=3070](http://www.bioversityinternational.org/index.php?id=19&user_bioversitypublications_pi1[showUid]=3070)).

de Vicente, M.C., Metz, T. & Alercia, A. 2004. *Descriptors for Genetic Marker Technologies.* Rome, Italy, IPGRI. 30 p. (available at [http://www.bioversityinternational.org/index.php?id=19&user_bioversitypublications_pi1\[showUid\]=2789](http://www.bioversityinternational.org/index.php?id=19&user_bioversitypublications_pi1[showUid]=2789)).

Laucou, V., Lacombe, T., Dechesne F. Siret, R., Bruno, J.P., Dessup, M., Dessup, P., Ortigosa, P., Parra, P., Roux, C., Santoni, S., Vares, D., Peros, J.P., Boursiquot, J.M. & This, P. 2011. High throughput analysis of grape genetic diversity as a tool for germplasm collection management. *Theoretical and Applied Genetics*, 122(6): 1233-1245.

Lehmann, C.O. & Mansfeld, R. 1957. Zur Technik der Sortimentserhaltung. *Kulturpflanze*, 5: 108-138.

UPOV Test Guidelines – English Index (available at http://www.upov.int/en/publications/tg_rom/tg_index.html).

USDA, ARS, National Genetic Resources Program. *Germplasm Resources Information Network - (GRIN).* [Online Database] National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland (available at <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/croplist.pl>).

4.6 Normas para la evaluación

Normas

- 4.6.1 Se deben tomar datos de evaluación de las accesiones de los bancos de germoplasma de los caracteres incluidos en las listas de descriptores de cultivos acordados a nivel internacional. Dichos datos se deben ajustar a formatos de medición estandarizados y calibrados.
- 4.6.2 Se deben obtener datos de evaluación de todas las accesiones como sea posible en la práctica, mediante análisis en laboratorio, vivero y/o campo según proceda.
- 4.6.3 Los ensayos de evaluación deben llevarse a cabo en al menos tres sitios distintos y se deben obtener datos en tres años como mínimo.

Contexto

La evaluación consiste en la observación y registro de aquellas características cuya expresión suele estar influida por factores ambientales. Incluye la recolección metódica de datos de caracteres agronómicos y de calidad mediante ensayos experimentales adecuadamente diseñados. Los datos de evaluación frecuentemente incluyen resistencias a plagas de insectos, patologías de la planta y evaluación de la calidad (por ejemplo, contenido en aceite o proteínas) así como caracteres ambientales (tolerancia a la sequía, al frío y otros). Este tipo de información facilita una identificación más orientada del germoplasma que satisface las necesidades de los posibles usuarios, por lo que los datos obtenidos deben ser incorporados al sistema de documentación del banco de germoplasma. Estos conjuntos de datos son de gran interés para los usuarios con el fin de incorporar caracteres en programas de mejoramiento genético y mejorar la utilización de colecciones. Los caracteres por los cuales se evalúan las accesiones de germoplasma son definidos previamente por los expertos en las especies en colaboración con los responsables de los bancos de germoplasma. Unos datos de evaluación fiables y de fácil

acceso por parte de mejoradores de plantas e investigadores facilitan enormemente el acceso y uso de las accesiones de germoplasma vegetal. El germoplasma debe ser evaluado de forma sistemática utilizando redes de colaboración tanto a nivel internacional como regional y nacional.

Obtener datos de evaluación lleva más tiempo y es muchas veces más costoso que obtener datos de caracterización. Los responsables de los bancos deben hacer todos los esfuerzos posibles para obtener registros de datos de evaluación. Una posible fuente son los registros de evaluación producidos por los usuarios a los que se ha enviado semillas. El banco de germoplasma debe solicitar al usuario que comparta los datos de evaluación, al menos tras un periodo de tiempo determinado desde el momento en el que el usuario haya publicado los resultados de la evaluación. Los aspectos prácticos del acuerdo se deben resolver entre el banco de germoplasma y el usuario/receptor del material.

Aspectos técnicos

Se han elaborado numerosas listas de descriptores de especies cultivadas, por ejemplo las del Consejo Internacional de Recursos Fitogenéticos (hoy Bioersity International) y de la Unión Internacional para la Protección de Nuevas Variedades de Plantas (UPOV). Además, existen listas de descriptores de evaluación elaboradas por organizaciones nacionales o regionales como el Sistema nacional de germoplasma vegetal (NPGS) del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA).

La toma de datos debe ser realizada por personal capacitado y utilizando formatos de medición calibrados y estandarizados tanto como sea posible, con accesiones testigo (control) suficientemente identificadas y listas de descriptores de cultivo publicadas. Los resultados de evaluación en vivero, en laboratorio o en campo, siguiendo protocolos estandarizados y procedimientos experimentales, se presentan normalmente como valores discretos (por ejemplo niveles de severidad en síntomas de enfermedad, conteos) o como valores continuos (basados en mediciones). Los datos deberán ser validados por el encargado y los oficiales encargados de la documentación antes de ser volcados en la base de datos del banco de germoplasma y puestos a disposición del público. Durante la evaluación es conveniente la participación de equipos multidisciplinares con experiencia en biología de semillas y patología vegetal, resistencia a plagas, tolerancias ambientales, tanto en la propia institución como en otras instituciones colaboradoras. Estos requisitos no es frecuente encontrarlos en los bancos de germoplasma por lo que la evaluación de accesiones de germoplasma es más eficaz si se realiza de forma conjunta con fitomejoradores especializados.

Muchos de los caracteres agronómicos demandados por los mejoradores son genéticamente demasiado complejos para ser observados en las evaluaciones preliminares del germoplasma. Los datos sobre caracteres agronómicos se obtienen normalmente durante la evaluación de germoplasma en programas de mejoramiento, y muchos de esos caracteres son resultado de fuertes interacciones de genotipo x ambiente (G x A) y por lo tanto son específicos de la zona de evaluación. Es esencial



realizar repeticiones de la evaluación de los caracteres buscados en diferentes ambientes y definir e identificar claramente los testigos a utilizar en años sucesivos. Esto debe llevarse a cabo en al menos tres sitios que tengan condiciones ambientales distintas y durante tres ciclos vegetativos, y los datos de los resultados obtenidos en los distintos años se deben comparar de manera estadísticamente concluyente.

Gracias a los avances de la biotecnología, las tecnologías de marcadores moleculares y genómicas son cada vez más utilizadas también en evaluación (de Vicente *et al.*, 2004) (ver Normas de caracterización). Entre los marcadores moleculares utilizados de forma más habitual en caracterización y evaluación de germoplasma se encuentran los AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*), los SSR (*Simple Sequence Repeats*) y los SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*). Estos han sustituido casi totalmente a los antiguos tipos de marcadores, RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) y RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) por su abundancia genómica relativa y por la alta posibilidad

de reproducir los datos. Además, los avances en la secuenciación de próxima generación y la consiguiente reducción de costos han propiciado un mayor uso de los ensayos basados en la secuenciación de regiones codificantes y no codificantes y del genotipado mediante secuenciación (GBS, *genotyping-by-sequencing*) en la evaluación de germoplasma. Los tipos de marcadores moleculares difieren en la forma en que detectan diferencias genéticas, el tipo de datos que generan, los niveles taxonómicos a los que se pueden aplicar mas adecuadamente, y sus requerimientos técnicos y financieros (Lidder y Sonnino, 2011). Cuando sea factible la selección asistida por marcadores (MAS, *Marked Assisted Selection*), es decir la selección por la presencia o ausencia de caracteres en materiales de mejora a nivel molecular, puede también aplicarse a la evaluación de germoplasma para caracteres de interés. La escasez de personal adecuadamente capacitado y la falta de recursos en comparación con los costes de establecimiento relativamente altos, siguen siendo un impedimento para la adopción generalizada de los marcadores moleculares como método elegido para la evaluación de germoplasma, especialmente en países en desarrollo.

Disposiciones particulares

La evaluación de germoplasma vegetal es una actividad que requiere mucho trabajo y niveles adecuados de financiamiento sostenible para permitir el ensamblaje de datos fiables de alta calidad. Para las situaciones en las que la evaluación completa de todas las accesiones, a pesar de ser deseable, no resulta factible desde el punto de vista económico, un punto de partida recomendado es la selección de accesiones genéticamente diversas, basada por ejemplo, en subconjuntos previamente definidos de colecciones de germoplasma.

Las variaciones en la incidencia de plagas y enfermedades, la gravedad de los estreses abióticos y las fluctuaciones de los factores ambientales y climáticos en el campo ejercen gran influencia en la precisión de los datos, por lo que deberían ser mitigados mediante evaluaciones razonablemente replicadas, en varias localizaciones, varias estaciones y varios años. Además, los ensayos de laboratorio para medición de algunos caracteres, como el contenido de aceites o proteínas, la calidad del almidón, factores nutricionales u otros, requieren equipos especializados que no siempre están disponibles o que podrían ser costosos. Una vez más se destaca la necesidad de conformar equipos multidisciplinares de diversas unidades o instituciones, según sea el caso.

La utilización de datos de evaluación generados por otros puede plantear problemas prácticos importantes. Por ejemplo, los datos pueden estar en formatos diferentes, y si ya han sido publicados pueden comportar derechos de autor o de propiedad intelectual. Con el fin de facilitar el uso de datos de origen externo es importante normalizar la recolección y el análisis de datos y utilizar formatos de información uniformes.

BIBLIOGRAFÍA

Alercia, A., Diulgheroff, S. & Metz, T. 2001. FAO/IPGRI. *Multi-crop passport descriptors* (available at [http://www.biodiversityinternational.org/index.php?id=19&user_biodiversitypublications_pi1\[showUId\]=2192](http://www.biodiversityinternational.org/index.php?id=19&user_biodiversitypublications_pi1[showUId]=2192)).

Biodiversity International. *Crop descriptor lists* (available at http://www.biodiversityinternational.org/research/conservation/sharing_information/descriptor_lists.html).

Biodiversity International. 2007. *Developing crop descriptor lists, Guidelines for developers. Biodiversity Technical Bulletin* No. 13. Rome, Italy, Biodiversity International. 71 p. (available at [http://www.biodiversityinternational.org/index.php?id=19&user_biodiversitypublications_pi1\[showUId\]=3070](http://www.biodiversityinternational.org/index.php?id=19&user_biodiversitypublications_pi1[showUId]=3070)).

Bretting, P.K. & Widrlechner, M.P. 1995. Genetic markers and plant genetic resource management. *Plant Breeding Reviews*, 13:11-86.

de Vicente, M.C., Metz, T. & Alercia, A. 2004. *Descriptors for genetic marker technologies*. Rome, Italy, IPGRI. 30 p. (available at [http://www.biodiversityinternational.org/index.php?id=19&user_biodiversitypublications_pi1\[showUId\]=2789](http://www.biodiversityinternational.org/index.php?id=19&user_biodiversitypublications_pi1[showUId]=2789)).

Karp, A., Kresovich, S., Bhat, K.V., Ayad, W.G. & Hodgkin, T. 1997. *Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies*. IPGRI Technical Bulletin No. 2. Rome, Italy, IPGRI. 47p.

Lehmann, C.O. & Mansfeld, R. 1957. Zur Technik der Sortimentserhaltung. *Kulturpflanze*, 5: 108-138.

Lidder, P. & Sonnino, A. 2011. *Biotechnologies for the management of genetic resources for food and agriculture*. FAO Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture Background Paper No. 52 (available at <http://www.fao.org/docrep/meeting/022/mb387e.pdf>).

NPGS (available at <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/croplist.pl>).

Rao, N.K., Hanson, J., Dulloo, M.E., Ghosh, K., Nowell, D. & Larinde, M. 2006. *Manual of seed handling in genebanks*. Handbooks for Genebanks No. 8. Rome, Italy, Biodiversity International.

UPOV (available at: http://www.upov.int/en/publications/tg_rom/tg_index.html).

4.7 Normas para la documentación

Normas

- 4.7.1 Los datos de pasaporte del 100 por ciento de las accesiones deben estar documentados utilizando los descriptores de pasaporte FAO/IPGRI para cultivos múltiples.
- 4.7.2 Toda la información y los datos generados en los bancos de germoplasma relacionados con todos los aspectos de la conservación y el uso del material deben ser registrados en una base de datos debidamente diseñada.

Contexto

La información acerca de las accesiones es esencial para la gestión y el mantenimiento de las colecciones en el banco de germoplasma. También es importante compartir esta información y ponerla a disposición de los potenciales usuarios de germoplasma, y deberá adjuntarse a todo material que se distribuya. Los datos de pasaporte son los datos mínimos de cada accesión que deben estar disponibles para garantizar una gestión adecuada, y deberán utilizarse normas internacionales, tales como los descriptores de pasaporte para cultivos múltiples de la FAO y el IPGRI (FAO/IPGRI 2001), para registrar los datos de pasaporte. El uso de normas acordadas a nivel internacional facilita en gran medida el intercambio de datos.

En la última década han tenido lugar grandes avances en la tecnología de la información y la bioinformática, gran parte de los cuales están disponible en línea. La mayoría de los bancos de germoplasma también disponen de computadoras y tienen acceso a Internet, lo cual hace posible registrar e intercambiar datos e información de manera eficiente. En última instancia, la conservación y la capacidad de conservar el germoplasma conservado se promueven a través de una buena gestión de la información y los datos. Toda la información y los datos generados durante el proceso de adquisición,

registro, almacenamiento, control, regeneración, caracterización, evaluación y distribución deberán ser registrados en una base de datos diseñada a propósito y empleada para mejorar la conservación y el uso del germoplasma. Estos datos e información abarcan desde los detalles de las características genéticas de las accesiones y las poblaciones individuales hasta las redes de distribución y los usuarios. Es importante alojar una copia de seguridad del sistema de la base de datos en una ubicación externa.

La documentación de los datos de caracterización, evaluación y distribución tiene particular importancia para mejorar el uso de la colección respectiva y ayudar a identificar accesiones concretas.

Dados los avances realizados en el campo de la biotecnología, surge la necesidad de complementar los datos sobre caracteres fenotípicos con datos moleculares. Se deberán realizar esfuerzos para registrar los datos moleculares que se generen a través de la genómica, la proteómica y la bioinformática.

Aspectos técnicos

Los sistemas informáticos para el archivo de datos e información permiten un mayor almacenamiento de toda la información relacionada con la gestión del banco de germoplasma. La adopción de los estándares de datos que actualmente existen para la mayoría de los aspectos de la gestión de datos en bancos de germoplasma facilita la gestión de la información y contribuye a mejorar el uso e intercambio de datos. Por ejemplo, la lista de descriptores de pasaporte para cultivos múltiples de la FAO/IPGRI (Alercia *et al.*, 2001) se deberá utilizar para documentar los datos de pasaporte, ya que es fundamental para el intercambio de datos entre bancos y países.

Existen sistemas de manejo de información sobre germoplasma, como GRIN-Global, GENESYS, Mansfield Database (IPK) y SESTO (NordGen)¹, desarrollados específicamente para bancos de germoplasma y sus necesidades de gestión de la documentación y la información. Otro sistema de manejo de la información de germoplasma es el Sistema internacional de información sobre cultivos (ICIS), plataforma en la que pueden almacenarse los datos del germoplasma de uno o más bancos, publicarse estos en línea con una función de búsqueda y consulta que permite a los usuarios establecer criterios para la selección del germoplasma en función de uno o múltiples caracteres, delimitar dichos datos mediante sus coordenadas GPS para una región y/o superponerlos con mapas climáticos y de suelos para la selección específica de germoplasma.

Muchas veces los datos de evaluación son producidos por los usuarios a los que se han distribuido semillas. El banco de germoplasma deberá solicitar al usuario que comparta los datos de evaluación, los cuales deberán incluirse en el sistema de

1 GRIN: <http://www.ars-grin.gov/>
GENESYS: <http://www.genesys-pgr.org/>
Mansfield Database: http://mansfield.ipk-gatersleben.de/pls/htmldb_pgrc/f?p=185:3:1644539197326401
SESTO: <http://www.nordgen.org/sesto/>

documentación del banco de germoplasma. Dicha información podrá abarcar las resistencias al estrés biótico y abiótico, las características de crecimiento y desarrollo de la accesión, las características de calidad de la producción, etc. El hecho de añadir este tipo de información permite una identificación más precisa del germoplasma con vistas a satisfacer las necesidades de los posibles usuarios. Sin embargo, se reconoce que el uso de la información generada por los usuarios puede no ser tan simple y entrañar problemas institucionales y de derechos de autor.

Disposiciones particulares

La falta o la pérdida de documentación suponen riesgos para el uso óptimo de las semillas e incluso pueden dar lugar a su pérdida. Los responsables de las colecciones deberán asegurarse de mantener registros adecuados de toda la información relacionada con la gestión del banco en sistemas de documentación de seguridad, como parte de su sistema de gestión de riesgos. En el caso de que no se disponga de un sistema informático, toda la información importante debe ser adecuadamente documentada en libros de contabilidad.

BIBLIOGRAFÍA

Alercia, A., Diulgheroff, S. & Metz, T. 2001. *FAO/IPGRI. Multi-crop passport descriptors* (available at [http://www.biodiversityinternational.org/index.php?id=19&user_biodiversitypublications_pi1\[showUId\]=2192](http://www.biodiversityinternational.org/index.php?id=19&user_biodiversitypublications_pi1[showUId]=2192)).

de Vicente, C., Alercia, A. & Metz, T. 2004. *Descriptors for genetic marker technologies*. Rome, Italy, IPGRI. 30 p. (available at [http://www.biodiversityinternational.org/index.php?id=19&user_biodiversitypublications_pi1\[showUId\]=2789](http://www.biodiversityinternational.org/index.php?id=19&user_biodiversitypublications_pi1[showUId]=2789)).

International Crop Information System (available at: <http://irri.org/knowledge/tools/international-crop-information-system>).

4.8 Normas para la distribución y el intercambio

Normas

- 4.8.1 Las semillas se deben distribuir de conformidad con las leyes nacionales y los tratados y convenios internacionales pertinentes.
- 4.8.2 Las muestras de semillas se deben suministrar con todos los documentos pertinentes exigidos por el país receptor.
- 4.8.3 El lapso de tiempo entre la recepción de una petición de semillas y el envío de las mismas deberá reducirse al mínimo posible.
- 4.8.4 El número mínimo de semillas viables a suministrar en una muestra debe estar entre 30 y 50, en la mayoría de las especies y en accesiones con suficientes semillas en stock. Cuando el número de semillas en el momento de la solicitud sea demasiado bajo y no existan accesiones alternativas adecuadas, las muestras se deben entregar después de su regeneración/multiplicación, previa renovación de la solicitud. Para algunas especies y determinados usos de investigación, se podrán aceptar muestras con un número menor de semillas a efectos de distribución.

Contexto

La conservación debe estar vinculada a la utilización. La distribución de germoplasma consiste en el suministro de una muestra representativa de accesiones de semillas de un banco de germoplasma en respuesta a peticiones de usuarios de germoplasma vegetal. La demanda de recursos genéticos crece constantemente para responder a los retos planteados por el cambio climático, los cambios en los espectros de virulencia de las principales plagas y enfermedades así como las especies exóticas invasivas. Esta demanda ha llevado a un mayor reconocimiento de la importancia de la utilización del germoplasma de los bancos, lo que determina en última instancia la distribución de



germoplasma. El tiempo que medie entre la recepción de una solicitud de semillas de un usuario y la respuesta y el envío correspondientes de semillas (junto con la información pertinente) deberá ser lo más corto posible.

Se reconoce la diversidad de sistemas legales con respecto a sus normas de procedimiento que regulan el acceso a los tribunales y al arbitraje, así como las obligaciones derivadas de los convenios internacionales y regionales aplicables a tales normas de procedimiento. Cuando un usuario solicita una accesión a un banco de germoplasma, el usuario es responsable de indicar los requisitos nacionales de importación de semillas, y en concreto las normas fitosanitarias de su país con el fin de evitar la propagación de plagas cuarentenarias o reguladas o de especies invasoras que puedan afectar gravemente a la producción nacional.

Los dos instrumentos internacionales que rigen el acceso a los recursos genéticos son el TIRFAA y el CDB. El TIRFAA facilita el acceso a los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura, y regula el reparto de beneficios derivados de su utilización. El TIRFAA establece un sistema multilateral de recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura para un conjunto de 64 especies cultivadas alimentarias y forrajeras (comúnmente conocidas como especies del Anexo 1 del Tratado) las cuales en su distribución están acompañadas de un ANTM. No obstante, el ANTM se puede utilizar también para las especies no incluidas en el Anexo 1, aunque también existen otros modelos disponibles. El acceso y el reparto de los beneficios en virtud del CDB se realiza en conformidad a su Protocolo de Nagoya. Tanto el TIRFAA como el CDB hacen énfasis en la continuidad entre la conservación y la utilización sostenible, junto con la facilitación del acceso y la distribución equitativa de los beneficios derivados de su uso.

Los bancos de germoplasma deben tener como objetivo poner a disposición de los usuarios tantas accesiones como sea posible, así como sus datos asociados. Cuando se agote el stock, se deberán multiplicar las accesiones para satisfacer las demandas de los usuarios con carácter prioritario. Los bancos de germoplasma deberán promover la disponibilidad de los recursos genéticos para usos tales como la investigación, el

mejoramiento, la educación, la agricultura y la repatriación. A nivel internacional, los bancos de germoplasma pueden ser una fuente de reabastecimiento de germoplasma de variedades locales para los países que estén creando su propio banco de germoplasma, o que hayan sufrido desastres tales como incendios, inundaciones o conflictos civiles. Es de señalar que el número mínimo de semillas para la distribución depende de la especie y el uso. Los bancos de germoplasma no se utilizan solamente para la pre-mejora y el fitomejoramiento aplicado, sino también en actividades de investigación. En este último caso, se suelen necesitar muy pocas semillas.

Aspectos técnicos

El germoplasma deberá distribuirse de forma que se garantice que llegue a su destino en buenas condiciones. Las condiciones ambientales pueden ser perjudiciales para la calidad de las semillas durante el transporte, por lo que éstas deberán embalsarse cuidadosamente y meterse en sobres herméticamente cerrados para protegerlas durante el transporte.

Las muestras que se distribuyan deberán cumplir con las disposiciones de las presentes normas de calidad y las disposiciones sobre sanidad de las semillas del país receptor. La distribución también deberá respetar la normativa y la legislación del país. Los aspectos legales y normativos, en particular las disposiciones sobre sanidad de las semillas, deberán ser comunicados por el usuario o las autoridades fitosanitarias nacionales.

La autorización de las aduanas y los departamentos de protección vegetal de los envíos, se suelen ver muy frecuentemente facilitados y agilizados cuando se tienen disponibles los documentos requeridos por el país receptor y el solicitante.

El certificado fitosanitario, las declaraciones adicionales, el certificado de donación, el certificado de ausencia de valor comercial, y el permiso de importación son entre otros algunos de los documentos que pueden ser requeridos por el país receptor. Por ello es importante mantener actualizada la lista de documentos solicitados por los diferentes países. Si la distribución o el intercambio de semillas entrañan otros costos (debidos a la obtención de certificados fitosanitarios, certificados de la Asociación Internacional de Análisis de Semillas, sobres específicos, u otros), estos correrán a cargo del usuario, salvo que ambas partes determinen lo contrario. Un problema importante relacionado con la distribución internacional es la obligación de los bancos de germoplasma de declarar que no se ha detectado una enfermedad determinada en el campo de producción de las semillas. Los bancos de germoplasma no pueden cumplir con otras obligaciones de declaración en relación con semillas que se hayan producido 20-30 años antes. Los países que reciban las semillas deberán aplicar procedimientos cuarentenarios para el manejo de semillas cuando no se puedan cumplir obligaciones adicionales de declaración.

Deberá facilitarse al destinatario la lista del material y la información relacionada (datos de pasaporte, como mínimo), junto con los acuerdos jurídicos relacionados con el acceso a los recursos genéticos proporcionados y el uso de los mismos.

Es muy recomendable reducir lo más posible el tiempo desde que el material se envía hasta que se recibe. En el caso de que las semillas no estén disponibles las

respuestas deberán incluir una descripción detallada del motivo, la fecha estimada de disponibilidad de la accesión, y las accesiones alternativas que pueden adaptarse a las necesidades del solicitante.

Se alienta a los receptores de accesiones de los bancos de germoplasma a realizar su propio acopio de semillas para sus necesidades de ensayos y experimentos. Esto es especialmente importante en lo referente a las especies silvestres, en las cuales los stocks de semillas suelen ser escasos, y para los ensayos de campo replicados cuando no sea posible suministrar la cantidad de semillas requerida.

Para el material distribuido fuera del Sistema multilateral del TIRFAA, el banco distribuidor deberá fomentar el retorno de información sobre la utilidad del germoplasma suministrado del receptor al proveedor de conformidad con las condiciones del ATM.

Disposiciones particulares

Las decisiones políticas, las situaciones de crisis o las demoras por razones burocráticas pueden prolongar el lapso de tiempo entre la recepción de una solicitud de semillas y la distribución del material. Las limitaciones relacionadas con la regeneración y/o la multiplicación de las accesiones también pueden afectar al proceso de distribución y retrasarlo.

BIBLIOGRAFÍA

Convention on Biological Diversity (CBD). 1992 (available at <http://www.cbd.int/convention/convention.shtml>).

Engels, J.M.M. & Visser, L. 2003. *A guide to effective management of germplasm collections*. IPGRI Handbooks for Genebanks No. 6. IPGRI, Rome, Italy.

FAO/IPGRI. 1994. *Genebank standards*. Rome, Italy, FAO and IPGRI (available at <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/meeting/015/aj680e.pdf>).

International Treaty on Plant Genetic Resources for Food and Agriculture (ITPGRFA) (available at <http://www.itpgrfa.net/International/>).

Rao, N.K., Hanson, J., Dulloo, M.E., Ghosh, K., Nowell, D. & Larinde, M. 2006. *Manual of seed handling in genebanks*. Handbooks for Genebanks No. 8. Rome, Italy, Bioversity International.

SGRP. *Crop genebank knowledge base* (available at <http://cropgenebank.sgrp.cgiar.org>).

Standard Material Transfer Agreement (SMTA) (available at <http://www.itpgrfa.net/International/>).

4.9 Normas para la duplicación de seguridad

Normas

- 4.9.1 Se deberá almacenar una muestra duplicada de seguridad de cada accesión original en una zona geográficamente distante, y en las mismas o mejores condiciones que las del banco de germoplasma original.
- 4.9.2 Cada muestra duplicada de seguridad deberá ir acompañada de la correspondiente información asociada.

Contexto

El duplicado de seguridad garantiza la disponibilidad de una submuestra de la accesión genéticamente idéntica a ella, para reducir el riesgo de que se pierda parcial o totalmente a causa de catástrofes de origen natural o humano. Los duplicados de seguridad son genéticamente idénticos a la colección a largo plazo y reciben la denominación de muestra secundaria más original (Engels y Visser, 2003). La duplicación de seguridad incluye el duplicado tanto del material como de la información asociada, incluida una copia de seguridad de la base de datos. Los duplicados de seguridad de los materiales se depositan para su almacenamiento a largo plazo en un lugar diferente. El lugar se elegirá de modo que se reduzcan al mínimo los posibles riesgos y se cuente con las mejores instalaciones de almacenamiento posibles. Para minimizar los riesgos que puedan surgir en un país determinado lo ideal será llevar a cabo la duplicación de seguridad fuera de ese país.

El duplicado de seguridad se realiza generalmente mediante el sistema de “caja negra”. Ello implica que el banco depositario no tiene derecho a usar ni distribuir el germoplasma. El depositante deberá garantizar que el material depositado sea de alta calidad, controlar la viabilidad de las semillas a lo largo del tiempo y utilizar su propia colección base para regenerar las colecciones cuando empiecen a perder su viabilidad. El germoplasma no se podrá tocar sin el permiso del depositante y solo se devolverá previa petición cuando la

colección original se haya perdido o destruido. La retirada del depósito también es posible cuando se reemplace con germoplasma recién regenerado. Se reconoce sin embargo que el sistema de “caja negra” no es el único enfoque. Puede haber casos en los que los bancos de germoplasma receptores también se hagan cargo de la colección de seguridad.

La duplicación de seguridad debe hacerse para todas las semillas originales recolectadas por el banco de germoplasma o cuando sea este banco el único que las mantiene. No obstante, el banco deberá conservar un conjunto de las muestras originales para facilitar el acceso a efectos de regeneración u otras decisiones de gestión. Las semillas que constituyan duplicados de otras colecciones se pueden recuperar por lo general de dichas colecciones y no requieren duplicación de seguridad, a menos que existan dudas sobre su seguridad en la otra colección.

Cualquier sistema de duplicación de seguridad requerirá de un acuerdo legal claramente firmado entre el depositante y el destinatario del duplicado de seguridad, en el que se establezcan las responsabilidades de las partes y las condiciones bajo las cuales se mantiene el material.

La Reserva mundial de semillas de Svalbard, situada en la isla de Spitsbergen (Noruega) ofrece esta duplicación de seguridad. Las instituciones que depositan semillas mantendrán la propiedad de estas y solo el depositario tendrá acceso a las muestras almacenadas en Svalbard.

Aspectos técnicos

En el momento de seleccionar el lugar para el duplicado de seguridad, se tomará en consideración principalmente la ubicación geográfica y las condiciones ambientales del sitio en cuestión. Las instalaciones deberán tener un nivel bajo de radiación (radiactividad) y ser estables (baja probabilidad de terremotos). Deberán estar en un lugar elevado que garantice un correcto drenaje durante las lluvias estacionales y evite el riesgo de inundaciones en caso de aumento del nivel del mar debido al calentamiento del planeta. La misma importancia revisten la estabilidad económica y la seguridad sociopolítica. Koo *et al.* (2004) sugieren que las muestras duplicadas de seguridad deberán estar alejadas de lugares donde exista un riesgo de bloqueo político, acción militar o terrorismo que puedan perturbar el acceso internacional.

Las muestras se prepararán para la duplicación de seguridad de la misma manera que para la colección base. Las condiciones deberán ser al menos tan estrictas como las del almacenamiento a largo plazo del germoplasma en un banco y la calidad de la preparación de las semillas (por ejemplo, el secado) será importante. En algunos casos será útil ordenar el material en función de la longevidad de los grupos de semillas (corta, media y larga) antes de su envío para la duplicación de seguridad.

No deberá limitarse el tamaño de la muestra a un número mínimo determinado. El tamaño de la muestra deberá ser suficiente para llevar a cabo al menos tres regeneraciones. Las copias de seguridad no sirven solo para una regeneración en el futuro, sino que también pueden proporcionar una muestra mínima para regenerar una accesión que

se haya perdido. Es mejor que haya una copia de seguridad “básica” con una cantidad mínima de semillas en otro lugar que ninguna copia en absoluto. Cuando sea posible, el duplicado de seguridad de una accesión en un banco de germoplasma de semillas deberá contener al menos 500 semillas viables para accesiones heterogéneas de especies alógamas y con una gran diversidad, y un mínimo de 300 semillas en las accesiones genéticamente uniformes. Para las accesiones de semillas de baja viabilidad se precisa un número mayor de semillas. La temperatura de almacenamiento deberá estar comprendida entre $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

El material de envasado para los duplicados de seguridad deberá ser trilaminado y la capa metálica intermedia tendrá un espesor suficiente. Deberá adoptar la forma de una bolsa cosida por los cuatro costados, sin refuerzos en los bordes. De esta forma se crea una protección adecuada contra el agua para el transporte y el almacenamiento a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante al menos 30 años. Se deberán colocar etiquetas en el exterior y el interior de cada paquete de semillas para asegurar que el germoplasma esté debidamente identificado.

Dado que las condiciones de almacenamiento para el duplicado de seguridad deberán ser iguales o mejores que las de la colección base, la viabilidad de las semillas podrá controlarse en lotes de semillas de la misma accesión que estén almacenadas a largo plazo en el banco de germoplasma, y hacer una extrapolación al duplicado de seguridad, siempre que se cumplan las normas básicas relativas a las condiciones de almacenamiento y se utilicen los mismos recipientes. En algunos casos, se pueden enviar junto con el duplicado de seguridad muestras para las pruebas de germinación en cajas separadas, y acordar con el depositario el control de la germinación.

Las mejores opciones para el transporte y el almacenamiento de semillas son las cajas sólidas y resistentes al frío, de cartón grueso o de polipropileno. Las cajas deberán sellarse adecuadamente. A fin de evitar el deterioro de la calidad de las semillas durante el transporte, este deberá realizarse por el medio más rápido disponible, ya sea la vía aérea o terrestre o un servicio de mensajería. El remitente deberá renovar las muestras cuando la viabilidad de las muestras almacenadas en condiciones similares en su colección base comience a disminuir.

Disposiciones particulares

Cuando se extrapole la viabilidad del duplicado de seguridad a partir de los resultados del control de la viabilidad de la muestra de la colección base, ello deberá hacerse con cierta cautela. Las semillas pueden envejecer a un ritmo diferente si hay diferencias en la humedad relativa ambiente entre ambos sitios y/o en el grado o frecuencia de las fluctuaciones de temperatura, aunque la temperatura media de almacenamiento sea la misma.

Pueden plantearse cuestiones de responsabilidad en relación con el envío de muestras en condiciones de caja negra sellada. Uno de ellos es la responsabilidad por el contenido de la caja sellada y su manejo por parte de funcionarios de aduanas y otras autoridades para la entrada en el país. En algunos casos, las autoridades abren las cajas y les ponen

sellos especiales para confirmar que las muestras no son medicamentos u otras plantas prohibidas. Otra cuestión es la de la responsabilidad de la institución receptora en caso de que el material sufra algún daño o pierda su viabilidad antes de lo esperado como resultado del estrés sufrido durante el transporte, el sellado defectuoso de los recipientes, o de temperaturas que se apartan de las normas especificadas. En las condiciones aquí descritas, el depositario de los duplicados de seguridad solo será “responsable” si la temperatura llega a ser incontrolable, lo cual deberá comunicarse inmediatamente a la institución de origen para que pueda decidir la medida a tomar. La institución de origen deberá asumir la responsabilidad íntegra por los daños derivados del transporte o la humedad no controlada.

Las normas y los aspectos técnicos pueden ser difíciles de aplicar en ciertas especies debido a la biología intrínseca de las muestras, como por ejemplo cuando las semillas son poco longevas o grandes. En este último caso el espacio y el costo pueden ser factores limitantes.

BIBLIOGRAFÍA

Engels, J.M.M. & Visser L. 2003. *A guide to effective management of germplasm collections*. IPGRI Handbooks for Genebanks No. 6. Rome, Italy, IPGRI.

SGRP. *Crop genebank knowledge base*. The page on safety duplication, available at http://cropgenebank.sgrp.cgiar.org/index.php?option=com_content&view=article&id=58&Itemid=207&lang=english contains detailed background documents, a list of references and a standard safety deposit agreement template.

4.10 Normas para la seguridad y el personal

Normas

- 4.10.1 Los bancos de germoplasma deberán disponer de una estrategia de manejo de riesgos que incluya, entre otras cosas, medidas contra los cortes de corriente, incendios, inundaciones y terremotos.
- 4.10.2 Los bancos de germoplasma deberán respetar las normas y protocolos locales de seguridad y salud en el trabajo cuando proceda.
- 4.10.3 Los bancos de germoplasma deberán emplear el personal necesario para desempeñar todas las funciones ordinarias y asegurar que el banco pueda adquirir, conservar y distribuir germoplasma de conformidad con las normas.

Contexto

La consecución de los objetivos de un banco de germoplasma consistentes en la adquisición, conservación y distribución de germoplasma no solo requiere que se disponga de procedimientos y equipos adecuados para el manejo del germoplasma, sino también que se emplee personal debidamente capacitado para llevar a cabo el trabajo necesario y garantizar la seguridad del banco.

La gestión activa de los bancos de germoplasma requiere de un personal bien capacitado, y es crucial asignar cometidos a empleados con la debida competencia. Por lo tanto, los bancos de germoplasma deberán contar con un plan o estrategia para el personal junto con el presupuesto correspondiente, a fin de garantizar que disponen de un mínimo de personal debidamente capacitado para cumplir con la responsabilidad de asegurar que el banco puede adquirir, conservar y distribuir germoplasma. El acceso a especialistas en una amplia gama de áreas temáticas es conveniente, en función de los objetivos y el mandato de cada banco de germoplasma. Sin embargo, los complementos y la formación del personal dependerán de las circunstancias de cada caso. El estado

sanitario y la utilidad de las semillas almacenadas en el banco de germoplasma dependen también de aspectos relacionadas con la seguridad y la protección de los bancos de germoplasma. Deberán adoptarse disposiciones, entre otras cosas, para garantizar el suministro eléctrico de seguridad, la existencia de equipos de extinción de incendios y la comprobación periódica de los mismos, y que los edificios que alberguen los bancos de germoplasma sean a prueba de terremotos si se hallan en una zona sísmica, por mencionar algunas. Por consiguiente, los bancos de germoplasma deberán llevar a cabo y promover una gestión de riesgos sistemática que trate los riesgos biológicos y físicos en el entorno cotidiano a los que estén expuestas las colecciones y la información relacionada.

Aspectos técnicos

El personal deberá tener una formación adecuada adquirida mediante de capacitación certificada y/o en el puesto de trabajo, y deberán estudiarse las necesidades de formación del personal. El personal de los bancos de germoplasma deberá conocer los procedimientos de seguridad y tener capacitación al respecto, a fin de minimizar los riesgos para el germoplasma.

Las instalaciones del banco de germoplasma deberán estar construidas de forma que resistan los desastres naturales, como huracanes, ciclones, terremotos o inundaciones, de los que se tenga conocimiento de ocurrencia en el lugar donde se haya construido el banco de germoplasma.

Las instalaciones para el almacenamiento deberán estar protegidas con dispositivos de seguridad normalizados tales como cercas, sistemas de alarma, puertas de seguridad y cualquier otro sistema que ayude a proteger al banco de germoplasma de los ladrones y otras personas ajenas al banco. La seguridad de las colecciones de semillas en el banco se verá reforzada si se permite la entrada única y exclusivamente en las instalaciones de almacenamiento al personal autorizado.

Deberá proporcionarse ropa de protección para su utilización en el área de almacenamiento. Se deberán tomar las debidas precauciones e instalar equipos de seguridad como alarmas y dispositivos para abrir las puertas desde el interior de las salas de secado y salas de refrigeración.

Con prácticamente toda seguridad, la refrigeración dependerá de la corriente eléctrica y por ello es necesario que el suministro sea adecuado y fiable. La falta de suministro eléctrico puede acarrear la pérdida completa de las accesiones de los bancos de germoplasma. Se debe considerar la posibilidad de disponer de un generador de seguridad que se ponga en marcha automáticamente cuando falle la fuente principal de suministro eléctrico. Para ello será necesario almacenar cantidades suficientes de combustible para el funcionamiento del generador durante los cortes de electricidad.

Deberá haber dispositivos de control de la temperatura en las salas de secado y almacenamiento para realizar un seguimiento de los parámetros reales en función del tiempo. En caso de que la refrigeración no sea fiable será necesario plantearse si es mejor almacenar las semillas sin refrigeración. Si se utiliza refrigeración para conservar el

germoplasma, esta deberá cumplir con las normas necesarias, ya que una refrigeración insegura puede ser mucho más perjudicial que un almacenamiento no refrigerado.

Si la refrigeración o el suministro eléctrico no son fiables, podrá construirse una instalación en el suelo a una profundidad de 10 a 20 m, donde la temperatura puede alcanzar los 10 °C de media. Esto podría ser interesante en varias regiones tropicales en las que no hay riesgo de inundación. A pesar de ello, las semillas deberán secarse apropiadamente y conservarse en frascos debidamente sellados.

Es necesario que los bancos de germoplasma dispongan de alarma y equipo de lucha contra incendios. La mayoría de los incendios se generan en circuitos eléctricos defectuosos y, por lo tanto, deberán efectuarse controles periódicos de los mismos para asegurar el cumplimiento de las normas de seguridad. Los equipos contra incendios deberán comprender extintores de incendios y mantas ignífugas. Para las zonas propensas a las tormentas, deberá instalarse un pararrayos en el banco de germoplasma.

Disposiciones particulares

Cuando no se disponga de personal debidamente capacitado, o cuando haya problemas de tiempo o limitaciones de otro tipo, una solución podría consistir en subcontratar parte del trabajo de los bancos de germoplasma o recabar la ayuda de otros bancos de germoplasma. Deberá informarse a la comunidad internacional de bancos de germoplasma cuando las funciones de un banco de germoplasma se encuentren en situación de riesgo.

La entrada no autorizada a las instalaciones de los bancos de germoplasma puede acarrear una pérdida directa de material, pero también puede poner en peligro las colecciones como consecuencia de la introducción involuntaria de plagas y enfermedades y la interferencia en los sistemas de gestión.

BIBLIOGRAFÍA

Engels, J.M.M. & Visser, L. 2003. *A guide to effective management of germplasm collections*. IPGRI Handbooks for Genebanks No. 6. IPGRI, Rome, Italy.

SGRP. *Crop genebank knowledge base*. Section on risk management (available at http://cropgenebank.sgrp.cgiar.org/index.php?option=com_content&view=article&id=135&Itemid=236&lang=english)





Capítulo 5

Normas para bancos de germoplasma de campo



5.1 Normas para la elección de la ubicación del banco de germoplasma de campo

Normas

- 5.1.1 Las condiciones agroecológicas (clima, altitud, suelo, drenaje) de la zona donde se ubique el banco de germoplasma de campo deben ser tan similares como sea posible al entorno donde los materiales vegetales se desarrollen normalmente o donde hayan sido recolectados.
- 5.1.2 El banco de germoplasma de campo debe estar ubicado de manera que se reduzcan al mínimo los riesgos de desastres y peligros tanto naturales como provocados por el hombre como plagas, enfermedades, daños causados por animales, inundaciones, sequías, incendios, daños por nieve y congelación, volcanes, granizo, robos o vandalismo.
- 5.1.3 Para aquellas especies utilizadas para producir semillas para su distribución, el banco de germoplasma de campo debe situarse de modo que se reduzcan al mínimo los riesgos de flujo de genes y de contaminación desde cultivos o poblaciones silvestres de la misma especie, para mantener la integridad genética.
- 5.1.4 El banco de germoplasma de campo debe estar ubicado en un lugar con una tenencia de la tierra segura y lo suficientemente grande como para permitir la expansión de la colección en el futuro.
- 5.1.5 El lugar donde se ubique el banco de germoplasma de campo debe ser fácilmente accesible para el personal y para las entregas de suministros, y tener acceso al agua e instalaciones adecuadas para la propagación y la cuarentena.

Contexto

Teniendo en cuenta la condición de largo plazo de un banco de germoplasma de campo, la elección de una ubicación apropiada es fundamental para una adecuada conservación del germoplasma. Hay muchos factores que deben tenerse en cuenta a la hora de elegir la ubicación de un banco de germoplasma de campo, como las condiciones agroecológicas adecuadas para las plantas que se van a conservar, los posibles desastres naturales y provocados por el hombre asociados con la zona, la tenencia de la tierra a largo plazo asegurada, la accesibilidad para el personal y la disponibilidad de los recursos hídricos.

Aspectos técnicos

Las plantas crecen fuertes y sanas cuando se plantan en condiciones agroecológicas apropiadas. Los bancos de germoplasma de campo son especialmente vulnerables a las pérdidas causadas por la falta de adaptación del material originado en entornos muy diferentes de la ubicación del banco. La zona elegida para el banco de germoplasma de campo debe tener el tipo de clima y suelo más adecuado para la especie con el fin de reducir el riesgo de la mala adaptación. Una solución a una mala adaptación consiste en la adopción de un enfoque descentralizado de la gestión del banco de germoplasma, es decir, ubicar las colecciones en diferentes zonas agroecológicas en lugar de en un único banco de germoplasma centralizado. Las accesiones con una adaptación similar se mantendrán juntas en un emplazamiento situado en un entorno agrícola similar al de su origen, o similar o cercano a su hábitat natural. Las condiciones naturales del entorno original puede ser simuladas proporcionando una mayor intensidad de sombra o un mayor drenaje, por ejemplo para los parientes silvestres de cultivos cuyo origen está en bosques naturales en comparación con las plantas cultivadas que están adaptadas a una mayor intensidad de luz.

Evitar plagas, enfermedades e insectos vectores es de gran importancia para las colecciones de campo. Cuando es posible, el banco de germoplasma de campo debe estar ubicado en un emplazamiento libre de las enfermedades y plagas patógenas más importantes o alejado de zonas de las que se tiene conocimiento de infección por hongos y virus, con el fin de reducir los riesgos y los costos de manejo relacionados con la protección fitosanitaria y garantizar una fuente limpia de material para su distribución. Antes de la plantación se debe comprobar que los suelos están libres de hongos, termitas y otros parásitos transmitidos por el suelo y asegurar que se proporciona el tratamiento adecuado para limpiar el suelo antes de la plantación. Cuando esto no sea posible, la zona elegida deberá estar ubicada a cierta distancia de parcelas cultivadas con la misma especie, con el fin de reducir el riesgo de plagas de insectos y enfermedades, y las plantas con síntomas de enfermedad deberán eliminarse mediante un intenso programa de raleo. Siempre que sea posible, las colecciones se deben mantener en zonas de clima cálido y seco que son menos favorables para las plagas y enfermedades y para el movimiento de vectores. Por otro lado, la concentración de un gran número de plantas susceptibles a una enfermedad puede aumentar gravemente el riesgo de brotes de dicha enfermedad.

Estas colecciones grandes de un único género requieren un estudio especial desde el punto de vista fitosanitario.

La evaluación del riesgo de ocurrencia de desastres naturales tales como inundaciones, incendios, nieve o hielo, volcanes, terremotos y huracanes es un criterio primordial para garantizar la seguridad física de las colecciones. Además, se deben tener en cuenta la seguridad física y la posibilidad de daños causados por el hombre como el robo y el vandalismo. Estas características deben ser consideradas en el momento de decidir la localización y el diseño de un banco de germoplasma de campo como elemento para reducir la pérdida de germoplasma (ver también las normas para la seguridad y la duplicación de seguridad).

En plantas pequeñas se pueden utilizar mosquiteras y jaulas como protección contra los daños de insectos o pájaros. Las especies alógamas, como árboles frutales con semillas recalcitrantes o plantas herbáceas cultivadas para obtener semilla y conservadas como plantas, requieren aislamiento frente a los potenciales polinizadores. Para asegurar la integridad genética de estas especies es importante elegir una zona alejada de campos de cultivo o de poblaciones silvestres de la misma especie y así evitar el flujo de genes o la contaminación por parte de malas hierbas. Para la propagación se deben establecer recomendaciones de distancias de aislamiento, jaulas de aislamiento o medidas de control de la polinización. La Base de Conocimientos de los Bancos de Genes de los Cultivos (*Crop Genebank Knowledge Base* en inglés) ofrece información específica por cultivo sobre distancias de aislamiento para la regeneración de accesiones (ver Bibliografía).

Un banco de germoplasma de campo debe estar ubicado en un sitio seguro en el sentido de contar con un acuerdo a largo plazo y con tenencia de la tierra y financiamiento garantizados o publicados en un boletín oficial, habiendo tomado en consideración el plan de desarrollo para la zona. El historial del uso del suelo puede dar información sobre el estado de plagas o malas hierbas en la tierra y sobre la cantidad de fertilizante utilizado. Un elevado uso de fertilizantes en los años anteriores podría afectar al crecimiento de raíces y tubérculos. Por ejemplo, un alto residuo de fertilizante puede impedir el desarrollo de tubérculos en la batata. El estrés hídrico se puede evitar si entre los criterios de elección de la ubicación se incluye la disponibilidad de suficiente agua de lluvia o de suministro de agua para riego suplementario. Además del historial del uso del suelo, se recomienda tomar medidas para determinar y corregir el estado físico y nutricional de los suelos. Básicamente, esto supone el análisis físico y químico del suelo con las posteriores medidas correctivas que procedan. Las zonas con uso frecuente de niveles altos de potasio deben equilibrarse con aplicaciones suplementarias de calcio y magnesio, especialmente para árboles frutales tropicales.

El tamaño de la zona elegida debe ser suficiente para proporcionar espacio al tipo de especies a conservar, así como para la posible expansión futura a medida que la colección crezca, especialmente en el caso de especies perennes. En los cultivos arbóreos el espacio requerido puede ser importante. También se debe disponer de espacio suficiente para dar cabida a las plantas anuales que requieren replantación continua y rotación entre parcelas para evitar cualquier posible contaminación de las plantaciones anteriores, así como la rotación de cultivos anuales y perennes para el control de enfermedades y manejo de la fertilidad

del suelo. Se necesitan instalaciones de almacenamiento suficientes y adecuadas cuando el material vegetal necesite ser almacenado en el periodo entre la cosecha y la siembra siguiente.

El acceso físico fácil al germoplasma favorecerá la supervisión y el manejo de las plantas. El sitio debe permitir el adecuado acceso de la mano de obra y la maquinaria para las aplicaciones de materia orgánica, fertilizantes y pesticidas y tener acceso a instalaciones adecuadas de riego durante todo el año, de propagación y de mantenimiento *in vitro* o crioconservación cuando sea necesario. Se debe contar con un buen sistema de seguridad para evitar robos y daños al germoplasma y a las instalaciones.

Disposiciones particulares

Cuando se planten en la misma ubicación accesiones de diferentes orígenes ecogeográficos, el personal de la colección deberá prestar especial atención al seguimiento de la fenología reproductiva y la producción de semillas, e identificar y transferir las accesiones mal adaptadas a los posibles sitios alternativos, invernaderos o cultivos *in vitro* para evitar la pérdida de diversidad genética. Algunas accesiones pueden requerir prácticas de manejo especiales. Para proteger a las plantas de los depredadores puede ser necesario protegerlas con estructuras como cubiertas o jaulas.

BIBLIOGRAFÍA

Anderson, C.M. 2008. *Recursos genéticos y propagación de variedades comerciales de cítricos*. XII Simposium Internacional de Citricultura. Tamaulipas, México. Available on CD.

Anderson, C.M. 2000. *Citrus germplasm resources and their use in Argentina, Brazil, Chile, Cuba and Uruguay*. Proc. IX ISC. Vol I: 123-125, Florida, USA.

Borokini, T.I., Okere, A.U., Giwa, A.O., Daramola, B.O. & Odojin, T.W. 2010. Biodiversity and conservation of plant genetic resources in field genebank of National Centre for Genetic Resources and Biotechnology, Ibadan, Nigeria. *International Journal of Biodiversity and Conservation*, 2(3): 037-050 (available at <http://www.academicjournals.org/ijbc/pdf/pdf%202010/mar/borokini%20et%20al.pdf>).

Crop Genebank Knowledge Base (available at:<http://cropgenebank.sgrp.cgiar.org/>).

Davies, F.S. & Albrigo, L.G. 1994. *Citrus*. Wallingford, UK, CAB International.

Gmitter, F.G. & Hu, X.L. 1990. The possible role of Yunnan, China, in the origin of contemporary citrus species (Rutaceae). *Economic Botany*, 44: 267-277.

Said Saad, M. & Ramanatha Rao, V. 2001. *Establishment and management of field genebank a training manual*. Serdang, IPGR-APO.

5.2 Normas para la adquisición de germoplasma

Normas

- 5.2.1 Todas las muestras que se incorporen al banco de germoplasma deberán haber sido adquiridas legalmente con la documentación técnica pertinente.
- 5.2.2 Todo material deberá ir acompañado de sus datos asociados, al menos los que se enumeran en los descriptores de pasaporte para cultivos múltiples de la FAO/IPGRI.
- 5.2.3 El material de reproducción se recogerá siempre que sea posible a partir de plantas sanas y en crecimiento, y en un estado de madurez suficiente para su adecuada propagación.
- 5.2.4 El período entre la recolección, el transporte y el procesamiento y la posterior transferencia al banco de germoplasma de campo debe ser lo más corto posible para evitar la pérdida y el deterioro del material.
- 5.2.5 Las accesiones adquiridas en otros países o regiones dentro del país deben pasar por los procesos de cuarentena pertinentes y cumplir con los requisitos correspondientes antes de su incorporación a la colección de campo.

Contexto

La adquisición es el proceso de recolectar o de solicitar materiales para su inclusión en el banco de germoplasma de campo, juntamente con la información relacionada con tales materiales. La particularidad de las plantas con semillas recalcitrantes y de las plantas propagadas vegetativamente requiere una atención especial en el momento de adquirir el germoplasma para su conservación en bancos de campo. Los propágulos necesarios para establecer un banco de germoplasma de campo pueden presentarse en diferentes formas, tales como semillas, esquejes, tubérculos, bulbos, estacas, cultivos de tejido, injertos o material crioconservado. Los materiales vegetales se pueden obtener a partir de otros

bancos de germoplasma existentes, colecciones de investigación y de fitomejoradores, variedades locales y otras formas cultivadas por los agricultores, así como de expediciones de recolección de material vegetal. Se deben tener en cuenta los reglamentos nacionales e internacionales pertinentes, tales como la legislación fitosanitaria y de cuarentena y las leyes nacionales de acceso a los recursos genéticos, la CIPF, el TIRFAA, el CDB, y cualquier otra normativa que afecte al movimiento y la adquisición de germoplasma.

Aspectos técnicos

El cumplimiento de la norma 5.2.1 permitirá el movimiento seguro de germoplasma a partir de sitios de recolección, tanto dentro como fuera del país, hasta el lugar donde se sitúe el banco de germoplasma. Cuando el material se recolecte *in situ* es importante atenerse a la reglamentación nacional, la cual normalmente exige la obtención de permisos de recolección de parte de las autoridades nacionales competentes. Si la recolección se hace en campos cultivados o en zonas comunitarias, el consentimiento fundamentado previo puede ser requerido de conformidad con la legislación nacional, regional o internacional en vigor. Si el material de germoplasma debe ser exportado de un país a otro, se debe utilizar un acuerdo de transferencia de material apropiado. En el caso de los RFAA, la exportación puede estar acompañada del ANTM o de otros permisos similares de conformidad con las normas nacionales de acceso y distribución de beneficios. Se deberá solicitar a la autoridad nacional competente del país receptor la normativa relativa al permiso de importación, en la cual se especifiquen los requisitos fitosanitarios y otras cláusulas de importación.

Durante la fase de adquisición, es importante garantizar que los datos de pasaporte de cada accesión son tan completos como sea posible. Los datos georreferenciados son especialmente útiles, ya que ofrecen una información precisa sobre la localización de los sitios de recolección originales y ayudan a identificar accesiones con caracteres específicos de adaptación de acuerdo a las condiciones agroclimáticas de los sitios de recolección originales. Los datos de pasaporte son fundamentales para identificar y clasificar cada accesión, y sirven de punto de partida para la selección y el uso de la accesión. Se deben utilizar formularios de recolección adecuados para capturar datos de recolección completos. Estos formularios deben incluir datos tales como la clasificación taxonómica inicial de la muestra, la latitud y longitud del lugar de recolección, una descripción del hábitat de las plantas recolectadas, el número de plantas incluidas en la muestra y otros datos de importancia para la adecuada conservación, conforme a lo dispuesto en los descriptores de pasaporte para cultivos múltiples de la FAO/IPGRI (Alercia *et al.*, 2001). Cuando el material se recolecta en los campos o fincas de los agricultores, las entrevistas pueden proporcionar información adicional de gran utilidad, como las prácticas culturales, los métodos de propagación, la historia y el origen, y los usos. Siempre que sea posible debe mantenerse un ejemplar de herbario, recogido de la misma población que las muestras, como colección de referencia, y tomar registro del método y la razón de la adquisición.



En caso de donación (por parte de programas de investigación o bancos de germoplasma), además de los datos de pasaporte disponibles se debe obtener información sobre la clasificación taxonómica, el nombre del donante, el número de identificación del donante y los nombres del germoplasma. Deberá recabarse del donante información adecuada sobre cómo se conservó el germoplasma recibido, además de la información del pedigrí o relaciones genealógicas y de la cadena de custodia, cuando se disponga de dicha información. Los materiales deberán tener asignado un número único de identificación (ya sea temporal o permanente, de acuerdo con la práctica seguida en el banco de germoplasma) que establecerá la relación del material con sus datos de pasaporte y cualquier otra información recopilada, garantizando así la autenticidad de la muestra.

Si bien es imposible garantizar que el material vegetal recolectado *in situ* se encuentra en un estado completamente sano (sin enfermedades ni infestación de plagas de insectos), es importante que en la medida de lo posible los propágulos se recojan de plantas con aspecto sano y que no presenten infestaciones o daños por enfermedades o plagas de insectos. El material limpio obtenido de fuentes certificadas debe ser almacenado en estructuras cubiertas para evitar que los insectos infesten las plantas limpias y propaguen patógenos. Durante la recolección, el recolector debe evitar también el agotamiento de la población natural objetivo. También puede resultar útil repetir el muestreo de una zona específica para capturar la máxima variabilidad genética que pueda estar presente en distintos momentos a lo largo del tiempo (Guarino *et al.*, 1995). En la fase de recolección de muestras de especies perennes de multiplicación vegetativa, especialmente cuando se recolectan brotes para la obtención de esquejes o injertos, podría ser deseable estimular la formación de brotes adecuados mediante marcas en el tronco o las ramas. Estos brotes se recolectarían en una segunda visita.

Es importante destacar la importancia crítica del periodo de tiempo que se tarde en transferir el recurso genético original desde su lugar de recolección hasta el banco de germoplasma. Esto es especialmente cierto para las especies que producen semillas recalcitrantes y material clonal, las cuales no mantienen su viabilidad durante mucho tiempo, y para propágulos vegetativos que se pudren con facilidad. En algunos casos el material de germoplasma debe ser transportado a largas distancias, como cuando el material se obtiene en otros países. Deberá prestarse la debida consideración al período de transporte, incluyendo el período de tránsito y de procesamiento, y se adoptarán las medidas adecuadas para garantizar que el material llega al banco de germoplasma de destino en buenas condiciones. También es importante preparar adecuadamente los propágulos (estacas, semillas esquejes) para mejorar la viabilidad durante el transporte postal o por paquetería. Por ejemplo, las semillas recalcitrantes y las estacas deben empaquetarse en algodón estéril u otro material adecuado dentro de una bolsa de plástico perforada para garantizar la suficiente renovación de aire. Para evitar que los clasificadores mecánicos de los servicios de correos aplasten las semillas, éstas se deben proteger con paquetes rígidos acolchados. En el caso de las estacas, los dos extremos cortados de la estaca limpia se deben envolver con tiras de film plástico de parafina para reducir la pérdida de humedad. En el envío de colecciones desde zonas tropicales se deben tener en cuenta las altas temperaturas durante el transporte.

Dado que las colecciones de campo no pueden dar cabida a un alto número de muestras (ver Normas para el establecimiento de colecciones de campo), el tamaño de la muestra en la recolección será por lo general pequeño en comparación con las semillas ortodoxas. No obstante, se debe procurar recolectar la máxima diversidad genética de la población objetivo que sea posible. Sin embargo, en la recolección para un banco de germoplasma de campo, el recolector tendrá que tomar las decisiones pertinentes en relación con el número de plantas de una población que en términos prácticos se puede recolectar. La cifra real dependerá en gran medida del sistema de reproducción de la planta, el tipo de planta y la parte de la planta que se recolecta.

Disposiciones particulares

La recolección no debe llevarse a cabo sin cumplir los requisitos legales, especialmente cuando el germoplasma se lleva después fuera del país donde se recolectó. En el caso de que los materiales no puedan ser retirados del país a causa de los requisitos fitosanitarios existentes, se deben hacer esfuerzos para establecer colecciones de campo en el país de origen y/o para establecer cultivos *in vitro*, los cuales se prestan mejor a la exportación. En términos del tamaño de las muestras se deberá tomar la debida consideración a las especies silvestres y raras donde el material de propagación podría no estar disponible en las condiciones o cantidades óptimas.

BIBLIOGRAFÍA

Alercia, A., Diulgheroff, S. & Metz, T. 2001. *FAO/IPGRI. Multi-crop passport descriptors.* (available at [http://www.bioversityinternational.org/index.php?id=19&user_bioversitypublications_pi1\[showUid\]=2192](http://www.bioversityinternational.org/index.php?id=19&user_bioversitypublications_pi1[showUid]=2192)).

Bioversity International, Food and Fertilizer Technology Center, Taiwan Agricultural Research Institute-Council of Agriculture. 2011. *A training module for the international course on the management and utilisation of field genebanks and in vitro collections.* Fengshan, Taiwan, TARI.

Brown, A.H.D. & Hardner, C.M. 2000. Sampling the gene pools of forest trees for ex situ conservation. In A. Young, D. Boshier & T. Boyle. *Forest conservation genetics. Principles and practice*, pp.185-196. CSIRO publishing and CABI.

Bustamante, P.G. & Ferreira, F.R. 2011. Accessibility and exchange of plant germplasm by EMBRAPA. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 51: 95-98.

Crop Genebank Knowledge Base. *Field genebanks* (available at: http://cropgenebank.sgrp.cgiar.org/index.php?option=com_content&view=article&id=97&Itemid=203&lang=english).

Engelmann, F., eds. 1999. *Management of field and in vitro germplasm collections.* Proceedings of a Consultation Meeting, 15-20 January 1996. Cali, Colombia, CIAT, and Rome, Italy, IPGRI

FAO Forest Resources Division. 1995. Collecting woody perennials. In L. Guarino, V.R. Rao & R. Reid, eds. *Collecting plant genetic diversity. Technical guidelines*, pp. 485-511. CABI.

Ferreira, F.R. & Nehra, N. 2011. *Forestry germplasm exchange and quarantine in Brazil.* In National Convention da Society Americam Foresters, realizada no Havai no período de 02 a 06 de Novembro de 2011 (available at <http://www.eforester.org/natcon11/program/2011conventiononsitebook.pdf>).

Frison, E.A. & Taher, M.M., eds. 1991. *FAO/IBPGR technical guidelines for the safe movement of citrus germplasm.* Rome, Italy, FAO & IBPGR.

Guarino, L., Ramanatha Rao, V. & Reid, R., eds. 1995. *Collecting plant genetic diversity: technical guidelines.* Wallingford, UK, CAB International on behalf of IPGRI. In association with FAO, IUCN and UNEP 748 p.

Marshall, D.R. & Brown, A.H.D. 1975. Optimum sampling strategies in genetic resources conservation. In O.H. Frankel & J.H. Hawkes, eds. *Crop genetic resources for today and tomorrow*, pp. 3-80. Cambridge University Press.

Reed, B.M., Engelmann, F., Dulloo, M.E. & Engels, J.M.M. 2004. *Technical guidelines for the management of field and in vitro germplasm collections.* IPGRI Handbooks for Genebanks No. 7. Rome, Italy, IPGRI

Said Saad, M. & Ramanatha Rao, V. 2001. *Establishment and management of field genebank: a training manual.* Serdang, IPGR-APO.

Veiga, R., Ares, I., Condon, F. & Ferreira, F.R. 2010. *Intercambio seguro de recursos fitogenéticos.* In Estrategia en los recursos fitogenéticos para los países del Cono Sur/IICA. pp. 75-83. Montevideo: PROCISUR, IICA. (ISBN 13:978-92-9248-327-2).

Walter, B.M. & Cavalcanti, T.B. 2005. *Fundamentos para a coleta de germoplasma vegetal.* D.F. Brasil, Embrapa Recursos Genéticos. 778 p.

5.3 Normas para el establecimiento de colecciones de campo

Normas

- 5.3.1 Se debe mantener un número de plantas suficiente para abarcar la diversidad genética de cada accesión y para garantizar la seguridad de la accesión.
- 5.3.2 Un banco de germoplasma de campo debe disponer de un mapa en el que se indique claramente la localización exacta de cada accesión en la parcela.
- 5.3.3 Se deben seguir las prácticas de cultivo apropiadas teniendo en cuenta el microambiente, la época de plantación, los portainjertos, el régimen de riego y el control de plagas, enfermedades y malas hierbas.

Contexto

Resulta difícil proponer normas específicas para el establecimiento de una colección de germoplasma de campo, ya que dependerá en gran medida de la naturaleza de las especies que se quiere conservar. Será necesario elaborar normas específicas para cada especie dependiendo de sus características biológicas, su fenología, mecanismo reproductivo y estructura de población. Hay tres consideraciones principales a tener en cuenta en el momento de establecer una colección de germoplasma de campo: (a) cuántas plantas por accesión se deben mantener; (b) cómo se distribuyen las plantas en el banco de germoplasma; y (c) qué prácticas de cultivo es necesario aplicar para garantizar unas condiciones de crecimiento óptimas de las accesiones en la colección.

Aspectos técnicos

La decisión de determinar el número plantas por accesión que se deben plantar en un banco de germoplasma de campo depende de la ponderación entre la necesidad de

mantener la diversidad genética de las accesiones, las consideraciones de espacio, las necesidades de caracterización y las condiciones económicas del banco de germoplasma de campo. El número será distinto para plantas anuales y perennes, y también varía si las especies se propagan por semillas o de forma vegetativa. En el caso de especies que se propagan por semillas, el tamaño de la muestra debe ser lo suficientemente grande como para abarcar la diversidad genética contenida en la accesión que se ha recolectado. Conviene mencionar en este punto que durante la recolección de semillas que no son ortodoxas el muestreo se debe diseñar adecuadamente estableciendo prioridades con respecto a la recolección de plantas, ya que en una colección de campo resulta difícil acoger una gran cantidad de diversidad genética dentro de cada accesión. Para especies de propagación vegetativa un pequeño número de plantas es suficiente para representar la diversidad genética de la accesión y garantizar su seguridad. Sin embargo pueden ser necesarias más plantas en los casos en que la diversidad intra-poblacional sea mayor que la diversidad inter-poblacional. El tamaño de la muestra puede depender también del objetivo de la colección; por ejemplo cuando éste es la evaluación y/o la distribución el número de individuos por accesión puede resultar distinto del que se establece cuando el propósito es la conservación.

Al establecer una colección de germoplasma de campo es muy importante saber dónde se va a situar cada accesión. Una distribución planificada apropiada y un plano de campo preparado con antelación mejorarán la eficacia del uso del espacio y el manejo de la colección. Se debe definir claramente la ubicación exacta de cada accesión. En este respecto, durante la fase de establecimiento del banco de germoplasma de campo deberán incorporarse mapas de distribución de la parcela, diseñados, electrónicos e impresos, así como etiquetas de campo y de códigos de barras. Se debe prestar atención a situar las accesiones en el micro-ambiente más apropiado del banco de germoplasma. Algunas plantas requieren condiciones ambientales especiales y pueden precisar ser resguardadas en invernadero para un mayor control ambiental (por ejemplo, para evitar el calor o el frío) o requerir la sombra de otras plantas.

En el momento de calcular el tamaño de las parcelas es necesario considerar el hábito de crecimiento y el tamaño adulto de las plantas, así como las estructuras de riego y la facilidad de mantenimiento. Para especies perennes el conveniente espaciamiento de plantas dentro de la parcela permite el adecuado crecimiento de cada una, por ejemplo de los árboles, y evita las mezclas en los cultivos que desarrollan tubérculos o estolones subterráneos grandes. Además, para evitar mezclas (flujo de genes) se deben establecer barreras físicas entre parcelas, por ejemplo mediante su separación con especies diferentes con las que no se polinizan. De esta forma se reduce la competencia que puede comportar debilidad en las plantas o favorecer la dispersión rápida de enfermedades o plagas de insectos. Los clones invasivos pueden requerir plantación en latas, macetas o cajas para reducir las mezclas o la competencia con accesiones menos vigorosas. Las accesiones con morfologías fácilmente diferenciables entre sí pueden plantarse en parcelas adyacentes cuando la extensión de rastreras o la dispersión o la caída de bulbillos o semillas a la parcela contigua suponen un problema. Para especies alógamas, con el fin de mantener la integridad genética de las semillas que se recojan para su posterior distribución, será

necesario establecer distancias de aislamiento suficientes entre parcelas de accesiones distintas u otras medidas como jaulas de aislamiento.

Es importante resaltar que los planos de distribución y de campo no son fijos en el tiempo, sino que cambiarán según los esquemas de plantación. En el caso de plantas anuales, la rotación es esencial y ello requiere una planificación adecuada y espacio adicional. También es importante diseñar la distribución de forma que se asegure que no hay flujo de pesticidas al entorno contiguo.

En las colecciones de campo es de extrema importancia contar con dos etiquetas por cada accesión, correcta y claramente escritas con tinta indeleble y resistente al agua. Las etiquetas deben contener información sobre la fecha, nombre común y número de la accesión en la colección de campo. Cuando sea posible se deben utilizar etiquetas producidas electrónicamente ya que reducen la reproducción de errores en nombres y números. Los mapas de campo (tanto en papel como en formato digital) constituyen documentos esenciales para los bancos de germoplasma de campo y sirven de copia de seguridad de las etiquetas de campo, las cuales se pierden o destruyen con facilidad. Estos mapas se deben preparar antes de la plantación y mantener regularmente actualizados.

El establecimiento de una colección de campo requiere la adopción de las prácticas de cultivo apropiadas y específicas de la especie, para garantizar el eficaz establecimiento de plantas en el banco de germoplasma. El material de plantación debe ser seleccionado con gran cuidado. Seleccionar solamente las plantas fuertes para su conservación en el banco de germoplasma de campo puede reducir la variación genética. La calidad del material de plantación inicial desde el punto de vista fitosanitario es extremadamente importante cuando se plantan nuevos campos, se replantan parcelas vacías o se rejuvenecen colecciones enteras, siempre que no se lleve a cabo una selección genética. Se debe utilizar solamente material sano y partes vigorosas de las plantas. Se observarán los cuidados sanitarios básicos, como el uso de herramientas desinfectadas y limpias en la preparación de materiales de plantación. Cuando sea posible, antes de establecer la colección se debe considerar la posibilidad de analizar la presencia de enfermedades no manifiestas producidas por virus y patógenos transmitidos en los injertos (como por ejemplo viroides, fitoplasmas y organismos no identificados).

Las plantas deben plantarse en la época adecuada. Se deberán seguir las recomendaciones que existan sobre la época de plantación de distintas especies en distintas zonas. Estas recomendaciones deberán tener en cuenta las condiciones óptimas para el establecimiento de las plantas, entre las que se podrían incluir la temperatura, los niveles de humedad, el tipo de suelo y el uso de portainjertos. En las plantas propagadas mediante injertos, se debe poner especial cuidado en conseguir los portainjertos de forma estandarizada para realizar el injerto de todas las muestras en el momento apropiado. Determinados tipos de especies se injertan sobre portainjertos de la misma especie o de otra estrechamente relacionada con la cual se haya demostrado la compatibilidad. En esos casos se debe utilizar el mismo portainjertos para todas las accesiones de esa especie. La elección del portainjertos se debe basar en la adaptación a las características del suelo y la influencia mínima sobre el comportamiento del



material injertado. Los árboles deben plantarse sin injertos, sobre sus propias raíces, a menos que el uso de portainjertos sea necesario para evitar enfermedades, o que el injerto sea la forma normal de cultivo de la especie.

Las especies de polinización cruzada se deben plantar en grupos por fecha de floración. En especies dioicas se debe ajustar la cantidad de plantas masculinas y femeninas que se plantan. En el caso de especies autoincompatibles de propagación vegetativa, el responsable de la colección debe conocer el sistema de autoincompatibilidad que presenta la especie y la combinación alélica con el fin de tener una buena colección de campo y garantizar la formación de frutos y semillas. Es también importante observar el tratamiento de la tierra (medidas agrotécnicas) durante el establecimiento de colecciones de campo.

Algunas especies requieren medidas complementarias como la plantación de árboles para sombra siguiendo un diseño apropiado (por ejemplo, el cafeto), los cuales se seleccionarán de acuerdo a las condiciones locales y los requisitos de la especie. Algunas especies trepadoras (por ejemplo, la vainilla, muchas leguminosas, cucúrbitas, y otras) necesitan árboles, palos de madera, cables u otras estructuras para su adecuado crecimiento. Determinadas especies pueden requerir mesas de cultivo muy específicas (principalmente las de climas áridos) por ejemplo “camas de mesa” y protecciones frente a las lluvias en ciertas épocas del año. De la misma forma, algunas plantas requieren periodos especiales de sombra, de riego o de inundación, así como cubiertas como protección contra heladas u otros cuidados específicos. Algunas especies de árboles frutales necesitan podas regulares para expresar su aspecto característico y permanecer sanas. Para cultivos de árboles, otra práctica que se debe fomentar es el uso de portainjertos enanizantes.

Disposiciones particulares

Algunos genotipos pueden no responder adecuadamente a los métodos de propagación comunes establecidos para tipos de especies particulares. En esos casos se deberán realizar las investigaciones pertinentes para el desarrollo de nuevas metodologías. En el caso de plantas propagadas con injertos en una zona de plantación que requiere el uso como portainjerto de una especie estrechamente relacionada, se deberá utilizar un injerto intermedio.

Es importante contemplar el mantenimiento de un duplicado de la colección en otra ubicación (ver Normas para seguridad y duplicados de seguridad). Algunos genotipos, por ejemplo los de especies adaptadas a la sombra de los árboles del bosque o los vulnerables a enfermedades, pueden no adaptarse bien a las condiciones de pleno sol en el campo y por lo tanto necesitar una protección adecuada. Este hecho se ve agravado cuando los recursos son limitados, creándose una función dual en los bancos de germoplasma de campo (conservación y mejora de cultivos) que puede llevar a conflictos, por ejemplo en la distribución del germoplasma, el manejo y la duplicación de las accesiones. Cuando resulte difícil mantener un duplicado de campo, una opción posible consiste en realizar duplicados utilizando cultivos *in vitro*.

BIBLIOGRAFÍA

Crop Genebank Knowledge Base (available at http://croptgenebank.sgrp.cgiar.org/index.php?option=com_content&view=article&id=97&Itemid=203&lang=english).

Reed, B.M., Engelmann, F., Dulloo, M.E. & Engels, J.M.M. 2004. *Technical guidelines for the management of field and in vitro germplasm collections*. IPGRI Handbooks for Genebanks No. 7. Rome, Italy, IPGRI.

Sebbenn, A.M. 2002. Número de árvores matrizes e conceito genéticos na coleta de sementes para reflorestamentos com espécies nativas. *Revista do Instituto Florestal de São Paulo*, V.14(2): 115-132.

5.4 Normas para el manejo en campo

Normas

- 5.4.1 Se debe realizar una vigilancia de forma regular de las plagas y enfermedades en las plantas y el suelo.
- 5.4.2 Se deben realizar las labores de cultivo apropiadas para el adecuado crecimiento de la planta, como fertilización, riego, poda, colocación de espalderas, labores de injerto y escarda.
- 5.4.3 Se debe controlar la identidad genética de cada accesión aislando adecuadamente las accesiones cuando sea necesario, evitando el crecimiento cruzado de las accesiones, usando etiquetas apropiadas y mapas de campo y estudiando periódicamente la identidad mediante técnicas morfológicas o moleculares.

Contexto

El manejo en campo se refiere a las operaciones cotidianas de las colecciones de campo que se llevan a cabo con el fin de asegurar que las accesiones se encuentran en buen estado sanitario, tienen fácil acceso y están disponibles para su uso. Esto implica muchas actividades diferentes entre las que se incluyen el control de plagas y enfermedades, la adecuada nutrición de las plantas, las operaciones de riego, escarda y poda y el control de las accesiones para asegurar la integridad genética de las colecciones.

Aspectos técnicos

La pérdida de germoplasma debida a un mal estado sanitario puede ser una causa importante de erosión genética en los bancos de germoplasma de campo. Mantener las plantas sanas es un reto fundamental de las colecciones de germoplasma, especialmente cuando las

accesiones provienen de un área de distribución amplia donde existen distintas plagas y enfermedades. Las accesiones de las colecciones pueden también ser fuente o foco de distribución de plagas y enfermedades cuando el manejo no es el adecuado. Por lo tanto, es importante realizar un control estricto en el momento de la incorporación de plantas al banco de germoplasma. Además, se deben tener en cuenta los niveles en cada momento e históricos de las poblaciones de insectos y de enfermedades. Las inspecciones cuidadosas y el registro son muy importantes en todas las operaciones de manejo de plagas. El momento del control de las enfermedades es también de importancia capital porque una vez que el material vegetal ha sido infectado el daño suele ser irreversible. La modelización de escenarios climáticos y enfermedades puede también ayudar en el control de la aparición de nuevas plagas y enfermedades.

Entre las plagas de insectos y las enfermedades se pueden incluir una gran diversidad de organismos dependiendo de la colección objetivo. Entre las plagas más frecuentemente asociadas al germoplasma vegetal se incluyen insectos, ácaros, hongos, bacterias, nematodos, virus, viroides, fitoplasma, babosas, caracoles y malas hierbas. Las plantas de propagación vegetativa pueden estar infectadas por virus, lo cual puede tener entre otros efectos la disminución del vigor y la resistencia y la incompatibilidad de injertos. Durante la fase de cuarentena o en el mantenimiento es posible detectar plagas de insectos y enfermedades mediante numerosas técnicas como el examen visual, el aislamiento por método placa de agar / placa por estría, la incubación en cámara húmeda, los injertos, los bioensayos, el estudio al microscopio electrónico y los kits de diagnóstico para plantas. Entre estos últimos se puede destacar el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), el cual es fácil de utilizar y se encuentra disponible para enfermedades de plantas que se cultivan por sus raíces (yuca, patata, remolacha) o por sus frutos (banano, frutos de pepita, frutos de hueso, frutos suaves) así como para plantas hortícolas. Las principales enfermedades fúngicas y bacterianas se pueden controlar mediante profilaxis o prevención. Los kits de diagnósticos basados en ADN son también extremadamente eficaces para detectar enfermedades mediante análisis PCR de genes específicos de patógenos. Se recomienda que el personal que realice la valoración de enfermedades esté adecuadamente capacitado en técnicas de agricultura, horticultura, micropropagación y patología.

Conviene realizar una correcta identificación de las accesiones más vulnerables a plagas de insectos y enfermedades en el momento de su incorporación a la colección. Es importante que los bancos de germoplasma de campo tengan a punto un sistema de identificación de todas las plagas y enfermedades asociadas a la diversidad de especies que mantienen en la colección. Esto es especialmente necesario para aquellas especies para las cuales se han descrito patógenos de cuarentena de alto riesgo. Los bancos de germoplasma deben también disponer de procedimientos para aplicar las metodologías de diagnóstico necesarias con el fin de obtener una garantía rigurosa del estado de plagas y enfermedades, siguiendo los requisitos locales, regionales o nacionales que se hayan dispuesto. Cuando el banco de germoplasma no tenga esta capacidad, estas tareas deben ser encargadas a instituciones especializadas en cuarentena de plantas de importación.

El personal del banco de germoplasma debe aplicar prácticas de manejo que reduzcan los riesgos de dispersión de enfermedades en la colección. Es necesario asegurar que

las herramientas, instrumentos, suelo y calzado estén adecuadamente desinfectados. El enfoque recomendado para el control de plagas cuando sea factible es el manejo integrado de plagas. Este programa se sirve en la medida de lo posible del control biológico, el cual se complementa con pesticidas y control mecánico. Puede resultar muy importante analizar la presencia de virus y otros patógenos transmitidos por los injertos en el material clonal, ya que en la última década se han producido grandes avances en las tecnologías de detección. Cuando se encuentren plantas infectadas individualmente, éstas deben limpiarse mediante termoterapia y/o cultivo de tejidos. Para evitar tratamientos costosos, se recomienda siempre buscar un material similar a partir de fuentes “limpias” o menos infectadas.

Los responsables de la gestión del banco de germoplasma de campo deben ser activos en cubrir las necesidades individuales de la diversidad de germoplasma presente en la colección. Una vez plantada la parcela, la función del personal es ayudar al crecimiento de las plantas solamente suministrando las condiciones favorables para su desarrollo. El riego regular de las plantas durante la estación seca es mucho más importante que la fertilización. El sistema de riego debe ser apropiado para el tipo de planta y las condiciones ecológicas donde se ha establecido el banco de germoplasma. La fertilización de la colección se ve dificultada por el hecho de que hay muchos tipos distintos de plantas creciendo juntos y cada uno de ellos tiene unos requisitos nutricionales específicos de su identidad genética, tamaño y edad. Se pueden utilizar mezclas compuestas y pequeñas cantidades por planta, con los cuidados adecuados para asegurar la correcta distribución. La aplicación de pequeñas cantidades a intervalos cortos puede ser más eficaz que la misma cantidad total aplicada a intervalos de varios meses. La poda es necesaria en la mayoría de las plantas para mantener su tamaño dentro de unos parámetros aceptables para la plantación, y en el caso de árboles para dar forma a la copa. En algunos casos solamente se debe aplicar un ligero aclareo para que las ramas tengan espacio para su adecuado desarrollo sin excesiva competición por la luz. Estas operaciones de poda y aclareo deben encargarse a una persona con experiencia. Dada la importancia que tiene una colección de germoplasma, las labores deben ser de alta calidad y el personal que realiza el mantenimiento en campo debe estar capacitado para ello.

La competición que suponen las malas hierbas es un problema mucho más serio para las plantas jóvenes que para las de mayor edad, debido a su sistema radicular menos profundo. El control de malas hierbas es importante para el crecimiento rápido y vigoroso de la planta. El control de las malas hierbas puede realizarse por métodos mecánicos o mediante el uso de productos químicos (herbicidas). Los herbicidas pueden servir para reducir al mínimo la necesidad de trabajo manual y labores mecánicas. El tipo de control de malas hierbas debe ser el recomendado para cada especie.

Algunas accesiones requieren la aplicación de otras prácticas de protección mediante el uso de cubiertas como la protección frente a heladas y/o granizo o contra insectos vectores de enfermedades. La eliminación de frutos es también una práctica de manejo importante para el control de enfermedades con el fin de evitar la competencia con las plantas del año siguiente y reducir el estrés de la planta.

Con el fin de asegurar la identidad genética de cada accesión se debe evitar cualquier contaminación entre accesiones, el flujo de genes entre plantas próximas entre sí y el

crecimiento cruzado de las accesiones. Las accesiones de las colecciones de campo pueden producir flores y después semillas que caigan y más tarde crezcan en la parcela. Estas semillas pueden no desarrollarse debido a la heterocigosis o pueden ser a la polinización cruzada. Es preciso evitar la germinación indeseada de estas semillas o quitarlas del suelo. Se deben realizar controles periódicos para asegurar que cada accesión está adecuadamente identificada y localizada en el campo. El etiquetado es de extrema importancia y necesita ser verificado constantemente *in situ* y cotejado con los planos de la colección de germoplasma. Las etiquetas deben ser claras, concisas y tan resistentes a los fenómenos climáticos como sea posible. Es deseable el uso de códigos de barras u otras etiquetas generadas electrónicamente con el fin de reducir la reproducción de errores. Siempre que sea posible se debe controlar la identidad de cada accesión de forma periódica mediante marcadores morfológicos y moleculares (ver Normas de caracterización).

Las prácticas de mantenimiento son a menudo específicas de cada especie y pueden variar en función del uso que se da a la colección (conservación, evaluación, distribución). Debe realizarse un seguimiento de todas las accesiones de la colección, si bien la frecuencia de este seguimiento dependerá principalmente de si la planta es herbácea (mayor frecuencia de seguimiento) o leñosa (menor frecuencia). También debe realizarse un seguimiento de cualquier plaga de animales, insectos enfermedades que aparezcan en la colección, y controlar los posibles actos de vandalismo (ver Normas de seguridad).

Disposiciones particulares

La falta de experiencia de los bancos de germoplasma en manejo de plagas y enfermedades puede ser un factor limitante de gran importancia para el mantenimiento del estado sanitario de las plantas de la colección, por lo cual puede ser necesario contar con patólogos de plantas experimentados. Los bancos de germoplasma deben disponer de planes de emergencia para afrontar los brotes de enfermedades. También deben estar en contacto con servicios de sanidad vegetal especializados, como los de las autoridades nacionales en sanidad vegetal o laboratorios universitarios o comerciales, quienes pueden proporcionar los servicios requeridos.

Otra buena práctica consiste en rotar los sitios de plantación (cuando sea posible, especialmente para especies de propagación anual y perennes altamente vulnerables a la fatiga del suelo) de forma que se reduzca la perpetuación de cualquier plaga o enfermedad del suelo. Otra opción consiste en desinfectar el suelo. En algunos casos, las plantas pueden crecer dentro de un invernadero donde las condiciones fitosanitarias pueden manejarse más fácilmente y después llevarse al campo cuando se hayan aclimatado.

Algunas accesiones pueden ser muy valiosas y susceptibles a patógenos. En tales casos es importante mantener las plantas bajo cubierta y mantener duplicados *in vitro* o en criopreservación como medida de conservación complementaria de seguridad.

Cuando las plantas son susceptibles a los daños por la aplicación de herbicidas puede ser necesaria la escarda manual. Para la regeneración se recomienda hacer uso de zonas que no favorezcan el desarrollo de plagas y enfermedades.

BIBLIOGRAFÍA

Crop Genebank Knowledge Base (available at http://cropgenebank.sgrp.cgiar.org/index.php?option=com_content&view=article&id=97&Itemid=203&lang=english).

Mathur, S.B. & Kongsdal, O. 2003. *Common laboratory seed health testing methods for detecting fungi*. Bassersdorf, Switzerland.

Navarro, L., Civerolo, E.L., Juarez J. & Garnsey, S.M. 1991. Improving therapy methods for citrus germplasm exchange. In R.H. Brlansky, R.F., Lee & L.W. Timmer, eds. *Proceedings of XI Conference of the International Organization of Citrus Virologists*, pp. 400–408. Riverside, Florida, USA.

Navarro, L. 1988. Application of shoot-tip grafting *in vitro* to woody species. *Acta Horticulturae*, 227: 43–55.

Reed, B.M., Engelmann, F., Dulloo, M.E. & Engels, J.M.M. 2004. *Technical guidelines for the management of field and in vitro germplasm collections*. IPGRI Handbooks for Genebanks No. 7. Rome, Italy, IPGRI.

Roistacher, C.N., Navarro, L. & Murashige, T. 1976. Recovery of citrus selections free of several viruses, exocortis viroid, and Spiroplasma citri by shoot-tip grafting *in vitro*. *Proceedings of VII Conference of the International Organization of Citrus Virologists*, pp.186–194. Riverside, Florida, USA.

Sheppard, J.W. & Cockerell, V. 1996. *ISTA PDC handbook of method validation for the detection of seed-borne pathogens*. Bassersdorf, Switzerland, ISTA

Sutherland, J.R., Diekmann, M. & Berjak, P. 2002. *Forest tree seed health*. IPGRI Technical Bulletin N° 6. Rome, Italy, IPGRI (available at http://www.bioversityinternational.org/fileadmin/bioversity/publications/pdfs/865_Forest_tree_seed_health_for_germplasm_conservation.pdf?cache=1336542152).

5.5 Normas para la regeneración y la propagación

Normas

- 5.5.1 Toda accesión de la colección de campo debe ser regenerada cuando el vigor o el número de plantas hayan disminuido hasta niveles críticos, con el fin de recuperar los niveles originales y garantizar que se mantiene la diversidad y la integridad genética.
- 5.5.2 Para la propagación se debe utilizar material vegetal sano y conforme a su tipo.
- 5.5.3 Se debe documentar adecuadamente e incluir en el sistema de información del banco de germoplasma toda información relativa a los ciclos y procedimientos de regeneración de plantas, incluyendo la fecha, la autenticidad de las accesiones, las etiquetas y los mapas de localización.

Contexto

En el contexto de las colecciones de campo los términos regeneración y propagación se refieren al restablecimiento de muestras de germoplasma que son genéticamente similares a la colección original cuando el vigor o el número de plantas son bajos (Dulloo *et al.*, 2008). Las normas para los procedimientos de regeneración y propagación deben ser específicas de cada especie. Se deben utilizar los protocolos o directrices específicos de la especie que estén disponibles. La regeneración y la propagación deben tener como objetivo asegurar que no hay pérdida de plantas dentro de la colección. Sin embargo, es inevitable que la pérdida de cualquier individuo particular conlleve una erosión genética dentro de la accesión ya que normalmente el número de plantas por cada accesión es pequeño (ver Normas para el establecimiento de la colección, tamaño de muestra). La regeneración y la propagación son procesos caros y deben planificarse con suma atención. Pueden requerir el cambio de ubicación por razones de seguridad o para evitar enfermedades, plagas y procesos de fatiga del suelo.

Aspectos técnicos

La regeneración y la propagación pueden ser necesarias por diversas razones dependiendo del tipo de planta, los riesgos a los que está sometida y las necesidades de distribución. Una planta puede perder vigor vegetativo o incluso morir por numerosas causas distintas de origen climático, edáfico y/o biótico. Para maximizar la eficacia de una colección de campo es esencial que toda planta muerta sea sustituida. Esto es especialmente importante porque el número de individuos por accesión suele ser bajo en las colecciones de campo (ver Normas para el establecimiento de la colección de campo).

El método a seguir para la propagación de la especie objetivo es uno de los aspectos a considerar de mayor importancia. Algunas especies pueden propagarse por semillas mientras que otras se propagan de forma vegetativa. En principio, en una colección de campo no se deben utilizar semillas para la propagación, aunque la especie se pueda reproducir por semillas, a menos que el tamaño de la población esté representado por un número suficientemente alto de individuos. Siendo el objetivo de la regeneración mantener la integridad genética de la accesión y dado que el número de plantas por accesión es bajo, la propagación por semillas puede causar una importante deriva genética en la accesión. Por otro lado, en las especies alógamas la hibridación entre accesiones puede reducir la varianza genética dentro de la colección y modificar la integridad de cada accesión individual. Siempre que sea posible las plantas deben propagarse de forma vegetativa, ya que al ser todos los descendientes réplicas exactas de la planta madre, se mantiene la integridad genética de la accesión.

El momento adecuado para llevar a cabo la regeneración es otro factor importante que con frecuencia depende del clima y de la época de plantación de la especie. La FAO ha publicado una serie de calendarios de cultivo para América Latina y África (FAO, 2004, 2012), que pueden resultar de utilidad como referencias en la determinación del momento apropiado para la plantación y por tanto para la regeneración. Los calendarios de cultivo de la FAO ofrecen información para más de 130 especies cultivadas en 283 zonas agro ecológicas de 44 países. Una vez más, la elección del momento apropiado es específica de la especie y posiblemente también de la ubicación. Una buena indicación del mejor momento para iniciar la propagación es cuando los propágulos comienzan a brotar o cuando las plantas madre comienzan a morir de forma continua. Otra consideración será si aplicar o no a la colección la técnica poda-rebrote, es decir, permitir que los hijuelos se desarrollen y que produzcan la siguiente planta, como en el caso de los aroides (Jackson, 2008).

La propagación debe realizarse utilizando material vegetal sano y conforme a su tipo. La nueva planta debe ser regenerada utilizando material de propagación almacenado en instalaciones especiales (invernaderos, *in vitro* o en frigorífico) si éste está disponible, con el fin de garantizar su buen estado sanitario. Se deben utilizar los protocolos o directrices existentes para cada especie en particular. La regeneración de accesiones de especies alógamas debe realizarse con el adecuado aislamiento utilizando instalaciones especiales y protección frente a las malas hierbas, plagas y enfermedades.

Es importante que toda la información relativa a la regeneración de la accesión se documente apropiadamente y se registre en el sistema de documentación del banco de germoplasma. Se deben incluir, entre otros datos, la información sobre el número de accesión y el número secuencial de la planta dentro de cada accesión, el lugar donde se lleva a cabo la regeneración, el tipo de propagación y de materiales utilizados (esquejes, tubérculos, cormos, bulbos), la fecha de plantación, la tasa de supervivencia de los materiales propagados, el protocolo seguido para romper la dormancia de las semillas, las prácticas de manejo empleadas, los métodos de plantación, las condiciones del campo, el número de plantas establecido y las fechas de recolección.

Disposiciones particulares

Los factores climáticos pueden ser más perjudiciales para las plantas jóvenes que para las más antiguas. Dada la probabilidad de que por diversas causas unas pocas plantas se pierdan durante el primer año, una precaución razonable consiste en reservar algunas plantas para reposición si fuera necesario. Así se garantiza que se dispone de plantas del mismo tipo y edad que la original para reemplazar a los individuos perdidos.

Las colecciones de campo son extremadamente vulnerables a las incidencias climáticas y en general ambientales, y por lo tanto es muy importante que los bancos de germoplasma de campo dispongan de un plan de emergencia para la regeneración urgente de la colección. Como medida complementaria se puede mantener una copia de seguridad en condiciones *in vitro* o de criopreservación. Las emergencias también pueden afectar a las especies silvestres emparentadas con las cultivadas y a las especies autóctonas para las cuales no se hayan elaborado aun protocolos de regeneración. Normalmente estas especies precisan tratamientos diferentes de los que se utilizan para las cultivadas con las cuales están emparentadas.



BIBLIOGRAFÍA

Costa, N., Plata, M.I. & Anderson, C. 2004. Plantas cítricas libres de enfermedades. In V. Echenique, C. Rubistein & L. Mroginski, eds. *Biotecnología y Mejoramiento vegetal*, pp. 317–318. Ediciones INTA, Argentina.

Crop Genebank Knowledge Base (available at http://cropgenebank.sgrp.cgiar.org/index.php?option=com_content&view=article&id=97&Itemid=203&lang=english).

Dulloo, M.E., Thormann, I., Jorge, A.M. & Hanson J., eds. 2008. *Crop specific regeneration guidelines*. Rome, Italy, CGIAR System-wide Genetic Resource Programme (SGRP). Available on CD-ROM.

ICRISAT. *Germplasm regeneration* (available at <http://www.icrisat.org/what-we-do/genebank/genebank-manual/germplasm-regeneration-9.pdf>).

FAO. 2004. *Calendario de cultivos. América Latina y el Caribe*. Estudio FAO producción y protección vegetal, No 186. Rome, Italy.

FAO. 2012. *Crop calendars* (available at <http://www.fao.org/agriculture/seed/cropcalendar/welcome.do>).

Jackson, G.V.H. 2008. Regeneration guidelines: major aroids. In M.E. Dulloo, I. Thormann, M.A. Jorge & J. Hanson eds. *Crop specific regeneration guidelines*. Rome, Italy, CGIAR System-wide Genetic Resource Programme. 16 p. Also available on CD-ROM.

Plata, M.I. & Anderson, C.M. 2008. In vitro *blueberry (Vaccinium spp.) germplasm management in Argentina*. 9th International Vaccinium Symposium, ISHS, Corvallis, USA.

Sackville Hamilton, H.R. & Chorlton, K.H. 1997. *Regeneration of accessions in seed collection: a decision guide*. Handbook for genebanks No 5. Rome, Italy, IPGRI.

5.6 Normas para la caracterización

Normas

- 5.6.1 Todas las accesiones deben ser caracterizadas.
- 5.6.2 Para la caracterización de cada accesión se debe utilizar un número representativo de plantas.
- 5.6.3 Las accesiones deben ser caracterizadas morfológicamente utilizando las listas de descriptores internacionalmente aceptadas que estén disponibles. Las herramientas moleculares también son importantes para confirmar la identidad de la accesión y la conformidad al tipo.
- 5.6.4 La caracterización se basará en formatos de registro que se ofrezcan en los descriptores utilizados internacionalmente.

Contexto

La caracterización es la descripción del germoplasma vegetal y constituye una herramienta para la descripción e identificación de las accesiones, la confirmación de su conformidad al tipo, y la identificación de duplicados en una colección. La caracterización determina la expresión de caracteres altamente heredables, ya sean morfológicos, fisiológicos o agronómicos, incluyendo caracteres agrobotánicos como la altura de la planta, la morfología de la hoja, el color de la flor, las características de la semilla, la fenología y la capacidad de sobrevivir al invierno de las plantas perennes. Esta información es esencial para que el personal del banco distinga entre las distintas accesiones de la colección.

En las colecciones de campo la caracterización se puede llevar a cabo en cualquier fase del proceso de conservación. No obstante, es esencial conocer y describir al máximo las accesiones conservadas para asegurar que su utilización por parte de clientes y otros actores es óptima. Por lo tanto, la caracterización se debe realizar lo antes posible para de esta manera añadir valor a la colección. El momento de la

caracterización variará entre las distintas especies dependiendo de su ciclo de vida. El uso de un conjunto mínimo de descriptores fenotípicos, fisiológicos y morfológicos y de información sobre el sistema de reproducción, seleccionados a partir de listas de descriptores utilizadas a nivel internacional (por ejemplo las publicadas por Bioversity International, la UPOV o el USDA-NPGS) incrementa la utilidad y la referenciación cruzada de los datos de caracterización.

Gracias a los progresos de la biotecnología, cada vez se utilizan más las tecnologías de marcadores moleculares y genómicas en la caracterización (de Vicente *et al.*, 2004). La caracterización permite la determinación de conformidad al tipo, la detección de flujo de genes y el establecimiento de perfiles de referencia, la identificación de duplicados y errores en el etiquetado, la detección de diversidad dentro y entre accesiones y la determinación del coeficiente de parentesco. Para garantizar la preservación de alelos poco frecuentes o para mejorar el acceso a alelos definidos podrán ser necesarias medidas como la división de muestras. La documentación de las observaciones y medidas tomadas es de gran importancia.

Aspectos técnicos

En comparación con las colecciones de semillas, la caracterización fenotípica de las colecciones de campo es más fácil de llevar a cabo ya que las plantas se encuentran en el campo y la apreciación de los caracteres relevantes para la caracterización se puede realizar en el momento apropiado y repetir año tras año.

Durante la recolección en el campo se pueden obtener algunos datos de caracterización importantes, por lo que siempre que sea posible se debe planificar con suma atención el momento de las expediciones de recolección. De esta forma es posible caracterizar las accesiones una al lado de otra directamente en el campo en el momento de la recolección. La información histórica y cultural que aportan los agricultores, botánicos, horticultores o campesinos durante las expediciones de recolección ofrece información muy valiosa. El conocimiento de la población local con respecto al origen de una accesión y su resistencia a enfermedades e insectos puede disminuir los costes de caracterización y reducir la duplicación.

Los descriptores de cultivos son definidos por expertos en los cultivos y/o curadores con la colaboración de expertos en los cultivos y responsables de los bancos de germoplasma por su relevancia para incrementar la utilización de las colecciones. Se ha elaborado una amplia gama de listas de descriptores de cultivos (por ejemplo los de Bioversity International, UPOV, OIV y el USDA-ARS NPGS), y para algunos cultivos se han establecido conjuntos mínimos de descriptores clave para la utilización. El registro de datos debe ser realizado por personal capacitado mediante el uso de formatos de medida calibrados y normalizados, siguiendo las indicaciones de las listas de descriptores. Los datos deben pasar por la validación de los curadores y los responsables de la documentación antes de ser volcados en la base de datos del banco de germoplasma para su publicación con el fin de fomentar el uso de la colección.

También se reconoce que las accesiones de referencia plantadas en el mismo campo son necesarias para tomar las medidas de los caracteres. Las colecciones de referencia (especímenes de herbario, imágenes de alta calidad) tienen una función esencial en la determinación de conformidad al tipo.

El número de plantas caracterizadas dentro de una accesión debe ser una muestra representativa, la cual a su vez depende de la diversidad de la accesión. En general, para que las medidas obtenidas tengan un fundamento estadístico, la muestra debe contener un mínimo de 3 plantas para las accesiones más diversas, mientras que para plantas clonales es suficiente con 1-2¹. En especies con tendencia a la mutación (por ejemplo, los cítricos) se deben realizar caracterizaciones anuales de caracteres clave para la verificación de conformidad al tipo.

Gracias a los progresos de la biotecnología, cada vez se utilizan más las tecnologías de marcadores moleculares y genómicas en la caracterización (de Vicente *et al.*, 2004), en combinación con la caracterización fenotípica, ya que ofrecen las ventajas de asegurar la identidad de las plantas clonales, identificar duplicados y errores en el etiquetado y detectar diversidad genética y parentesco dentro y entre accesiones. Los datos genotípicos obtenidos a partir de la caracterización de germoplasma mediante técnicas moleculares tienen la ventaja con respecto a los datos fenotípicos de que las variaciones detectadas en los primeros carecen en su mayor parte de influencias ambientales (Bretting y Widrechner, 1995). Las tecnologías se desarrollan con rapidez y los costes disminuyen también rápidamente, lo cual favorece un uso más extensivo en las colecciones de campo, por lo que deben utilizarse siempre que los recursos lo permitan. Sin embargo, la escasez de personal adecuadamente capacitado y la falta de recursos para los relativamente altos costes de instalación siguen siendo obstáculos para la amplia adopción de los marcadores moleculares como método escogido para la caracterización y evaluación de germoplasma, especialmente en los países en desarrollo. Se encuentran disponibles un gran número de marcadores y técnicas (por ejemplo SSR, EST-SSR, AFLP) pero para fines de caracterización solamente se deben utilizar marcadores bien establecidos y repetibles como los SSR. Para muchas especies se han desarrollado un amplio conjunto de marcadores primers apropiados para su uso en caracterización, y también se han establecido conjuntos mínimos de marcadores clave. Con el fin de garantizar que los resultados de las diferentes series de análisis sean comparables, en cada serie se deben incluir algunas accesiones del banco de germoplasma como testigos. La inclusión de testigos en la caracterización molecular tiene también una función esencial en la comparación entre bancos de germoplasma diferentes.

Una de las tecnologías más avanzadas que se emplean en el mejoramiento de especies arbóreas es la selección genómica (GWS, *genome-wide selection*) (Grattapaglia y Resende, 2011; Fonseca *et al.*, 2010). Esta técnica requiere el uso de marcadores moleculares que permiten una amplia cobertura del genoma y una alta densidad de genotipado. Si bien

1 http://cropgenebank.sgrp.cgiar.org/index.php?option=com_content&view=article&id=47&Itemid=205&lang=es

esta técnica se utiliza principalmente en mejoramiento, la información generada puede servir de utilidad para caracterizar y conservar nuevas accesiones o genotipos superiores.

Disposiciones particulares

El grado de fiabilidad de los datos puede variar entre los técnicos que toman los datos y depende de su formación y experiencia. Por lo tanto se debe disponer de personal técnico formado y experimentado en manejo de recursos fitogenéticos durante todo el ciclo de registro y documentación de los datos de caracterización. Durante el proceso de caracterización es conveniente contar con expertos en taxonomía, biología de semillas, patología vegetal y caracterización molecular (propios o mediante colaboración con otras instituciones). En las especies para las cuales no existen listas de descriptores utilizadas internacionalmente, será necesario elaborar tales listas utilizando como referencia las listas de descriptores para especies relacionadas que estén disponibles.

BIBLIOGRAFÍA

Alercia, A., Diulgheroff, S. & Metz, T. 2001. FAO/IPGRI. *Multi-croppassport descriptors* (available at [http://www.bioversityinternational.org/index.php?id=19&user_bioversitypublications_pi1\[showUId\]=2192](http://www.bioversityinternational.org/index.php?id=19&user_bioversitypublications_pi1[showUId]=2192)).

Bioversity International. 2007. *List of published crop descriptors* (available at http://www.bioversityinternational.org/fileadmin/bioversityDocs/Research/Conservation/Sharing%20Plant%20Information/Descriptor_lists/LIST_OF_CROP_DESCRIPTOR_PUBLISHED.pdf).

Bioversity International. 2007. *Developing crop descriptor lists, guidelines for developers*. Bioversity Technical Bulletin No. 13 (available at [http://www.bioversityinternational.org/index.php?id=19&user_bioversitypublications_pi1\[showUId\]=3070](http://www.bioversityinternational.org/index.php?id=19&user_bioversitypublications_pi1[showUId]=3070)).

Bioversity International. *Descriptor lists and derived standards* (available at <http://www.bioversityinternational.org/?id=3737>).

Crop Genebank Knowledge Base (available at http://cropgenebank.sgrp.cgiar.org/index.php?option=com_content&view=article&id=97&Itemid=203&lang=english).

de Vicente, C., Metz, T. & Alercia, A. 2004. *Descriptors for genetic markers technologies*. International Plant Genetic Resources Institute, Rome Italy.

Engels, J.M.M. & Visser, L., eds. 2003. *A guide to effective management of germplasm collections*. IPGRI Handbooks for Genebanks No. 6. Rome, Italy, IPGRI.

Fang, D.Q., Roose, M.L., Krueger, R.R. & Federici, C.T. 1997. Fingerprinting trifoliolate orange germplasm accessions with isozymes, RFLPs, and inter-simple sequence repeat markers. *Theor. Appl. Genet.*, 95: 211-219.

Fonseca, S.M., Resende, M.D.V., Alfenas, A.C., Guimarães, L.M.S., Assis, T.F. & Grattapaglia, D. 2010. *Manual práctico de melhoramento genético do eucalipto*. UFV, Viçosa, MG.

Grattapaglia, D. & Resende, M.D.V. 2011. Genomic selection in forest tree breeding. *Tree Genetics & Genomes*, 7: 241.

Lateur, M., Maggioni, L. & Lipman, E. 2010. *Report of a Working Group on Malus/Pyrus*. Third Meeting, 25-27 October 2006, Tbilisi, Georgia. Rome, Italy, Bioversity International.

Maggioni, L., Lateur, M., Balsemin, E. & Lipman, E. 2011. *Report of a Working Group on Prunus*. Eighth Meeting, 7-9 September 2010, Forlì, Italy. Rome, Italy, Bioversity International.

OIV. 2009. *OIV descriptor list for grape varieties and Vitis species*. 2nd edition. Paris, France, Organisation International de la Vigne et du Vin.

UPOV. *Descriptor lists* (available at http://www.upov.int/test_guidelines/en/list.jsp).

USDA/ARS/GRIN. *Evaluation/characterization Data queries* (available at <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/croplist.pl>).

5.7 Normas para la evaluación

Normas

- 5.7.1 Se deben tomar datos de evaluación de las accesiones de los bancos de germoplasma de los caracteres de interés y en conformidad con las listas de descriptores de cultivos acordados a nivel internacional, cuando éstos estén disponibles.
- 5.7.2 Los métodos/protocolos, formatos y mediciones para la evaluación deberán estar adecuadamente documentados con las citas pertinentes. Las normas de almacenamiento de datos deberán utilizarse como referencia para la toma de datos.
- 5.7.3 Los ensayos de evaluación deberán replicarse (en tiempo y localización) según proceda y estar basados en un diseño estadístico concluyente.

Contexto

La evaluación consiste en la observación y el registro de aquellas características cuya expresión suele estar influida por factores ambientales. Incluye la recolección metódica de datos de caracteres agronómicos y de calidad mediante ensayos experimentales adecuadamente diseñados. Los datos de evaluación frecuentemente incluyen resistencias a plagas de insectos y evaluación de la calidad (por ejemplo, densidad de contenido en aceite, proteínas o azúcares), y de la producción (madera, grano, frutos, semillas, hojas, otros), así como caracteres abióticos (tolerancia a la sequía, al frío y otros). Estos conjuntos de datos son de gran utilidad para los usuarios con el fin de incorporar caracteres de interés en programas de mejoramiento genético y mejorar la utilización de colecciones. Los caracteres por los cuales se evalúan las accesiones de germoplasma son definidos previamente por los expertos en las especies en colaboración con los responsables de los bancos de germoplasma. Unos datos de

evaluación fiables y de fácil acceso por parte de mejoradores de plantas e investigadores facilitan enormemente el acceso y uso de las accesiones de germoplasma vegetal. El germoplasma debe ser evaluado de forma sistemática utilizando redes de colaboración tanto a nivel internacional como regional y nacional.

Obtener datos de evaluación lleva más tiempo y es muchas veces más costoso que obtener datos de caracterización. Por lo tanto, tendrá prioridad la evaluación de aquellas accesiones que tengan características destacadas o excepcionales, y en este esfuerzo se recomienda la colaboración con mejoradores y otros especialistas (virólogos, entomólogos, micólogos). Los responsables de los bancos deben hacer todos los esfuerzos posibles para obtener al menos unos datos mínimos de evaluación. Una posible fuente son los registros de evaluación producidos por los usuarios a los que se ha enviado germoplasma anteriormente. El banco de germoplasma debe solicitar al usuario que comparta los datos de evaluación, y los aspectos prácticos del acuerdo se deben resolver entre el banco de germoplasma y el usuario/receptor del material. Entre los datos de evaluación se pueden incluir datos de resistencias a estreses bióticos y abióticos, características del crecimiento y desarrollo del germoplasma y características de calidad de los productos, entre otros. Este tipo de información permite orientar mejor la identificación del germoplasma que satisface las necesidades de los posibles usuarios, por lo que los datos obtenidos deben ser incorporados al sistema de documentación del banco de germoplasma. Antes de ello, los datos deberán pasar por las verificaciones y validaciones pertinentes.

Aspectos técnicos

Se han elaborado un amplio rango de listas de descriptores de especies cultivadas, por ejemplo las de Bioversity International y de la Unión Internacional para la Protección de Nuevas Variedades de Plantas (UPOV). Además, existen listas de descriptores de evaluación elaboradas por organizaciones nacionales o regionales como el Sistema nacional de germoplasma vegetal (NPGS) del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA).

La toma de datos debe ser realizada por personal capacitado y utilizando formatos de medición calibrados y normalizados en la medida de lo posible, accesiones de testigo (control) suficientemente identificadas y listas de descriptores de cultivo publicadas. Los resultados de evaluación en vivero, en laboratorio o en campo, siguiendo protocolos normalizados y procedimientos experimentales, se presentan normalmente como valores discretos (por ejemplo niveles de severidad en síntomas de enfermedad, conteos) o como valores continuos (basados en mediciones). Los datos deberán ser validados por el encargado y los oficiales encargados de la documentación antes de ser volcados en la base de datos del banco de germoplasma y puestos a disposición del público.

Muchos de los caracteres agronómicos demandados por los mejoradores son genéticamente demasiado complejos para ser observados en las evaluaciones preliminares del germoplasma. Los datos sobre caracteres agronómicos se obtienen normalmente durante la evaluación de germoplasma en programas de mejoramiento, y muchos de

esos caracteres son resultado de fuertes interacciones de genotipo x ambiente (G x A) y por lo tanto son específicos del sitio. Es esencial realizar repeticiones de la evaluación de los caracteres buscados en diferentes ambientes y definir e identificar claramente los testigos a utilizar en años sucesivos. Los testigos hacen posible las comparaciones en los distintos años de toma de datos.

Gracias a los avances de la biotecnología, las tecnologías de marcadores moleculares y genómicas son cada vez más utilizadas también en evaluación (de Vicente *et al.*, 2004) (ver Normas de caracterización). Entre los marcadores moleculares utilizados de forma más habitual en la caracterización y evaluación de germoplasma se encuentran los AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*), los SSR (*Simple Sequence Repeats*) y los SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*). Estos han sustituido casi totalmente a los antiguos tipos de marcadores, RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) y RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) por su abundancia genómica relativa y por la alta posibilidad de reproducir los datos. Además, los avances en la secuenciación de próxima generación y la consiguiente reducción de costos han propiciado un mayor uso de los ensayos basados en la secuenciación de regiones codificantes y no codificantes y del genotipado mediante secuenciación (GBS, *genotyping-by-sequencing*) en la evaluación de germoplasma. Los tipos de marcadores moleculares difieren en la forma en que detectan diferencias genéticas, el tipo de datos que generan, los niveles taxonómicos a los que se pueden aplicar más adecuadamente, y sus requerimientos técnicos y financieros (Lidder y Sonnino, 2011). Cuando sea factible la selección asistida por marcadores (MAS, *Marked Assisted Selection*), es decir la selección por la presencia o ausencia de caracteres en materiales de mejora a nivel molecular, puede también aplicarse a la evaluación de germoplasma para caracteres de interés. La escasez de personal adecuadamente capacitado y la falta de recursos en comparación con los costes de establecimiento relativamente altos, siguen siendo un impedimento para la adopción generalizada de los marcadores moleculares como método elegido para la evaluación de germoplasma, especialmente en países en desarrollo.

Disposiciones particulares

El grado de fiabilidad de los datos puede variar entre los técnicos que toman los datos cuando éstos no tienen la adecuada formación y experiencia, y cuando los procedimientos de toma de datos no son los normalizados. Por lo tanto se debe disponer de personal técnico formado y experimentado en manejo de recursos fitogenéticos durante todo el ciclo de registro y documentación de los datos de evaluación. Durante la evaluación es muy conveniente la participación de equipos multidisciplinares con experiencia en patología vegetal, entomología y tolerancias a estreses ambientales (abióticos), tanto en la propia institución como en instituciones colaboradoras.

La evaluación de germoplasma vegetal es una actividad que requiere mucho trabajo y niveles adecuados y continuos de financiamiento sostenible para permitir el ensamblaje de datos fiables de alta calidad. Para las situaciones en las que la evaluación completa



de todas las accesiones, a pesar de ser deseable, no resulta factible desde el punto de vista económico, un punto de partida recomendado es la selección de accesiones genéticamente diversas, basada por ejemplo en subconjuntos previamente definidos de colecciones de germoplasma.

Las variaciones en la incidencia de plagas y enfermedades, la gravedad de los estreses abióticos y las fluctuaciones de los factores ambientales y climáticos en el campo ejercen gran influencia en la precisión de los datos, por lo que deberían ser mitigados mediante evaluaciones razonablemente replicadas en varias localizaciones, varias estaciones y varios años. Además, los ensayos de laboratorio para la medición de algunos caracteres, como el contenido de aceites o proteínas, la calidad del almidón o factores nutricionales, requieren equipos especializados que no siempre están disponibles o podrían ser costosos. Una vez más se destaca la necesidad de conformar equipos multidisciplinares de diversas unidades o instituciones, según sea el caso. El estado sanitario (virus) de la accesión puede influir en la evaluación así como en las descripciones morfológicas.

La utilización de datos de evaluación generados por otros puede plantear problemas prácticos importantes. Por ejemplo, los datos pueden estar en formatos diferentes, y si ya han sido publicados pueden comportar derechos de autor o de propiedad intelectual. Con el fin de facilitar el uso de datos de origen externo es importante normalizar la toma y el análisis de los datos y los formatos de información.

Se debe señalar que la evaluación de muchos caracteres se puede realizar de forma apropiada dentro del mismo banco de germoplasma de campo. No obstante, los estreses que suponen riesgos para la colección y que pueden producir pérdidas de accesiones si no se controlan adecuadamente, deberán ser evaluados separadamente, en ensayos diseñados a tal efecto. Algunos ejemplos son las resistencias a plagas de insectos y enfermedades graves o problemas importantes del suelo. La colección de campo no suele ser un lugar apropiado para evaluar el rendimiento o la calidad debido a su diseño de parcela específico o a la necesidad de dejar plantas en el suelo mucho después del periodo normal de recolección.

BIBLIOGRAFÍA

Ayad, W.G., Hodgkin, T., Jaradat, A. & Rao, V.R. 1997. *Molecular genetic techniques for plant genetic resources*. Report on an IPGRI workshop, 9-11 October 1995, Rome, Italy. Rome, Italy, IPGRI, 137 p.

Bretting, P.K. & Widrlechner, M.P. 1995. Genetic markers and plant genetic resource management. *Plant Breeding Reviews*, 13: 11-86.

de Vicente, M.C. & Fulton, T. 2004. *Using molecular marker technology in studies on plant genetic diversity*. Rome, Italy, IPGRI, and Ithaca, New York, USA, Institute for Genetic Diversity.

Karp, A., Kresovich, S., Bhat, K.V., Ayad, W.G. & Hodgkin, T. 1997. *Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies*. IPGRI Technical Bulletin No. 2. Rome, Italy, IPGRI, 47 p.

5.8 Normas para la documentación

Normas

- 5.8.1 Los datos de pasaporte de todas las accesiones deben estar documentados utilizando los descriptores de pasaporte para cultivos múltiples de la FAO/IPGRI. Además, la información de la accesión también debe incluir datos de inventario, mapas, situación de las parcelas, regeneración, caracterización, evaluación, peticiones, datos de distribución e información proporcionada por los usuarios.
- 5.8.2 Todos los procesos de manejo de campo y prácticas culturales deben ser registrados y documentados.
- 5.8.3 Los datos generados en 5.8.1 y 5.8.2 deben ser registrados en una base de datos apropiada, en la cual se deben actualizar los cambios, y se deben adoptar estándares internacionales de datos.

Contexto

La información exhaustiva sobre las accesiones, incluyendo los mapas de campo detallados y regularmente actualizados así como la información sobre los procesos de manejo de campo, es esencial para la gestión y el mantenimiento de las colecciones de campo en el banco de germoplasma. La documentación de los datos de caracterización y evaluación tiene particular importancia para mejorar el uso de la colección respectiva y ayudar a identificar accesiones concretas.

Aspectos técnicos

Toda la información y los datos generados durante el proceso de adquisición, establecimiento de la colección, manejo en campo, regeneración, caracterización, evaluación y distribución deberán ser registrados. Estos datos e información abarcan desde los detalles de las características genéticas de las accesiones y las poblaciones individuales hasta la información proporcionada por las redes de distribución y los usuarios. Además de los datos de pasaporte y los descriptores normalizados de especies cultivadas, otros tipos de datos específicos de las colecciones de campo que se deben registrar son por ejemplo catálogos de plantas, imágenes (fotografías, dibujos), fechas de plantación y de recolección y notas sobre el historial de verificación de la identidad.

La lista de descriptores de pasaporte para cultivos múltiples de la FAO/IPGRI (Alercia *et al.*, 2001) se deberá utilizar para documentar los datos de pasaporte, ya que es fundamental para el intercambio de datos entre bancos y países. También se deben utilizar los estándares existentes para la documentación de datos de caracterización, como los descriptores de cultivo de Bioversity International, así como descriptores de marcadores genéticos (de Vicente *et al.*, 2004). Dados los avances realizados en el campo de la biotecnología, surge la necesidad de complementar los datos sobre caracteres fenotípicos con datos moleculares. Se deberán realizar esfuerzos para registrar los datos moleculares que se generen a través de la genómica, la proteómica, la metabolómica y la bioinformática.

El mantenimiento de registros relativos a los procesos de manejo de campo, entre los que se incluyen las operaciones rutinarias, es de enorme importancia para el buen manejo de la colección de campo. Es esencial documentar de forma apropiada registros de buena calidad de mapas de campo, tanto en papel como en formato digital. Los mapas antiguos deberán mantenerse y fecharse para posibles referencias en el futuro.

Para el adecuado manejo de accesiones de diferentes tipos de especies es preciso llevar a cabo diversas prácticas de cultivo, las cuales deben documentarse con atención para garantizar su uso consistente a lo largo del tiempo y dar el tratamiento adecuado a las accesiones.

La mayoría de los bancos de germoplasma disponen actualmente de computadoras y acceso a Internet. Los sistemas informáticos de almacenamiento de datos e información facilitan el almacenamiento de toda la información relacionada con el manejo de colecciones de campo. Existen sistemas de manejo de información sobre germoplasma, como GRIN-Global, desarrollados específicamente para las necesidades de gestión de la documentación y la información comunes a todos los bancos de germoplasma. La adopción de los estándares de datos que actualmente existen para la mayoría de los aspectos de la gestión de los datos de los bancos de germoplasma facilita la gestión de la información y contribuye a mejorar el uso e intercambio de datos. Compartir y hacer pública la información de las accesiones a los posibles usuarios del germoplasma es primordial para facilitar y apoyar el uso de la colección. En última instancia, la conservación y la capacidad de utilizar el germoplasma conservado se promueven a través de una buena gestión de la información y los datos.

Todos los datos deberán mantenerse actualizados. También deberán duplicarse a intervalos regulares y las copias se deberán almacenar en un lugar alejado donde estén protegidas del fuego, de los fallos informáticos, etc. (ver Normas para la seguridad). Contar con registros escritos de los principales datos de pasaporte y copias en papel de los mapas de campo puede resultar de utilidad.

Disposiciones particulares

La falta o la pérdida de documentación, mapas de campo o etiquetas suponen riesgos para el uso óptimo del germoplasma e incluso pueden dar lugar a su pérdida si ello hace imposible su manejo y regeneración adecuados.

La incorrecta identificación de las especies impide el registro de toda la información necesaria para el manejo adecuado de las accesiones ni la identificación de las prácticas de cultivo apropiadas.

BIBLIOGRAFÍA

- Alercia, A., Diulgheroff, S. & Metz, T.** 2001. *FAO/IPGRI. Multi-crop passport descriptors* (available at [http://www.bioversityinternational.org/index.php?id=19&user_bioversitypublications_pi1\[showUid\]=2192](http://www.bioversityinternational.org/index.php?id=19&user_bioversitypublications_pi1[showUid]=2192)).
- de Vicente, M.C., Metz, T. & Alercia, A.** 2004. *Descriptors for genetic markers technologies*. Italy, IPGRI. 30 p.
- Lipman, E., Jongen, M.W.M, van Hintum, Th.J.L., Gass, T. & Maggioni L. compilers.** 1997. *Central crop databases: tool for plant genetic resources management*. Rome, Italy, IPGRI, and Wageningen, Netherlands, CGN.
- Fabiani, A., Anderson, C. & Tillería J.** 1996. *Desarrollo de una base de datos para la evaluación de germoplasma cítrico. (Abstr.)*. VIII Congreso latinoamericano y VI Nacional de Horticultura. Montevideo, Uruguay, Soc.Urug. Hortic.
- GRIN GLOBAL.** *Germplasm Resource Information Network Database - Version 1* (available at http://www.grin-global.org/index.php/Main_Page).
- Painting, K.A, Perry, M.C, Denning, R.A. & Ayad, W.G.** 1993. *Guidebook for genetic resources documentation*. Rome, Italy, IPGRI.
- Tillería, J., Andrade, R. & Zamuz, J.** 2011. *Documentación de la colección de chirimoya (Annona cherimola Mill) del INIAP con la herramienta curatorial DBGERMOWeb*. VIII SIRGEALC, Quito, Ecuador.
- Tillería, J., Paniego, N., Zamuz, J. & Luján, M.** 2009. *El Sistema DBGERMO Web para la Documentación de Colecciones Vegetales*. VII SIRGEALC, Pucon, Chile.
- Tillería, J. & Zamuz, J.** 2011. *La Herramienta Curatorial DBGERMOWeb para la Documentación de Colecciones Vegetales. Demostración de la aplicación web en tiempo real con colecciones documentadas*. VIII SIRGEALC, Quito, Ecuador.
- Tillería, J.** 2001. *Sistema DBGERMO para la Documentación de Bancos Activos de Germoplasma*. Memoria, Reunión Técnica para Latinoamérica y el Caribe del Sistema Mundial de la FAO de Información y Alerta para los Recursos Filogenéticos. pp 85-115. Turrialba, Costa Rica.
- Tillería, J. & Anderson, C.M.** 2004. *The DBGERMO II desktop system for an easy documentation of germplasm collections*. Proc. ISC. (Abstr.), Morocco.

5.9 Normas para la distribución

Normas

- 5.9.1 Todo germoplasma se debe distribuir de conformidad con las leyes nacionales y los tratados y convenios internacionales pertinentes.
- 5.9.2 Todas las muestras se deben suministrar junto con todos los documentos pertinentes exigidos por los países donante y receptor.
- 5.9.3 Todo germoplasma que se distribuya debe estar acompañado de su información asociada. Como mínimo esta información debe incluir una lista detallada con la identificación de la accesión, el número y/o peso de las muestras, y los datos de pasaporte más importantes.

Contexto

La distribución de germoplasma consiste en el suministro de una muestra representativa de una accesión de un banco de germoplasma en respuesta a las peticiones de los usuarios de germoplasma vegetal. La demanda de recursos genéticos crece constantemente para responder a los retos planteados por el cambio climático, los cambios en los espectros de virulencia de las principales plagas y enfermedades, las especies exóticas invasivas, así como otras necesidades de los usuarios finales. Esta demanda ha llevado a un mayor reconocimiento de la importancia de la utilización del germoplasma de los bancos, lo que determina en última instancia la distribución del germoplasma. Es importante que la distribución de germoplasma de un país a otro cumpla la normativa internacional relativa a las medidas fitosanitarias, y se ajuste a lo estipulado en los tratados y convenciones internacionales sobre diversidad biológica y recursos fitogenéticos.



Aspectos técnicos

Los dos instrumentos internacionales que rigen el acceso a los recursos genéticos son el TIRFAA y el CDB. El TIRFAA facilita el acceso a los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura, y regula el reparto de beneficios derivados de su utilización. El TIRFAA establece un sistema multilateral de recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura para un conjunto de 64 especies cultivadas alimentarias y forrajeras (comúnmente conocidas como especies del Anexo 1 del Tratado) las cuales en su distribución están acompañadas de un ANTM. El ANTM se puede utilizar también para las especies no incluidas en el Anexo 1, aunque también existen otros modelos disponibles. El acceso y el reparto de los beneficios en virtud del CDB se realiza en conformidad a su Protocolo de Nagoya. Tanto el TIRFAA como el CDB hacen énfasis en la continuidad entre la conservación y la utilización sostenible, junto con el acceso facilitado y la distribución equitativa de los beneficios derivados del uso.

Además, todas las accesiones estarán acompañadas de la documentación requerida como los certificados fitosanitarios y los permisos de importación según corresponda en conformidad con la CIPF. Antes de realizar el envío se deberá confirmar el destino final y los requisitos fitosanitarios de importación más recientes del país receptor (en muchos países la normativa cambia con frecuencia). La transferencia de germoplasma debe planificarse con gran atención y contar con el asesoramiento de la organización nacional de protección vegetal o el instituto oficialmente autorizado, el cual debe proporcionar la documentación apropiada, como el certificado fitosanitario oficial, en cumplimiento con los requisitos del país importador. El receptor del germoplasma debe proporcionar al banco de germoplasma proveedor toda la información relativa a la documentación requerida para la importación del material vegetal, incluyendo los requisitos fitosanitarios.

Los materiales vegetativos de una accesión de un banco de germoplasma de campo deben ser sometidos a tratamientos terapéuticos y de indexación antes de su distribución a los usuarios del germoplasma. La indexación de los agentes patógenos difíciles de detectar, como los virus, es fundamental para limitar su propagación. Cuando no se disponga de las capacidades para la indexación de virus, especialmente cuando se sabe que el material procede de áreas infectadas por virus, el estado sanitario se debe adjuntar a los datos de pasaporte. En tales casos, el material puede ser distribuido si el destinatario cuenta con instalaciones de cuarentena o si cumple con el criterio del permiso de importación del país o región solicitante.

El tipo de contenedor para el transporte, los materiales de embalaje y la elección de la empresa de transporte dependerán en gran medida de la parte de la planta que se va a distribuir. Los certificados fitosanitarios y de cuarentena y los permisos de importación a menudo incluyen disposiciones sobre la forma en que cada tipo específico de germoplasma debe ser empaquetado y enviado. Los órganos durmientes o de almacenamiento requieren menos precauciones y pueden permanecer más tiempo en tránsito sin sufrir daños que los propágulos en crecimiento activo. Durante el transporte las accesiones deben mantenerse separadas unas de otras y no deben mezclarse. Muchos bancos de germoplasma disponen de procedimientos normalizados de trabajo que cubren aspectos técnicos tales como el empaquetado, el tratamiento, el método de envío, el tamaño de la muestra, y otros, y a los cuales se debe hacer referencia.

Para aumentar la probabilidad de que las plantas lleguen a su destino en buenas condiciones, los envíos se pueden programar de forma que se eviten las condiciones climatológicas adversas (frío o calor). También se puede notificar previamente de la llegada de la planta al receptor o al funcionario de la aduana. Para los propágulos frágiles pueden ser necesarios los servicios de entrega urgente. Los envíos internacionales se ven facilitados si los documentos necesarios se sujetan a la parte exterior del contenedor para el acceso directo de los funcionarios sin necesidad de tocar las plantas, incluyendo dentro del contenedor copias para el receptor. El solicitante puede necesitar los servicios de un mensajero para llevar el germoplasma desde la aduana al país.

Todas las accesiones deberán ir acompañadas de la información mínima necesaria para que el solicitante pueda hacer un uso adecuado del material. Esta información debe incluir al menos una lista detallada, con la identificación de la adhesión, el

número y/o peso de las muestras y los principales datos de pasaporte. También es útil incluir el historial de los estudios de patógenos. Los registros de distribución (registros con la fecha de solicitud, las plantas solicitadas, la forma de la planta, el nombre y dirección del solicitante, la fecha y el costo del envío) se deben mantener e incluir en el sistema de documentación del banco de germoplasma (ver Normas para la documentación). El material vegetal distribuido puede llegar a ser una fuente de material de propagación en caso de una pérdida catastrófica del material original en el banco de germoplasma proveedor.

Disposiciones particulares

La conservación de las accesiones en condiciones *in vitro* de forma simultánea a su conservación en campo ofrece protección contra plagas, patógenos y eventos climáticos y aumenta su disponibilidad para la distribución, si los materiales se mantienen libres de virus. En algunos casos, como en la yuca (*Manihot esculenta* L.) y el cacao (*Theobroma cacao* L.) las estacas de los bancos de campo normalmente sólo se pueden distribuir dentro del país, y a veces sólo en ciertas regiones del país, debido a los reglamentos de cuarentena de plagas y enfermedades. Para el intercambio de germoplasma entre países o regiones en cuarentena se deben utilizar otras formas de propagación, por ejemplo material cultivado *in vitro* o semillas. La distribución de materiales procedentes de invernaderos o cubiertas puede ser necesaria para las especies con virus transmitidos por insectos o por ácaros, y puede ser necesario el cultivo *in vitro*.

Las decisiones políticas, las situaciones de crisis o las demoras burocráticas podrían prolongar el lapso de tiempo entre la recepción de una solicitud de muestra y la distribución del material. Las limitaciones relacionadas con la regeneración y/o la multiplicación de las accesiones también pueden afectar y retrasar el proceso de distribución. Retrasar la verificación de las normas de cuarentena hasta que el envío esté listo para enviar resultará en un desperdicio de recursos. Los envíos de germoplasma infestado o sin la documentación apropiada verán rechazada su entrada al país importador o serán destruidos.

BIBLIOGRAFÍA

Crop Genebank Knowledge Base (available at http://croptgenebank.sgrp.cgiar.org/index.php?option=com_content&view=article&id=59&Itemid=208&lang=english).

5.10 Normas para la seguridad y la duplicación de seguridad

Normas

- 5.10.1 Se deberá implementar y actualizar según proceda una estrategia de manejo de riesgos que incluya los riesgos físicos y biológicos identificados en las Normas.
- 5.10.2 Los bancos de germoplasma deberán respetar las normas y protocolos locales de seguridad y salud en el trabajo.
- 5.10.3 Los bancos de germoplasma deberán emplear el personal necesario para desempeñar todas las funciones ordinarias y asegurar que el banco puede adquirir, conservar y distribuir germoplasma de conformidad con las normas.
- 5.10.4 Se realizará un duplicado de seguridad de cada una de las muestras del banco de germoplasma de campo en al menos en un sitio adicional, y/o éstas serán respaldadas por un método o estrategia de conservación alternativa como el cultivo *in vitro* o la criopreservación, cuando sea posible.

Contexto

Un banco de germoplasma de campo consiste en un conjunto de plantas vivas originarias de diferentes zonas geográficas que permanecerán en un mismo lugar durante muchos años, por lo que es extremadamente vulnerable a una serie de amenazas, incluidas las condiciones ambientales, las plagas y enfermedades, y la tenencia de la tierra y el desarrollo territorial. Además, un banco de germoplasma de campo es caro de mantener y requiere un cuidado constante en comparación con otros medios de conservación. Se debe implementar y promover una gestión sistemática de los riesgos que aborde los riesgos físicos y biológicos en las operaciones cotidianas. Estas normas proporcionan los elementos necesarios que un banco de germoplasma debe cumplir con el fin de proteger la colección de estas amenazas y garantizar que no se producen pérdidas de la diversidad genética.

Aspectos técnicos

El banco de germoplasma de campo debe contar con una estrategia de manejo de riesgos por escrito con las medidas que se deben tomar cada vez que ocurra una emergencia en el banco de germoplasma que afecte al germoplasma o a los datos relacionados. Esta estrategia, así como un plan de acción adjunto, deben ser revisados y actualizados regularmente para aprovechar las circunstancias cambiantes y las nuevas tecnologías, y difundirse adecuadamente entre el personal del banco de germoplasma.

Los bancos de germoplasma de campo están expuestos a muchas amenazas. Entre estas se incluyen las condiciones climáticas extremas como sequías, heladas, granizo, ciclones, tifones y huracanes, que son en parte predecibles y frente a los cuales se pueden tomar las precauciones necesarias para dar a las plantas una protección adicional durante los períodos desfavorables. Si las plantas se mantienen en macetas, se pueden llevar a un lugar protegido. Para las plantas más pequeñas en campo abierto, en función del tipo de planta, poco se puede hacer salvo reforzar las estacas o, cuando sea posible, proteger las plantas con una cubierta. Para los árboles frutales la poda de ramas puede reducir el impacto de los fuertes vientos que pudieran arrancar los árboles.

Otros eventos extremos como los incendios o terremotos son difíciles de predecir, y en esos casos es necesario tomar medidas cautelares para evitar que se produzcan daños en las plantas del banco de germoplasma. Se deben establecer y mantener en todo momento cortafuegos por todo el banco de germoplasma de campo. Además, debe haber equipos de extinción de incendios preparados, incluyendo extintores y mantas térmicas, que se deben revisar de forma regular. Los invernaderos, viveros y otros edificios de los bancos de germoplasma de campo que se hallen en zonas sísmicas deben estar construidos a prueba de terremotos.

Otras amenazas para las colecciones de campo están relacionadas con factores bióticos como plagas y enfermedades, depredadores, especies exóticas, plagas de roedores y material nativo de la misma especie que crece de forma natural en la zona y que puede invadir el campo como maleza. Se deben tomar las medidas cautelares contra estas amenazas. Los pesticidas se deben usar con precaución ya que tienen un impacto negativo no solamente en el medio ambiente sino también en la salud y la seguridad del personal que los aplica. Cuando sea apropiado, existen otras prácticas más respetuosas con el medio ambiente, como las trampas para atrapar a los depredadores o zanjas para impedir su acceso a las parcelas. La entrada de animales en los bancos de germoplasma de campo se debe evitar mediante el uso de protocolos humanitarios aprobados por las asociaciones pertinentes.

El vandalismo o el robo de material de plantación también puede ser un problema importante para la seguridad de las colecciones. Los bancos de germoplasma de campo deben estar debidamente cercados y el acceso a las instalaciones se debe controlar de forma apropiada. En algunos lugares puede ser necesario disponer de guardias de seguridad adicionales o vallas de seguridad. Teniendo en cuenta la naturaleza a largo plazo de los bancos de germoplasma de campo, especialmente los de frutales y otras especies de árboles, es importante tener asegurada la tenencia de la tierra y el plan de



desarrollo para la zona, para reducir la necesidad de trasladar la colección a un nuevo sitio y para permitir su expansión.

También se deben considerar los aspectos de salud y seguridad en el trabajo del personal. Se deben proporcionar equipos y ropa de protección que funcionen correctamente para su uso en el campo, especialmente cuando se utilizan pesticidas y fertilizantes químicos. La elección de los productos agroquímicos es importante para reducir los riesgos. Se debe preparar una lista de los productos químicos que se consideran generalmente seguros para diversos cultivos, así como una “lista negra” de los productos químicos peligrosos y prohibidos. El personal debe ser instruido en el uso correcto y seguro de los equipos mediante una formación regular en salud y seguridad en entornos de campo.

La gestión activa de los bancos de germoplasma requiere de un personal bien capacitado, y es crucial asignar cometidos a empleados con la debida competencia. Por lo tanto, los bancos de germoplasma deberán contar con un plan o estrategia para el personal junto con el presupuesto correspondiente, a fin de garantizar que disponen de suficiente personal debidamente capacitado para cumplir con la responsabilidad de asegurar que el banco puede adquirir, conservar y distribuir germoplasma. El acceso a especialistas en una amplia gama de áreas temáticas es conveniente, en función de los objetivos y el mandato de cada banco de germoplasma. Sin embargo, los complementos y la formación del personal dependerán de las circunstancias de cada caso. El personal deberá tener una formación adecuada, adquirida mediante capacitación certificada y/o en el puesto de trabajo, y deberán estudiarse las necesidades de formación del personal.

El uso de métodos complementarios de conservación para la duplicación en condiciones seguras de las accesiones mantenidas en bancos de germoplasma de campo es una estrategia importante para reducir los riesgos mencionados anteriormente, y además puede resultar más económico. Las accesiones pueden ser duplicadas en cultivos

in vitro de crecimiento lento o en criopreservación en nitrógeno líquido, siempre que existan protocolos para las accesiones objetivo. Para las especies que producen semillas de vida corta o recalcitrantes, el almacenamiento de semillas a corto plazo, renovando las semillas antes de que pierdan viabilidad, es una alternativa de seguridad viable y rentable. También se puede utilizar como respaldo de seguridad la duplicación del banco de germoplasma de campo en otra zona con clima y agroecología apropiados para el crecimiento de las plantas, pero que no esté sometida a los riesgos del banco principal. Además, el banco duplicado ofrece un lugar adicional a partir del cual se puede distribuir material, y puede estar situado en una zona con distintas amenazas de plagas y enfermedades, para la seguridad de la colección y para aligerar las restricciones de cuarentena para la distribución dentro de las regiones. El almacenamiento de polen y ADN también es complementario de los bancos de germoplasma de campo, ofreciendo una posibilidad económica de mantener mayor diversidad dentro de una accesión de la que se puede mantener en las plantas del banco de germoplasma de campo.

Cualquier sistema de duplicación de seguridad requerirá de un acuerdo legal claramente firmado entre el depositante y el destinatario del duplicado de seguridad, en el que se establezcan las responsabilidades de las partes y los términos y condiciones bajo los cuales se mantiene el material. Esto tiene especial relevancia para los bancos de germoplasma de campo, ya que las plantas se manejan de forma cotidiana.

Disposiciones particulares

Cuando no se disponga de personal debidamente capacitado, o cuando haya problemas de tiempo o limitaciones de otro tipo, entre las posibles soluciones se puede considerar subcontratar parte del trabajo de los bancos de germoplasma o recabar la ayuda de otros bancos. Deberá informarse inmediatamente a la comunidad internacional de bancos de germoplasma en caso de que peligren las funciones de un banco de germoplasma.

La entrada no autorizada de personas a las instalaciones de los bancos de germoplasma y la incursión de animales, incluyendo aves y fauna silvestre en general, pueden acarrear la pérdida directa del material, y además puede poner en peligro las colecciones como consecuencia de la introducción involuntaria de plagas y enfermedades y la interferencia en los sistemas de gestión. Una estrecha colaboración con las comunidades locales con el fin de darles a conocer el propósito y el valor de la colección puede contribuir a un sentido de propiedad y a una mayor protección de la zona donde se encuentra la colección de campo.

BIBLIOGRAFÍA

Crop Genebank Knowledge Base. *Safety duplication* (available at http://cropgenebank.sgrp.cgiar.org/index.php?option=com_content&view=article&id=58&Itemid=207&lang=english).

Engels, J.M.M. & Visser, L., eds. 2003. *A guide to effective management of germplasm collections*. IPGRI Handbooks for Genebanks No. 6. Rome, Italy, IPGRI. Available in English and Spanish.

Nordgen. 2008. *Agreement between (depositor) and the Royal Norwegian Ministry of Agriculture and Food concerning the deposit of seeds in the Svalbard Global Seed Vault*. The Svalbard Global Seed Vault. The Nordic Genetic Resource Centre, ALNARP available at http://www.nordgen.org/sgsv/scope/sgsv/files/SGSV_Deposit_Agreement.pdf).

Reed, B.M., Engelmann, F., Dulloo, M.E., & Engels, J.M.M. 2004. *Technical guidelines for the management of field and in vitro germplasm collections*. IPGRI Handbooks for genebanks No. 7. Rome, Italy, IPGRI (available at http://cropgenebank.sgrp.cgiar.org/images/file/learning_space/genebankmanual7.pdf).





Capítulo 6

Normas para bancos de germoplasma de cultivo *in vitro* y criopreservación





Las normas para el cultivo *in vitro* y la criopreservación son por naturaleza amplias y genéricas debido a las grandes diferencias que existen dentro del grupo de especies con semillas no ortodoxas y de propagación vegetativa. Esta variabilidad es función de la biología y del estado metabólico inherentes a estas plantas, los cuales influyen en sus distintas respuestas a las diversas operaciones, y a menudo requiere cambios en los enfoques básicos que se deben adoptar para cada especie en particular. Estos diversos elementos hacen necesaria una introducción al fenómeno de la no ortodoxia y la respuesta de las semillas no ortodoxas al almacenamiento, con el fin de comprender mejor la base científica de estas Normas.

El fenómeno de la no ortodoxia

Para la criopreservación es de gran importancia conocer bien los mecanismos de la tolerancia y la sensibilidad a la desecación en semillas ortodoxas en comparación con las no ortodoxas (intermedias y recalcitrantes). El contenido hídrico en las semillas ortodoxas maduras se encuentra normalmente en el rango de 0,05 a 0,16 g g⁻¹ (de 5 a 14 por ciento M.H.)¹, si bien en algunas especies puede ser mucho mayor en el momento en que se liberan del fruto, pasando después por una importante deshidratación. Al contrario que las semillas recalcitrantes, todas las semillas ortodoxas adquieren la tolerancia a la desecación, la cual está contenida y programada genéticamente, antes o al comienzo de la desecación que se producen en la maduración. Las semillas recalcitrantes no pierden agua durante las últimas fases del desarrollo y se liberan con un contenido hídrico mínimo

1 En este documento se utiliza el término contenido hídrico (M.H. es aquí materia húmeda) con preferencia respecto a contenido de humedad, ya que se puede considerar que las semillas recalcitrantes están hidratadas más que húmedas. Por otro lado, las cifras que se dan se expresan en términos de materia seca (gramos de agua por cada gramo de materia seca, g g⁻¹), lo cual se considera más explícito que la expresión como porcentaje de materia húmeda.

de 0,3-0,4 y máximo de 4.0 g g⁻¹. Por su sensibilidad a la deshidratación, la pérdida de agua tiene como consecuencia inmediata un descenso del vigor y la viabilidad, y posteriormente la muerte de la semilla a niveles de contenido hídrico relativamente altos. Esto se debe a su actividad metabólica (Berjak y Pammenter, 2004) con baja o ninguna diferenciación intracelular, exponiendo así a las membranas a las consecuencias perjudiciales del estrés por falta de agua (Walters *et al.*, 2001; Varghese *et al.*, 2011). En las semillas intermedias también ocurre un amplio espectro de diferencias en la fisiología de la fase posterior a la liberación del fruto. Las semillas que muestran un comportamiento intermedio pueden soportar pérdidas de agua hasta 0,11 o 0,14 g g⁻¹ (Berjak y Pammenter, 2004). Estas tienen la capacidad de llevar a cabo algunos de los mecanismos y procesos importantes que regulan la tolerancia a la desecación, pero no tienen vida larga en condiciones deshidratadas, especialmente en algunas especies y a temperaturas muy bajas.

La variabilidad en la fisiología de las semillas recalcitrantes muchas veces también es intraespecífica. El contenido hídrico de la semilla o del embrión (eje embrionario) puede variar de forma significativa de un año a otro entre materiales recolectados en el mismo lugar, y también dentro de una estación del año. Esto significa que los parámetros (contenido hídrico, respuesta a la desecación) deben calcularse para cada especie. Además, las semillas que se recolectan al final de la estación tienen normalmente una calidad sensiblemente inferior que las recolectadas al principio (Berjak y Pammenter, 2004). La procedencia de la población de la cual se han recolectado las semillas es también un factor importante para las propiedades y respuestas de las semillas recalcitrantes. Así, aunque sean de la misma especie, las semillas que desarrollan un gradiente latitudinal pueden mostrar unas características notablemente diferentes (Daws *et al.*, 2006; Daws *et al.*, 2004).

El estado de desarrollo de la semilla representa un factor crítico cuando el germoplasma recalcitrante debe ser criopreservado. En las fases tempranas de su ontogenia, todas las semillas son altamente sensibles a la desecación, pero en las semillas recalcitrantes la sensibilidad a la desecación va aumentando a la vez que se manifiestan los procesos de metabolismo de la germinación (Berjak y Pammenter, 2004). En estas semillas los primeros procesos de germinación se inician justo después de que la semilla es liberada del fruto, sin la discontinuidad entre el final del desarrollo y el comienzo de la germinación que la desecación durante la maduración impone en las semillas ortodoxas.

Si bien varía con la especie, las semillas recalcitrantes generalmente comienzan el metabolismo de germinación después de su liberación del fruto. Las especies con embriones totalmente desarrollados en el momento de la liberación normalmente inician la germinación casi inmediatamente, con un aumento simultáneo de la sensibilidad a la desecación. En otras especies, las semillas se liberan cuando los embriones no están desarrollados por lo que requieren la finalización del desarrollo para comenzar el metabolismo de germinación. Estas diferencias de desarrollo marcan la duración del periodo en el cual las semillas pueden ser almacenadas en húmedo (por ejemplo, almacenamiento hidratado al contenido hídrico en el momento de la liberación del fruto). Actualmente se sabe que las semillas recalcitrantes no pueden ser deshidratadas

hasta un contenido hídrico que impida la germinación (el llamado almacenamiento sub-imbibido), ya que esto en realidad reduce el periodo de almacenamiento hidratado. La deshidratación leve en realidad estimula el comienzo/progreso de la germinación, adelantando de esta forma el momento en el que sea necesario un suministro externo de agua sea para apoyar el proceso (Drew *et al.*, 2000; Eggers *et al.*, 2007).

En general, las semillas recalcitrantes con origen en zonas templadas toleran las temperaturas por debajo de 0 °C, mientras que las de la misma especie pero de ambientes tropicales y subtropicales tienen más probabilidad de ser sensibles a la congelación. La sensibilidad a la congelación también es un elemento importante para el almacenamiento de semillas intermedias, especialmente para las procedentes de los trópicos o subtropicos. Una vez deshidratadas hasta niveles de contenido hídrico que en sí mismos no son perjudiciales, el período eficaz de almacenamiento de tales semillas se reduce cuando las temperaturas bajan de 10 °C (Hong *et al.*, 1996).

La microflora asociada a las semillas (hongos y bacterias), especialmente la asociada con las superficies interiores (por ejemplo, de los cotiledones o del eje embrionario), normalmente representa un problema importante para las semillas recalcitrantes y en especial las de origen tropical y subtropical (Sutherland *et al.*, 2002). Las condiciones de almacenamiento hidratado, por ser de alta humedad y temperaturas por lo general necesariamente benignas, estimulan la proliferación de hongos, con lo que aumenta la probabilidad de que las hifas penetren en los tejidos del embrión. Esto tiene un efecto nocivo y acorta de forma significativa el periodo eficaz del almacenamiento hidratado.

En condiciones de campo, si el establecimiento de las plántulas no es suficientemente rápido, las semillas recalcitrantes perderán agua gradualmente, a un ritmo que dependerá de las características y morfología propias de la especie. En condiciones de pérdida lenta de agua (entre unos días y una semana o más) se acumulan los daños por desecación y las semillas de la mayoría de las especies habrán perdido viabilidad cuando el embrión (eje embrionario) haya alcanzado un contenido hídrico aproximado de 0,8 g g⁻¹ (Pammenter *et al.*, 1993). Por lo tanto, en el manejo o almacenamiento de semillas recalcitrantes normalmente es preciso un gran cuidado en mantener los contenidos hídricos a los niveles de la liberación de la semilla del fruto.

La respuesta de los explantos a la deshidratación depende de la velocidad de desecación y del tamaño de los explantos. Es frecuente que las semillas recalcitrantes tengan un tamaño grande por lo que no se deshidratan rápidamente ni se enfrían rápidamente cuando se exponen a un producto criogénico (tal como se requiere para conseguir una criopreservación eficaz). Por esta razón, los explantos preferidos son los embriones o ejes embrionarios escindidos, ya que pueden ser deshidratados hasta contenidos hídricos que reducen al mínimo la cristalización del hielo y que se encuentran por debajo de 0,4 g g⁻¹. Los embriones o ejes embrionarios pueden ser sometidos a una corriente de aire para su secado (secado ultrarrápido, *flash-dry*) (Pammenter *et al.*, 2002), lo cual reduce el tiempo durante el cual pueden ocurrir los daños de desecación vinculados al metabolismo. No es que los embriones o ejes embrionarios se hayan vuelto tolerantes a la desecación, sino simplemente que se secan antes de que se hayan acumulado los daños letales, consiguiendo así el tiempo necesario para someterlos

a temperaturas criogénicas. En los casos en los que se demuestra que es imposible manipular los embriones o ejes embrionarios para una criopreservación eficaz, se pueden usar explantos alternativos, como por ejemplo meristemas apicales escindidos de plántulas desarrolladas a partir de semillas germinadas *in vitro*.

Además de la criopreservación existen otras formas de conservar las especies que producen semillas recalcitrantes o no ortodoxas, como la conservación *in vitro* la cual puede comportar el crecimiento lento de plántulas o plantas jóvenes. En algunos casos las condiciones de crecimiento lento pueden ser impuestas *ex vitro*. En este último caso, las plántulas pueden derivarse de callos embriogénicos (los cuales a su vez pueden ser aptos para la criopreservación) y ser conservadas *in vitro*, bajo condiciones de crecimiento lento cuando sea posible.

BIBLIOGRAFÍA

Benson, E.E., Harding K., Debouck D., Dumet D., Escobar R., Maffa G., Panis B., Panta A., Tay D., Van den houwe I. & Roux, N. 2011. *Refinement and standardization of storage procedures for clonal crops - Global Public Goods Phase 2: Part I. Project landscape and general status of clonal crop in vitro conservation technologies*. Rome, Italy, System-wide Genetic Resources Programme.

Berjak, P. & Pammenter, N.W. 2004. Recalcitrant Seeds. In R.L. Benceh-Arnold, & R.A. Sánchez, eds. *Handbook of seed physiology: applications to agriculture*, pp. 305-345. New York, USA, Haworth Press.

Daws, M.I., Cleland, H., Chmielarz, P. Gorian, F., Leprince, O., Mullins, C.E., Thanos, C.A., Vandvik, V. & Pritchard, H.W. 2006. Variable desiccation tolerance in *Acer pseudoplatanus* seeds in relation to developmental conditions: a case of phenotypic recalcitrance? *Functional Plant Biology*, 33: 59-66.

Daws, M.I., Lydall, E., Chmielarz, P., Leprince, O., Matthews, S., Thanos, C.A. & Pritchard, H.W. 2004. Developmental heat sum influences recalcitrant seed traits in *Aesculus hippocastanum* across Europe. *New Phytologist*, 162: 157-166.

Drew, P.J., Pammenter, N.W. & Berjak, P. 2000. 'Sub-imbibed' storage is not an option for extending longevity of recalcitrant seeds of the tropical species, *Trichilia dregeana* Sond. *Seed Science Research*, 10: 355-363.

Eggers, S., Erdey, D., Pammenter, N.W. & Berjak, P. 2007. Storage and germination responses of recalcitrant seeds subjected to mild dehydration. pp. 85-92 in Adkins, S., Ashmore, S., Navie, S.C. (eds) *Seeds: biology, development and ecology*. Wallingford, UK, CABI.

Engelmann F. & Takagi, H., eds. 2000. *Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application*. Tsukuba, Japan, Japan International Research Centre for Agricultural Sciences, and Rome Italy, IPGRI.

Hong, T.D., Linington, S. & Ellis, R.H. 1996. *Seed storage behaviour: A compendium*. Handbooks for genebanks: No. 4. Rome, Italy, IPGRI.

Lync P., Souch, G., Trigwell, S., Keller, J & Harding, K. 2011. Plant cryopreservation: from laboratory to genebank. *As. Pac J. Mol. Biol. Biotechnol.*, 18 (1): 239-242.

Pammenter, N.W., Vertucci, C. & Berjak, P. 1993. Responses to dehydration in relation to non-freezable water in desiccation-sensitive and -tolerant seeds. In D. Côme & F. Corbineau, eds. *Proceedings of the Fourth International Workshop on Seeds: Basic and Applied Aspects of Seed Biology*, pp.867-872. Angers, France. ASFIS, Paris. Vol. 3.

Pammenter, N.W., Berjak, P., Wesley-Smith, & Vander Willigen, C. 2002. Experimental aspects of drying and recovery. In M. Black & H.W. Pritchard, eds. *Desiccation and survival in plants: drying without dying*, pp. 93-110. Wallingford, UK, CABI.

Reed, B.M. 2010. *Plant cryopreservation. A practical guide*. New York, USA, Springer.

Reed, B., Engelmann F., Dulloo M.E. & Engels J.M.M. 2004. *Technical guidelines on management of field and in vitro germplasm collections*. Handbook for genebanks No.7, Rome, Italy, IPGRI.

Sutherland, J.R., Diekmann, & Berjak, P., eds. 2002. *Forest tree seed health*. IPGRI Technical Bulletin No. 6. Rome, Italy, IPGRI.

Varghese, B., Sershen, Berjak, P., Varghese, & Pammenter, N.W. 2011. Differential drying rates of recalcitrant *Trichilia dregeana* embryonic axes: A study of survival and oxidative stress metabolism. *Physiologia Plantarum*, 142: 326-338.

Walters, C., Pammenter, N.W., Berjak, & Crane, J. 2001. Desiccation damage, accelerated ageing and respiration in desiccation-tolerant and sensitive seeds. *Seed Science Research*, 11: 135-148.

6.1 Normas para la adquisición de germoplasma

Normas

- 6.1.1 Todas las muestras incorporadas al banco de germoplasma deben ser adquiridas legalmente y con la documentación técnica pertinente.
- 6.1.2 Todo material deberá ir acompañado de por lo menos los datos asociados que se enumeran en los descriptores de pasaporte para cultivos múltiples de la FAO/IPGRI.
- 6.1.3 Solamente se recolectará material en buenas condiciones y en un estado de madurez estable, y el tamaño de la muestra debe ser suficiente para que la conservación de germoplasma en un banco sea viable.
- 6.1.4 El material debe ser transportado al banco de germoplasma en un periodo tan corto como sea posible y en condiciones idóneas.
- 6.1.5 Todo material recibido debe ser tratado con un agente desinfectante de superficie para eliminar todos los microorganismos adheridos, y manejado de forma que no se altere su estado fisiológico en un área asignada a la recepción.

Contexto

La adquisición es el proceso de recolectar o de solicitar germoplasma (semillas y otros propágulos¹) para su inclusión en el banco de germoplasma, juntamente con la información relacionada con el material. Es esencial respetar los requisitos legales, y se deben cumplir los requisitos tanto nacionales como internacionales pertinentes. Durante la fase de adquisición es importante que los datos de pasaporte de las accesiones sean tan completos como sea posible, y que estén totalmente documentados (Alercia *et al.*, 2001).

1 En este contexto, el término propágulo se refiere a las partes vegetativas de una planta utilizadas para su propagación, como semillas, yemas, bulbos, esquejes y otras estructuras.

Es preciso asegurar la máxima calidad del germoplasma y evitar la conservación de semillas inmaduras y semillas que hayan estado expuestas durante demasiado tiempo a las condiciones climatológicas adversas. La forma en que las semillas y otros propágulos se manipulan después de la recolección y antes de ser trasladados a entornos controlados es fundamental para la calidad. Unas condiciones de temperatura y humedad extremas y adversas en el período posterior a la recolección y durante el transporte al banco de germoplasma pueden menoscabar rápidamente la viabilidad y reducir la longevidad durante el almacenamiento. Lo mismo ocurre con la manipulación después de la recolección en el banco de germoplasma. La calidad y la longevidad de las semillas se ven afectadas por las condiciones a las que hayan estado expuestas antes de su almacenamiento en el banco de germoplasma. Dado que las semillas recalcitrantes son metabólicamente activas y tienen contenidos hídricos altos en la fase de maduración, el modo en que se manejan después de la recolección es esencial para su conservación eficaz a largo plazo. El material que crece en el campo suele estar contaminado con hongos y/o bacterias, por lo que es necesario contar con un conjunto de medidas preparadas para reducir el riesgo de deterioro del material en la fase posterior a la recolección.

El material deberá estar lo más limpio posible. En consecuencia, se recomienda transferir el material de campo a macetas y mantenerlo en invernadero para su crecimiento durante periodos cortos. En estos casos se deben regar las plantas desde abajo y, cuando el material está muy infectado, aplicar pesticidas, lo cual servirá de ayuda a la posterior desinfección de los explantos. El material visiblemente infectado debe ser excluido desde el primer momento o eliminado en cuanto se detecte.

Aspectos técnicos

Los recursos fitogenéticos que se encuentren dentro del sistema multilateral del Tratado Internacional tendrá que ir acompañado de un ANTM. Para el material adquirido o recolectado fuera del país donde se encuentra el banco de germoplasma, los adquirentes deberán cumplir con las disposiciones legales nacionales e internacionales pertinentes. Se debe solicitar a la autoridad nacional competente del país receptor la normativa fitosanitaria y cualquier otro requisito de importación.

Los datos de pasaporte son necesarios para identificar y clasificar las accesiones. Gran parte de las accesiones son poblaciones silvestres, por lo que la recolección de datos de campo precisos es absolutamente necesaria. Los descriptores de pasaporte para cultivos múltiples deben por lo tanto complementarse, en la medida de lo posible, con un espécimen de herbario así como con coordenadas GPS e imágenes fotográficas del hábito de crecimiento, el hábitat y el sustrato. Si se recolecta material que se hubiera caído al suelo, este hecho debe ser registrado y el material debe mantenerse separado del recolectado directamente de la planta madre. El tamaño de la muestra incluye un número adecuado de individuos/accesiones, suficiente para establecer un protocolo apropiado de criopreservación y/o para llevar las muestras a su criopreservación a largo plazo.

Resulta necesario garantizar la máxima calidad de semillas y propágulos y evitar la conservación de material inmaduro o senescente (en el caso de semillas) que haya estado expuesto durante demasiado tiempo a condiciones climáticas adversas. La recolección de propágulos maduros, limpios y de alta calidad garantizará que la longevidad durante el almacenamiento alcance niveles máximos. Se debe evitar el material caído al suelo y los frutos o semillas que muestren abrasión o signos de desgaste. Las semillas que se recolectan al final de la estación suelen mostrar una calidad inferior que las recolectadas al principio (Berjak y Pammenter 2004) por lo que se recomienda no recolectar semillas recalcitrantes de ninguna especie al final de la estación. La temporalidad también es un elemento a tener en cuenta cuando se utilizan bulbos y tubérculos, los cuales brotan únicamente en determinadas estaciones, en plantas leñosas que tienen yemas con dormancia solamente en invierno, y en explantos de inflorescencias jóvenes o polen solamente disponibles en el periodo de floración.

Muchos de los frutos que contienen semillas recalcitrantes portan hongos contaminantes que pueden no estar visibles. Esto representa un problema grave, por lo que la desinfección de superficie previa al transporte es importante con el fin de eliminar cualquier contaminante superficial. Altos niveles de temperatura y humedad durante el periodo siguiente a la recolección y el transporte al banco de germoplasma intensifican este problema y pueden causar una rápida pérdida de viabilidad y reducir la longevidad durante el almacenamiento. Sin embargo, las semillas y otros propágulos pueden ser sensibles al frío y las altas temperaturas pueden adelantar la germinación o bien dañar las semillas. Por lo tanto la temperatura durante el transporte no debe ser ni demasiado baja ni demasiado alta, por lo general entre 16 y 25 °C aproximadamente.

El problema de la contaminación por hongos también afecta al manejo posterior a la recolección dentro del banco de germoplasma y la superficie de los frutos debe ser cuidadosamente desinfectada antes de su apertura. De igual forma, las accesiones importadas pueden portar contaminantes procedentes de contenedores y embalajes, los cuales deben ser incinerados tal como se establece normalmente en las normativas de sanidad de plantas y semillas. Pulpa, fibras y otras partes del fruto deben ser completamente separadas de la superficie exterior de las semillas, pero para ello no se debe utilizar agua ya que las semillas fácilmente podrían hidratarse (aun más) lo cual afectaría al contenido hídrico de las semillas. También es importante recoger información sobre el peso del fruto y de las semillas antes de la determinación del contenido hídrico (ver Normas para las pruebas de comportamiento no ortodoxo y valoración del contenido hídrico, el vigor y la viabilidad).

Siempre que sea posible (como en el caso de frutos de cubierta dura), las semillas deben transportarse dentro del fruto, tanto por protección como para evitar la deshidratación. La pérdida de agua estimula el metabolismo de germinación y además acorta la duración del almacenamiento, por lo que es importante que el contenido hídrico no disminuya desde el momento de la recolección y durante todo el transporte, manteniendo una alta humedad relativa en los recipientes de almacenamiento. Se recomienda utilizar bolsas de plástico especiales ya que son resistentes a la rotura al contrario que los tubos de vidrio. Para mantener la temperatura estable puede servir de ayuda utilizar envases aislantes, los cuales pueden ser de especial importancia cuando los periodos de transporte son largos.

Por lo general, las semillas recalcitrantes producidas en frutos de cubierta dura permanecen en mejores condiciones durante largos periodos que si se extrae las semillas de los frutos. Cuando los frutos son blandos, han sufrido daños o se han abierto, se debe descontaminar inmediatamente la superficie, extraer las semillas y separar y destruir los restos de los frutos. Si el periodo de transporte es largo, se recomienda extraer, limpiar manualmente y desinfectar la superficie de las semillas antes del transporte. Lo ideal es llevar en las expediciones de campo un equipo de desinfección que incluya tabletas de purificación de agua o hipoclorito sódico (NaOCl), agua (estéril cuando sea posible, o alternativamente hervida *in situ*) y papel absorbente estéril.

En condiciones tropicales se pueden aplicar otras medidas como el almacenamiento de plántulas bajo sombra (Marzalina y Krishnapillay, 1999) o la recolección en campo *in vitro* (Pence *et al.*, 2002; Pence y Engelmann, 2011). Cuando se utiliza material recolectado *in vitro* también es importante reducir al mínimo los tiempos de transporte.

Para explantos de cultivo *in vitro*, la descontaminación de la superficie suele comenzar con etanol al 70 por ciento, seguido de hipoclorito sódico (NaOCl) diluido de una solución pura o como componente de una lejía comercial que tenga una concentración de cloro activo equivalente al 3 por ciento aproximadamente. Unas gotas de detergente pueden contribuir al efecto desinfectante. También se pueden utilizar otras sustancias (por ejemplo hipoclorito cálcico) en concentraciones adecuadas. Después de la desinfección de superficie se deberá cortar el explanto a su tamaño final. Es necesario señalar que el desinfectante se introducirá en las superficies cortadas lo que creará zonas muertas que deben ser eliminadas en el momento del corte.

Disposiciones particulares

Cuando una remesa se contamina o se deteriora, todo el material junto con su envase debe ser incinerado, a pesar de las implicaciones económicas que esto conlleve.

Los retrasos que puedan sufrir las remesas en las instalaciones nacionales de cuarentena suponen un riesgo imposible de estimar. En estos casos se deben tomar las medidas apropiadas para reducir los retrasos al mínimo, incluyendo el uso de servicios de mensajería.

Cuando la temporada de producción de frutos ha sido “pobre”, es preferible retrasar la recolección a la siguiente estación de frutos. Cuando sea estrictamente necesario recolectar frutos que hayan caído al suelo, solamente se tendrán en cuenta aquellos que hayan caído recientemente.

En algunas ocasiones, las semillas de algunas especies tienen una reacción negativa al hipoclorito sódico y/o a los fungicidas más comunes, en cuyo caso se deben aplicar alternativas seguras (Sutherland *et al.*, 2002). Es de destacar que una posibilidad es utilizar etanol al 70 por ciento (en volumen) en agua estéril o hervida.

BIBLIOGRAFÍA

Alercia, A., Diulgheroff, S. & Metz, T. 2001. FAO/IPGRI. *Multi-croppassport descriptors* (available at [http://www.biodiversityinternational.org/index.php?id=19&user_biodiversitypublications_pi1\[showUid\]=2192](http://www.biodiversityinternational.org/index.php?id=19&user_biodiversitypublications_pi1[showUid]=2192)).

Berjak, P. & Pammenter, N.W. 2004. Recalcitrant seeds. In R.L. Benceh-Arnold & R.A. Sánchez, eds. *Handbook of seed physiology: applications to agriculture*, pp. 305-345. New York, USA, Haworth Press.

Engelmann, F. 1997. *In vitro* conservation methods. In J.A. Callow, B.V. Ford-Lloyd & H.J. Newbury, H.J., eds. *Biotechnology and plant genetic resources*, pp. 119-161. Wallingford, Oxon, UK, CABI.

ENSCONET. 2009. *Seed collecting manual for wild species*. ISBN 978-84-692-3926-1 (available at www.ensconet.eu).

Marzalina, M. & Krishnapillay, B. 1999. Recalcitrant seed biotechnology applications to rainforest conservation. In E.E. Benson, ed. *Plant conservation biotechnology*, pp. 265-276. London, UK, Taylor & Francis.

Pence, V.C. 1996. *In vitro* collection (IVC) method. In M.N. Normah, M.K. Narimah & M.M. Clyde, eds. *In vitro conservation of plant genetic resources*, pp. 181-190. Percetakan Watan Sdn. Bhd, Kuala Lumpur, Malaysia.

Pence, V. C., Sandoval, J., Villalobos, V. & Engelmann, F., eds. 2002. *In vitro collecting techniques for germplasm conservation*. IPGRI Technical Bulletin No. 7. Rome, Italy, IPGRI (available at http://www.biodiversityinternational.org/fileadmin/biodiversity/publications/pdfs/866_In_vitro_collecting_techniques_for_germplasm_conservation.pdf?cache=1322754009).

Pence, V.C. & Engelmann, F. 2011. Chapter 24: Collecting *in vitro* for genetic resources conservation. In L. Guarino, V. Ramanatha Rao & E. Goldberg. *Collecting plant genetic diversity: technical guidelines. 2011 update*. Rome, Italy, Biodiversity International (available at http://cropgenebank.sgrp.cgiar.org/index.php?option=com_content&view=article&id=661).

Sutherland, J.R., Diekmann, M. & Berjak, P. eds. 2002. *Forest tree seed health*. IPGRI Technical Bulletin No. 6. Rome, Italy, IPGRI (available at http://www.biodiversityinternational.org/fileadmin/biodiversity/publications/pdfs/865_Forest_tree_seed_health_for_germplasm_conservation.pdf?cache=13365421520).

6.2 Normas para las pruebas de comportamiento no ortodoxo y valoración del contenido hídrico, el vigor y la viabilidad

Normas

- 6.2.1 La categoría de almacenamiento de las semillas debe ser determinada inmediatamente mediante el estudio de su respuesta a la deshidratación.
- 6.2.2 El contenido hídrico debe determinarse de forma individual y separada en cada uno de los componentes de los propágulos, y en un número suficiente de plantas.
- 6.2.3 El vigor y la viabilidad deben ser calculados mediante pruebas de germinación y en un número suficiente de individuos.
- 6.2.4 Durante los experimentos, las muestras de semillas limpias deberán almacenarse en condiciones que impidan la deshidratación o la hidratación.

Contexto

Mantener la viabilidad de las semillas es una función esencial del banco de germoplasma que garantiza la disponibilidad del germoplasma para los usuarios y su representatividad genética de la población de la que fue adquirido. Como primer paso para la conservación, es importante determinar con certeza la categoría de almacenamiento de la semilla mediante el estudio de la respuesta del propágulo a la deshidratación. La respuesta a la desecación determina a su vez el tratamiento necesario para el crioalmacenamiento. Una serie de factores influyen en la velocidad de desecación, entre los que se incluyen la humedad relativa, el tamaño de la semilla, las características de los revestimientos de la semilla, la velocidad de flujo de aire sobre las semillas, y la altura de la capa de semillas (Pammenter *et al.*, 2002).

La velocidad y uniformidad de germinación de una muestra de semillas o de explantos derivados de semillas, son indicadores fiables del vigor, mientras que la germinación total (es decir, la proporción o porcentaje de las semillas o explantos estudiados que finalmente

germinan) indica la viabilidad general de la muestra. La viabilidad nunca debe ser menor del 80 por ciento en ninguna muestra.

Aspectos técnicos

Los análisis para determinar el contenido hídrico y para calcular el vigor y la viabilidad se deben llevar a cabo como una sola operación, y son los elementos a determinar antes de seleccionar el tipo de técnica de secado. El número de procedimientos que pueden ser investigados viene determinado por el número de semillas disponibles. Se pueden utilizar tres métodos de análisis para la categorización de las semillas: un método que puede discriminar entre semillas intermedias y recalcitrantes (Hong y Ellis, 1996), uno que está diseñado para los casos en que el número de semillas es reducido (Pritchard *et al.*, 2004), y uno que estudia el contenido hídrico del eje, en lugar del de toda la semilla. Independientemente del método elegido, la deshidratación impuesta durante el procedimiento de análisis no debe llevarse a cabo a temperaturas elevadas, ya que son perjudiciales. Las temperaturas recomendadas para especies tropicales/subtropicales y especies de origen templado son 25 °C y 15 °C, respectivamente (Pritchard *et al.*, 2004). El tiempo de secado para evaluar la pérdida de viabilidad con reducción del contenido hídrico se debe determinar para cada nueva accesión.

Conocer los contenidos hídricos que presentan los distintos componentes de las semillas recalcitrantes es fundamental para su criopreservación eficaz. El contenido hídrico determinado sobre la base de la semilla recalcitrante entera no da ninguna indicación del contenido hídrico del eje. Por lo tanto, las determinaciones de contenido hídrico deben llevarse a cabo de forma separada para los ejes, los embriones, el tejido carnoso de los cotiledones y el endospermo (Berjak y Pammenter 2004) y medirse de forma individual (no en muestras combinadas). En muchos casos, la masa seca de los ejes de las semillas recalcitrantes puede llegar a ser muy pequeña (unos pocos miligramos), por lo que se requiere una microbalanza de 6 cifras decimales.

Es importante determinar el contenido hídrico de cada nueva accesión inmediatamente después de haber limpiado los propágulos, para evitar el secado adicional. Aunque se haya recolectado anteriormente otras accesiones de la misma especie, no se puede asumir que el contenido hídrico será similar. Normalmente se desconoce la composición de los ejes y tejidos de almacenamiento de especies silvestres recalcitrantes o no ortodoxas, por lo que se recomienda llevar a cabo el secado a 80 °C hasta alcanzar un peso constante. Cuando los tejidos se secan a 80 °C, el tiempo necesario para llegar al peso constante suele estar entre 24 y 48 horas. Después del período de secado y antes de volver a pesar las muestras, es indispensable llevarlas a temperatura ambiente, sin absorber agua.

Se recomienda analizar el contenido hídrico de un mínimo de 10 semillas (determinado sobre la base semilla/embrión/eje individual). Para cualquier análisis bioquímico que se lleve a cabo será necesario añadir semillas nuevas.

Las semillas y los embriones/ejes extirpados a partir de ellas deben estar en su etapa de desarrollo de máximo vigor cuando se recolecten. Las semillas intactas germinan mejor

en agar agua a 0,8-1 por ciento en recipientes de plástico cerrados o placas Petri, los cuales ofrecen las condiciones comunes para este tipo de análisis. Es importante desinfectar las superficies de las semillas antes de ponerlas a germinar, o antes de la escisión de los embriones o los ejes embrionarios. La dormancia no es una característica habitual en las semillas recalcitrantes por lo que normalmente las semillas deberán comenzar la germinación en un intervalo relativamente corto. Sin embargo, el tiempo variará entre las distintas especies en función del grado de desarrollo del embrión. Es esencial que todos los análisis de germinación/viabilidad para accesiones de la misma especie se realicen en las mismas condiciones controladas. La producción de plántulas morfológicamente anormales (Pammenter *et al.*, 2011) debe ser observada y cuantificada, ya que esto puede ocurrir como resultado de un estrés impuesto (por ejemplo, la deshidratación de semillas, embriones o ejes embrionarios recalcitrantes). Para los análisis de viabilidad se recomienda un mínimo de 20 semillas.

Cuando se manejan semillas recalcitrantes normalmente se pone un gran cuidado en mantener el contenido hídrico en los niveles característicos del momento de la liberación del fruto. Sin embargo, las semillas recalcitrantes intactas tienen prácticamente siempre un tamaño demasiado grande para su enfriamiento a temperaturas criogénicas. Por lo tanto los explantos, embriones o ejes embrionarios deben ser extirpados de las semillas y deshidratados. Además de esto, es esencial que el grueso de la muestra limpia de semillas se almacene bajo condiciones que eviten cambios en su estado de hidratación. Si las semillas se exponen a la atmósfera durante un tiempo prolongado, cambiará el contenido hídrico de las semillas y las semillas que se liberan con un contenido hídrico relativamente alto sufrirán cierta deshidratación.

Disposiciones particulares

Si un banco de germoplasma no dispone de una sala de secado con temperatura y humedad controladas, el secado se puede realizar, para semillas enteras, en la mesa de trabajo dentro de campanas de vidrio o en monocapas a la sombra. Las placas de Petri que no se hubieran cerrado antes de su extracción del horno de secado, deberán ser sustituidas en el horno, ya que los tejidos secos rápidamente adsorben vapor de agua, especialmente en ambientes húmedos.

Por lo general, los embriones y ejes embrionarios extirpados no germinan tan rápidamente como las semillas intactas. Cuando se trabaja con ejes embrionarios extirpados, es frecuente que el ápice del tallo no se desarrolle. En estos casos, la producción de la raíz será el criterio para evaluar el vigor y la viabilidad.

En los casos en que resulte imposible manipular los embriones o ejes para un criomacernamiento eficaz, se deben utilizar explantos alternativos. Estos pueden ser de diversos tipos, pero los más adecuados son los meristemas apicales del tallo extirpados de plántulas desarrolladas a partir de semillas germinadas *in vitro*.

BIBLIOGRAFÍA

Berjak, P. & Pammenter, N.W. 2004. Recalcitrant seeds. In R.L. Benech-Arnold & R.A. Sánchez, eds. *Handbook of seed physiology: applications to agriculture*, pp. 305-345 Haworth Press, New York.

Hong, T.D. & Ellis, R.H. 1996. *A protocol to determine seed storage behaviour*. IPGRI Technical Bulletin No. 1. International Board for Plant Genetic Resources, Rome, Italy.

Pammenter, N.W., Berjak, P., Wesley-Smith, J. & Vander Willigen, C. 2002. Experimental aspects of drying and recovery. In M. Black & H.W. Pritchard, eds. *Desiccation and survival in plants: drying without dying*, pp. 93-110. Wallingford, UK, CABI.

Pammenter, N.W., Berjak, P., Goveia, M., Sershen, Kioko, J.I., Whitaker, C., Beckett, R.P. 2011. Topography determines the impact of reactive oxygen species on shoot apical meristems of recalcitrant embryos of tropical species during processing for cryopreservation. *Acta Horticulturae*, 908: 83-92.

Pritchard, H.W., Wood, C.B., Hodges, S., Vautier, H.J. 2004. 100-seed test for desiccation tolerance and germination: a case study on eight tropical palm species. *Seed Science and Technology*, 32: 393-403.

6.3 Normas para el almacenamiento hidratado de semillas recalcitrantes

Normas

- 6.3.1 El almacenamiento hidratado debe llevarse a cabo bajo condiciones de humedad relativa saturada, y las semillas deben mantenerse en recipientes herméticos, a la menor temperatura que toleren sin que se produzcan daños.
- 6.3.2 Todas las semillas deben ser desinfectadas antes de su almacenamiento hidratado y el material infectado debe ser eliminado.
- 6.3.3 Las semillas almacenadas deben ser inspeccionadas periódicamente para comprobar si se ha producido alguna contaminación por hongos o bacterias, y si ha habido alguna disminución en su contenido hídrico y/o su vigor y viabilidad.

Contexto

Algunas veces es necesario almacenar semillas recalcitrantes a corto y medio plazo (de semanas a meses) para el suministro de material de plantación a programas de reintroducción y restauración, o simplemente para el mantenimiento de las semillas mientras se llevan a cabo los experimentos. El principio básico para que el periodo de almacenamiento de semillas recalcitrantes sea lo más largo posible es que el contenido hídrico debe mantenerse en niveles prácticamente iguales a los típicos de su estado recién recolectado. De esta forma las semillas no deben perder agua ni antes ni después de ser llevadas a las condiciones de almacenamiento. La deshidratación, incluso en grados muy bajos, puede estimular el inicio de la germinación, y una deshidratación adicional puede iniciar cambios perjudiciales que supongan un impacto negativo en el vigor y la viabilidad y que acorten el período para el cual las semillas se pueden almacenar. Mantener semillas recalcitrantes en condiciones en las cuales mantienen su contenido hídrico se denomina almacenamiento hidratado, y se logra preservando las semillas en condiciones aisladas bajo humedad relativa de saturación.

Aspectos técnicos

Para evitar la pérdida de agua de las semillas, el almacenamiento hidratado debe llevarse a cabo a humedad relativa saturada, lo cual se consigue manteniendo una atmósfera saturada dentro de los recipientes de almacenamiento. Lo ideal es sellar bolsas de polietileno con una bolsa interna de papel en el interior (“bolsa dentro de una bolsa”) o bien sellar cubetas de plástico del tamaño adecuado para el número de semillas, para favorecer el almacenamiento (Pasquini *et al.*, 2011). Como precaución esencial, antes de introducir las semillas en los recipientes de almacenamiento tales como cubetas con tapas de sellado, éstos y las rejillas internas deben ser esterilizados. Independientemente del recipiente elegido, se debe incluir un medio para la absorción del condensado, el cual se debe cambiar al empaparse.

La temperatura de almacenamiento debe ser la mínima de las toleradas por las semillas de cada especie individual sin efecto perjudicial en el vigor y la viabilidad. Así se reduce tanto el progreso de la germinación como la proliferación de hongos. La temperatura de almacenamiento debe mantenerse constante para minimizar la condensación en las superficies interiores de los recipientes de almacenamiento. Generalmente la temperatura adecuada para el almacenamiento de semillas recalcitrantes de origen templado es de 6 ± 2 °C, mientras que para la mayoría de las semillas de origen tropical o subtropical, 16 ± 2 °C es el rango normal. Se producen excepciones a esta pauta, sobre todo en semillas de algunas especies ecuatoriales (Sacandé *et al.*, 2004; Pritchard *et al.*, 2004).

En condiciones de almacenamiento hidratado hay una alta probabilidad de que proliferen hongos y con menor frecuencia también bacterias, por lo que se requiere vigilancia y medidas adecuadas para reducir la infección de semilla a semilla. Si las semillas infectadas no se retiran, contaminarán todo el lote incluido en el recipiente de almacenamiento, lo cual hará que el almacenamiento de semillas resulte inútil y anulará su potencial para el suministro de explantos para la criopreservación. Por lo tanto, desde el primer momento se debe realizar una inspección regular y tomar lo antes posible las medidas oportunas, como la aplicación de agentes fungicidas para eliminar de las semillas los contaminantes de superficie e internos (Calistru *et al.*, 2000).

Se deben desinfectar las superficies de las semillas, secar todo residuo de desinfectante y aplicar un fungicida de amplio espectro. La forma más eficaz de eliminar los hongos situados en el interior, principalmente justo debajo de las cubiertas de las semillas, es por la absorción de fungicidas sistémicos adecuados para las semillas. Sin embargo, éstos también pueden afectar negativamente a las semillas. Otra posibilidad es la termoterapia tal como se aplica a las bellotas infectadas (Sutherland *et al.*, 2002), pero este método sólo se puede utilizar cuando las semillas son resistentes a temperaturas elevadas de forma transitoria, lo cual no siempre es el caso. Para desinfectar directamente las superficies interiores, es necesario asegurarse de que las semillas sobrevivan bien en almacenamiento hidratado después de la eliminación de las cubiertas, y que la presencia de fungicidas sistémicos en los tejidos de las semillas no sea perjudicial.

Dependiendo de la duración del almacenamiento hidratado, los recipientes deben ser brevemente ventilados de forma periódica para evitar el desarrollo de condiciones

anóxicas, y en ese momento se debe inspeccionar el contenido de los recipientes y retirar cualquier semilla contaminada. Lo ideal es el almacenamiento de semillas en una sola capa, pero si se almacenan en varias capas se deben mezclar durante la aireación. Después de eliminar cualquier semilla que muestre señales de contaminación, se debe vaciar el contenedor, desinfectar todas las semillas que no tengan apariencia de contaminadas y recolocar el lote de semillas en un recipiente esterilizado.

Periódicamente se deben tomar muestras de las semillas almacenadas para comprobar si el contenido hídrico, el vigor o la viabilidad han disminuido. Si el contenido hídrico ha permanecido prácticamente igual que cuando las semillas se colocaron en almacenamiento hidratado, y no hay proliferación aparente de hongos (o bacterias), pero la viabilidad ha disminuido, entonces se habrá llegado al final del período de almacenamiento útil. De manera similar, si en muchas semillas se observan señales evidentes de germinación, se habrá llegado al final del período de almacenamiento útil. Una disminución en la viabilidad de las semillas que no han perdido agua de forma significativa, la protrusión de la raíz en la mayoría de las semillas, dan una medida del tiempo durante el cual resulta posible el almacenamiento hidratado bajo el régimen de temperatura específico utilizado.

Disposiciones particulares

La pérdida de agua en las semillas indica que la humedad relativa no se ha mantenido en niveles altos, probablemente debido a que los recipientes de almacenamiento no estaban adecuadamente sellados. En este caso los resultados de la muestra serán inciertos, por lo cual debe ser descartada. La pérdida de viabilidad de las semillas durante el almacenamiento también puede ocurrir como resultado de temperaturas de mantenimiento inadecuadas. Este parámetro debe ser resuelto mediante ensayos para conocer las respuestas de las semillas a un rango de temperaturas distintas. Las semillas pueden haber perdido su viabilidad debido a que originalmente eran de mala calidad o a que en el momento de la recolección estaban inmaduras.

En los casos en los que en una accesión hay una alta incidencia de las semillas contaminadas internamente, los contaminantes deben ser aislados e identificados, con el fin de desarrollar medios efectivos para eliminarlos en futuras recolecciones. La identificación de los hongos, como mínimo a nivel de género, puede ayudar en la elección de los fungicidas que pueden resultar más eficaces en combinación (“cócteles”), dirigidos específicamente a tales hongos. Algunas veces en las semillas se encuentran virus, los cuales no pueden ser eliminados mediante ningún tratamiento. Si estos virus pueden ser causa de enfermedades graves, las plantas deben ser eliminadas en el momento en que se observen los síntomas virales.

En los casos en los que la contaminación no responda a ningún tratamiento curativo, las semillas no se podrán conservar de esta forma, por lo que se deberán buscar métodos alternativos de conservación de recursos genéticos. En tales casos, las semillas se deben poner a germinar, y las plántulas desarrolladas a partir de semillas no infectadas se

deben mantener bajo condiciones de crecimiento lento, y/o utilizarse para proporcionar explantos alternativos para la conservación *ex situ*, por ejemplo con la transferencia y plantación en bancos de germoplasma de campo u otros jardines, según proceda.

BIBLIOGRAFÍA

- Calistru, C., McLean, M., Pammenter, N.W. & Berjak, P. 2000. The effects of mycofloral infection on the viability and ultrastructure of wet-stored recalcitrant seeds of *Avicennia marina* (Forssk.) Vierh. *Seed Science Research*, 10: 341-353.
- Pasquini, S., Braidot, S., Petrusa, E. & Vianello, A. 2011. Effect of different storage conditions in recalcitrant seeds of holm oak (*Quercus ilex* L.) during germination. *Seed Science and Technology*, 39: 165-177.
- Pritchard, H.W., Wood, C.B., Hodges, S., & Vautier, H.J. 2004. 100-seed test for desiccation tolerance and germination: a case study on eight tropical palm species. *Seed Science and Technology*, 32: 393-403.
- Sacandé, M., Jøker D., Dulloo, M.E. & Thomsen K.A. eds. 2004. *Comparative storage biology of tropical tree seeds*. Rome, Italy, IPGRI. 363 p.
- Sutherland, J.R., Diekmann, M. & Berjak, P. eds. 2002. *Forest tree seed health*. IPGRI Technical Bulletin No. 6. Rome, Italy, IPGRI (available at http://www.bioversityinternational.org/fileadmin/bioversity/publications/pdfs/865_Forest_tree_seed_health_for_germplasm_conservation.pdf?cache=1336542152).

6.4 Normas para el cultivo *in vitro* y el almacenamiento en crecimiento lento

Normas

- 6.4.1 La identificación de las condiciones óptimas de almacenamiento para el cultivo *in vitro* se debe determinar de acuerdo a la especie.
- 6.4.2 El material para la conservación *in vitro* debe mantenerse como plántulas enteras o yemas, u órganos de almacenamiento en aquellas especies que los formen de modo natural.
- 6.4.3 Se debe establecer un sistema de seguimiento periódico para comprobar la calidad del cultivo *in vitro* en el almacenamiento en crecimiento lento, así como la posible contaminación.

Contexto

La conservación *in vitro* se utiliza para el mantenimiento de órganos vegetales o plántulas en un periodo de tiempo medio (desde varios meses hasta algunos años) en condiciones no perjudiciales y de limitación del crecimiento. Por lo general no es conveniente para la conservación a largo plazo (Engelmann, 2011). La conservación *in vitro* se aplica preferentemente al germoplasma vegetal clonal, ya que también es de utilidad en las transferencias seguras de germoplasma bajo control fitosanitario regulado. Los documentos técnicos proporcionan información detallada sobre las posibilidades que ofrece el almacenamiento *in vitro*, los principales parámetros a tener en cuenta y las relaciones y la complementariedad con otras tecnologías de almacenamiento como los bancos de germoplasma de campo (Reed *et al.*, 2004; Engelmann, 1999a).

El cultivo *in vitro* sirve para generar material libre de enfermedades para su distribución y multiplicación, y como fuente de explantos para la criopreservación. Resulta esencial separar y eliminar de forma segura los materiales infectados, garantizando así que un patógeno o plaga no se libere al ambiente. Es necesario realizar un seguimiento regular y

permanente para evitar la acumulación de contaminación que pueda tener lugar durante los traslados, transmitirse por el aire de tubo a tubo o ser transportada activamente por vectores como ácaros y tisanópteros. Otro riesgo es el colapso por hiperhidratación, el cual por lo general comienza en algunos tubos un poco antes, de manera que existe la posibilidad de salvar el resto del material si se detecta con suficiente antelación.

Aspectos técnicos

Las condiciones óptimas para el crecimiento lento deben determinarse antes del almacenamiento. Estas condiciones pueden ser alcanzadas mediante el manejo de variables como el régimen de iluminación, la temperatura y composición del medio, individualmente o en combinación (Engelmann, 1991), pero generalmente se requiere experimentación para lograr resultados óptimos.

El tipo de explantos y su condición fisiológica son elementos fundamentales para el éxito o el fracaso del crecimiento lento *in vitro*. El cultivo *in vitro* se utiliza también como fase preparatoria para la criopreservación, así como para las fases de recuperación después de la criopreservación. Como primer paso se deben desarrollar los medios y condiciones adecuados para el crecimiento *in vitro* de explantos. Esto supone poner a punto los procedimientos adecuados de desinfección de superficie y también el medio de germinación, partiendo de un medio modelo (Murashige y Skoog, 1962) el cual puede necesitar ser ajustado. El medio basal se puede determinar a partir de la bibliografía relativa al cultivo de especies similares. Existen protocolos normalizados y publicados que pueden servir de referencias útiles (entre otros George, 1993; Hartmann *et al.*, 2002; Chandel *et al.*, 1995), si bien en muchos casos es esencial realizar ensayos detallados utilizando medios y condiciones de crecimiento para explantos, y es necesario desarrollar protocolos específicos utilizando los medios y condiciones de crecimiento de explantos, incluso cuando se trate de especies estrechamente relacionadas.

Para evitar la hiperhidricidad (o vitrificación) es importante asegurar que los materiales se mantienen como plántulas o brotes enteros. Para explantos de especies que naturalmente tienen un crecimiento lento puede no ser necesaria la manipulación de los medios o de las condiciones de cultivo.

La experimentación con una serie de permutaciones y combinaciones de los medios hasta conseguir un crecimiento lento satisfactorio es imprescindible la primera vez que se trabaja con explantos de una especie. Por ejemplo, se han documentado respuestas muy variables a la manipulación en el crecimiento lento de distintas especies del mismo género. El mantenimiento de la estabilidad genética a largo plazo del material almacenado bajo condiciones de crecimiento lento es imprescindible (Engelmann, 2011). Las temperaturas óptimas de almacenamiento para las especies tolerantes al frío están entre 0 y 5 °C o un poco más, mientras que para el material de origen tropical las temperaturas más bajas toleradas pueden estar en el intervalo de 15 a 20 °C, dependiendo de la especie (Normah *et al.*, 2011; INIBAP 2011; Engelmann, 1999a; Engelmann, 1991).

Los medios de cultivos normalmente se someten a diversas modificaciones, principalmente la reducción de los niveles de minerales, la reducción del contenido de

sacarosa y/o la manipulación del tipo y concentración de reguladores del crecimiento, mientras que la inclusión de sustancias osmóticamente activas (como el manitol) también puede ser eficaz (Engelmann, 2011; Engelmann, 1999a). El carbón activado puede servir para absorber polifenoles exudados en el medio (Engelmann, 1991).

El tipo, volumen, mecanismo de cierre y atmósfera de los recipientes de cultivo constituyen parámetros importantes (Engelmann, 2011; Engelmann, 1991), los cuales, cuando se trabaja con material nuevo, solamente se pueden establecer a través de la experimentación.

Aunque el almacenamiento en crecimiento lento se ha utilizado tradicionalmente para material cultivado *in vitro*, también se pueden mantener plántulas *ex vitro* bajo condiciones limitantes del crecimiento. Una alternativa económica es el crecimiento lento de plántulas en las condiciones de sombra y limitación de luz que ofrecen las copas los árboles (Chin, 1996). Por otra parte, la inducción de órganos de almacenamiento *in vitro* puede servir para mejorar de manera eficaz el período de conservación en especies cultivadas que forman estos órganos de modo natural (por ejemplo, jengibre [Engels *et al.*, 2011], taro, ñame, papa, y otros).

Disposiciones particulares

En cultivo *in vitro* de explantos de especies leñosas puede plantear problemas específicos, especialmente en relación con la exudación de polifenoles (Engelmann, 1999b). Entre los problemas asociados se incluyen el enraizamiento pobre y la hiperhidricidad de los explantos. La hiperhidratación y la necrosis foliar desarrolladas durante el crecimiento lento pueden causar un deterioro de la calidad y en algunos casos la muerte de propágulos enteros.

En algunos materiales, la acumulación de bacterias encubiertas puede resultar un obstáculo gradualmente creciente para el almacenamiento en crecimiento lento prolongado. Puede ser contrarrestado mediante la retirada temporal de las vitaminas del medio o la adición de antibióticos, pero estas medidas difícilmente consiguen resultados de forma permanente. Por lo tanto, puede ser necesario desechar estos cultivos del almacenamiento (Abreu-Tarazi *et al.*, 2010; Leifert y Cassels, 2001; Senula y Keller, 2011; Van den Houwe, 2000, Van den Houwe, 1998).

Dentro de un acervo génico pueden presentarse grandes diferencias en la respuesta al almacenamiento *in vitro* entre especies y entre variedades: algunas responden bien, mientras que otras no pueden ser conservadas con esta tecnología, lo cual hace imposible su aplicación (por ejemplo, el cafeto - Dussert, 1997). En algunas especies (por ejemplo, el ñame), se pueden formar órganos de almacenamiento *in vitro*, pero es difícil conseguir la germinación. Esto también es válido para bulbillos formados *in vitro* en algunas accesiones de una especie (por ejemplo, el ajo - Keller, 2005).

En algunas especies (por ejemplo, la caña de azúcar) la inestabilidad genética intrínseca puede verse potenciada por las técnicas de cultivo *in vitro*, mientras que en otras (por ejemplo, la yuca) se ha demostrado la estabilidad durante períodos prolongados (IPGRI/CIAT 1994). En estos últimos casos la variación somaclonal puede ocurrir con

frecuencias más altas. En la mayoría de los casos la variación somaclonal se reduce al mínimo mediante el uso consiguiente de técnicas que eviten la inducción de tallos adventicios o cualquier formación de callo basal después del corte. La zona donde se ha formado el callo debe ser eliminada durante la transferencia al siguiente período de cultivo. Para evitar la confusión acerca de las razones de las desviaciones genéticas que ocurren, es necesaria la observación minuciosa de la uniformidad de los explantos fuente y también excluir el quimerismo del material recibido (o mantenerlo cuidadosamente si es necesario en las plantas con variegación). La revisión regular por medio de marcadores moleculares puede resultar demasiado cara, por lo que se puede llevar a cabo un muestreo regular en los casos donde se espera que se produzca variación somaclonal.

La latencia de órganos puede resultar un problema cuando los brotes detienen su desarrollo, lo cual ocurre a menudo en especies que forman órganos de almacenamiento en condiciones *in vitro*. Para romper la latencia se pueden realizar cortes adicionales o aplicar citoquininas. Si de esta forma no se consiguen resultados, la única (aunque incierta) solución es esperar algún tiempo hasta que el brote se produzca de forma espontánea.

BIBLIOGRAFÍA

- Abreu-Tarazi, M.F., Navarrete, A.A., Andreote, F.D., Almeida, C.V., Tsai, S.M. & Almeida, M. 2010. Endophytic bacteria in long-term *in vitro* cultivated "axenic" pineapple microplants revealed by PCR-DGGE. *World J. Microbiol Biotechnol.*, 26: 555-560.
- Benson, E.E., Harding, K. & Johnston, J.W. 2007. Cryopreservation of shoot-tips and meristems. In J.G. Day and G. Stacey, eds. *Methods in molecular biology*, Vol. 368. *Cryopreservation and freeze drying protocols*. 2nd edition, pp. 163-184. Totowa, NJ, USA, Humana Press.
- Chandel, K.P.S., Chaudhury, R., Radhamani, J. & Malik, S.K. 1995. Desiccation and freezing sensitivity in recalcitrant seeds of tea, cocoa and jackfruit. *Annals of Botany*, 76: 443-450.
- Chin, H.F. 1996. Strategies for conservation of recalcitrant species. In M.N. Normah, M.K. Narimah & M.M. Clyde, eds. *In vitro conservation of plant genetic resources*, pp. 203-215. Kuala Lumpur, Malaysia.
- Dussert S., N. Chabrilange, F. Anthony, F. Engelmann, C. Recalt & S. Hamon. 1997. Variability in storage response within a coffee (*Coffea* spp.) core collection under slow growth conditions. *Plant Cell Reports*, 16: 344-348.
- Engelmann, F. 1991. *In vitro* conservation of tropical plant germplasm - a review. *Euphytica*, 57: 227-243.
- Engelmann, F. eds. 1999a. *Management of field and in vitro germplasm collections*. Proceedings of a consultation meeting, 15-20 January 1996. Cali, Colombia, CIAT, and Rome, Italy, IPGRI. 165 p.
- Engelmann, F. 1999b. Alternative methods for the storage of recalcitrant seeds - an update. In M. Marzalina, K.C. Khoo, N. Jayanthi, F.Y.M. Tsan & B. Krishnapillay, eds. *Recalcitrant seeds*, pp. 159-170. Kuala Lumpur, Malaysia, FRIM.

- Engelmann, F.** 2011. Biotechnologies for conserving biodiversity. In vitro *Cellular and Developmental Biology - Plant*, 47: 5-16.
- Engels, J. M. M., Dempewolf H. & Henson-Apollonio V.** 2011. Ethical considerations in agro-biodiversity research, collecting, and use. *J. Agric. Environ. Ethics*, 24: 107-126.
- George, E.F.** 1993. *Plant propagation by tissue culture. Part 1: The technology*. 2nd edition. Whitechurch, Shropshire, UK, Exegenics Limited.
- Hartmann, H.T., Kesler, D.E., Davies, F.T. & Geneve, R.L.** 2002. *Plant propagation - principles and practices*. 7th edition. New Jersey, USA, Prentice Hall.
- INIBAP.** 2011 (available at http://www.biw.kuleuven.be/dtp/tro/_data/itc.htm).
- IPGRI/CIAT.** 1994. *Establishment and operation of a pilot in vitro active genebank*. Report of a CIAT-IBPGR collaborative project using cassava (*Manihot esculenta* Crants) as a model. A joint publication of IPGRI and CIAT, Cali, Colombia.
- Keller, E.R.J.** 2005. Improvement of cryopreservation results in garlic using low temperature preculture and high-quality *in vitro* plantlets. *Cryo-Letters*, 26: 357-366.
- Leifert, C. & Cassells, A.C.** 2001. Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant*, 37: 133-138.
- Murashige, T. & Skoog, F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- Normah, M.N., Kean, C.W., Vun, Y.L. & Mohamed-Hussein, Z.A.** 2011. *In vitro* conservation of Malaysian biodiversity - achievements, challenges and future directions. *In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 47: 26-36.
- Reed B.M., Engelmann, F., Dulloo, E. & Engels, J.M.M., eds.** 2004. *Technical guidelines for the management of field and in vitro germplasm collections*. Rome, Italy, IPGRI/FAO/SGRP.
- Senula, A. & Keller, E.R.J.** 2011. Cryopreservation of mint - routine application in a genebank, experience and problems. *Acta Hort.*, 908: 467-475.
- Van den Houwe, I., Guns, J. & Swennen, R.** 1998. Bacterial contamination in *Musa* shoot tip cultures. *Acta Hort.*, 490: 485-492.
- Van den Houwe, I. & Swennen, R.** 2000. Characterization and control of bacterial contaminants in *in vitro* cultures of banana (*Musa* spp.). *Acta Hort.*, 530: 69-79.

6.5 Normas para la criopreservación

Normas

- 6.5.1 Los explantos seleccionados para la criopreservación deben ser de la calidad más alta que sea posible, y permitir su posterior desarrollo después de la escisión y la criopreservación.
- 6.5.2 Todas las etapas del protocolo de criopreservación deben ser analizadas individualmente y optimizadas en términos de vigor y viabilidad en la retención de los explantos.
- 6.5.3 Se deben desarrollar los medios para contrarrestar los efectos dañinos de las especies reactivas del oxígeno en la escisión y en todas las operaciones posteriores.
- 6.5.4 Después de la recuperación, los explantos se deben desinfectar utilizando procedimientos antisépticos normalizados.

Contexto

La criopreservación permite el almacenamiento de células o tejidos en nitrógeno líquido (NL) (-196 °C) y con las actividades metabólicas interrumpidas durante un período de tiempo indefinido. En cualquier protocolo de criopreservación hay cuatro pasos principales: (i) la selección, (ii) el precultivo¹, (iii) las técnicas de criopreservación, (iv) la recuperación del almacenamiento, y (v) el establecimiento de plántulas.

Se deben desarrollar protocolos de criopreservación para evitar daños durante la conservación. Estos pueden incluir la crioprotección, la desecación parcial, la refrigeración y el almacenamiento a temperaturas criogénicas, el recalentamiento y la rehidratación.

1 Tratamiento para la aclimatación lenta de explantos a la deshidratación/frío/congelación.

Existen dos tipos principales de procedimientos de criopreservación: la congelación lenta convencional, basada en la deshidratación inducida por la congelación, y, la congelación ultrarrápida o vitrificación, que implica la deshidratación previa a la refrigeración (Engelmann, 2011a).

Aspectos técnicos

Selección de explantos

La velocidad y la homogeneidad de la deshidratación de células y tejidos dependen de su tamaño, y puesto que la gran mayoría de las semillas recalcitrantes son demasiado grandes para el secado rápido y uniforme, no se pueden llevar intactas a la criopreservación. Además, las células con contenido hídrico mayor de $1,0 \text{ g g}^{-1}$ no sobreviven a la exposición a condiciones criogénicas. La escisión y el cultivo de explantos apropiados deben ser desarrollados específicamente para el propósito de la criopreservación. Los explantos deben ser tan pequeños como sea posible, pero lo suficientemente grandes para permitir el posterior desarrollo después de la escisión y después de la criopreservación. Una mayor uniformidad celular o del tejido dentro del explanto aumenta la probabilidad de crioprotección de todas (o de la mayoría) de las células de dicho explanto y su capacidad de regeneración sin que medie la proliferación del callo. Se pueden producir explantos para criopreservación a partir de ejes embrionarios, yemas terminales, y tejidos meristemáticos y embriogénicos. En semillas recalcitrantes, los embriones o ejes extirpados son los explantos más apropiados para la criopreservación. Cuando éstos sean demasiado grandes, no resistan el grado necesario de deshidratación, sean sensibles a todos los modos comunes de desinfección de superficies y/o resulte imposible someterlos a las condiciones de cultivo, otros explantos como los meristemas apicales del tallo representan una opción mejor.

Los explantos más adecuados para las especies de multiplicación vegetativa son las yemas, las puntas apicales y los tejidos meristemáticos y embriogénicos. No todos los tipos de explantos pueden ser tratados con los mismos o similares procedimientos de crioprotección, aunque sean de especies con una relación taxonómica relativamente estrecha (Sershen *et al.*, 2007). Es preciso determinar las respuestas a los procedimientos de crioprotección de cada especie y de cada genotipo. El material insuficientemente desarrollado suele ser más sensible al daño durante la escisión, y del mismo modo no se deben seleccionar semillas que hayan desarrollado o germinado hasta la fase de protrusión visible de las radículas o de otras partes del embrión (Gouveia *et al.*, 2004).

También se pueden utilizar para la criopreservación anteras enteras o granos de polen aislados. Estos representan la diversidad genética heredada igual que las semillas, pero al llevar las unidades germinales masculinas, normalmente tienen solamente el conjunto de cromosomas haploide (para mayor información ver Ganeshan, 2008; Rajashekarán, 1994; Weatherhead *et al.*, 1978). Cuando se conserva polen es necesario impregnarlo en cápsulas de gelatina o bolsitas de papel, o envolverlo en una tira de papel, y algunas especies requieren la deshidratación del polen antes de su almacenamiento.

Para recuperar el material, las anteras o el polen se deben desprender de las cápsulas, bolsitas o tiras a temperatura ambiente. La estimación de la germinación del polen se realiza preferiblemente en un medio de germinación. Los ensayos de viabilidad pueden realizarse por tinción de polen, y los resultados se correlacionan con la germinación del polen, si bien la tasa de germinación casi siempre será inferior. Cuando aun no se conozca el comportamiento de una especie, los ensayos de polinización serán necesarios para confirmar la eficacia de la fertilización por conjunto de semillas (Ganeshan 2008; Rajashekarán 1994; Weatherhead *et al.*, 1978).

Existen herramientas probabilísticas disponibles que facilitan el cálculo del número de propágulos que se deben almacenar y recuperar en función de los objetivos, la tasa de supervivencia a la criopreservación y otros parámetros (Dussert *et al.*, 2003).

Técnicas de criopreservación

Es importante aplicar a los embriones o ejes extirpados un periodo de desecación con el fin de determinar el tiempo necesario para reducir el contenido hídrico del material hasta un nivel apropiado. Después de cualquier tratamiento previo al crecimiento o crioprotector se debe realizar una nueva desecación.

La velocidad de refrigeración hasta temperaturas de NL es importante y debe ser considerada en relación con el contenido hídrico del explanto. El protocolo de criopreservación debe ser elegido con el criterio de asegurar que el contenido hídrico se encuentra dentro del rango que impide la formación de cristales de hielo intracelulares en las fases de refrigeración y calentamiento, pero evitando a la vez los daños de la desecación en la subestructura celular. En la parte alta del rango de contenido hídrico al cual se desecan los ejes, la refrigeración debe ser lo más rápida posible, ya que la refrigeración muy rápida de especímenes pequeños tiende a ser uniforme y reduce al mínimo el tiempo en el que se permanece dentro del intervalo de temperaturas que permitiría la cristalización de hielo. Los embriones y ejes generalmente constituyen solamente una fracción insignificante de la masa y el volumen de la semilla, por lo que son adecuados para la desecación ultrarrápida, solventando así el problema de los daños relacionados con el metabolismo. Por otro lado, la velocidad de refrigeración es menos crítica en ejes recalcitrantes que han sufrido desecación ultrarrápida (utilizando la deshidratación por evaporación) cerca de sus límites inferiores de tolerancia.

Las técnicas basadas en la deshidratación durante el enfriamiento a velocidad controlada son aplicables cuando el material que va a ser criopreservado consiste en cultivos embriogénicos y yemas apicales de especies templadas (Engelmann, 2011a). Para el material vegetativo, se han documentado muchos protocolos y ejemplos de criopreservación de una gran variedad de explantos de muchas especies, utilizando uno o varios procedimientos (Benson *et al.*, 2007). Además, existe un gran número de publicaciones sobre la criopreservación de ápices, otros tejidos meristemáticos, tejidos embriogénicos y yemas latentes, y la revista *CryoLetters* constituye una buena fuente de muchas de estas publicaciones. Una vez desarrollado con éxito un protocolo para una especie, deben llevarse a cabo análisis periódicos de muestras extraídas de la criopreservación, al principio tras un intervalo corto de almacenamiento.

La mayoría de los protocolos de vitrificación de plantas utilizan crioprotectores, los cuales normalmente consisten en una mezcla de tipos penetrantes y no penetrantes. La deshidratación por evaporación se ha empleado normalmente en embriones y ejes embrionarios cigóticos. Aunque se desarrollaron originalmente para ápices y embriones somáticos, la encapsulación-deshidratación y el procedimiento llamado vitrificación (que emplea diversas soluciones de vitrificación de plantas - PVS, *Plant Vitrification Solutions*) también se han utilizado en procedimientos para criopreservar embriones y ejes embrionarios derivados de semillas. Un estudio reciente (Engelmann, 2011b) proporciona información sobre todos los protocolos de vitrificación que se han desarrollado para embriones somáticos utilizando PVS2. La vitrificación con PVS2 también se ha utilizado para la criopreservación de yemas apicales de una gran variedad de especies de origen tanto tropical como templado, incluyendo entre las de origen tropical algunas especies de semilla recalcitrante y especies de propagación vegetativa. Otra solución de vitrificación habitual es la PVS3 (Nishizawa, 1993), que no utiliza DMSO (dimetil sulfóxido) y que por lo tanto puede ser la mejor opción para las especies que sufren daños con DMSO. Recientemente se han desarrollado diversas soluciones de carga y vitrificación alternativas que puede ser muy eficaces en la crioconservación de materiales sensibles a PVS2 y PVS3 (Kim *et al.*, 2009a; Kim *et al.*, 2009b).

En los límites inferiores de la deshidratación tolerada por embriones y ejes recalcitrantes, normalmente se retiene una porción de agua congelable. Tanto en el enfriamiento lento como en el recalentamiento puede ocurrir cristalización de hielo en la fracción de agua congelable entre -40 y -80 °C aproximadamente. El recalentamiento entre 37 y 40 °C evita la cristalización, si bien hay que señalar que la transferencia desde las temperaturas criogénicas debe ser muy rápida.

A continuación se indican las principales técnicas de crioconservación y sus parámetros fundamentales necesarios:

- velocidad de enfriamiento controlada: elección de un crioprotector (raramente mezcla de crioprotectores); selección de la velocidad de enfriamiento (para evitar la cristalización en el interior de las células);
- encapsulación-deshidratación: determinación del tiempo de deshidratación osmótica y de la velocidad de tratamiento, determinación del tiempo de desecación del aire;
- vitrificación: determinación del tipo de solución de vitrificación y del tiempo de tratamiento (evaluación de su toxicidad); en presencia de hielo se deben utilizar PVS2;
- congelación de microgotas: determinación del tipo de solución de vitrificación y del tiempo de tratamiento (evaluación de su toxicidad).

Recuperación del criomacernamiento

El recalentamiento del germoplasma vitrificado se suele realizar en dos pasos: el primero es lento para permitir la relajación de los cristales, generalmente a temperatura ambiente, y el segundo más rápido a 45 °C aproximadamente para evitar la nucleación del hielo (Benson *et al.*, 2011).

Las muestras procesadas por encapsulación-deshidratación² pueden transferirse directamente a un medio de recuperación/germinación para su recalentamiento rápido, o los criotubos que contienen las cápsulas de alginato pueden colocarse en un baño de agua a 40 °C durante 2-3 minutos. Alternativamente, las cápsulas pueden ser rehidratadas mediante su colocación durante unos 10 minutos en medio líquido. Se ha demostrado que la eliminación de la cápsula también es ventajosa (Engelmann *et al.*, 2008). La encapsulación-deshidratación ha demostrado ser consistente y eficaz para yemas terminales de muchas especies (González y Engelmann, 2006), embriones somáticos de coníferas (Engelmann, 2011b), una variedad de especies y variedades de cítricos y especies frutales de clima templado (Damiano *et al.*, 2003; Damiano *et al.*, 2007).

Para restaurar la actividad metabólica de la célula en el recalentamiento, se deben retirar de ella los crioprotectores tóxicos y el equilibrio hídrico normal se debe restaurar de forma gradual mientras la célula vuelve a una temperatura de funcionamiento normal. La composición inicial del medio de recuperación puede tener que ser ligeramente modificada después de que los explantos hayan sido deshidratados o expuestos al producto criógeno. Cuando se utilizan soluciones de vitrificación de plantas (PVS), después del recalentamiento rápido es necesaria una dilución o fase de descarga (eliminación de tóxicos PVS) (Sakai *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2004).

Todas las fases de la criopreservación pueden poner en peligro la supervivencia, pero especialmente durante el calentamiento y la rehidratación pueden ocurrir explosiones de especies reactivas del oxígeno (ERO o ROS por *Reactive Oxygen Species*)³ (Whitaker *et al.*, 2010; Berjak *et al.*, 2011). En principio el recalentamiento y los medios de rehidratación también deben contrarrestar los efectos nocivos de las ERO, pero es imprescindible establecer los medios para reducir al mínimo las explosiones de ERO que acompañan a la escisión (Whitaker *et al.*, 2010; Berjak *et al.*, 2011; Engelmann, 2011a; Goveia *et al.*, 2004). Los tratamientos con agua catódica (una solución electrolizada diluida de cloruro de calcio y cloruro de magnesio) han demostrado un fuerte efecto antioxidante al contrarrestar los efectos de las explosiones de ERO en todas las etapas de un protocolo de criopreservación de ejes embrionarios recalcitrantes de *Strychnos gerrardii*, y favorecer el desarrollo de brotes (Berjak *et al.*, 2011). Los efectos beneficiosos del tratamiento son más marcados cuando el desarrollo de los embriones o ejes progresa durante un período de almacenamiento hidratado, lo que indica la importancia del estado de desarrollo de las semillas. El tratamiento de ejes con agua catódica, no tóxica y antioxidante, parece ofrecer por un lado una explicación a los fracasos anteriores de la producción de brotes en los ejes, y por otro un tratamiento paliativo para contrarrestar el estrés relacionado

2 La encapsulación-deshidratación implica la encapsulación de los explantos en cápsulas de alginato y su cultivo (previo al crecimiento) en un medio líquido enriquecido en sacarosa durante periodos de hasta 7 días. Después se someten a deshidratación, utilizando un flujo de aire laminar o secado ultrarrápido, o a exposición a gel de sílice activado, para desecar los explantos hasta un contenido hídrico aproximado de 0,25 g g⁻¹ (20 por ciento M.H.), para finalmente enfriarlos rápidamente.

3 Las ERO son moléculas altamente reactivas, normalmente radicales libres, que dañan las proteínas, lípidos y ácidos nucleicos.

con las explosiones de ERO. Además, los instrumentos utilizados para la escisión de embriones y ejes pueden contribuir a la producción de ERO. A este respecto, el uso de una aguja hipodérmica es probable que cause menos trauma que el uso de un bisturí de hoja pequeña (Benson *et al.*, 2007). El uso de dimetil sulfóxido (DMSO), un captador de radicales hidroxilo, como paso previo al cultivo (antes de la ruptura completa de los restos de cotiledones) y como tratamiento después de su retirada, se ha demostrado que facilita el desarrollo de brotes. Entre otras sustancias antioxidantes que también se utilizan para neutralizar la formación de ERO se incluyen por ejemplo el ácido ascórbico y el tocoferol (Chua y Normah, 2011; Johnston *et al.*, 2007; Uchendu *et al.*, 2010). La supervivencia de material vegetal también se puede evaluar sobre la base de la actividad enzimática de las células vegetales vivas (Mikula 2006).

Establecimiento de plántulas

Una vez los embriones o ejes embrionarios escindidos han sido recalentados, el siguiente paso es generar y establecer una planta o plántula para completar el ciclo de regeneración. El establecimiento de plántulas y plantas jóvenes requiere de dos pasos: primero su establecimiento *in vitro* y después el establecimiento *ex vitro* y aclimatación. El material recuperado de la criopreservación debe ser introducido en un medio de recuperación inicialmente en ausencia de luz. Para la introducción en el cultivo *in vitro*, la superficie de los explantos se debe desinfectar y éstos se deben manipular con instrumentos esterilizados, siguiendo todos los procedimientos que se llevan a cabo en un flujo de aire laminar. Cuando no se dispone de una cabina de flujo laminar (“banco de trabajo de aire limpio”) puede ser posible realizar el trabajo en salas limpias y cerradas desinfectando rigurosamente la sala y el aire de la misma. Los embriones y ejes embrionarios deben ser rehidratados durante 30 minutos a temperatura ambiente y sin luz. Cuando se exponen directamente a un medio de recalentamiento, la rehidratación debe realizarse en una solución de la misma composición. La producción en cada plántula resultante de una raíz y un tallo es una medida de la eficacia de la criopreservación de ejes. Para el material de propagación vegetativa, la criopreservación se considera satisfactoria cuando se obtienen brotes, los cuales pueden ser enraizados o llevados a una posterior micropropagación.

Después de un período preventivo de cultivo en oscuridad (Touchell y Walters, 2000), los explantos generalmente se exponen a condiciones convencionales de crecimiento con iluminación de sala y a regímenes de temperatura que deben estar establecidos desde el principio por su adaptación a la especie y a su procedencia. La temperatura y los regímenes de luz para la germinación *in vitro* y el desarrollo de plántulas son parámetros que pueden necesitar ajustes, y la transferencia de explantos por varias de las fases de cultivo puede ser necesaria. Es fundamental que las plántulas producidas *in vitro* se mantengan inicialmente bajo condiciones de alta humedad relativa y después reducir ésta gradualmente.

El establecimiento *ex vitro* y la aclimatación de plántulas implica esencialmente su transferencia desde el cultivo de crecimiento lento o la criopreservación de material vegetativo en condiciones *in vitro* heterótrofas a un sustrato estéril en el que se desarrollará la condición autotrófica. Los medios de recuperación deben contener macro y micronutrientes, minerales esenciales y una fuente de carbono, y también puede ser

necesaria la adición de reguladores del crecimiento. Los medios deben haber pasado por un autoclave durante su preparación, y si un componente sensible al calor es necesario, éste deberá ser esterilizado por filtración antes de ser añadido al medio. Los medios de germinación adecuados para los embriones y ejes de muchas especies se basan en MS (Murashige y Skoog, 1962). El medio nutriente MS puede ser utilizado a plena potencia, a media o a un cuarto de potencia, según lo que indiquen las respuestas de los explantos la primera vez que se trabaja con semillas de una especie determinada. Dependiendo del objetivo que se persiga, los explantos recuperados de la criopreservación pasan directamente a convertirse en plántulas para la aclimatación, o se puede producir una fase de multiplicación previa a la aclimatación, ofreciendo así la posibilidad de producir el número deseado de copias de la accesión recuperada.

Disposiciones particulares

Se debe tener en cuenta que la elaboración del protocolo puede requerir más de una sola colección y puede prolongarse durante dos o más años, debido a la naturaleza estacional de la disponibilidad de semillas.

Es preciso señalar que el material puede ser conservado en NL o por encima del NL en la fase de vapor. El almacenamiento en la fase de vapor es mucho más caro y menos seguro que el almacenamiento directamente en NL. Aunque en el NL haya algunos microbios en suspensión esto no constituye necesariamente una causa de contaminación de las muestras, porque éstas pasan por algunos procesos de lavado en condiciones estériles durante el recalentamiento. Si bien las esporas pueden adherirse a la superficie de los explantos, los microbios no pueden introducirse en ellos en NL porque todos estos procesos se interrumpen a temperaturas tan bajas.

Los ejes escindidos pueden no germinar debido a su estado de madurez. De ahí la necesidad de colocar los propágulos recolectados en almacenamiento hidratado y de tomar muestras periódicamente para conocer la germinación y el comportamiento de los ejes extirpados. En el caso de que no germinen ni la semilla o propágulo ni los embriones o ejes extirpados, el material puede estar muerto o durmiente. La prueba de tetrazolio determinará si las semillas son viables o no. Si son viables se puede asumir que están durmientes, y será necesario llevar a cabo los experimentos apropiados para romper la condición de dormancia.

En el caso de la mayoría de las especies con semillas recalcitrantes, no es factible la regeneración tal como se practica en especies de semillas ortodoxas. Si se produce una caída inaceptable en la calidad de los embriones o ejes criopreservados, la única opción consistiría en repetir el muestreo de semillas en la población o poblaciones originales y adaptar los procedimientos. En los casos en que los embriones o ejes embrionarios sigan sin mostrar respuesta a la criopreservación, se debe centrar toda la atención en el desarrollo de explantos alternativos adecuados, preferiblemente los derivados de plántulas establecidas *in vitro*.

Cuando el material ha sido mantenido durante mucho tiempo en cultivo *in vitro* o almacenamiento *in vitro* puede ya no ser adecuado para la extracción de ápices para



la criopreservación, ya que este material puede contener o haber acumulado bacterias encubiertas (endófitos) que se difundirán durante la recuperación de la criopreservación, y por lo tanto dificultarán enormemente la criopreservación. Hay casos en los que los explantos (por ejemplo, segmentos nodales) de material originado en cultivos mantenidos *in vitro* durante largo tiempo se encuentran hidratados en exceso. En tales casos, el material fuente debe cultivarse desde el principio.

Los cultivos que se han infectado deben ser inmediatamente extraídos de la sala de crecimiento y destruidos. El problema más devastador en cualquier sala de crecimiento es la infestación por ácaros. Después de extraer todos los cultivos que muestren señales de ácaros, se requiere como respuesta rápida una desinsectación de las instalaciones. Después será necesaria una inspección de todos los recipientes de cultivo y la retirada y destrucción de cualquier recipiente que muestre evidencia de ácaros (los cuales muerden a través del Parafilm™, y extienden esporas de hongos desde un cultivo infectado al resto).

El agotamiento de nitrógeno líquido en un tanque de almacenamiento o en un congelador de NL llevaría a la pérdida irrecuperable de todas las muestras. Un fallo no detectado, de origen eléctrico u otro, en el sistema de control de temperatura de una sala de crecimiento puede causar un sobrecalentamiento con la consiguiente pérdida del material *in vitro*.

BIBLIOGRAFÍA

Benson, E.E. & Bremner, D. 2004. Oxidative stress in the frozen plant: a free radical point of view. In B.J. Fuller, N. Lane & E.E. Benson, eds. *Life in the frozen state*, pp. 205-241. Boca Raton, CRC Press.

Benson, E.E., Harding, K., Johnston, J.W. 2007. Cryopreservation of shoot-tips and meristems. In J.G. Day & G. Stacey, eds. *Methods in molecular biology* vol. 368. *Cryopreservation and freeze drying protocols*. 2nd edition, pp. 163-184. Totowa, NJ, USA, Humana Press.

Benson, E.E., Harding, K., Debouck, D., Dumet, D., Escobar, R., Mafla, G., Panis, B., Panta, A., Tay, D., Van den houwe, I. & Roux, N. 2011. *Refinement and standardization of storage procedures for clonal crops - Global Public Goods Phase 2: Part I. Project landscape and general status of clonal crop in vitro conservation technologies*. Rome, Italy, System-wide Genetic Resources Programme.

Berjak, P., Sershen, Varghese, B. & Pammenter, N.W. 2011. Cathodic amelioration of the adverse effects of oxidative stress accompanying procedures necessary for cryopreservation of embryonic axes of recalcitrant-seeded species. *Seed Science Research*, 21: 187-203.

Chua, S.P. & Normah, M.N. 2011. Effect of preculture, PVS2, and vitamin C on survival of recalcitrant *Nephelium ramboutan* Ake shoot tips after cryopreservation by vitrification. *Cryo Letters*, 32: 596-515.

Damiano, C., Frattarelli, A., Shatnawi, M.A., Wu, Y., Forni, C. & Engelmann, F. 2003. Cryopreservation of temperate fruit species: quality of plant materials and methodologies for gene bank creation. *Acta Horticulturae*, 623: 193-200.

Damiano, C., Arias Padró, M. D., & Frattarelli, A. 2007 Cryopreservation of some Mediterranean small fruit plants. *Acta Horticulturae*, 760: 187-194

Dussert, S., Engelmann, F. & Noirot, M. 2003. Development of probabilistic tools to assist in the establishment and management of cryopreserved plant germplasm collections. *CryoLetters*, 24: 149-160.

Engelmann, F. 2011a. Germplasm collection, storage and preservation. In A. Altman & P.M. Hazegawa, eds. *Plant biotechnology and agriculture - prospects for the 21st century*, pp. 255-268. Oxford, UK, Academic Press.

Engelmann, F. 2011b. Cryopreservation of embryos: an overview. In T.A. Thorpe & E.C. Yeung, eds. *Plant embryo culture methods and protocols. Methods in molecular biology*, Vol. 710, DOI 10.1007/978-1-61737-988-8_13, Springer Science+Business Media, LLC.

Engelmann, F., Gonzalez-Arno, M.-T., Wu, Y., & Escobar, R. 2008. The development of encapsulation dehydration. In B.M. Reed, ed. *Plant cryopreservation. A practical guide*, pp. 59-75. New York, USA, Springer.

Ganeshan, S., Rajasekharan, P.E., Shashikumar, S. Decruze, W. 2008. Cryopreservation of pollen. In B.M. Reed, ed. *Plant cryopreservation. A practical guide*. pp. 443-464. New York, USA, Springer.

Gonzalez Arno, M.T. & Engelmann, F. 2006. Cryopreservation of plant germplasm using the encapsulation-dehydration technique: review and case study on sugarcane. *Cryo Letters*, 27: 155-168.

Goveia, M., Kioko, J.I. & Berjak, P. 2004. Developmental status is a critical factor in the selection of excised recalcitrant axes as explants for cryopreservation: A study of *Trichilia dregeana* Sond. *Seed Science Research*, 14: 241-248.

- Johnston, J.W., Harding, K. & Benson, E.E. 2007. Antioxidant status and genotypic tolerance of *Ribes in vitro* cultures to cryopreservation. *Plant Sci.*, 172: 524-534.
- Kim, H.H., Cho, E.G., Baek, H.J., Kim, C.Y., Keller, E.R.J. & Engelmann, F. 2004. Cryopreservation of garlic shoot tips by vitrification: Effects of dehydration, rewarming, unloading and regrowth conditions. *Cryo Letters*, 25: 59-70.
- Kim, H.H., Lee, Y.G., Shin, D.J., Kim, T., Cho, E.G. & Engelmann, F. 2009a. Development of alternative plant vitrification solutions in droplet-vitrification procedures. *Cryo Letters*, 30: 320-334.
- Kim, H.H., Lee, Y.G., Ko, H.C., Park, S.U., Gwag, J.G., Cho, E.G. & Engelmann, F. 2009b. Development of alternative loading solutions in droplet-vitrification procedures. *Cryo Letters*, 30: 291-299.
- Mikuła, A., Niedzielski, M. & Rybczyński, J.J. 2006. The use of TTC reduction assay for assessment of *Gentiana* spp. cell suspension viability after cryopreservation. *Acta Physiologiae Plantarum*, 28: 315-324.
- Murashige, T. & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- Nishizawa, S., Sakai, A., Amano, Y., Matsuzawa, T. 1993. Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification. *Plant Sci.*, 91: 67-73.
- Rajasekharan, P.E., Rao, T.M., Janakiram, T. & Ganeshan, S. 1994. Freeze preservation of gladiolus pollen. *Euphytica*, 80: 105-109.
- Reed, B.M., eds. 2008. *Plant cryopreservation. A practical guide*. New York, USA, Springer. 513 p.
- Sakai, A., Hirai, D. & Niino, T. 2008. Development of PVS-based vitrification and encapsulation-vitrification protocols. In B.M. Reed, ed. *Plant cryopreservation A practical guide*, pp. 33-57. New York, USA, Springer.
- Sershen, Pammenter, N.W., Berjak, P. & Wesley-Smith, J. 2007. Cryopreservation of embryonic axes of selected amaryllid species. *Cryo Letters*, 28: 387-399.
- Sershen, Berjak, P., Pammenter, N.W. & Wesley-Smith, J. 2011. Rate of dehydration, state of subcellular organisation and nature of cryoprotection are critical factors contributing to the variable success of cryopreservation: studies on recalcitrant zygotic embryos of *Haemanthus montanus*. *Protoplasma*, 249(1): 171-86.
- Shatnawi, M.A., Engelmann, F., Frattarelli, A. & Damiano, C. 1999 Cryopreservation of apices of in vitro plantlets of almond (*Prunus dulcis* Mill.). *CryoLetters*, 20: 13-20.
- Touchell, D. & Walters, C. 2000. Recovery of embryos of *Zizania palustris* following exposure to liquid nitrogen. *Cryo Letters*, 21: 26-270.
- Uchendu, E.E., Leonard, S.W., Traber, M.G. & Reed, B.M. 2010. Vitamins C and E improve regrowth and reduce lipid peroxidation of blackberry shoot tips following cryopreservation. *Plant Cell Rep.*, 29: 25-35.
- Weatherhead, M.A., Grout, B.W.W. & Henshaw, G.G. 1978. Advantages of storage of potato pollen in liquid nitrogen. *Potato Res.*, 21: 331-334.
- Whitaker, C., Beckett, R.P., Minibayeva, F. & Kranner, I. 2010. Production of reactive oxygen species in excised, desiccated and cryopreserved explants of *Trichilia dregeana* Sond. *South African Journal of Botany*, 76: 112-118.

6.6 Normas para la documentación

Normas

- 6.6.1 Los datos de pasaporte de todas las accesiones deben estar documentados utilizando los descriptores de pasaporte para cultivos múltiples de la FAO/IPGRI. Además, la información de la accesión también debe incluir datos de inventario, de peticiones y de distribución, así como la información proporcionada por los usuarios.
- 6.6.2 Se deberá registrar en una base de datos apropiada la información y los datos de gestión generados en el banco de germoplasma, y los datos de caracterización y evaluación que se tomen.
- 6.6.3 Los datos generados en 6.6.1 y 6.6.2 deben ser registrados en una base de datos apropiada, en la cual se deben actualizar los cambios, y se deben adoptar estándares internacionales de datos.

Contexto

La información exhaustiva sobre las accesiones es esencial para la gestión del banco de germoplasma. Los datos de pasaporte constituyen un mínimo, pero otros tipos de información también son de gran utilidad como los datos geográficos (coordenadas GPS) y ecológicos (superposición de mapas de clima y suelo) del lugar de la recolección e información histórica, así como los datos de caracterización y evaluación.

Aspectos técnicos

Dados los avances en las tecnologías de la información, actualmente es relativamente simple registrar, manejar y compartir información sobre las accesiones. Todos los bancos

de germoplasma deben utilizar sistemas compatibles de almacenamiento y recuperación de datos, así como los descriptores de pasaporte para cultivos múltiples de la FAO/IPGRI (Alercia *et al.*, 2001), ya que facilitan el intercambio de datos.

Los datos de caracterización y evaluación son producidos por los usuarios. Estos datos son muy útiles en el banco de germoplasma para el manejo de sus colecciones (BRAHMS, 2011) y para facilitar su uso en el futuro. Se recomienda que los bancos de germoplasma soliciten esta información a los usuarios.

Los datos de gestión deben ser tan completos como sea posible para permitir un manejo eficaz de la colección. La mayoría de los datos de gestión son solamente para uso interno del responsable de la colección y de valor limitado o nulo para otros, tanto usuarios como bancos de germoplasma receptores. Por lo tanto, los datos de gestión deben estar restringidos al uso exclusivo del responsable de la colección, si bien se puede extraer una parte de la información (historial, forma biológica y disponibilidad) para uso público. Además de los datos clave de la accesión (datos de pasaporte y caracterización), los datos de gestión deben incluir lo siguiente:

- Historia (fecha de adquisición, cifras preliminares, fecha de cambio de los números, determinación taxonómica, nombre del especialista que determinó el material, cultivo en campo o invernadero de cualquier material recibido de un donante, forma de extracción del material *in vitro* o criopreservado de este material del donante)
- Tipo de almacenamiento (*in vitro* o criopreservación, o almacenamiento hidratado en el caso de semillas recalcitrantes)
- Lugar donde se almacena el material (salas de cultivo o tanques de frío, incluyendo situación concreta en estante y caja)
- División de la accesión en varias partes (cuando el material se divide en subclones, varios lotes de criopreservación, número de tubos almacenados)
- Duplicación de seguridad (fecha de la duplicación, institución y país donde se encuentra el duplicado, persona responsable en esa institución, referencia a los documentos del acuerdo de duplicación)
- Referencia al protocolo utilizado para el cultivo *in vitro* y/o la criopreservación
- Etiquetado de los recipientes de cultivo (códigos de color, códigos de barras). Existen etiquetas resistentes al NL, las cuales se puede envolver alrededor de tubos ya congelados si es necesario.

Los avances de la biotecnología permitirán complementar los datos fenotípicos con datos moleculares. El uso de códigos de barras en las colecciones será de gran utilidad en el manejo de la información y el material ya que reduce la posibilidad de cometer errores.

La mayoría de los bancos de germoplasma disponen actualmente de computadoras y acceso a Internet. Los sistemas informáticos de almacenamiento de datos e información facilitan el almacenamiento de toda la información relacionada con el manejo de colecciones *in vitro* y en criopreservación. Existen sistemas de manejo de información sobre germoplasma, como GRIN-Global (2011), desarrollados específicamente para las necesidades de gestión de la documentación y la información comunes a todos los bancos de germoplasma. La adopción de los estándares de datos que actualmente existen para

la mayoría de los aspectos de la gestión de los datos de los bancos de germoplasma facilita la gestión de la información y contribuye a mejorar el uso e intercambio de datos. Compartir y hacer pública la información de las accesiones a los posibles usuarios del germoplasma es primordial para facilitar y fomentar el uso de la colección. En última instancia, la conservación y la capacidad de utilizar el germoplasma conservado se promueven mediante una buena gestión de la información y los datos.

Disposiciones particulares

La documentación perdida o incompleta reduce el valor de una accesión, hasta el punto de hacer imposible su utilización. Un material inapropiado (por ejemplo etiquetas no resistentes al NL) puede causar pérdida de datos. En las colecciones grandes, la destreza de los trabajadores es un factor muy importante. Los riesgos de cometer errores en la entrada de datos deben indicarse claramente. En colecciones complicadas, el acceso activo a los datos de gestión debe limitarse exclusivamente a las personas responsables.

BIBLIOGRAFÍA

Alercia, A., Diulgheroff, S. & Metz, T. 2001. FAO/IPGRI. *Multi-crop passport descriptors* (available at http://www.biodiversityinternational.org/.../faoipgri_multi_crop_passport_descriptors).

BRAHMS. 2011. *Botanical Research and Herbarium Management System* (available at <http://dps.plants.ox.ac.uk/bol>).

GRIN-Global. 2011. *Germplasm Resource Information Network Database - Version 1* (available at http://www.grin-global.org/index.php/Main_Page).

6.7 Normas para la distribución y el intercambio

Normas

- 6.7.1 Todo germoplasma se debe distribuir de conformidad con las leyes nacionales y los tratados y convenios internacionales pertinentes.
- 6.7.2 Todas las muestras se deben suministrar junto con la documentación completa exigida por los países donante y receptor.
- 6.7.3 El proveedor y el receptor deberán establecer las condiciones de la transferencia de material y deberán asegurar el adecuado restablecimiento de las plantas a partir del material *in vitro* o criopreservado.

Contexto

La distribución de germoplasma consiste en el suministro de una muestra representativa de una accesión de un banco de germoplasma en respuesta a las peticiones de los usuarios de germoplasma vegetal. La demanda de recursos genéticos crece constantemente para responder a los retos planteados por el cambio climático, los cambios en los espectros de virulencia de las principales plagas y enfermedades, las especies exóticas invasivas, así como otras necesidades de los usuarios finales. Esta demanda ha llevado a un mayor reconocimiento de la importancia de la utilización del germoplasma de los bancos, lo que determina en última instancia la distribución del germoplasma. Es importante que la distribución de germoplasma de un país a otro cumpla la normativa internacional relativa a las medidas fitosanitarias, y se ajuste a lo estipulado en los tratados y convenciones internacionales sobre diversidad biológica y recursos fitogenéticos.

Aspectos técnicos

Los dos instrumentos internacionales que rigen el acceso a los recursos genéticos son el TIRFAA y el CDB. El TIRFAA facilita el acceso a los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura, y regula el reparto de beneficios derivados de su utilización. El TIRFAA establece un sistema multilateral de recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura para un conjunto de 64 especies cultivadas alimentarias y forrajeras (comúnmente conocidas como especies del Anexo 1 del Tratado) las cuales en su distribución están acompañadas de un ANTM. No obstante, el ANTM se puede utilizar también para las especies no incluidas en el Anexo 1, aunque también existen otros modelos disponibles. El acceso y el reparto de los beneficios en virtud del CDB se realiza en conformidad a su Protocolo de Nagoya. Tanto el TIRFAA como el CDB hacen énfasis en la continuidad entre la conservación y la utilización sostenible, junto con la facilitación del acceso y la distribución equitativa de los beneficios derivados de su uso.

Todas las accesiones estarán acompañadas de la documentación requerida como los certificados fitosanitarios y los permisos de importación según corresponda, además de la información de pasaporte. Antes de realizar el envío se deberá confirmar el destino final y los requisitos fitosanitarios de importación más recientes del país receptor (en muchos países la normativa cambia con frecuencia). La transferencia de germoplasma debe planificarse con gran atención y contar con el asesoramiento del instituto nacional oficialmente autorizado, el cual debe proporcionar la documentación apropiada en cumplimiento con los requisitos del país importador, como el certificado fitosanitario oficial. El receptor del germoplasma debe proporcionar al banco de germoplasma proveedor toda la información relativa a la documentación requerida para la importación del material vegetal, incluyendo los requisitos fitosanitarios.

La mayor parte de las especies de semillas recalcitrantes son perennes y longevas y no se reproducen hasta que tienen varios años de vida. Por esta razón, la regeneración no constituye una forma rápida de aumentar el tamaño de las muestras para los fines de satisfacer la demanda. Si la muestra está en forma de explantos *in vitro* alternativos para la multiplicación, ésta es posible antes de la producción de plántulas independientes, pero es necesario contar con una petición previa.

El germoplasma debe llegar a su destino en óptimas condiciones y por lo tanto se deben reducir al mínimo las condiciones ambientales adversas durante el transporte así como las autorizaciones de las aduanas. Se recomienda hacer uso de un servicio de mensajería de confianza, con experiencia en tratar con aduanas. El periodo de tiempo entre la recepción de una petición de germoplasma y el envío de los materiales se debe reducir al mínimo, con el fin de mejorar la eficacia de la función del banco de germoplasma. Si la muestra se encuentra en criopreservación y se va a transferir a otro banco de germoplasma donde continuará en criopreservación, debe enviarse dentro de un embalaje de tipo termo de NL con aislamiento (“*dry shipper*”).

Si el propósito es poner la muestra para su crecimiento inmediatamente después de su recepción, puede ser recalentada, rehidratada y encapsulada en cápsulas de alginato de calcio antes de su envío. Estas semillas sintéticas se desarrollaron originalmente

para embriones somáticos, pero pueden mantener eficazmente en buenas condiciones embriones o ejes escindidos que hayan sido recalentados e hidratados durante al menos 10 días a 16 °C sin que se inicie la germinación (protrusión de radículas). La germinación y el establecimiento de plántulas a partir de semillas sintéticas es posible en condiciones *in vitro*, y también podría ser eficaz en sustratos esterilizados para semilleros. También representa una alternativa para otros explantos pequeños de criopreservación, pero la técnica solamente se ha aplicado en unos pocos casos.

Las plántulas derivadas del almacenamiento *in vitro* en crecimiento lento o de criopreservación deben ser enviadas en contenedores apropiados. Los contenedores para material *in vitro* o de criopreservación deben ofrecer la posibilidad de transferir el material a macetas o al campo, ser capaces de realizar tales funciones.

Para el envío de plántulas *in vitro* se recomiendan las bolsas de plástico asépticas que pueden contener dispositivos especiales de ventilación. Si se utilizan recipientes de vidrio, hay que asegurar que se coloca suficiente material de relleno en los contenedores y que la declaración de fragilidad queda a la vista. En los casos de tubos de vidrio y plástico, también se debe indicar la correcta orientación de los contenedores.

Disposiciones adicionales

Las deficiencias en el manejo, incluido el embalaje inapropiado o retrasos en el envío, pueden llevar a la pérdida de la viabilidad y a la pérdida de material. Por lo tanto, es muy importante que el proveedor y el receptor hayan establecido las condiciones bajo las cuales se transfiere el material, y que se asegure el requisito previo del adecuado restablecimiento de las plantas.

BIBLIOGRAFÍA

Rao, N.K., Hanson, J., Dulloo, M.E., Ghosh, K., Nowell, D. & Larinde, M. 2006. Germplasm distribution. *In: Manual of seed handling in genebanks*. Handbooks for Genebanks No. 8. Rome, Italy, Bioversity International.

6.8 Normas para la seguridad y la duplicación de seguridad

Normas

- 6.8.1 Se deberá implementar una estrategia de manejo de riesgos debidamente actualizada que incluya los riesgos físicos y biológicos identificados en las Normas, tales como incendios, inundaciones y fallos del suministro eléctrico.
- 6.8.2 Los bancos de germoplasma deberán respetar las normas y protocolos locales de seguridad y salud en el trabajo. La sección de criopreservación debe cumplir con todas las medidas cautelares específicas relacionadas con el uso de nitrógeno líquido.
- 6.8.3 Los bancos de germoplasma deberán emplear el personal necesario para desempeñar todas las funciones ordinarias y asegurar que el banco pueda adquirir, conservar y distribuir germoplasma.
- 6.8.4 Se debe almacenar un duplicado de seguridad de cada accesión en un banco de germoplasma geográficamente distante en las mejores condiciones posibles.
- 6.8.5 El duplicado de seguridad debe ir acompañado de la documentación pertinente.

Contexto

Es de suma importancia que la infraestructura física de cualquier banco de germoplasma, así como la seguridad de su personal, estén protegidas de forma que se garantice que el germoplasma conservado está a salvo de cualquier factor externo que suponga un peligro. Para manejar una colección de germoplasma de forma eficaz, un banco de germoplasma requiere personal capacitado y con experiencia. El manejo no sólo implica el mantenimiento de la colección y de sus datos, sino una evaluación de los riesgos derivados de la actividad humana o los provocados por causas naturales. Existen peligros específicos relacionados con el uso de NL.



La seguridad física de las colecciones también requiere una duplicación de las colecciones en condiciones seguras y en una ubicación geográficamente distante, bajo las mismas condiciones. En caso de catástrofe natural o física (incendios, inundaciones), se pueden utilizar estos duplicados para reconstruir las colecciones. Además de la duplicación de las accesiones, la duplicación de seguridad comprende la duplicación de la información, lo que implica la creación de copias de seguridad de las bases de datos.

Aspectos técnicos

Un banco de germoplasma debe aplicar y promover un manejo sistemático de los riesgos que considere los riesgos físicos y biológicos en el entorno cotidiano de trabajo. Debe contar con una estrategia de manejo de riesgos por escrito con las medidas que se deben tomar cada vez que ocurre una emergencia en el banco de germoplasma que afecte al germoplasma o a los datos relacionados. Esta estrategia, así como un plan de acción

adjunto, deben ser revisados y actualizados regularmente para tomar en cuenta las circunstancias cambiantes y las nuevas tecnologías, y difundirse adecuadamente entre el personal del banco de germoplasma.

También se deben tener en cuenta los aspectos de salud y seguridad del personal en sus puestos de trabajo. El área de criopreservación debe estar bien aireada mediante ventilación forzada y se debe contar con monitores de oxígeno. La fuga de NL hacia los crioviales puede ser muy peligrosa, por lo que se deben utilizar recipientes adecuados que hayan sido específicamente diseñados para su función y seguir estrictamente las instrucciones del fabricante. Para reducir el riesgo de lesiones físicas, los operadores deben usar ropa protectora, guantes y mascarillas.

Siempre debe haber suministros de NL disponibles, y es fundamental mantener los niveles de NL. En principio, los tanques criogénicos de almacenamiento se deben situar en una ubicación apropiada, es decir, aireados y a una temperatura por debajo de 50 °C. El mantenimiento del nivel de NL en los contenedores de almacenamiento es absolutamente crítico: si el NL llega a evaporarse, todo el contenido del recipiente de almacenamiento debe ser desechado.

Para que las muestras mantengan su viabilidad, la temperatura del tejido debe permanecer por debajo de la temperatura de transición vítrea¹. Al retirar un vial de una caña o caja se debe prestar especial atención a que la temperatura del resto de los viales no aumente hasta la temperatura de transición vítrea. Los viales no deben ser etiquetados con etiquetas adhesivas convencionales porque éstas se despegarán a las temperaturas del NL. El uso de una impresora de etiquetas operada desde una computadora permite que se impriman etiquetas específicas para los viales, así como el registro de información y el uso de un código de barras único. Se deben seguir las recomendaciones del fabricante sobre el vial más apropiado para cada caso particular.

La gestión activa de los bancos de germoplasma requiere de un personal bien capacitado, y es crucial asignar cometidos a empleados con la debida competencia. Por lo tanto, los bancos de germoplasma deberán contar con un plan para el personal junto con un presupuesto correspondiente asignado regularmente, a fin de garantizar que disponen de personal suficiente y debidamente capacitado para cumplir con la responsabilidad de asegurar que el banco puede adquirir, conservar y distribuir germoplasma. El acceso a especialistas en una amplia gama de áreas temáticas es conveniente. El personal deberá tener una formación adecuada, adquirida mediante capacitación certificada y/o en el puesto de trabajo, y deberán determinarse las necesidades de formación del personal que vayan surgiendo.

Para la seguridad física de las colecciones también se debe considerar la duplicación de las colecciones en condiciones seguras, en las mismas condiciones y en una ubicación geográficamente distante. En caso de catástrofe natural o física (incendios, inundaciones), estos duplicados se pueden utilizar para restablecer las colecciones. El duplicado de

1 En PVS2, una de las soluciones crioprotectoras utilizadas más habitualmente, las transiciones vítreas se producen a -115 °C aproximadamente.

seguridad debe estar ubicado en un lugar política y geológicamente estable, y a una elevación suficiente para que un aumento del nivel del mar no represente un problema. Las condiciones de almacenamiento de los duplicados de seguridad deben ser al menos tan buenas como las de la colección inicial.

La duplicación de seguridad requerirá de un acuerdo legal firmado entre el banco depositante y el banco de almacenamiento o receptor. Este último no tendrá derecho al uso y distribución del germoplasma. Para evitar el uso no autorizado de las colecciones se debe controlar el acceso a las mismas.

Las muestras para el duplicado de seguridad deben prepararse de la misma manera que para la colección original. Es responsabilidad del depositante asegurar que el duplicado de seguridad tiene una calidad suficiente. Para evitar el deterioro durante el transporte al banco receptor, las muestras criopreservadas deberán enviarse en embalajes de tipo termo de NL con aislamiento (“dry shipper”), y el transporte deberá ser lo más rápido posible.

Disposiciones adicionales

Cuando no se disponga de personal debidamente capacitado, o cuando haya problemas de tiempo o limitaciones de otro tipo, entre las posibles soluciones se puede considerar subcontratar parte del trabajo o recabar la ayuda de otros bancos de germoplasma.

La entrada no autorizada a las instalaciones de los bancos de germoplasma puede acarrear la pérdida directa del material y puede poner en peligro las colecciones como consecuencia de la introducción involuntaria de plagas y enfermedades.

Es frecuente que los contenedores de NL estén contaminados con hongos o bacterias. Si las muestras se almacenan en la fase líquida del nitrógeno, puede ocurrir la contaminación de la muestra.

Pueden plantearse cuestiones de responsabilidad en relación con el deterioro del material durante el transporte. Por lo tanto, será necesario cubrir todas las posibles circunstancias en el contrato de envío.

BIBLIOGRAFÍA

Benson, E.E. 2008. Cryopreservation of phytodiversity: a critical appraisal of theory and practice. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 27: 141-219.

Volk, G.M. & Walters, C. 2006. Plant vitrification solution 2 lowers water content and alters freezing behaviour in shoot tips during cryoprotection. *Cryobiology*, 52: 48-61.



Anexo 1: Lista de siglas y abreviaturas

AADB	Acuerdo de acceso y distribución de beneficios
AAM	Acuerdo de adquisición de material
ANTM	Acuerdo normalizado de transferencia de material
ATM	Acuerdo de transferencia de material
BRAHMS	Botanical Research and Herbarium Management System (Sistema de Gestión de la Investigación Botánica y Herbario)
CDB	Convenio sobre la Diversidad Biológica
CGIAR	Grupo Consultivo para la Investigación Agrícola Internacional
CIPF	Convención Internacional de Protección Fitosanitaria
CRGAA	Comisión de Recursos Genéticos para la Alimentación y la Agricultura
DMSO	dimetil sulfóxido
ELISA	ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
ENSCONET	European Native Seed Conservation Network
ERO	especies reactivas del oxígeno
EST-SSR	Expressed Sequence Tags - Simple Sequence Repeats
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

GBS	Genotyping-By-Sequencing
GPS	Sistema de posicionamiento mundial
GRIN	Red de Información de Recursos de Germoplasma
GWS	Genome-Wide Selection
HR	Humedad relativa
ICIS	Sistema internacional de información sobre cultivos
ICT	Tecnología de la información y la comunicación
ISTA	Asociación Internacional de Análisis de Semillas
MS	Murashige and Skoog's nutrient medium
N_e	Effective Population Size
NL	nitrógeno líquido
NPGS	Sistema nacional de germoplasma vegetal
OIV	Organización Internacional de la Viña y el Vino
PVS	vitricación de plantas
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RFAA	Recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SID	Base de datos de información sobre semillas
SMTA	Standard Material Transfer Agreement
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SSR	repetición de secuencia única
TIRFAA	Tratado Internacional sobre los Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura
UPOV	Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales
USDA	Departamento de Agricultura de los Estados Unidos

Anexo 2: Glosario

Accesión: Una muestra distinta, singularmente identificable de semillas que representa un cultivar, una línea de cría o una población y que se mantiene almacenada para su conservación y uso.

Almacenamiento en crecimiento lento *in vitro*: El mantenimiento de órganos de la planta o plantas enteras en condiciones que retrasan la velocidad de desarrollo de las plantas para reducir el insumo de mano de obra necesaria y la frecuencia de las transferencias, que pueden ir acompañadas de un riesgo de infecciones y condiciones de estrés que con el tiempo pueden poner en peligro la estabilidad genética. El principal método para reducir la velocidad de desarrollo es la reducción de la temperatura, manteniendo una temperatura adecuada dependiente del taxón. Al final de una fase de subcultivo es necesaria la transferencia a un medio nuevo, con o sin una etapa de multiplicación y algunas veces períodos de cultivo caliente para su restablecimiento.

Banco de germoplasma: Centro para la conservación de recursos genéticos en condiciones adecuadas para prolongar sus vidas.

Base de datos: Conjunto organizado de datos interrelacionados reunidos para un propósito específico y que se conserva en uno o más medios de almacenamiento.

Campo: Parcela de tierra con límites definidos dentro de un lugar de producción en el que se cultiva un producto.

Caracterización: Registro de caracteres altamente heredables que pueden ser vistos fácilmente y que se expresan en todos los ambientes.

Certificado fitosanitario: Certificado expedido por los servicios fitosanitarios públicos para atestar que el material de semillas está prácticamente exento de plagas y enfermedades.

Código de barras: Sistema informático de codificación que utiliza un patrón impreso o una serie de barras en las etiquetas para identificar accesiones de germoplasma. Los códigos de barras son leídos por medio de un barrido óptico del patrón impreso y se descodifican usando un programa de ordenador.

Colección: Grupo de accesiones de germoplasma mantenido para un propósito específico en condiciones definidas.

Colección activa: Accesoión de germoplasma que se utiliza para la regeneración, multiplicación, distribución, caracterización y evaluación. Las colecciones activas se mantienen almacenadas de corto a medio plazo y por lo general se duplican en una colección base que se mantiene almacenada de medio a largo plazo.

Conservación a largo plazo: Almacenamiento de germoplasma durante un largo período, como el que se hace en las colecciones base y en las colecciones duplicadas. El período de almacenamiento antes de que las semillas necesiten ser regeneradas varía, pero es como mínimo de varias décadas y posiblemente de un siglo o más. La conservación a largo plazo tiene lugar a temperaturas bajo cero.

Conservación a medio plazo: Almacenamiento de germoplasma a plazo medio, como el que se hace en las colecciones activas y las colecciones de trabajo. Se da por supuesto generalmente que se producirá poca pérdida de viabilidad durante aproximadamente diez años. La conservación a plazo medio se lleva a cabo a temperaturas entre 0 °C y 10 °C.

Conservación *ex situ*: Conservación de la diversidad biológica fuera de su hábitat natural. En el caso de los recursos fitogenéticos esto puede realizarse utilizando bancos de semillas, bancos de germoplasma *in vitro* o como colecciones vivas en bancos de genes de campo.

Contenido de humedad (base de peso húmedo): Peso de humedad libre dividido por el peso de agua más materia seca, expresado en porcentaje.

Criopreservación o Crioconservación: El almacenamiento de los órganos de la planta en nitrógeno líquido (-196 °C o por encima), en su fase vapor (máximo de -140 °C). En el contexto de los bancos de germoplasma, se utiliza para los brotes, las puntas de los brotes y otros tejidos meristemáticos y embriogénicos, explantos de recalcitrantes y (en casos especiales) semillas ortodoxas enteras, polen y embriones somáticos. En la mayoría de los casos la fase de almacenamiento propiamente dicha va precedida o seguida de una fase *in vitro*.

Criopreservación de polen: Es posible utilizar los granos de polen de algunas familias de plantas. Al igual que en el caso de las semillas, hay especies con polen “ortodoxo” y especies con comportamiento “recalcitrante”. La deshidratación del polen puede ser necesaria antes de la criopreservación, pero el polen de algunas especies es fácilmente almacenable sin ningún tratamiento previo. Para la regeneración de las muestras de polen almacenadas debe disponerse de un individuo para el cruzamiento para así obtener el material de la planta finalmente deseado a través de la muestra de semillas y de la germinación.

Cuarentena: Confinamiento oficial de germoplasma introducido sujeto a reglamentos fitosanitarios para asegurar que no transmita enfermedades o plagas perjudiciales para el país importador.

Cultivo *in vitro*: Cultivo de órganos de la planta o plantas enteras utilizando un medio artificial de nutrientes almacenados en recipientes de vidrio o de plástico. El cultivo *in vitro* de cultivos de propagación vegetativa incluye varias opciones, como la micropropagación, la eliminación del virus mediante el cultivo de meristemos y el almacenamiento de crecimiento lento. El cultivo *in vitro* se utiliza también como fase preparatoria para la crioconservación así como para las fases de recuperación después de la crioconservación (véase también el almacenamiento en crecimiento lento).

Datos de pasaporte: Información básica sobre el origen de una accesión, como los detalles registrados en el lugar de recolección, la información pertinente sobre el pedigrí o de otro tipo que ayude a la identificación de una accesión.

Deriva genética: Cambios en la composición genética de una población cuando el número de individuos se reduce por debajo de la frecuencia de ciertos alelos dentro de ella.

Descriptor: Rasgo, característica o atributo identificable y medible observado en una accesión que se utiliza para facilitar la clasificación, el almacenamiento, la recuperación y el uso de datos.

Distribución: Proceso mediante el cual se suministran muestras de accesiones de germoplasma a los mejoradores y otros usuarios.

Diversidad genética: Variedad de los rasgos genéticos que da lugar a diferentes características.

Documentación: Colección organizada de registros que describen la estructura, el propósito, los procedimientos, el mantenimiento y las necesidades de datos.

Donante: Institución o persona responsable de la donación de germoplasma.

Duplicación de seguridad: Duplicado de una colección base almacenado en condiciones similares para la conservación a largo plazo, pero en un lugar diferente para precaver la pérdida accidental de material de la colección base.

Equilibrio en el contenido de humedad: Contenido de humedad con el que una semilla está en equilibrio con la humedad relativa del aire circundante.

Estándar de regeneración: Porcentaje de viabilidad de la semilla por debajo del cual la accesión debe regenerarse para producir semillas frescas.

Evaluación: Registro de aquellas características en cuya expresión influyen a menudo factores ambientales.

Fenotipo: Apariencia externa de una planta que resulta de la interacción de su composición genética (genotipo) con el medio ambiente.

Fitosanitario: Perteneciente a la cuarentena de las plantas.

Gel de sílice: Substancia química inerte que absorbe el agua de su entorno y la pierde por evaporación cuando se calienta.

Genotipo: Constitución genética de una planta o de un organismo individual.

Germinación: Proceso biológico que conduce al desarrollo de una plántula a partir de una semilla. El crecimiento de la radícula es el primer signo visible de la germinación, pero a veces el crecimiento puede detenerse o puede ir seguido por un desarrollo anormal. De acuerdo con las normas de la Asociación Internacional de Análisis de Semillas (ISTA), se considera que han germinado solamente las plántulas que muestran una morfología normal.

Germoplasma: Material genético que constituye la base física de la herencia y que se transmite de una generación a la sucesiva mediante las células germinales.

Humedad relativa: Medida de la cantidad de agua presente en el aire en comparación con la mayor cantidad posible que pueda tener el aire a una temperatura dada, expresada en porcentaje. Se diferencia de la humedad absoluta, que es la cantidad de vapor de agua presente en una unidad de volumen de aire, generalmente expresada en kilogramos por metro cúbico.

Intervalo de monitoreo: Período de almacenamiento entre las pruebas de monitoreo.

Isoterma: Gráfico que muestra la relación entre el contenido de humedad y el porcentaje de humedad relativa de la semilla.

Isoterma de adsorción: Véase *isoterma*.

Latencia: Estado en que ciertas semillas vivas no germinan, incluso en condiciones normalmente adecuadas.

Lista de descriptores: Colección de todos los descriptores individuales de un determinado cultivo o especie.

Monitoreo: Control periódico de las accesiones para controlar la viabilidad y la cantidad.

Muestra: Parte de una población que se utiliza para estimar las características del conjunto.

Muestra aleatoria: Muestra tomada al azar de un grupo más grande.

Muestra más similar a la original: Muestra de semillas que se han sometido al menor número de ciclos de regeneración desde que el material fue adquirido por el banco de genes, tal como se recomienda para el almacenamiento de las colecciones base. Puede ser una submuestra del lote original o una muestra de semillas proveniente del primer ciclo de regeneración si el lote de semillas original requería regeneración antes de almacenarse.

Multiplicación: Muestra representativa de una accesión cultivada para multiplicar la cantidad de material conservado para su distribución.

Número de accesión: Identificador único asignado por el curador cuando la accesión se incorpora a una colección. Este número no debe ser asignado a otra accesión.

Patógeno: Microorganismo vivo como un virus, una bacteria o un hongo que causa una enfermedad a otro organismo.

Pedigrí: Registro de la ascendencia de una línea genética o variedad.

Población: Grupo de plantas o animales que comparten una misma área geográfica o región y que tienen rasgos comunes.

Polinización: Proceso por el cual el polen se transfiere de una antera a un estigma receptivo gracias a agentes polinizadores tales como el viento, los insectos, las aves, los murciélagos o la apertura misma de la flor.

Propágulo: Cualquier estructura capaz de dar lugar a una planta nueva, ya sea a través de la reproducción sexual o asexual (vegetativa). Esto incluye semillas, esporas y cualquier parte del cuerpo vegetativo capaz de crecer de modo independiente si se separa del progenitor.

Prueba de tetrazolio: Prueba de viabilidad en la que las semillas húmedas se sumergen en una solución de cloruro de trifetil tetrazolio.

Prueba de viabilidad: Análisis de una muestra de semillas de una accesión con la finalidad de estimar la viabilidad de la accesión completa.

Pruebas de germinación: Procedimiento para determinar el porcentaje de semillas que pueden germinar bajo un conjunto determinado de condiciones.

Rasgo: Cualidad o atributo reconocible resultante de la interacción de un gen o un grupo de genes con el medio ambiente.

Raza nativa: Variedad de un cultivo que se ha desarrollado a través de muchos años de selección dirigida por el agricultor y que está específicamente adaptada a las condiciones locales. Las razas nativas suelen ser genéticamente heterogéneas.

Regeneración: Proceso por el que se hace crecer una accesión de semillas para obtener una muestra fresca con alta viabilidad y numerosas semillas.

Semillas ortodoxas: Semillas que pueden secarse hasta alcanzar un bajo contenido de humedad y almacenarse a bajas temperaturas, sin que sufran daños, para aumentar su longevidad.

Semillas recalcitrantes: Semillas que no son tolerantes a la desecación, que no se secan durante las últimas etapas de desarrollo y que se deshacen en un contenido de agua que varía entre 0,3 y 4 g g⁻¹. La pérdida de agua resulta en una pérdida de vigor y una disminución de la viabilidad rápidas y la muerte de las semillas en contenidos de agua relativamente altos.

Tiempo de almacenamiento: Número de años que una semilla puede almacenarse antes de morir.

Variedad: División reconocida de una especie, que sigue en rango por debajo de la subespecie. Se distingue por características como el color de las flores, el color de las hojas y el tamaño de la planta madura. El término se considera sinónimo de cultivar.

Viabilidad de las semillas: Capacidad de las semillas para germinar en condiciones favorables.

Créditos fotográficos

Cubierta:

Composición gráfica adaptada del archivo digital de fotografías FAO Mediabase y otras fuentes de Internet

Páginas internas:

- v © FAO/M. Uz Zaman
- vii © nkzs - adaptado de www.sxc.hu/photo/1239768
- ix © lazysheep1 - www.sxc.hu/photo/566617
- 1 © Linn Borgen Nilsen
- 2 © FAO/M. Uz Zaman
- 7 © FAO/G. Napolitano
- 8 © FAO/G. Napolitano
- 13 © chesnutt - www.sxc.hu/photo/1187030
- 15 © johnnyberg - www.sxc.hu/photo/1379733
- 17 © FAO/G. Napolitano
- 21 © CIAT/Neil Palmer
- 26 © CIAT/Neil Palmer
- 28 © gokoroko - www.sxc.hu/photo/298008
- 35 © iliana - www.sxc.hu/photo/107131
- 47 © FAO/P. Thekiso
- 54 © FAO/P. Thekiso
- 65 © Linn Borgen Nilsen
- 72 © FAO/O. Asselin
- 79 © FAO/G. Thomas
- 83 © alainap - www.sxc.hu/photo/922348
- 99 © FAO/G. Napolitano
- 106 © FAO/D. Dennis
- 111 © Ayla87 - www.sxc.hu/photo/757027
- 115 © FAO/G. Napolitano
- 116 © Linn Borgen Nilsen
- 146 © FAO/G. Bizzarri
- 156 © Global Crop Diversity Trust (GCDT)/Cary Fowler
- 159 Adaptado de: www.az-cactus-for-sale.com/seeds-for-sale/Bottle-Tree-Seeds-For-Sale.htm
- 168 © brokenarts - www.sxc.hu/photo/211551



Impreso en Italia - Agosto 2013

La buena gestión de los bancos de germoplasma salvaguardan la diversidad genética y la ponen a disposición de los mejoradores. Las Normas para Bancos de Germoplasma de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura establecen las normas para la conservación de los recursos fitogenéticos. Estas Normas voluntarias constituyen el punto de referencia para las mejores prácticas científicas y técnicas actuales, y reflejan los instrumentos internacionales claves de política para la conservación y utilización de los recursos fitogenéticos.

ISBN 978-92-5-307855-4



9 789253 078554

I3394S/1/07.13