

## Crioconservación de germoplasma de cítricos

Nuria Durán-Vila, Carmen Ortega, Oscar Olivares-Fuster, Luis Navarro Departamento de Protección Vegetal y Biotecnología, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA)

### INTRODUCCIÓN

La conservación de germoplasma de cítricos se realiza normalmente mediante el establecimiento y conservación de plantas en colecciones mantenidas en campo por instituciones dedicadas a la investigación o en jardines botánicos. Dichas colecciones aunque necesarias, son vulnerables a condiciones climatológicas adversas y a daños causados por plagas y enfermedades, lo que se ha paliado en algunos países mediante su conservación en invernadero o bajo abrigos de malla. Tal como se describe en otro artículo de esta revista (NAVARRO y col., 2005), en el IVIA existe un importante banco de germoplasma que consta de una colección de árboles de campo para efectuar la evaluación y caracterización de genotipos, así como una colección de plantas cultivadas en contenedores en el interior de recintos cubiertos con malla anti-insectos que se usa como material inicial en el programa de certificación para la propagación comercial de cítricos en viveros. El riesgo de pérdida de genotipos en estas colecciones se ha demostrado este año en el que las heladas han ocasionado la muerte de las plantas de ambas colecciones de algunos genotipos especialmente sensibles a las bajas temperaturas.

Desafortunadamente el número de genotipos que es posible conservar mediante colecciones de plantas se encuentra limitado por el espacio disponible y por el coste que supone su mantenimiento en recintos cubiertos. En el caso de especies con semillas ortodoxas, el germoplasma suele conservarse en bancos de semillas, que una vez deshidratadas mantienen su viabilidad y se pueden conservar a largo plazo en cámaras frigoríficas a  $-20^{\circ}\text{C}$  o crioconservar en nitrógeno líquido. Esta vía, sin embargo, no es aplicable en el caso de especies propagadas vegetativamente o cuyas semillas son recalcitrantes. En el caso de los cítricos cuyas semillas no son estrictamente recalcitrantes, su conservación a largo plazo es inviable ya que las semillas de la mayoría de especies son sensibles a la deshidratación.

La disponibilidad de métodos que permitan la conservación a largo plazo de germoplasma cítricos es un reto al que la biotecnología ofrece posibilidades de gran interés como complemento o incluso como alternativa a la conservación tradicional. Estos métodos se basan en la aplicación de tecnologías de cultivo *in vitro*, ya sea mediante estrategias de cultivo en condiciones de crecimiento mínimo o mediante crioconservación. A lo largo de los últimos 20 años, en el IVIA se han abordado estudios exhaustivos para desarrollar protocolos de conservación y aplicarlos para el mantenimiento de genotipos de interés.

Se han desarrollado con éxito protocolos para la crioconservación de semillas pero las tasas de viabilidad obtenidas han sido muy variables, según los genotipos. Estas diferencias se han atribuido a diferencias en susceptibilidad a la deshidratación, lo cual ha resultado ser un factor limitante para establecer un protocolo de crioconservación único y aplicable a todas las especies y genotipos que se desea conservar.

Se ha desarrollado también un protocolo de conservación de cultivos *in vitro* en condiciones de crecimiento mínimo, pero por la complejidad y la frecuencia de manipulaciones a realizar, hacen inviable dicha aproximación para la conservación rutinaria de genotipos de interés. En consecuencia las investigaciones más recientes se han dirigido al desarrollo de protocolos para la crioconservación de cultivos *in vitro*.

La crioconservación consiste en llevar tejidos y células vegetales a condiciones tales, que la división celular y el metabolismo se encuentren totalmente parados, y se puedan conservar a temperaturas muy bajas, generalmente en nitrógeno líquido ( $-196^{\circ}\text{C}$ ). Para ello, es preciso que los tejidos o células a crioconservar sobrevivan al proceso y sean susceptibles de volver a crecer y regenerar plantas completas una vez descongelados. Por tanto hay que establecer aquellas condiciones de congelación, conservación y descongelación que aseguren la supervivencia del material a conservar. La crioconservación se utiliza

de forma rutinaria para la conservación tanto de microorganismos como de células y embriones animales y humanos, pero su aplicación en plantas se ha visto limitada por la peculiar estructura de la células vegetales. Estas presentan grandes vacuolas con metabolitos en suspensión acuosa, que al congelarse forman cristales de hielo que pueden dañar y destruir las células. Para paliar esta limitación, se han propuesto distintos protocolos para proteger a las células de este tipo de daños, ya sea mediante la deshidratación inducida durante la congelación o mediante la vitrificación.

Los protocolos clásicos se basan en conseguir que durante el proceso de enfriamiento al que se someten los tejidos, sus células se deshidraten suficientemente, de manera que cuando tenga lugar la congelación del contenido celular, no lleguen a formarse cristales de hielo. Para ello es preciso establecer con precisión los tratamientos crioprotectores, las condiciones de enfriamiento (lento, rápido o escalonado), el almacenamiento y las condiciones de descongelación (lenta o rápida) y recuperación de los cultivos.

Los protocolos basados en la vitrificación consisten en provocar la deshidratación de las células antes de someter los tejidos a la congelación. Para utilizar estos protocolos es preciso establecer cuidadosamente las condiciones de deshidratación, ya que es ésta y no el proceso de congelación lo que determina la supervivencia del material crio-

conservado. Se han desarrollado distintas aproximaciones denominadas, encapsulación-deshidratación, vitrificación y encapsulación-vitrificación.

En especies poliembrionadas de cítricos y géneros afines, los ovarios de flores recogidas inmediatamente antes de la antesis y los frutos recogidos entre 2 y 8 semanas después de la antesis (Figura 1A), contienen óvulos (Figura 1B) que son los precursores de las semillas de los frutos maduros. El cultivo *in vitro* de óvulos da lugar a embriones aislados (Figura 1C), masas de embriones y pequeñas proliferaciones de células o callo (Figura 1D), todos ellos generados a partir de los tejidos de la nucela y por tanto con un genotipo idéntico al de la planta madre. El callo una vez separado del óvulo y transferido a medio de cultivo fresco crece dando lugar a más callo y/o nuevos embriones. La composición del medio de cultivo determina la evolución del callo que puede crecer dando lugar a nuevas proliferaciones de callo o bien regenerar embriones. En nuestro laboratorio se han desarrollado protocolos para la crioconservación de óvulos, embriones y callo.

**Crioconservación de óvulos.** Los primeros intentos para crioconservar óvulos se llevaron a cabo utilizando protocolos clásicos con los que no se obtuvo ningún éxito. Con la aplicación de un protocolo de encapsulación-deshidratación se consiguió la supervivencia de óvulos de naranjo dulce, pomelo, limonero, mandarino y naranjo amargo. Para ello, los óvulos se encapsularon en alginato, las cápsulas se precultivaron en medio con sacarosa 0.75M (Figura 2A) y posteriormente se desecaron por corriente de aire en la cabina de flujo laminar. Las cápsulas se depositaron en tubos criogénicos y se congelaron por inmersión en nitrógeno líquido (Figura 2B). Después de su almacenamiento también en nitrógeno líquido, se descongelaron a temperatura ambiente (Figura 2C) y se cultivaron para determinar su supervivencia que fue en general baja (Figura 2D).

A pesar de las bajas tasas de supervivencia alcanzadas, los resultados obtenidos son prometedores y abren una alternativa a la conservación y crioconservación de semillas, que conviene seguir explorando. La manipulación necesaria para extraer óvulos a partir de ovarios y frutos inmaduros es mínima, y estos se encuentran en gran número incluso en el caso de genotipos sin semillas, ya que éstas abortan en estadios de desarrollo posteriores. La disponibilidad de óvulos crioconservados permitiría recuperar plantas por la vía embriológica o líneas de callos susceptibles de ser utilizados para otras aplicaciones biotecnológicas.

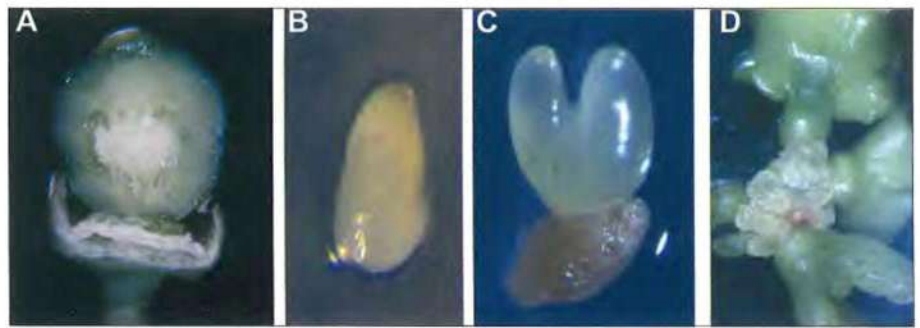


Figura 1. Cultivo *in vitro* de óvulos de especies poliembrionadas: Fruto de naranjo Washington navel de 5 mm de diámetro (A), del cual se extraen los óvulos (B) que al ser cultivados *in vitro* producen embriones aislados (C) y/o masas de embriones acompañadas de callo (D).

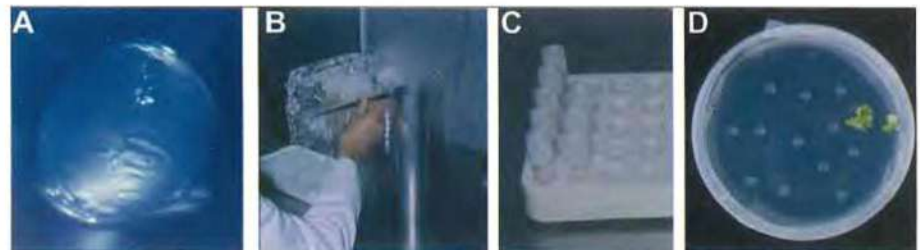


Figura 2. Crioconservación de óvulos de pomelo Duncan por encapsulación-deshidratación: Óvulos encapsulados en precultivo (A) que una vez deshidratados y depositados en tubos criogénicos se congelan en nitrógeno líquido (B), se descongelan a temperatura ambiente (C) y se cultivan *in vitro* para producir embriones (D).

**Crioconservación de embriones.** Los primeros intentos para crioconservar embriones nucleares de naranjo dulce Washington navel obtenidos por cultivo de óvulos se realizaron utilizando protocolos clásicos que consistían en un pretratamiento con una solución crioprotectora de DMSO al 10%, que se adicionó de forma gradual a los tubos criogénicos en los que se habían depositado los embriones. La congelación se realizó por enfriamiento rápido sumergiendo los tubos en nitrógeno líquido y la descongelación se llevó a cabo a temperatura ambiente. Aunque la supervivencia fue sólo del 5%, los embriones cultivados *in vitro* germinaron dando lugar a plantas completas. A pesar de la baja tasa de supervivencia, éste fue el primer caso descrito en la literatura científica en la que se obtuvieron plantas completas a partir de material de cítricos crioconservado. La modificación de dicho protocolo realizando la congelación por enfriamiento lento a una velocidad de  $-0,5^{\circ}\text{C min}^{-1}$  permitió alcanzar tasas de supervivencia de hasta el 30%. Posteriormente mediante un protocolo de encapsulación-deshidratación se alcanzaron tasas de supervivencia medias del 86% (Figura 3A). En todos los casos los embriones germinaron (Figura 3B) y dieron plantas competas (Figura 3C). Dicho

protocolo se aplicó con éxito para crioconservar embriones de otros cultivares de naranjo dulce, mandarino, naranjo amargo, limonero, pomelo, y algunas especies que se usan como patrón, obteniéndose en todos los casos tasas de supervivencia que oscilaron entre 76% y 100%.

En la actualidad, la crioconservación de embriones mediante encapsulación-deshidratación constituyen la mejor alternativa a la conservación de semillas. Dado que las tasas de supervivencia fueron siempre elevadas utilizando un protocolo único, éste puede aplicarse de forma rutinaria como alternativa o como complemento a la conservación convencional.

**Crioconservación de callos.** La aplicación de protocolos clásicos para la crioconservación de callos ha dado excelentes resultados y se está aplicando en el IVIA para la conservación de genotipos de interés para la mejora genética. El protocolo se desarrolló inicialmente con callos de naranjo dulce Salustiana y consistía en un pretratamiento con una solución crioprotectora de DMSO al 10%, la congelación en un congelador programable que permite establecer las rampas de enfriamiento hasta alcanzar  $-150^{\circ}\text{C}$ , temperatura a la que los cultivos pueden tras-

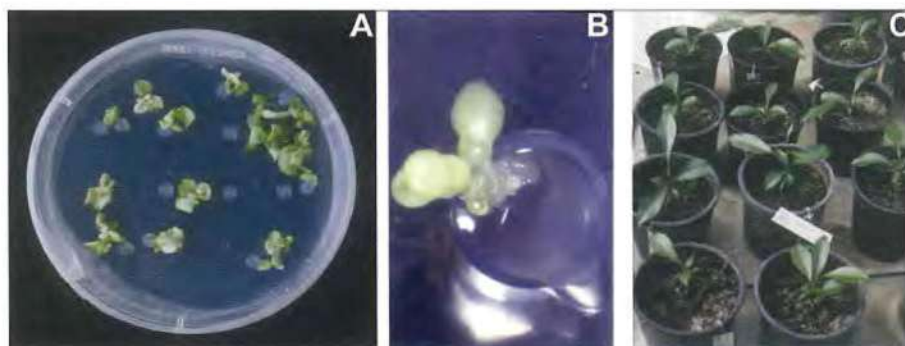


Figura 3. Crioconservación de embriones de naranjo Washington navel por encapsulación-deshidratación: Supervivencia de embriones encapsulados después de precultivo, deshidratación, congelación, almacenamiento y descongelación (A), inicio de la germinación a través de la cápsula (B) y recuperación de plantas (C).



Figura 4. Crioconservación de callo de naranjo dulce Salustiana mediante un protocolo clásico: Callo recuperado después de la congelación, almacenamiento y descongelación (A), que crece dando lugar a nuevo callo (B) con capacidad de producir embriones (C).

Especie	Genotipos crioconservados
Naranja dulce	19
Naranja amargo	5
Mandarino	6
Satsuma	1
Tangor	2
Tangelo	2
Otros mandarinos híbridos	7
Pomelo	2
Mandarino Cleopatra	1
<i>Citrus ambicarpa</i>	1
<i>Citrus macrophylla</i>	2
<i>Citrus volkameriana</i>	1
<i>Glycosmis pentaphylla</i>	1
<i>Citrus sunki</i>	2
<i>Microcitrus australis</i> x <i>M. australasica</i>	1

Tabla 1. Colección de callos crioconservados.

ferirse a nitrógeno líquido para su almacenamiento. La descongelación se efectúa de forma rápida sumergiendo los viales a un baño de agua a 37°C. La aplicación de este protocolo permite tasas de supervi-

vencia del 100%. Los callos recuperados después de este proceso (Figura 4A) crecen dando lugar a nuevo callo (Figura 4B), que cuando se trasfiere a un medio de cultivo apropiado regenera embriones (Figura

4C) que germinan dando plantas completas.

En la actualidad se dispone de una colección de callos crioconservados (Tabla 1) que se utilizan en un programa de mejora basado en la hibridación somática. Como se indica en otro artículo de este número de la revista (OLIVARES-FUSTER y col., 2005), los híbridos somáticos se obtienen mediante técnicas de fusión de protoplastos para la cual es indispensable que al menos uno de los parentales proceda de callo nucelar, ya que éste confiere a las células híbridas la capacidad de dividirse y regenerar plantas vía embriogénesis somática. Desafortunadamente, la obtención de callos es un proceso lento que se inicia mediante el cultivo *in vitro* de óvulos, cuyo crecimiento es lento, lo que no permite disponer de callo suficiente para realizar una fusión hasta después de varios meses. Además, los óvulos pueden extraerse de ovarios y frutos inmaduros durante un periodo de unas pocas semanas, lo cual resulta ser un factor limitante para el desarrollo de programas de mejora por hibridación somática. La disponibilidad de líneas de callo crioconservados supone un apoyo de gran valor para aplicar este tipo de estrategias al programa de mejora de cultivares y patrones que se desarrolla en el Departamento de Protección Vegetal y Biotecnología del IVIA.

Por otra parte, durante los procesos de fusión de protoplastos se obtienen híbridos que no pueden evaluarse de inmediato y por tanto suelen desecharse. Asimismo durante el desarrollo los trabajos basados en la transformación genética de protoplastos y en la obtención de haploides y triploides, se generan líneas de callo que pueden ser de interés en el futuro y que son susceptibles de ser crioconservados para una futura evaluación.

En resumen, los trabajos dirigidos a la crioconservación de óvulos abren una vía que sería de interés seguir explorando como alternativa a la conservación convencional de semillas. Éste es un material idóneo para ser crioconservado, dada facilidad para obtener óvulos y su versatilidad para obtener callos, embriones y plantas completas mediante su cultivo *in vitro*. Por otra parte los protocolos ya establecidos para crioconservar embriones y callos, son aplicables de forma rutinaria como apoyo al banco de germoplasma y a los trabajos de mejora en curso.

## BIBLIOGRAFÍA

- OLIVARES-FUSTER, O., DURÁN-VILA, N., PENSABENE, G., NAVARRO, L. 2005. La hibridación somática en la mejora de los cítricos. Phytoma, este número.
- NAVARRO, L., PINA, J.A., JUÁREZ, J., BALLESTER-OLMOS, J.F., MONTALT, R., VIVES, M.C., AREGUI, J.M., ORTEGA, C., NAVARRO, A., DURÁN-VILA, N., GUERRI, J., MORENO, P., CAMBRA, M., MEDINA, A., ZARAGOZA, S. 2005. El programa de mejora sanitaria de variedades de cítricos en España: 30 años de historia. Phytoma, este número.