

CRIOCONSERVACIÓN DE PLANTAS

Nieves Westendorp* y Carlos L. Encina§

*Licenciada. §Científico Titular del CSIC. Estación Experimental La Mayora. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Finca La Mayora. 29750. Algarrobo-Costa. Málaga

La criopreservación, que describimos a continuación, puede ser aplicada ventajosamente a la conservación de especies y variedades vegetales silvestres o cultivadas como alternativa a las colecciones y bancos de germoplasma clásicos (bancos de semillas, colecciones en campo). La criopreservación de plantas es un proceso consistente en la preparación, mantenimiento y preservación a largo plazo de un material vegetal, en unas condiciones de temperatura ultra bajas de $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, obtenidas mediante nitrógeno líquido (NL). Este método de conservación de material vegetal presenta una serie de ventajas frente a otros sistemas de preservación de recursos filogenéticos: es un método rápido, sencillo, no altera la estabilidad genética del material y reduce sustancialmente el esfuerzo y los costes que representan el mantenimiento de colecciones de germoplasma vegetal *in vivo* o *in vitro*, al eliminar casi por completo la mano de obra y evitar los riesgos fitopatológicos y fisiológicos que habitualmente aparecen en el mantenimiento de los bancos de germoplasma vegetales. Hay que señalar el importante ahorro de espacio que supone mantener una colección de especies hortícolas o leñosas en pocos metros cuadrados en vez de en plantaciones de cientos o miles de metros cuadrados.

El elemento fundamental de la criopreservación es el NL que se almacena y mantiene en tanques especiales herméticos que permiten que se mantenga en estado líquido y se evapore muy lentamente, manteniendo una temperatura de $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. El NL es incoloro, inodoro y no combustible y está a una temperatura de $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ a presión atmosférica, por lo que el contacto con los tejidos provoca el congelamiento del área. Es de fácil manejo pero, teniendo en cuenta que desplaza el oxígeno del aire, hay que tener cuidado al manipularlo, lo que se debe hacer en lugares bien ventilados.

El material vegetal a utilizar puede proceder de cualquier parte de la planta: meristemas, yemas, ápices, tallos, callos, embriones somáticos, etc. Debe ser seleccionado de plantas sanas y, en el caso de proceder de material de cultivo *in vitro*, los parámetros de cultivo se deben optimizar antes de la criopreservación, ya que el éxito de éste proceso de conservación va a depender tanto de los tratamientos utilizados antes de someter al material al NL, como de los utilizados una vez recuperado el material del NL. Por lo tanto, es de extrema importancia poner especial atención en la composición de los medios de cultivo donde se incuba el material vegetal antes y después de introducirlo en NL para su conservación [Sakai y cols., 1993, *Cryopreservation of Plant Genetic Resources* 6: 5-26].

Para la manipulación del material es necesario utilizar recipientes de materiales resistentes a las bajas temperaturas, como los crioviales de polipropileno, donde el material vegetal que queremos conservar se deposita antes de introducirlo en el NL. Estos crioviales, con capacidades entre 1,2 y 15,0 ml, tienen un sistema de cierre a rosca especialmente diseñado para soportar la rápida conversión del NL a gas, que tiene lugar a temperatura ambiente, conversión que de otro modo produciría la explosión del contenedor. Debido a la facilidad con que se evapora el NL, es necesario controlar su nivel dentro de los tanques donde se almacena, para reponer las pérdidas y mantener estable la temperatura a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ y así asegurar la perfecta conservación del material.

Según la bibliografía, existen dos métodos de congelación. Podemos hablar de un *método de congelación lento*, y un *método de congelación rápido*.

El método de congelación lento, también llamado método convencional de precongiamiento [Sakai y cols., 1991, *Plant Physiology* 137: 465-470], consiste en someter el material a un descenso gradual de temperatura desde $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ó $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ antes de introducir el material en el NL. Esto puede realizarse bajando la temperatura a saltos térmicos relativamente amplios ($5\text{ }^{\circ}\text{C}/5\text{ min}$), o bien a saltos térmicos muy pequeños ($0,5\text{ }^{\circ}\text{C}/5\text{ min}$), siendo este último sistema mucho más lento y dando lugar a una bajada de temperatura aparentemente continua. En el método de congelación rápido o simple, el material vegetal se congela inicialmente a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, para pasarlo posteriormente al NL.

En general, conviene disminuir el contenido de agua del material vegetal para reducir los efectos de la formación de hielo en la congelación. Para ello el material se deshidrata parcialmente antes de la congelación. Esta deshidratación previa se puede realizar con sustancias como el gel de sílice o medios con altos contenidos en glicerol o sacarosa. Así, se elimina un gran porcentaje del agua contenida en el material, teniendo en cuenta que la mayoría de los materiales mantienen su viabilidad si conservan entre el 16,5 % y el 20 % del agua existente inicialmente en fresco [Uragami y cols., 1990, *Plant Cell Reports* 9:328-331], siendo la determinación de la tolerancia a la deshidratación y los métodos que permiten alcanzarla uno de los objetivos más importantes en el estudio de la criopreservación.

Por lo tanto, el método de congelación, la deshidratación y la utilización de sustancias crioprotectoras, de las que hablaremos más adelante, son los recursos existentes para reducir al máximo los daños que se pueden producir en la célula durante el proceso de congelación. De forma

resumida, aunque al formarse el hielo, ya causa por sí mismo daños celulares, estos daños se agravan debido a que se produce el fenómeno de recristalización, que consiste en que los cristales de hielo que se forman en el interior celular durante el proceso de congelación, se derriten y vuelven a formarse dando lugar a estructuras termodinámicamente más estables, es decir, cristales más grandes, con un efecto sumamente dañino ya que provoca una extensa destrucción de estructuras protoplasmáticas y la lisis celular.

En el sistema de congelación lenta, el hielo comienza a formarse desde el exterior hacia el interior celular. El agua sale hacia el exterior desde el citoplasma y la vacuola, lo que provoca una diferencia de potencial osmótico que causa un aumento de la concentración de soluto en el interior celular, y esto va en detrimento de la posibilidad de supervivencia de la célula. Desarrollar este sistema requiere un equipo complejo y de gran coste que controle la disminución gradual y exacta de la temperatura y el tiempo de permanencia del material en cada estadio térmico programado en el protocolo. En el caso del sistema de congelación rápida ocurre lo contrario: se forma hielo desde el interior celular al exterior. El agua entra y la diferencia de potencial osmótico provocada es menor que en el método lento, por lo que los daños celulares que ocasiona una alta concentración de solutos no son tan críticos, si bien los daños por formación de hielo persisten.

Aunque los métodos de congelación son variados, curiosamente casi todos los autores coinciden en que el proceso de descongelación debe realizarse de forma rápida para evitar la recristalización, siendo el método más habitual la inmediata introducción del material congelado en agua caliente a 38 °C.

Para evitar los daños celulares se recurre generalmente al uso de crioprotectores. Los crioprotectores son sustancias de diferente composición (DMSO, glicerol o etilenglicol) que van a embeber y cubrir el material a conservar, protegiéndolo, al facilitar el paso de agua a través de la célula. Es decir, van a estimular la deshidratación celular antes de la congelación intracelular. Entran en la célula retrasando el proceso de congelación celular, disminuyendo los efectos

osmóticos negativos de los solutos intracelulares. En los procedimientos en que se utilizan crioprotectores, el material se somete frecuentemente a pretratamientos como son la encapsulación-deseccación o la vitrificación. El método de encapsulación-deseccación fue desarrollado por primera vez por Fabre y cols. [1991, *Cryoletters* 11: 413-426] para ápices de *Solanum plureja* y consiste básicamente en envolver el material en una cuenta de alginato y, posteriormente, someterlo a desecación, como por ejemplo, usando gel de sílice, antes de introducirlo en el NL. En el método de vitrificación [Sakai y cols., 1990, *Cryobiology* 27: 657; Sakai y cols., 1991, *Plant Physiology* 137: 465-470; Sakai y cols., 1991, *Plant Science* 74: 243-248] se utilizan combinaciones de agentes protectores, como DMSO, glicerol y etilenglicol, a diferentes concentraciones para proteger el material, ya que las combinaciones de agentes protectores son más eficaces que la utilización de cualquier agente en solitario. Una de las mezclas más utilizadas es: DMSO al 1 %, etilenglicol al 1 %, y glicerol al 30 %, o bien, DMSO al 5 o 10%, glicerol al 5 o 10 % y sacarosa.

Para incrementar los efectos de la utilización de los crioprotectores, el material vegetal puede precultivarse en un medio que contenga altas concentraciones de azúcar. Los azúcares, reducirían el contenido hídrico de la célula disminuyendo así la formación de hielo intracelular. Por ello, el trabajo preliminar para la conservación en cada especie es determinar su tolerancia a la deshidratación y ajustar los sistemas o protocolos de congelación para obtener una elevada supervivencia y viabilidad del material crioconservado.

Con esta técnica pretendemos contribuir a la preservación de un valioso recurso fitogenético de Andalucía: las variedades autóctonas andaluzas de espárrago originarias de Huétor-Tájar en la Vega del río Genil en Granada. Estas variedades autóctonas están protegidas por una Denominación Específica de Calidad por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación [BOE, 17 de Abril de 1997], pero la realidad es que están en peligro de desaparición por la competencia de variedades híbridas foráneas, ya que en la actualidad ocupan menos de un 10 % de la superficie cultivada de espárrago en la zona de Huétor-Tájar.