

## RESUMEN

En el presente trabajo se sintetiza información relacionada con la conservación *ex situ* de recursos genéticos forestales. Se describen los procedimientos generales para el almacenamiento de colecciones de germoplasma (semillas, polen y propágulos vegetativos), particularmente para la mantención de bancos *in vitro*. Se describe el banco de conservación de germoplasma *in vitro* del Instituto Forestal (INFOR) y se detallan las estrategias y procedimientos empleados en su mantención. Finalmente, como antecedentes complementarios, se describen y comentan otras formas de conservación *ex situ*, particularmente los bancos de ADN y las colecciones conservadas en campo.

Palabras clave: Conservación *ex situ*, bancos de conservación, germoplasma *in vitro*

## SUMMARY

Information about *ex situ* conservation of forest genetic resources is summarized. The general procedures for storage of collections of germplasm (seeds, pollen and vegetative propagules), particularly to the maintenance of *in vitro* banks are described. The Instituto Forestal's *in vitro* germplasm conservation bank is described, and also the strategies and procedures used in the maintenance of this bank are described too. Finally, as supplementary information, other forms of *ex situ* conservation, particularly DNA banks and the field collections, are described and discussed.

Keywords: *Ex situ* conservation, conservation banks, *in vitro* germplasm

## INTRODUCCIÓN

Los sistemas de conservación *ex situ*, entendidos como la mantención de los organismos o germoplasma de los mismos fuera de su hábitat natural, surgen como una medida complementaria a los mecanismos de conservación *in situ*, y buscan el resguardo de los recursos genéticos fundamentalmente a través de operaciones de almacenamiento y propagación de colecciones de germoplasma representativas de la variabilidad que se desea preservar. El almacenamiento se lleva a cabo mediante el mantenimiento de colecciones de plantas y germoplasma. En el caso de las plantas estas se conservan en colecciones de campo y jardines botánicos, mientras que el germoplasma se mantiene en bancos de semillas, de polen, bancos *in vitro*, bancos de genes o de ADN (Seguel, 2001). Respecto de este último, si bien la biotecnología permite el aislamiento, secuenciación y transferencia de genes, en la actualidad continúa siendo lo más frecuente el hecho que los genes no se conservan individualmente, sino que formando parte de los organismos, partes de estos o del germoplasma que los contiene.

El objetivo de esta y otras formas de almacenamiento *ex situ* es garantizar la viabilidad y la información del material almacenado, permitiendo de esta forma que se disponga de un efectivo resguardo del germoplasma obtenido en las campañas de muestreo y recolección de las muestras representativas de la variabilidad genética de las especies y poblaciones que se hayan definido

como prioritarias de conservar. Estas colecciones, adecuadamente almacenadas y administradas, permitirán, además de conservar los recursos genéticos, mejorar el conocimiento de las características anatómicas, fisiológicas y bioquímicas del material almacenado, y proporcionar propágulos para su utilización en programas educativos, de investigación, de mejora genética, y de restauración entre otros.

En tal contexto, en el presente trabajo se abordan los elementos esenciales relacionados con el almacenamiento de colecciones de germoplasma para la conservación *ex situ* de recursos genéticos forestales, entre ellos la mantención de bancos *in vitro*, detallándose para estos últimos las estrategias y procedimientos empleados por INFOR para el almacenamiento de germoplasma forestal en su banco de conservación *in vitro*.

## CONSERVACIÓN DE GERMOPLASMA

En forma tradicional los bancos de conservación de germoplasma *ex situ* se han materializado fundamentalmente como bancos de semillas, no obstante su utilidad se ve severamente limitada como consecuencia de la existencia de semillas no ortodoxas o recalcitrantes que pierden rápidamente su viabilidad y por lo tanto no son almacenables (FAO *et al.*, 2007). En tales casos, así como para especies involucradas en sistemas de producción intensiva, que poseen programas de mejoramiento genético o alto valor de conservación, se considera además de las semillas el almacenamiento y mantención de otras formas de germoplasma, como explantes *in vitro*, polen u otros.

También son sistemas de conservación *ex situ* aquellos que involucran al ADN y a colecciones de plantas establecidas en terreno. En rigor, en estos dos últimos casos no se trata de germoplasma, por cuanto este concepto hace referencia a "partes de plantas con capacidad para regenerar individuos completos". En el caso de los bancos de ADN se almacenan información genética y no germoplasma propiamente tal, de modo que como se verá en la sección correspondiente, no es fácil regenerar plantas completas a partir de muestras de ADN; por su parte, en el caso de las colecciones en campo, lo que se conserva son individuos vivos, completos y no partes (o germoplasma) de los mismos, aunque evidentemente también pueden constituir fuentes de germoplasma para generar plantas completas.

### Bancos de Semillas

Para fines de conservación las semillas se clasifican en ortodoxas y recalcitrantes. Las primeras conservan su viabilidad después de deshidratarse, pudiendo reducirse su contenido de humedad hasta menos de 4 y germinar sin problemas después de rehidratarse; por lo mismo constituyen el material idóneo para almacenamiento de largo plazo en bancos de conservación. Por el contrario, las semillas recalcitrantes no toleran una deshidratación significativa respecto al contenido de humedad presente en el momento de la diseminación (generalmente entre el 30 y 50), de modo que no pueden ser objeto de conservación como tales en bancos de semillas.

La extensión del periodo de almacenamiento de las semillas ortodoxas aumenta al disminuir la temperatura y el contenido de humedad, siendo el bajo contenido de humedad en la semilla el parámetro clave entre los que influyen sobre el éxito del proceso (Bacchetta *et al.*, 2008).

Atendiendo al efecto relevante del contenido de humedad en la conservación de semillas ortodoxas, los envases que se utilicen para este fin deben ser absolutamente herméticos, en el sentido de no permitir el paso de vapor de agua a su interior. Debe tenerse en cuenta que la humedad relativa en una cámara fría suele ser muy alta y que las semillas secas son fuertemente higroscópicas, de modo que si el envase no es suficientemente hermético a la larga la humedad de la semilla tenderá a equilibrarse con la humedad ambiental exterior, perdiéndose así la posibilidad de conservar su viabilidad en el largo plazo.

Tradicionalmente, el proceso de conservación de semillas ortodoxas en bancos de semillas consiste en secarlas hasta contenidos de humedad del 5 al 7, depositarlas en envases herméticos y posteriormente disponerlas en cámaras de baja temperatura. Si bien un contenido de humedad de 4-5 puede bastar para la conservación efectiva, estas no se ven afectadas si se les sigue secando hasta un 1-3. Aun así, el uso de semilla ultradesecada, es decir con contenidos de humedad de entre 1 y 3, es una práctica poco difundida.

El uso de bajas temperaturas es una recomendación generalizada para la conservación de semillas a largo plazo, sugiriéndose normalmente valores de  $-18^{\circ}\text{C}$  o inferiores. Sin embargo, parece ser que el contenido de humedad de las semillas, más que la temperatura de almacenamiento de las mismas, determina en mejor forma el éxito de la conservación. Así, semillas ultradesecadas y mantenidas a temperatura ambiente por 10 a 40 años, han mostrado un comportamiento mejor, o al menos no distinto, respecto a otras con mayor contenido de humedad, pero almacenadas en cámara fría. Aun así, se reconoce que la baja temperatura contribuye al éxito de la conservación, por lo que no es recomendable prescindir de ella. Sin embargo, temperaturas moderadamente bajas, entre  $-5^{\circ}\text{C}$  y  $5^{\circ}\text{C}$ , pueden ser más que suficientes para las semillas bien deshidratadas, ahorrándose con ello enormes cantidades de energía (Bacchetta *et al.*, 2008).

El control de la humedad dentro de los envases usando gel de sílice resulta particularmente práctico, por cuanto permite alcanzar un mayor nivel de secado, permitiendo además un traslado rápido del material a otras cámaras, en caso de mudanza o problemas técnicos. La ultradesecación con gel de sílice se consigue fácilmente poniendo las muestras en un envase cerrado en presencia de gel deshidratado y sustituyendo el gel por otro seco cada vez que cambie de color. Esto permite alcanzar contenidos de humedad en las semillas de entre 1 y 3, y se mantendrán en equilibrio con el gel indefinidamente, en la medida que los envases permanezcan herméticos.

### **Bancos de Polen**

El almacenamiento de polen es en cierta forma similar al de semillas ortodoxas, por cuanto puede secarse hasta contenido de humedad cercanos al 5 y conservarse a temperaturas inferiores a  $0^{\circ}\text{C}$ . Sin embargo, al igual que en las semillas, hay especies que producen polen recalcitrante que no admite almacenamiento de largo plazo (Wang y Beardmore, 2004). Además, a diferencia de las semillas, el polen tiene una vida relativamente corta y sus ensayos de viabilidad son comparativamente más complejos que los de las semillas. Por estas y otras razones, el almacenamiento de polen ha sido escasamente utilizado en la conservación de germoplasma (Theilade *et al.*, 2007a).

En líneas generales, el polen se debe almacenar en pequeños recipientes individuales, así se puede utilizar la cantidad necesaria sin interferir en el estado de conservación de todo el lote. Respecto a las formas de almacenamiento Bacchetta *et al.* (2008) reconocen las siguientes:

- Conservación a bajas temperaturas y baja humedad relativa: Es el método más utilizado debido a su simpleza, pero solo permite conservar polen en forma segura por algunos meses. Para este efecto el polen se deposita en pequeños contenedores, como tubos eppendorf, los que se depositan dentro de un desecador que se maneja a temperaturas de  $-20$  a  $+4^{\circ}\text{C}$ , con una humedad relativa inferior a 10. Para asegurar estas condiciones se coloca gel de sílice en el desecador, a la vez que este se ubica dentro de un frigorífico o de un congelador.
- Conservación a bajas temperaturas al vacío: Este método involucra la congelación del polen hasta  $-60$  a  $-80^{\circ}\text{C}$  y la extracción gradual, aunque no completa, del agua por sublimación. Después de este tratamiento el polen se conserva a temperaturas algo inferiores a  $0^{\circ}\text{C}$ , permitiendo así conservar su viabilidad durante algunos años.

- Crioconservación: En este método se hace descender el contenido de agua del polen hasta un determinado umbral y después se sumerge y conserva en nitrógeno líquido. Es un procedimiento adoptado especialmente en los últimos años y que permite una correcta conservación a largo plazo.
- Conservación en disolventes orgánicos: Involucra la deshidratación del polen y su posterior almacenamiento en disolventes como acetona, benceno, éter de petróleo, xileno o tolueno, entre otros. No es un procedimiento de uso muy difundido y ha sido probado en pocas especies. Sus ventajas son que evita la necesidad de mantener una humedad relativa específica, además permite que el polen pueda ser transportado de un lugar a otro sin necesidad de mantenerlo a baja temperatura.

Independientemente del método de conservación utilizado, el paso del polen desde las condiciones de almacenamiento a las condiciones ambientales o de laboratorio resulta crítico. Si ha sido conservado a bajas temperaturas, la descongelación y rehidratación debe hacerse lenta y gradualmente. Este último proceso se puede realizar colocando el polen en una superficie plana al interior de un recipiente con elevada humedad relativa, la que puede lograrse disponiendo dentro del recipiente trozos de papel filtro embebidos en agua, pero sin contacto físico con el polen. Antes de utilizar el polen conservado, es aconsejable verificar su viabilidad.

### **Bancos de Germoplasma *In Vitro***

Además de una técnica de producción vegetativa de plantas, el cultivo *in vitro* constituye una estrategia de conservación de germoplasma vegetal, que puede ser de utilidad para aquellas especies que poseen semillas recalcitrantes, que son de alto valor de conservación o que por alguna razón no pueden conservarse usando métodos convencionales. En este caso la conservación *in vitro* de explantes vegetativos viables y capaces de regenerar plantas completas permite mantener un respaldo de material genético de interés por considerables periodos de tiempo.

Todos los métodos de propagación y cultivo *in vitro* se basan en la totipotencialidad de las células, lo que les permite la regeneración de una planta completa, a partir de células individuales, o grupo de células contenidas en tejidos u órganos.

El cultivo *in vitro* puede realizarse mediante organogénesis somática y embriogénesis somática. La primera puede generar plantas a partir de un determinado propágulo, o explante inicial, usando medios enriquecidos con citoquininas para favorecer la multiplicación y elongación de brotes axilares o adventicios, los que posteriormente son estimulados a enraizar en otro medio suplementado con auxinas (Sabja, 1998; Ortíz, 2013).

En el caso de la embriogénesis se induce la formación de embrioides a partir de la desdiferenciación de un explante inicial, normalmente semillas en distintos grados de maduración, para formar estructuras equivalentes a embriones cigóticos, que son capaces de germinar y generar plantas completas (Ahuja, 1983; Ortiz, 2013).

Mientras el germoplasma *in vitro* se mantenga activo (en crecimiento) es necesario subcultivarlo sistemáticamente a medios frescos, de lo contrario experimenta senescencia y muere. Por otra parte, asociado al permanente subcultivo pueden producirse fenómenos de variación somaclonal, que alteran la genética del material conservado. Para evitar la incidencia de este efecto se debe minimizar el número de reproducciones de los explantes conservados, idealmente inhibir totalmente su crecimiento como ocurre al criopreservarlos.

Los cultivos *in vitro* y sus propágulos pueden almacenarse por períodos cortos, medianos y largos. Durante un almacenamiento de corto plazo se promueve el crecimiento de los cultivos *in vitro*, en tanto que en el almacenamiento por plazos medianos y largos se busca reducir fuertemente el crecimiento o incluso inhibirlo (Wang y Beardmore, 2004).

#### - **Conservación *In Vitro* de Corto Plazo**

El almacenamiento de corto plazo es de utilidad para mantener explantes activos mediante el subcultivo regular de los tejidos en medios frescos. Este método es práctico para multiplicar germoplasma, pero no es apropiado para fines de conservación *ex situ* de largo plazo, por cuanto conlleva el permanente peligro de contaminación de los cultivos, fallas de equipo, elevados costos de almacenamiento y trabajo intensivo. Adicionalmente el permanente subcultivo incrementa el riesgo de variación somaclonal.

#### - **Conservación *In Vitro* de Mediano Plazo**

Los cultivos *in vitro* pueden almacenarse por plazos de mediana duración minimizando el crecimiento del tejido y por consiguiente reduciendo la frecuencia de los subcultivos. La reducción del crecimiento del germoplasma *in vitro* puede conseguirse por métodos variados, entre ellos, reduciendo la temperatura, la concentración de oxígeno o la intensidad de la luz. También puede manejarse la composición de los medios (concentración de nutrientes, reguladores de crecimiento y otros) de forma tal que minimicen el crecimiento. Al respecto, altos contenidos de sacarosa y manitol han demostrado minimizar el crecimiento de los cultivos *in vitro*, sin embargo pueden conducir también a una reducción en la viabilidad del cultivo. Por otra parte, la adición de inhibidores como el ácido abscísico también pueden reducir el crecimiento e inducir latencia en el tejido, aunque en estos casos también suele ocurrir que los cultivos que han crecido por algún periodo en presencia de inhibidores, posteriormente experimentan dificultades para su regeneración (Wang y Beardmore, 2004).

#### - **Conservación *In Vitro* de Largo Plazo (Criopreservación)**

La criopreservación o almacenamiento en nitrógeno líquido (-196°C) es un método apropiado para el almacenamiento a largo plazo de germoplasma vegetal, permitiendo en teoría conservarlo indefinidamente. En combinación con el cultivo *in vitro*, la criopreservación representa con frecuencia la única opción segura y rentable para el almacenamiento de especies no ortodoxas (Theilade *et al.*, 2007a).

El polen y las semillas ortodoxas con bajos contenidos de humedad son capaces de sobrevivir a la criopreservación. Por el contrario, los explantes de germoplasma *in vitro* debido a sus altos contenidos de humedad y a su incompatibilidad con la desecación no resultan, en primera instancia, adecuados para criopreservarlos. En estos casos, la criopreservación de explantes *in vitro* requiere de la aplicación de pretratamientos que acondicionen el material para permitirle sobrevivir al congelamiento y mantener su viabilidad después del descongelamiento (Wang y Beardmore, 2004).

En efecto, la tolerancia del tejido a la criopreservación puede incrementarse por métodos que disminuyen el contenido de agua del tejido, minimizando así la incidencia de formación de hielo intracelular. En el caso de los cultivos *in vitro*, al ser intolerantes a la desecación, deben someterse a la infusión de sustancias crioprotectoras, las que alteran la permeabilidad de la membrana celular, el punto de congelamiento y la respuesta del tejido al congelamiento. Según González y Engelmann (2013) la utilización exógena de estas sustancias clasificadas como crioprotectoras puede tener lugar mediante su adición a los medios de cultivo *in vitro*, o realizando tratamientos con soluciones que las contengan, con lo cual se propicia la penetración de algunos de ellos a las células y, a su vez, se contribuye a regular el equilibrio osmótico, a incrementar la viscosidad y a reemplazar las moléculas de agua eliminadas por la deshidratación. De esta forma se ejerce un efecto protector celular, que disminuye el punto de congelación y que puede inducir la ocurrencia de la vitrificación, es decir de una condición en que el agua interna de las células adquiere una alta viscosidad que la asimila al estado sólido de un cristal amorfo, condición en la que no puede congelarse, por lo tanto no se produce cristalización de hielo que dañe los tejidos.

Los crioprotectores más usados en esta materia son el dimetil-sulfóxido (DMSO), glicerol, sorbitol o polietilen-glicol. El DMSO altera la permeabilidad de la membrana celular, permitiendo que otros crioprotectores también puedan minimizar el daño debido a la formación de hielo intracelular, protegiendo a las membranas celulares del daño por formación de hielo.

## CONSERVACIÓN *IN VITRO* EN BANCO DE GERMOPLASMA INFOR

El Instituto Forestal dispone de un banco activo de conservación de germoplasma forestal *in vitro*, el que funciona en las dependencias de su laboratorio de micropropagación, en la sede Bío Bío de este Instituto. El complejo laboratorio-banco se implementó en respuesta a las necesidades de conservar y multiplicar material genético selecto obtenido o identificado en diversos programas de mejoramiento genético de especies nativas y exóticas ejecutados por INFOR. En su actual modalidad de funcionamiento, el banco permite efectuar conservación *in vitro* de germoplasma forestal a corto y mediano plazo.

Las instalaciones, administradas por el grupo de Conservación y Mejoramiento Genético de INFOR, comprenden una superficie de 71 m<sup>2</sup>, dividida en cuatro áreas de trabajo especialmente diseñadas y equipadas para el adecuado desarrollo de las actividades asociadas al mantenimiento *in vitro* de la colección del Banco de Germoplasma. Las cuatro áreas corresponden a:

- Área recepción de material y lavado: En esta sala se recibe, lava y desinfecta el material vegetal recolectado en terreno, para su posterior utilización en el cultivo *in vitro*. La estructura tiene un acceso independiente y se encuentra aislada para prevenir el ingreso de agentes contaminantes a las restantes instalaciones.
- Laboratorio central: En esta sección se preparan, esterilizan y almacenan los medios nutritivos que serán utilizados en el cultivo *in vitro*. El equipamiento de esta sala es el habitual en un laboratorio de cultivo de tejidos, donde se incluyen autoclave, destilador de agua, hornos de secado, balanzas pH-metros, agitadores y todo el complemento de insumos, reactivos y accesorios asociados a esta labor.
- Sala de establecimiento o cultivo: Es una sala de acceso restringido y aislada, cuenta con dos cámaras de flujo laminar equipadas con esterilizadores eléctricos, para el cultivo y manipulación aséptica del material *in vitro*. En esta área se realiza el establecimiento de los cultivos y los subcultivos de los mismos para su conservación.
- Salas de crecimiento y conservación: El laboratorio cuenta con dos salas de incubación con controles independientes de temperatura y fotoperiodo. Las salas tienen una superficie de 24 m<sup>2</sup>, y se encuentran equipadas con repisas iluminadas que permiten maximizar su capacidad de almacenamiento.

### Colecciones Conservadas

Actualmente en el banco de conservación *in vitro* se mantiene germoplasma viable de 86 árboles selectos, pertenecientes a dos especies nativas (*Nothofagus alpina* y *N. pumilio*) y cuatro especies exóticas (*Acacia melanoxylon*, *Castanea sativa*, *Eucalyptus camaldulensis* y *Eucalyptus globulus*). En todos los casos se trata de árboles de características superiores identificados en los programas de mejoramiento genético de INFOR, en función de atributos de propósito general como crecimiento, rectitud, forma del fuste y sanidad; en algunos especies también se han aplicado criterios de resistencia a estreses abióticos, como tolerancia al déficit hídrico. En la mayoría de los casos se trata de selecciones masales de mediana a alta intensidad, que conllevan importantes diferenciales de selección y ganancias genéticas esperadas.

En general el material conservado en el banco corresponde a individuos de interés para

la producción maderera. En situaciones como las de raulí, se trata de un ideal de árbol, escaso en los bosques naturales, debido a que ha sido preferencialmente cosechado en las intervenciones de floreo que fueron tradicionales en el país. Por lo mismo, es posible afirmar que el Banco de Germoplasma constituye uno de los últimos reservorios del material genético más valioso de esta especie.

En términos generales el material conservado en el banco de germoplasma *in vitro* de INFOR corresponde al siguiente:

- Raulí: El material vegetal representado en el banco corresponde a 39 árboles plus adultos, de *Nothofagus alpina* (raulí) con edades que fluctúan entre 40 y 100 años, los cuales fueron seleccionados en rodales naturales, en función de su manifiesta superioridad en atributos de crecimiento y forma, lo que los constituye en individuos especialmente deseables para el establecimiento de plantaciones con fines de producción maderera. Los árboles seleccionados se encuentran localizados en toda el área de distribución natural de la especie, que abarca desde los 35° hasta los 41° de latitud Sur.
- Lenga: Los árboles conservados en el banco corresponden a 5 individuos juveniles seleccionados en un ensayo de progenies establecido en la Reserva Forestal Coyhaique. En este caso la selección se basó en la evaluación genética cuantitativa del ensayo, utilizando un índice de selección para la variable altura. A su vez el ensayo donde se efectuó la selección representa a las progenies de polinización abierta de árboles adultos seleccionados en bosques naturales de tres procedencias de lenga en la región de Aysén.
- Castaño: En el banco se presentan explantes de cinco individuos de *Castanea sativa* (castaño), seleccionados en plantaciones forestales adultas de entre 40 y 60 años de edad, ubicadas entre las regiones del Bío Bío y Los Lagos. Los individuos representados corresponden a árboles plus que exhibían crecimientos superiores a la media de sus rodales, así como excelentes atributos de sanidad y forma de fuste. En todos los casos se trata de plantaciones establecidas y manejadas con fines forestales y no de plantaciones frutales.
- *Eucalyptus globulus*: En el banco se conserva germoplasma *in vitro* de un total de 24 árboles plus de *Eucalyptus globulus*. La mayoría de ellos fueron seleccionados en plantaciones establecidas en condiciones de secano desde la región de Bío Bío al norte y corresponden a individuos que exhibían características superiores de volumen y forma en ambientes en que las limitaciones hídricas restringen el crecimiento de la especie. Adicionalmente se incluyen individuos de sobresalientes características productivas identificados en las evaluaciones genéticas de los ensayos de procedencias y progenies australianas que constituyen las poblaciones bases del programa de mejoramiento genético para eucaliptos desarrollado por el Instituto Forestal
- *Eucalyptus camaldulensis*: El banco conserva material genético (explantes *in vitro*) de nueve árboles plus de *Eucalyptus camaldulensis* seleccionados por su capacidad para exhibir superioridad productiva en terrenos con limitaciones hídricas en las regiones de Valparaíso y Metropolitana.
- *Acacia melanoxydon*: El banco conserva germoplasma *in vitro* de 4 árboles plus adultos de *Acacia melanoxydon*, seleccionados en función de su superioridad en volumen y forma de fuste en rodales prospectados entre las regiones de Bío Bío y Los Lagos.



Izquierda a Derecha: Raulí (*Nothofagus alpina*), lenga (*Nothofagus pumilio*), castaño (*Castanea sativa*), *Eucalyptus camaldulensis*, *Eucalyptus globulus* y aramo australiano (*Acacia melanoxylon*)

**Figura N° 1**  
**ESPECIES FORESTALES CONSERVADAS EN BANCO DE GERMOPLASMA *IN VITRO* DE INFOR**

### Procedimientos y Labores de Mantenimiento del Banco

El establecimiento de germoplasma *in vitro* y la posterior mantención de las colecciones almacenadas en el banco demandan una serie de actividades que permiten mantener viable y reactivo el material durante su conservación. Las principales de ellas se describen a continuación.

#### - Introducción de Germoplasma

La introducción del material vegetal para el inicio del proceso de conservación se hace a través de técnicas de micropropagación, particularmente organogénesis somática. Para este efecto se utilizan como explantes iniciales brotes epicórmicos en el caso de las especie *E. globulus* y *A. melanoxylon*; yemas latentes, inducidas a brotar en laboratorio bajo condiciones controladas de temperatura y humedad en raulí, lenga y castaño, esto último según procedimiento desarrollado por Vieitez *et al.* (1986), Sánchez y Vieitez (1991), Sánchez *et al.* (1997a) y Sánchez *et al.* (1997 b), y segmentos nodales provenientes de terreno en el caso de *E. camaldulensis*.

Cada especie del Banco contiene un protocolo específico de cultivo, cuya secuencia va desde la desinfección del material a propagar hasta el establecimiento y la multiplicación. Adicionalmente, para producir plantas se agregan las fases de elongación, enraizamiento y aclimatación.

Los medios nutritivos empleados dependen de la especie y en algunos casos del tipo de clon, y fueron desarrollados y definidos durante la ejecución de proyectos de I+D relacionados con la multiplicación clonal de árboles plus (Sabja *et al.*, 2005; Delard *et al.*, 2007; Ortiz *et al.*, 2006; Gutiérrez *et al.*, 2005; Ortiz y Koch, 2010).

Los medios utilizados para cada especie son:

-Lenga: Medio nutritivo base BTM, suplementado con 20g/L de sacarosa, 7g/L de agar, 0,22mg/L de BAP, 0,002mg/L de ANA, 250mg/L de caseína hidrolizada y 20mg/L de putrescina.

-Raulí y castaño: Medio nutritivo base BTM adicionado con 0,125mg/L de BAP, 20g/L de sacarosa y 7g/L de agar.

-*E. globulus*, *E. camaldulensis* y *A. melanoxylon*: Medio nutritivo identificado por Oller *et al.* (2004), el cual se compone de las sales minerales del medio MS (Murashige y Skoog,

1962), complementado con 0,1 mg/L de tiamina, 0,1 mg/L de piridoxina, 0,5 mg/L de ácido nicotínico, 100 mg/L de m-inositol, 7 g/L de agar, 20g/L de sacarosa, 0,22mg/L de BAP y 0,001 mg/L de ANA.

En la Figura N° 2 se muestra el proceso de introducción de germoplasma de la especie *E. globulus*.



a) Selección de árboles plus, b) Proceso de inducción de brotes en laboratorio para obtención de los explantes (brotes epicórmicos), c) Selección y siembra de los explantes en medio de cultivo, d) Multiplicación de brotes y e) conservación del germoplasma en sala de crecimiento.

**Figura N° 2**  
**INTRODUCCIÓN DE GERMOPLASMA DE *Eucalyptus globulus***

#### - **Conservación *In Vitro***

El método de conservación *in vitro* utilizado en el banco de germoplasma forestal de Infor se basa en el empleo de técnicas de crecimiento retardado, donde la conservación *in vitro* se realiza manteniendo los explantes confinados en frascos de vidrio, que contienen un medio aséptico y sustancias nutritivas adecuadas para la generación de brotes axilares sostenida en el tiempo.

Los explantes son cultivados en frascos de 500cc de volumen, que contienen 200ml de medio nutritivo aséptico adicionado con hormonas del tipo citocininas y, dependiendo de la especie, también con auxinas, ambas en concentraciones muy bajas, pero suficientes para permitir la formación de nuevos brotes. El medio nutritivo es renovado cada 60 días. El pH de los medios nutritivos es ajustado en  $5,7 \pm 0,05$ , antes de su esterilización en autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  y  $0,1\text{MPa}$ , durante 20 minutos.

La colección de germoplasma, se mantiene en una sala de incubación con temperatura de  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$  y fotoperíodo de 16 horas luz ( 800 a 1330 lux) y 8 horas de oscuridad ( Figura N° 3).



**Figura N° 3**  
**CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO DE LAS COLECCIONES**  
**DEL BANCO DE GERMOPLASMA *IN VITRO* DE INFOR**

El principal riesgo asociado a la mantención del Banco de Germoplasma es el de contaminación externa, que inevitablemente puede ocurrir en algún porcentaje, pero que puede ser minimizada a través de la organización y ejecución de procedimientos adecuados de cultivo. Con el objetivo de minimizar el riesgo de pérdida de clones por efecto de la contaminación externa durante la ejecución de las actividades de repique a medio fresco se toman las siguientes precauciones:

- Cada clon cuenta con un mínimo de 6 réplicas, dispuestas en distintos frascos.
- Los clones son ordenados en grupos, de manera que cada uno de ellos cuenta al menos con una réplica de cada clon.
- Los subcultivos de cada grupo se realizan en días separados.
- Existe un permanente seguimiento y monitoreo del programa de subcultivo.

El éxito de la conservación *in vitro* radica en las labores cotidianas que se llevan a cabo para su buen funcionamiento. Una de las labores principales es la supervisión de las condiciones físicas de la sala de incubación (temperatura, luz, humedad, asepsia), como también revisar el estado fisiológico y fitosanitario del material vegetal que se está conservando.

- Temperatura: En la sala de conservación se ubica un termómetro e higrómetro que permite monitorear día y noche la temperatura y humedad relativa de la sala según lo establecido para mantener tasas de crecimiento reducido.

-Iluminación: Una adecuada intensidad lumínica depende del buen funcionamiento de las lámparas fluorescentes que permiten el crecimiento de los cultivos. Las lámparas dañadas deben ser reemplazadas oportunamente. En relación al fotoperiodo es controlado con un reloj *timer*.

-Asepsia: La evaluación de presencia de contaminación bacteriana o fúngica se realiza mediante inspección visual. En la eventualidad de detectarse material contaminado, este se elimina inmediatamente, registrándose el descuento y la causa. También se restringe el acceso de personal a la sala de cultivo y a las cámaras de incubación.

-Cultivo: Los cultivos deben mantenerse con hojas y tallos verdes y deben renovarse si presenta zona necrótica. Hay especies que poseen alta liberación de fenoles lo que provoca oxidación del medio de cultivo y aumenta la frecuencia de subcultivo.

Los procedimientos señalados han permitido conservar germoplasma viable en el banco de INFOR por 15 años hasta la fecha. No obstante, el alto costo que han significado los permanentes subcultivos que se han requerido durante todo ese periodo confirma las ventajas y conveniencia de disponer de medios para almacenamiento criogénico.

## **OTRAS FORMAS DE CONSERVACION EX SITU**

### **Bio-Bancos de ADN**

Los bio-bancos de ADN son una técnica emergente de conservación de recursos genéticos. Gracias a la relativa facilidad actual para hacer extracciones de ADN, se les reconoce como un método eficiente, sencillo y de largo plazo, apropiado para conservar gran cantidad de información genética requiriendo muestras muy pequeñas (Dulloo *et al.*, 2006).

A diferencia de los bancos tradicionales de germoplasma, los bio-bancos de ADN no almacenan germoplasma propiamente tal, sino que información genética (Rice *et al.*, 2006). El ADN que se conserva en el banco: (i) Se extrae de las células y se purifica antes de almacenarlo, o (ii) Se almacena dentro de células para extraerlo después, cuando se saca de almacenamiento. En este segundo caso, en el banco de ADN las células y tejidos se almacena para extraer ADN y no para regenerar plantas. En efecto, Theilade *et al.* (2007a) son enfáticos en mencionar que el principal problema del almacenamiento de ADN es que no permite la regeneración de plantas completas. Para reconstituir plantas completas directamente del ADN, primero es necesario introducir artificialmente el material genético en células somáticas (mediante la transformación o la transducción de plásmidos o liposomas), recién después de este complejo proceso se pueden cultivar las células *in vitro* para producir plantas. Por lo mismo, los bio-bancos de ADN deben estar relacionados con estructuras tradicionales de conservación de germoplasma, o mejor aún en el caso de recursos forestales, con colecciones establecidas en terreno (ensayos de progenies y procedencias de alta variabilidad), de modo de disponer de material viable para regeneración de plantas y estudios complementarios.

Para especies difíciles de conservar por medios convencionales, o que están altamente amenazadas en sus ambientes naturales, el almacenamiento de ADN puede representar la última opción para conservar la diversidad genética de sus poblaciones. En este sentido, los bio-bancos de ADN pueden considerarse como un "medio complementario de conservación", por cuanto no reemplazan a los bancos de germoplasma tradicionales. En efecto, el almacenamiento de ADN hasta ahora se ha realizado con propósitos distintos a los de la conservación, generalmente para que el material genético sea fácilmente accesible y pueda utilizarse ya sea en aplicaciones moleculares o distribuirse para otras investigaciones. Sobre este particular Dullo *et al.* (2006) señalan que con solo cumplir la función de proveer ADN para la investigación, los bio-bancos ya tienen justificada su razón de ser.

Así, el almacenamiento de ADN en bio-bancos posibilitaría el inicio de estudios de aislación, clonación y transferencia de genes. Por otra parte, además de constituir una estructura de complemento para las estrategias de conservación, Ebert *et al.* (2006) señalan que los bio-bancos de ADN pueden proporcionar material que sirva de base para estudios de evolución y genómica comparativa; para estudios de asociación genética y selección asistida por marcadores; pueden facilitar el intercambio de información y muestras de ADN; pueden mejorar el rendimiento en caracterización de germoplasma y mejorar la gestión de bancos tradicionales. Adicionalmente, otros autores agregan que los BioBancos de ADN son estructuras de utilidad para estudios bio-taxonómicos y de evolución; estudios de la evolución de una determinada estructura genética; facilitar el intercambio de datos e información; inventariar las entidades de interés particular; conservar información en el largo plazo; y certificar el origen o procedencia para material reproductivo forestal.

## **Colecciones en Campo**

Como se ha indicado anteriormente, la conservación *ex situ* de especies cuyas semillas no son compatibles con el almacenamiento de largo plazo demanda el uso de técnicas alternativas de conservación, una de ellas es la mantención de colecciones de plantas en campo, ya sea en jardines botánicos o en los denominados rodales de conservación *ex situ*. En los jardines botánicos y arboretos las colecciones normalmente consisten de pocos individuos, mientras que los rodales de conservación *ex situ* se diseñan y establecen para representar a un número mucho mayor de ejemplares. Si bien en ambos casos la finalidad es mantener los recursos genéticos en un área segura para su utilización futura, en los rodales de conservación este objetivo de largo plazo suele estar combinado con otras finalidades prácticas, fundamentalmente con aquellas relacionadas con programas de mejoramiento genético (Theilade *et al.*, 2007b).

En efecto, los rodales de conservación pueden tener varias funciones importantes, incluyendo la de proporcionar material para programas de plantación y de mejoramiento genético. Los rodales de conservación *ex situ*, con diseño apropiado, pueden transformarse en huertos semilleros, logrando dos objetivos simultáneamente; la conservación de los recursos genéticos y la producción de semilla.

Aunque los rodales de conservación *ex situ* se encuentren en ambientes diferentes al original, desde donde se obtuvo las plantas que los componen, podrán mantener frecuencias génicas similares a las de la población original, en la medida que sean suficientemente extensos para representar adecuadamente la diversidad genética de dicha población; se genere una polinización panmíxica libre de barreras; y las presiones de selección en su área de emplazamiento no sean significativamente diferentes a las del ambiente original.

Hasta ahora, los rodales de conservación *ex situ* han servido principalmente para proporcionar material para plantaciones y programas de mejoramiento genético, pero el material conservado *ex situ* puede ser de gran importancia también para la restauración de sitios *in situ*.

## **CONCLUSIONES**

El almacenamiento de semillas ortodoxas es el principal método de conservación *ex situ* de colecciones de germoplasma. En el caso de especies con semillas recalcitrantes es necesario usar métodos alternativos, entre ellos el almacenamiento de explantes *in vitro*. Este último es un método con enorme potencial en la medida que se complementa con crio-preservación; de lo contrario, la necesidad de subcultivos y el riego de variación somaclonal lo limitan para efectuar conservación de largo plazo.

La conservación de ADN en bio-bancos no corresponde a una forma de almacenamiento de germoplasma propiamente tal, sino que de información genética. En tal sentido es de importante valor para efecto de estudios de diversa naturaleza, pero posee severas limitaciones al

momento de regenerar plantas a partir del ADN almacenado.

En cuanto al establecimiento de colecciones en campo, resulta particularmente interesante como un método de conservación *ex situ* para colecciones de plantas forestales, debido a la longevidad de las mismas y a su compatibilidad con programas de mejoramiento genético.

## REFERENCIAS

**Ahuja, M., 1983.** Micropropagation à la carte. In: Micropropagation of woody plants, Forestry Science. V.41. Ahuja, MR. (Ed). Kluwer Academic Publishers. Pp: 3-9.

**Bacchetta, G.; Bueno-Sánchez, A.; Fenu, G.; Jiménez-Alfaro, B.; Mattana, E.; Piotto, B. y Virevaire, M. (Eds), 2008.** Conservación *ex situ* de plantas silvestres. Principado de Asturias / La Caixa. 378 p.

**Delard, C.; González, M.; Ortiz, O.; Molina, M. y López, C., 2007.** Producción de plantas forestales de castaño. En: Castaño, Madera de Alto Valor para Chile. Benedetti S.; Loewe V.; López C. y M. González (Editoras). INFOR. Chile. Pp: 157-188.

**Dulloo, E.; Nagamura, Y. and Ryder, O., 2006.** DNA storage as a complementary conservation strategy. En: de Vicente, MC. and Andersson, MS. (Eds). 2006. DNA banks—providing novel options for genebanks? Topical Reviews in Agricultural Biodiversity. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. Capítulo 3, Pp: 11-40.

**Ebert, A. W.; Karihaloo, J. L. and Ferreira, M. E., 2006.** Opportunities, limitations and needs for DNA Banks. En: de Vicente MC and Andersson MS (Eds). 2006. DNA banks—providing novel options for genebanks? Topical Reviews in Agricultural Biodiversity. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. Capítulo 9. Pp: 61-68.

**FAO, FLD y Bioversity International, 2007.** Conservación y manejo de recursos genéticos forestales. Vol. 3: En plantaciones y bancos de germoplasma (*ex situ*). Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, Roma, Italia.

**González, M. T. y Engelmann, F., 2013.** Consideraciones teóricas y prácticas para la crioconservación de germoplasma vegetal En: González, M. T. y Engelmann, F. (Eds.) 2013. Crioconservación de plantas en América Latina y el Caribe. Instituto Interamericano de Cooperación Agrícola, IICA. San José, Costa Rica. ISBN 978-92-9248-446-0. 204 p. capítulo 4. Pp: 37-52.

**Gutiérrez, B.; Ortiz, O.; Molina, M.; Chung, P.; Koch, L.; González, M.; Casanova, K. y Soto, H., 2005.** Protocolos de clonación para *Eucalyptus camaldulensis*: Macro y micropropagación. Instituto Forestal. 62 p.

**Murashige, T. and Skoog, F., 1962.** A revised media for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.

**Oller, J.; Toribio, M.; Celestino, C. y Toval, G., 2004.** The culture of elite adult trees in a genetic improvement programme through *Eucalyptus globulus* Labill clonal micropropagation. *Eucalyptus* in a Changing World. Proc. of IUFRO Conf., Aveiro 11-15 October 2004.

**Ortiz, O., 2013.** Micropropagación de *Eucalyptus globulus*. En: Ipinza, R.; Barros, S.; Gutiérrez, B. y Borralho, N. (Eds). 2013. Mejoramiento genético de eucaliptos en Chile. Instituto Forestal- Fundación para la Innovación Agraria. Santiago, Chile. Pp: 167-199.

**Ortiz, O. y Koch, L., 2010.** Micropropagación de árboles superiores de *E. globulus*, seleccionados en zonas de estrés hídrico. Informe técnico, proyecto INNOVACHILE “Generación y Producción de plantas de *E. globulus* tolerantes a la sequía”, INFOR. 25 p.

**Ortiz, O.; Sabja, A. y Koch, L., 2006.** Protocolo de micropropagación de lenga. En: Cultivo *in vitro* de Lenga (*Nothofagus pumilio*). Editado por Braulio Gutiérrez. INFOR. CHILE. 76 p.

**Rice, N.; Henry, R. and Rossetto, M., 2006.** DNA banks: a primary resource for conservation research. En: de Vicente MC and Andersson MS (Eds). 2006. DNA banks—providing novel options for genebanks? Topical Reviews in Agricultural Biodiversity. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. Capítulo 6, Pp: 41-48.

**Sabja, A., 1998.** Macro y micropropagación en especies forestales. En: Ipinza, R., B. Gutiérrez y V. Emhart (Eds.). Curso Mejora Genética Forestal Operativa. Apunte Nº 1. 16 – 21 noviembre de 1998 Valdivia Chile. 219 – 232.

**Sabja, A.; Ortiz, O. y Triviño, C., 2005.** Micropropagación de árboles *plus* de raulí. En: Clonación de raulí, estado actual y perspectivas. Editado por Braulio Gutiérrez, Oriana Ortiz y María Paz Molina. CEFOR, INFOR, UACH. pp 41-58.

**Sánchez, M. and Vieitez, A., 1991.** *In vitro* morphogenetic competence of basal sprouts and crown branches of mature chestnut. *Tree Physiology* 8: 59-70.

**Sánchez, M.; Ballester, A. and Vieitez, A., 1997a.** Reinvigoration treatments for the micropropagation of mature Chestnut trees. *Annales des Sciences Forestières* 54: 359-370.

**Sánchez, M.; San Jose, C.; Ferro, C.; Ballester, A. and Vieitez, A., 1997b.** Improving micropropagation conditions for adult-phase shoot of Chestnut. *Journal of Horticultural Science* 72(3): 433-443.

**Seguel, I., 2001.** Conservación de recursos fitogenéticos ex situ. En: PROCISUR. Estrategia en recursos fitogenéticos para los países del Cono Sur. 12 p. En: [http://www.fagro.edu.uy/~fitotecnia/docencia/materiales20apoyo/Conservacion\\_de\\_recursos\\_Fitogeneticos.pdf](http://www.fagro.edu.uy/~fitotecnia/docencia/materiales20apoyo/Conservacion_de_recursos_Fitogeneticos.pdf). (Consulta: Noviembre, 2013).

**Theilade, I.; Petri, L. y Engels, J., 2007a.** Conservación *ex situ* mediante almacenamiento y utilización. En: FAO-FLD-Bioversity International. 2007. Conservación y manejo de recursos genéticos forestales. Vol. 3: En plantaciones y bancos de germoplasma (*ex situ*). Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, Roma, Italia. Capítulo 6, Pp: 51-65.

**Theilade, I.; Yanchuk, A. y Hald, S., 2007b.** Establecimiento y manejo de rodales *ex situ*. En: FAO-FLD-Bioversity International. 2007. Conservación y manejo de recursos genéticos forestales. Vol. 3: En plantaciones y bancos de germoplasma (*ex situ*). Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, Roma, Italia. Capítulo 5, Pp: 33-49.

**Vieitez, A.; Vieitez, M.; Vieitez, E., 1986.** Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol.1: Trees I, 393-414.

**Wang, B. y Beardmore, T., 2004.** Almacenamiento y manejo de germoplasma. En: Vargas, J.; Bermejo, B. y Ledig, T. (Eds.). 2004. Manejo de Recursos Genéticos Forestales, Segunda Edición. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Edo. de México, y Comisión Nacional Forestal, Zapopan, Jalisco México. 109 p. Capítulo 8, Pp: 102-127.