

●
LA
AGROBIODIVERSIDAD
ESTRATEGIAS
DE
CONSERVACIÓN
●


EDITORES

JOAN SIMÓ CRUANYES
MARÇAL PLANS PUJOLRÀS
FRANCESC CASAÑAS ARTIGAS


2^{do}

**Seminario Internacional
sobre la Agrobiodiversidad
como estrategia
para el mantenimiento
del territorio**

 **UIMP** Barcelona
Centre Ernest Lluch

 **Ajuntament d'Olot**

FES /
FUNDACIÓ
D'ESTUDIS
SUPERIORS
D'OLOT

 **Fundació
Miquel Agustí**



LA
AGROBIODIVERSIDAD
ESTRATEGIAS
DE
CONSERVACIÓN



EDITORES

JOAN SIMÓ CRUANYES
MARÇAL PLANS PUJOLRÀS
FRANCESC CASAÑAS ARTIGAS

2^{do}
Seminario Internacional
sobre la Agrobiodiversidad como estrategia
para el mantenimiento del territorio

Barcelona, 2011

Los bancos internacionales de germoplasma

Maritza Cuervo, Luis Guillermo Santos, Ángela Marcela Hernández,
María del Socorro Balcázar, Graciela Mafla, Ericson Aranzales, Cesar Ocampo,
Arsenio Ciprian, Orlando Toro, Daniel Debouck.

Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT

1. Introducción

El Grupo Consultivo sobre Investigaciones Agrícolas Internacionales (CGIAR), creado en 1971, es una alianza estratégica de diversos donantes que respalda a 15 centros internacionales que trabajan en colaboración con centenares de organizaciones gubernamentales y de la sociedad civil, y empresas privadas de todo el mundo. Estos centros en conjunto contienen más de 690.000 accesiones de cultivos, forrajes y especies agroforestales. Éstos incluyen las variedades tradicionales desarrollados a través de muchas generaciones de selección por los agricultores, así como especies silvestres, líneas de mejoramiento de cultivos, y variedades mejoradas. Dentro de los cultivos conservados se encuentran el trigo, el arroz, el maíz, el frijol, la patata, la yuca, el banano, el plátano, etc.

Debido a la necesidad de proteger estas colecciones, en 1994, la mayoría del germoplasma resguardado en los bancos genéticos del CGIAR pasó formalmente a estar en fideicomiso para la comunidad mundial bajo la autoridad intergubernamental de la Organización para la Alimentación y la Agricultura de las Naciones Unidas (FAO). En Octubre del 2006 se firma un acuerdo ya directamente entre el Centro individual del CGIAR y el Órgano Rector del Tratado Internacional, siguiendo la figura legal del fideicomiso y teniendo en cuenta la propiedad legal de los países sobre sus recursos genéticos.

Los centros tienen la responsabilidad de asegurar que las colecciones en depósito estén conservadas y mantenidas bajo los estándares internacionales y a disposición del público bajo los términos del Tratado Internacional sobre los Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura de la FAO.

En este capítulo se describirá el funcionamiento y manejo del banco de germoplasma del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), con el objetivo de conocer su manejo y funcionamiento. El CIAT está ubicado en la ciudad de Cali, Valle del Cauca, Colombia.

El Programa de Recursos Genéticos (PRG) del CIAT se dedica a proteger la diversidad genética del frijol, la yuca y los forrajes tropicales; así como la de sus parientes silvestres, combinando métodos de conservación, tanto in situ como ex situ. Igualmente la distribución de materiales es una razón fundamental de la existencia de este banco de germoplasma, el cual parte de la premisa que los materiales distribuidos deben cumplir con tres requisitos de calidad: i) calidad fisiológica (que el material distribuido esté viable), ii) calidad sanitaria (que el material distribuido se encuentre libre de enfermedades de importancia cuarentenaria), y iii) calidad genética (se refiere a que el material tenga las características anunciadas en los catálogos, páginas de internet, etc.).

En la primera parte se hace una descripción de los procesos realizados para el manejo

de germoplasma de frijol y forrajes, luego un enfoque al manejo de germoplasma de yuca, y por último, se hace referencia a la documentación y sistema de información de las colecciones.

Estas colecciones, que se consideran las más grandes del mundo en su categoría, contienen más de 60.000 accesiones, como muestras de semillas y de otros materiales ve-

getales reproductivos, representan más de 720 especies y han sido obtenidas en más de 141 países.

El PRG distribuye anualmente de 5.000 a 9.000 accesiones dentro del país anfitrión y externamente a más de 100 países, los cuales se benefician tanto del servicio de distribución de germoplasma como de toda la información relacionada.

2. Descripción de las colecciones conservadas en CIAT

2.1. Colección de frijol

Se conserva en forma de semilla y es la colección de frijol más grande y diversa del mundo con 36.197 materiales de *Phaseolus* spp. hasta la fecha, correspondientes a 44 taxones provenientes de 109 países, en donde su mayor representante es *Phaseolus vulgaris* (frijol común) que cuenta con el 86% del total de esta colección.

La mayor representación corresponde a los centros primarios de origen en el Neotrópico, especialmente México, Perú, Colombia y Guatemala, pero también se conservan colecciones importantes de Europa y África, y en menor proporción de Asia. Aunque falta todavía trabajo de coleccionar y estudiar las especies silvestres, la colección ya cuenta con 1.855 materiales de éstas, aparte de más de 33.000 materiales de formas cultivadas. La diversidad de la colección también se refleja en los hábitos de crecimiento, desde los arbustivos hasta los trepadores indeterminados, los materiales precoces, dando su cosecha a los dos meses, y materiales tardíos que se demorarán unos años antes de producir sus semillas. Igualmente la colección alberga la mayor parte de los genes de resistencia a las enfermedades, plagas, y problemas de estrés abiótico conocidos en el cultivo.

2.2. Colección de pastos tropicales

Se conserva igualmente en forma de semilla y es una de las colecciones de forrajes tropicales de mayor tamaño y diversidad en el mundo, con 23.140 materiales (127 géneros y 700 especies) hasta la fecha. Esta colección única para las zonas tropicales de suelos poco fértiles por debajo de 1.200 msnm, cuenta con 21.460 materiales de leguminosas y 1.680 materiales de gramíneas, procedentes de 72 países.

Entre los años 1977 y 1993 se realizaron 75 exploraciones que aportaron más de la mitad del material conservado, contribuyendo así a la originalidad de la colección, y se recibieron 9.877 materiales de 41 países en calidad de donación.

La colección en su mayoría está representada por materiales originarios de la América tropical con más de 13.900 números, seguidos por los de Asia tropical, África, y una pequeña cantidad proveniente de Oceanía y Europa. En la colección también se refleja una amplia diversidad en formas de vida donde se pueden encontrar alrededor de 17.600 materiales perennes, 2.849 semiperennes y más de 500 anuales; 656 materiales arbustivos, más de 371 árboles y 22.142 consideradas como herbáceas.

Hacen parte de esta colección materiales con características especiales como *Cratylia ar-*

gentea, *Flemingia macrophylla*, *Stylosanthes guianensis* var. *pauciflora*, que son tolerantes a sequía, otros tolerantes a inundaciones como *Brachiaria arrecta*, *Brachiaria mutica*, algunos *Aeschynomene*, *Clitoria* y *Vigna*. Existe un gran rango de altitudes donde crecen estas especies que van desde 0–2.780 msnm, las cuales también presentan un amplio rango de ciclos de producción que van desde 45 días a 10 años.

2.3. Colección de yuca

La colección del género *Manihot* Mill conservada en el laboratorio de conservación *in vitro* es considerada la más importante a nivel mundial por el número de materiales conservados, la diversidad genética, y las áreas geográficas representadas. Se encuentra actualmente representada por 6.467 materiales y está constituida por tres categorías: 5.584 materiales de yuca cultivada (*Manihot esculenta*) procedentes de 28 países, 883 materiales de las especies silvestres del género *Manihot* (33 especies) y 408

materiales mejorados por el CIAT. Estos materiales comprenden razas nativas de América Latina y de Asia, clones elite seleccionados por el CIAT y por el Instituto Internacional de Agricultura Tropical (IITA), situado en Nigeria, y varias especies silvestres de *Manihot*.

La colección está representada en un alto porcentaje por las zonas de origen y de alta diversidad para la yuca. Materiales de Colombia (37,7%) y Brasil (24,1%) se encuentran ampliamente representados, pero también se conservan colecciones de otros países de Sur América (21,2%), y en menor proporción materiales de América Central y el Caribe (7,2%), Asia (7,1%) y otros países (2,5%).

Un total de 883 genotipos correspondientes a 33 de las 98 especies silvestres reportadas para el género son conservados. Muchas de estas especies presentan características de interés para los programas de mejoramiento por ser fuentes potenciales de variabilidad para la especie cultivada.

3. Manejo del germoplasma de frijol y pastos tropicales

Con el propósito de disponer, en cualquier momento, de materiales de la colección con una óptima calidad sanitaria, fisiológica y genética, de asegurar la colección base, de mantener duplicados de seguridad en lugares externos al CIAT, de poder en forma general, realizar un manejo efectivo de las colecciones, se estableció un orden de actividades representadas en el diagrama de flujo en el manejo de germoplasma de frijol y forrajes (Figura 1), (Debouck, 2009).

Mediante este diagrama de flujo y para una mayor eficiencia y control de calidad, el grupo de conservación contrata servicios a dos grupos de producción especializados, y a tres laboratorios de control de calidad: Viabilidad, Sanidad, y Calidad Genética.

3.1. Introducción y postcuarentena

La introducción de materiales nuevos, aún no existentes en la colección, puede realizarse a partir del intercambio con otra institución o mediante colectas. Después del ingreso de una accesión, se hace la asignación del número CIAT, designación a la FAO y toma de imagen digital. Posteriormente, los materiales entran directamente a conservación, luego se contratan los servicios de multiplicación a producción. El objetivo de la multiplicación es aumentar el tamaño de la muestra para cumplir con todos los otros procesos del diagrama de flujo general del banco de germoplasma del CIAT. Cuando no se tiene experiencia sobre adaptación de especies, inicialmente, se hace la selección de acuerdo

por un proceso cuarentenario. Este proceso consiste en germinar las semillas y sembrarlas en una casa de malla aislada o en un invernadero de vidrio cerrado, de acuerdo a la categoría de riesgos del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), en donde serán revisadas periódicamente por funcionarios de esta institución, quienes regulan las normas para la importación y exportación del material vegetal. Posterior al recibo de las plantas, se realiza la inspección para determinar si existe algún problema fitosanitario como la presencia de bacterias, hongos y principalmente virus. Finalmente, es esta institución autoriza el ingreso de los materiales para su multiplicación en campo.

3.2. Producción de semillas

La producción de semillas es un proceso fundamental en el manejo del Banco de Germoplasma y comprende diferentes actividades como son la regeneración o refrescamiento, la multiplicación, la reproducción vegetativa (esquejes), la caracterización, la evaluación, y la cosecha, entre otros.

La responsabilidad de conservar y distribuir estas colecciones tiene, para el grupo de producción, varias implicaciones raramente satisfechas con el material original, por este motivo hay que aumentar la semilla original, asegurándose de obtener las cantidades necesarias para permitir la distribución de las mismas, por lo menos durante 30 años, sin necesidad de estar continuamente multiplicando la colección, lo que aumentaría los costos, los riesgos de mezclas mecánicas, contaminación genética por cruzamientos accidentales, deriva genética, erosión genética interna, y posibles infecciones por patógenos.

Adicionalmente, se producen copias para los duplicados de seguridad, para el país de origen si lo requiere, para el caso de colecciones núcleo, para fuentes de genes especiales, etc.

Del mismo lote de semillas aumentadas en estas condiciones saldrán submuestras para la verificación de la viabilidad, la cual se hace periódicamente, cada 5 ó 10 años, y la calidad sanitaria que es única, en ambos casos hay que prever las cantidades de semillas que se van a consumir durante estos procesos.

Para el cumplimiento de estos objetivos, el grupo de producción cuenta actualmente con tres estaciones con ambientes contrastados en Palmira, departamento del Valle del Cauca (altitud: 965 msnm, temperatura promedio: 23,8° C, precipitación promedio: 913 mm/año), Santander de Quilichao, departamento del Cauca (altitud: 990 msnm, temperatura promedio: 23° C, precipitación promedio: 1.800 mm/año, y Popayán, departamento del Cauca (altitud: 1730 msnm, temperatura: 18,1 °C, precipitación: 2377 mm/año). Además, cuenta con invernaderos y casas de malla en estos sitios para los procesos de multiplicación y regeneración.

Se aprovechan estos ciclos de producción para verificar la identidad de la especie, y avanzar la caracterización del germoplasma mediante el uso de descriptores morfoagronómicos que servirán para la gestión futura de la colección. Esta caracterización es parte de la verificación de la diversidad, siendo un aspecto importante de relevancia de las colecciones. La información recogida en la pre-caracterización morfoagronómica más la caracterización bioquímica proporcionan soporte para la detección de duplicados, ubicación de ambientes adecuados para la multiplicación de semilla, y la separación de nuevas variantes morfogenotípicas para el manejo como sub-números, entre otros.

En algunas ocasiones se tienen dificultades para la obtención de semillas. Cuando esto sucede, la opción de reproducción vegetativa por el método de producción de esquejes, es practicada en el banco, igualmente se está tratando de implementar la conservación y/o multipli-

cación *in vitro* de accesiones con problemas de establecimiento en campo y/o invernadero.

3.3. Cosecha

Una vez los materiales han alcanzado su madurez fisiológica se procede a la cosecha, la cual es muy variada y de mucho cuidado, debido a la gran cantidad de especies que se manejan. Estas cosechas se deben hacer muy uniformemente, es decir, tomando semilla por partes iguales de cada planta para poder mantener la integridad genética de cada material. Todas las cosechas se hacen de forma manual para evitar mezclas mecánicas.

3.4. Presecado, trilla y limpieza

Una vez recibida la cosecha es muy importante colocarla a secar inmediatamente, pues los frutos en este momento están con una humedad del 15-25%, dependiendo de factores tales como la carnosidad, la turgencia y el clima; posteriormente se debe llevar a un porcentaje de humedad del 12-14%, que es el contenido de humedad ideal para empezar las labores de trilla y limpieza (Lima *et al.*, 2009).

Para lograr este presecado los frutos se introducen dentro de bolsas de muselina que se disponen en secadores de aire fresco (SAF,

T=20° C y HR: 35%) o secadores a temperatura ambiental (sin calor) de aire pulsado, en cajas plásticas ventiladas sobre las parrillas para facilitar su deshidratación. El tiempo de secado para alcanzar el contenido de humedad óptimo depende de cada especie y del volumen de semillas. Posterior a este tiempo los frutos son desgranados de acuerdo a sus características morfológicas.

Luego de la trilla, vendrán los procesos de limpieza y de secado, para asegurar que uno de estos dos permita obtener 5% o menos en humedad de las semillas, garantía para que se conserve a largo plazo.

Durante este proceso es muy importante realizar algunos procedimientos y tomar ciertos datos como son: limpieza preliminar, comparación con imagen digital, comparación con semilla original, separación de variantes fenotípicas (segregantes), toma de la humedad, peso de 100 semillas, peso total en gramos, total de semillas cosechadas, forma, colores, brillo de semillas, ingreso de información a la base de datos, y por último, generación de listados.

3.5. Calidad de semillas y almacenamiento temporal

Cuando las semillas son extraídas de sus frutos, se someten a un control de cantidad (el banco de semillas del PRG del CIAT tiene estipulado unas metas de cantidad de semillas que oscilan entre 340 y 6.900 semillas dependiendo de la accesión) y se controla rigurosamente la calidad donde se seleccionan una a una, descartando las que presentan semillas vanas, semillas con algún tipo de manchas, y semillas que contengan perforaciones provenientes de picaduras de insectos (Figura 2).

Todas las semillas pasan por un segundo proceso de desecación donde son dispuestas en bolsas de muselina en un cuarto de secado que tiene temperatura y humedad controlada (20° C y HR: 20%) hasta lograr alcanzar un



Figura 2. Selección de las mejores semillas

contenido de humedad alrededor del 9%. Del lote seco y limpio de semillas, se extrae una muestra de 50 y 100 unidades (frijol y forrajes respectivamente) que se envía al laboratorio de viabilidad donde se observa la calidad fisiológica de las semillas; otra muestra de 200 unidades se envía al laboratorio de sanidad de germoplasma donde se verifica la calidad sanitaria de los materiales.

Las semillas que no alcanzan la meta de cantidad se depositan dentro frascos herméticos, los cuales se guardan en un cuarto frío de almacenamiento temporal a 7° C hasta que se logre este objetivo, unificando cosechas hasta de dos años, pero de la misma procedencia. De lo contrario, las semillas se vuelven a enviar a producción para ser refrescadas y no permitir su envejecimiento.

3.6. Calidad fisiológica de las semillas

La viabilidad de las semillas se define como la cantidad de semillas de un lote que estén vivas y que pueden llegar a convertirse en plantas capaces de reproducirse en condiciones de campo (Rao *et al.*, 2007). Siguiendo este parámetro, el laboratorio de viabilidad de semillas, realiza dos pruebas diferentes para determinar el estado fisiológico de las semillas: pruebas de germinación y prueba de Tetrazolio.

3.6.1. Pruebas de germinación

Estas pruebas se realizan para determinar la proporción de semillas que producen plántulas normales, capaces de desarrollarse en plantas reproductivamente maduras (Rao *et al.*, 2007). Se realizan pruebas de germinación en arena y en papel, según las metodologías establecidas por el ISTA (ISTA, 2009).

La prueba de Tetrazolio se utiliza como un procedimiento de apoyo para identificar semillas viables pero dormantes que no han brotado al final de una prueba de germinación

(Rao *et al.*, 2007). Esta prueba también se hace en el laboratorio de viabilidad del PRG del CIAT, de forma rutinaria, a todos los materiales de gramíneas de la colección de forrajes por sus características de silvestre.

Para estas pruebas el banco de semillas del PRG sólo acepta materiales que tengan más de 85% de viabilidad; si la viabilidad está por debajo de este porcentaje se rechaza el lote y entra en lista de espera para ser de nuevo enviado a multiplicación en campo.

3.7. Verificación de la calidad sanitaria de las semillas

La distribución y conservación de germoplasma libre de patógenos y plagas implica inicialmente una producción controlada de las semillas o del material vegetativo de propagación, posteriormente, un plan de manejo postcosecha que mantenga la sanidad de los materiales, y finalmente un proceso de análisis de laboratorio que certifique su calidad fitosanitaria.

Con el objetivo de minimizar los riesgos asociados al movimiento de germoplasma, especialmente el transporte de patógenos y plagas de interés cuarentenario, en el CIAT existe un Laboratorio de Sanidad de Germoplasma (LSG) que tiene la responsabilidad de verificar el estado fitosanitario del germoplasma que distribuye el Banco de Germoplasma y demás programas del CIAT, a nivel nacional e internacional. El LSG certifica que el material esté libre de enfermedades cuarentenarias aplicando las regulaciones existentes en Colombia y en el país receptor.

Mediante previo acuerdo entre el CIAT y el ICA, organismo adscrito al Ministerio de Agricultura de Colombia, se encuentra dentro de CIAT una oficina de la División de Sanidad Vegetal (Sección de Inspección y Cuarentena) del ICA, que se encarga de la inspección de

material con el fin de prevenir la diseminación de enfermedades transmitidas por semilla, reducir al mínimo el riesgo accidental de introducción de plagas y patógenos a Colombia, supervisar los invernaderos, los invernaderos de cuarentena donde se encuentra el germoplasma importado, inspeccionar lotes e invernaderos de multiplicación de germoplasma, y por último certificar la sanidad de la semilla utilizada para envíos internacionales según pruebas de sanidad realizadas en el LSG del CIAT.

3.7.1. Metodología para certificar el germoplasma de frijol y pastos tropicales

La metodología empleada para certificar la sanidad del material genético a transferir se fundamenta en los resultados de la inspección que se hace durante la producción de las semillas. Un control sanitario preventivo se lleva a cabo durante los ciclos de producción del germoplasma, minimizando así el riesgo de presencia de patógenos transmisibles por semilla, y teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el análisis proveniente del LSG (Figura 3).

En este laboratorio se examinan muestras de semillas para patógenos (hongos, bacterias, virus) de interés cuarentenario que se presentan en los lugares de producción o que se consideran como un riesgo sanitario de importancia en nuestro país o en el país de destino, y que aparecen registrados en las guías técnicas para el movimiento de germoplasma (Frison *et al.*, 1990). Adicionalmente, se inspecciona la presencia de nematodos (*Meloidogyne* spp. y *Pratylenchus* spp.) y de algunos coleópteros (*Acanthoscelides* spp. y *Zabrotes* spp.) que pueden causar daño a las semillas. Los métodos para detectar patógenos pueden variar por cada organismo y huésped, y se requieren procedimientos definidos para una identificación precisa de la mayoría de patógenos (Kameswara *et al.*, 2006).

Para realizar los análisis de laboratorio, se

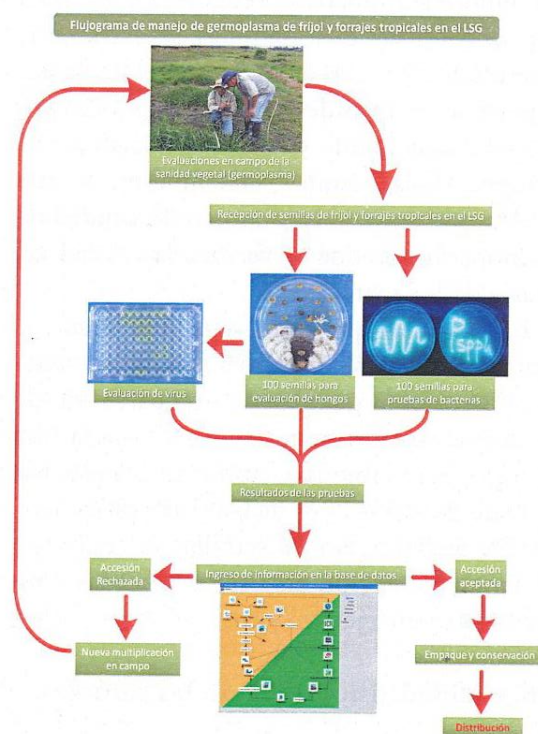


Figura 3. Actividades para la realización de las pruebas de diagnóstico de fitopatógenos cuarentenarios en el LSG

toman al azar, de los paquetes a enviar o almacenar, muestras representativas no inferiores a 200 semillas; se subdivide la muestra principal en dos submuestras de 100 granos, y se empacan por separado en bolsas de papel nuevas (Cuervo *et al.*, 2009).

Metodología utilizada para la detección de hongos

La identificación de los hongos cuarentenarios se realiza por los métodos de Blotter y de Agar plato, aprobados como métodos estándar por la Asociación Internacional para la Evaluación de Semillas (ISTA) (Kameswara *et al.*, 2006), y basados en claves taxonómicas para la identificación de hongos imperfectos. Para analizar las semillas de leguminosas se sigue la metodología de Agar Test (Kameswara *et al.*, 2006).

Metodología utilizada para la detección de bacterias

En general, la metodología usada para el diagnóstico de bacterias es la misma para frijol y forrajes tropicales; esto incluye diluciones de las muestras previamente remojadas en solución salina, plateo en agar específico para cada género, e incubación y lectura de características morfológicas. Finalmente se confirma el diagnóstico con pruebas serológicas específicas.

Metodología utilizada para la detección de virus

En el diagnóstico de virus para frijol, leguminosas forrajeras y pastos tropicales se utiliza una metodología común. Se realiza el diagnóstico mediante la técnica serológica de ELISA con kits comerciales específicos para cada virus. Adicionalmente, en el LSG se realizan pruebas de diagnóstico molecular de acuerdo a requerimientos específicos.

Después de tener los datos con las diferentes pruebas realizadas se procede a registrarlos en la base de datos del PRG.

3.8. Verificación de la calidad genética de las semillas

La calidad genética del germoplasma es uno de los objetivos primordiales de la conservación *ex situ*, ya que permite una mejor conservación, una reducción de su costo financiero y un uso más eficiente del germoplasma distribuido. La responsabilidad principal del Laboratorio de Calidad Genética del PRG del CIAT es asegurar que cada accesión conservada represente una fracción única de la diversidad genética de cada cultivo, asegurando la integridad genética de esta diversidad desde la etapa de adquisición hasta la distribución del germoplasma. Esta doble verificación permite orientar los trabajos de prospección y colecta de materiales (frecuentemente amenazados por extinción), lo que permite introducir germoplasma genéticamente nuevo y

llenar los vacíos genéticos existentes en las colecciones. Lo anterior permite que las colecciones estén cada vez más relevantes, con miras a su uso directo: agronomía, fitomejoramiento y genómica. Finalmente, la calidad genética inserta valor agregado a las colecciones, de tal forma que los usuarios presentes y futuros del germoplasma, puedan encontrar documentada y caracterizada, la variación que necesiten.

3.8.1. Metodología para verificar la calidad genética

Para desarrollar la calidad genética debemos utilizar las tecnologías actualmente disponibles para el análisis genético del germoplasma, como son los diferentes tipos de marcadores bioquímicos (proteínas de reserva de semilla y enzimas del metabolismo) y moleculares de ADN (RFLPs, SSRs, y AFLPs) (CIAT, 1995; Ocampo y Hernández, 2011). Estos marcadores constituyen una plataforma molecular para la genotipificación del germoplasma, la cual nos permite identificar cada una de las accesiones conservadas y monitorear su integridad genética durante todo el proceso de la conservación *ex situ*.

Esta verificación es diferente de acuerdo a la naturaleza del cultivo. Para los cultivos de propagación vegetativa, como el germoplasma de *Manihot*, se verifica la integridad genética del germoplasma conservado en el tiempo, y para la yuca cultivada, se rastrean e identifican las copias genéticas internas de la colección. En cambio para el germoplasma conservado por semilla sexual (*Phaseolus* y forrajes tropicales) se debe evitar que durante la multiplicación de la semilla ocurra contaminación genética por cruzamientos accidentales, deriva y erosión genética. Finalmente, para ambos tipos de germoplasma, hay que evitar la ocurrencia de contaminación mecánica, para esto es necesario el monitoreo genético periódico durante la multiplicación del germoplasma.

3.9. Empaque, conservación y distribución de semillas

Después de que las semillas han sido aprobadas por viabilidad y sanidad se entregan al área de empaque, donde se someten a un último secado (20° C y HR: 10%) hasta que logren alcanzar un contenido de humedad alrededor del 5-6%, recomendable para empaquetar y conservar las semillas durante 35-40 años a -18° C.

El empaque consiste en colocar una muestra de semillas, contada o pesada en un recipiente (para este caso usamos bolsa de aluminio plástico trilaminar) que luego se cierra herméticamente (empacadas al vacío) para su posterior almacenamiento (Figura 4). Las semillas se empaquetan para evitar que absorban agua después del secado, para mantener las accesiones separadas y evitar mezclas, así como para prevenir la contaminación de insectos y patógenos (Rao *et al.*, 2007).

En el banco de semillas del PRG del CIAT se empaquetan muestras de semillas para cinco objetivos diferentes:

- *Muestra base:* Está representada por 4 dosis de 100 semillas, las cuales serán usadas para una posterior regeneración de los materiales, cuando sea necesario.
- *Duplicados de seguridad:* Es una submuestra genéticamente idéntica a la accesión que está almacenada en otro sitio (preferiblemente fuera del país) a manera de seguro contra la pérdida del material. Actualmente, el PRG del CIAT mantiene un total de 27.501 accesiones de frijol y 13.893 accesiones de forrajes que están almacenados en la Bóveda Global de Semillas en Svalbard, Noruega y 20.271 accesiones de frijol y 10.061 de forrajes en el Centro Internacional para el Mejoramiento del Maíz y Trigo (CIMMYT) en México.



Figura 4. Muestras de semillas empacadas al vacío en bolsas de aluminio plástico

- *Repatriación:* Es devolver una submuestra idéntica de la accesión, al país de origen del material, en caso de ser requerido.
- *Distribución:* Es el suministro de muestras representativas de accesiones de semillas en respuesta a solicitudes de los usuarios de germoplasma (internas y externas). Desde la conformación del banco de semillas del CIAT (años: 1973 para frijol y 1980 para forrajes tropicales hasta el 31 de diciembre de 2010) se ha distribuido a 103 países alrededor del mundo, un total de 418.762 muestras de frijol, correspondiente a 34.707 accesiones (95.3% de toda la colección), y 85.342 muestras (13.495 accesiones), representadas en el 58.3% de lo que se tiene conservado a la fecha, para forrajes. Cabe anotar que todos estos envíos van acompañados del Acuerdo Normalizado de Transferencia de Materiales (SMTA, sigla en inglés, previamente aceptado), y de un certificado fitosanitario expedido por la entidad cuarentenaria colombiana, ICA, para nuestro caso).
- *Monitoreo:* Es la verificación regular de la calidad fisiológica de las accesiones de germoplasma almacenadas en el banco. Este monitoreo se hace en el banco de semillas del PRG del CIAT cada 5 años, y consiste en retirar los materiales que se encuentran conservados a -18° C, tomar una muestra de 25 a 50 semillas dependiendo de la ac-

cesión y enviarla al laboratorio de viabilidad para ver si se ha alterado la calidad fisiológica de las mismas. Si la prueba arroja resultados por encima del 85%, se continúa conservando la semilla por 5 años más

a -18°C , hasta que se le realice la siguiente prueba. Si el resultado es por debajo de este porcentaje se envía nuevamente la semilla a campo para su posterior refresco y recuperación.

4. Manejo de la colección in vitro de yuca

4.1. Introducción

La introducción de materiales a la colección se puede hacer de tres formas diferentes: material vegetativo (estacas), proveniente de centros experimentales o colectas realizadas en el país anfitrión, en forma in vitro, provenientes

de los países donantes, o en forma de semilla botánica y posterior rescate de embriones específicamente para las especies silvestres.

Con el objetivo de tener un óptimo manejo de la colección *in vitro* se estableció un diagrama de flujo de actividades, que se describirán a continuación (Figura 5), (Mafla *et al.*, 2010).

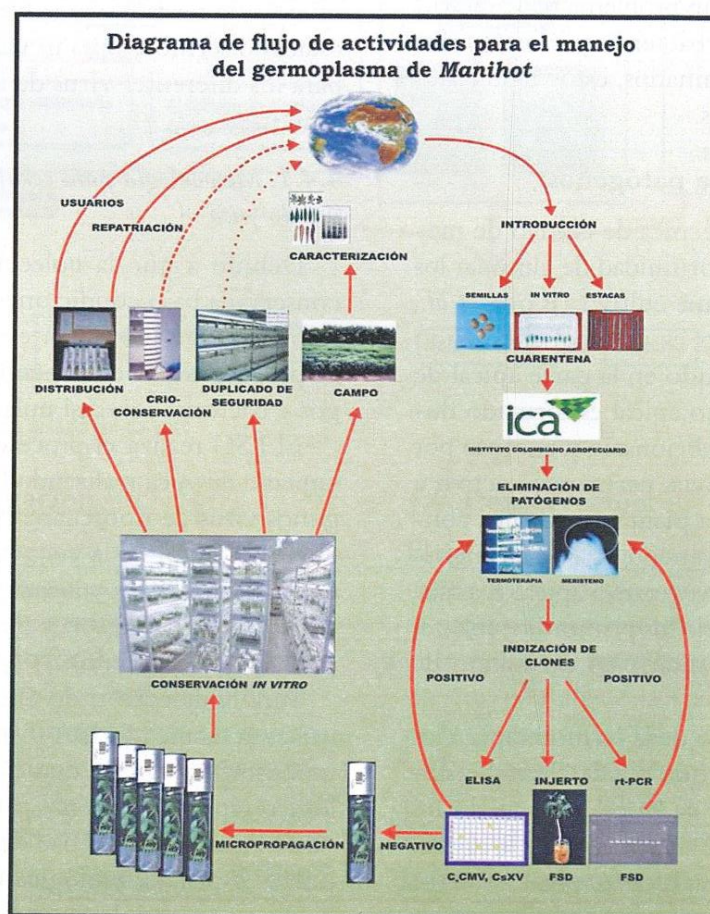


Figura 5. Diagrama de flujo de actividades para el manejo del germoplasma de *Manihot*

4.2. Cuarentena

En Colombia, ICA es la entidad que regula las normas para la importación y exportación del material vegetal. De común acuerdo entre el CIAT y el ICA se han diseñado los procedimientos que permiten manejar el germoplasma que es introducido a la colección *in vitro* de *Manihot*. El permiso de importación, expedido previamente por el ICA, el certificado fitosanitario, expedido por la entidad oficial fitosanitaria del país donante, y el listado con los datos de pasaporte, son la información y documentación requerida para las variedades enviadas. Posterior al recibo de las plantas, se realiza la inspección de las mismas para determinar si existe algún problema fitosanitario (contaminación con bacterias y hongos). En caso de estar contaminados, estos materiales deben ser incinerados.

4.3. Eliminación de patógenos

La utilización de la técnica de cultivo de meristemas ofrece la oportunidad de eliminar los virus existentes en un cultivo (Roca *et al.*, 1991). El meristemo es un pequeño tejido (0,2-0,3 mm) localizado en la parte apical de la yema. El meristemo apical es formado durante el desarrollo embrionario y, excepto por periodos de dormancia, permanece activo a través de la vida de la planta. La técnica consiste en aislar asépticamente la región meristemática de la yema vegetativa apical o axilar, juntamente con 1-2 de los primordios foliares más jóvenes, e implantarla en un medio de cultivo estéril.

El principio básico de la termoterapia a los tejidos infectados es que puede alterar la síntesis viral y retardar la translocación de los virus en la planta, de tal forma que la región libre de virus del meristema apical aumenta de tamaño y, por lo tanto, se hace más factible la limpieza (Roca *et al.*, 1991).

La termoterapia, al afectar el metabolismo celular, parece que altera la síntesis del virus, por lo tanto, el éxito de la termoterapia depende de la capacidad que tenga el tejido de soportar periodos largos de alta temperatura que inactiven el virus sin afectar significativamente el crecimiento del tejido (CIAT, 1982; Roca *et al.*, 1991). Los métodos para el saneamiento de clones infectados por virus se pueden aplicar a las estacas (*in vivo*) o a los materiales *in vitro*.

4.4. Certificación sanitaria

Las plantas establecidas que han sido obtenidas después de haber sido sometidas al tratamiento de termoterapia, bien sea a partir de estacas o termoterapia *in vitro*, son evaluadas para los diferentes virus de importancia cuarentenaria.

4.4.1. Metodología para certificar el germoplasma de yuca

Debido a que la colección de yuca está conservada bajo condiciones asépticas en que se multiplica y conserva el material *in vitro*, las probabilidades de contaminación por hongos y bacterias son casi nulas.

El LSG realiza el proceso de certificación sanitaria de yuca realizando la detección de algunos virus de tipo cuarentenario como son: el virus común de la yuca (CsCMV), virus X de la yuca (CsXV), y la enfermedad del cuero de sapo (CSY) (Frison y Feliu, 1991; Cuervo *et al.*, 2009) (Figura 6).

Para la detección de CsCMV y CsXV se utiliza la técnica ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), que es un método serológico rápido y eficiente para la detección de virus. Para la enfermedad del cuero de sapo se utiliza la prueba biológica de injerto y también una metodología molecular por medio de PCR.

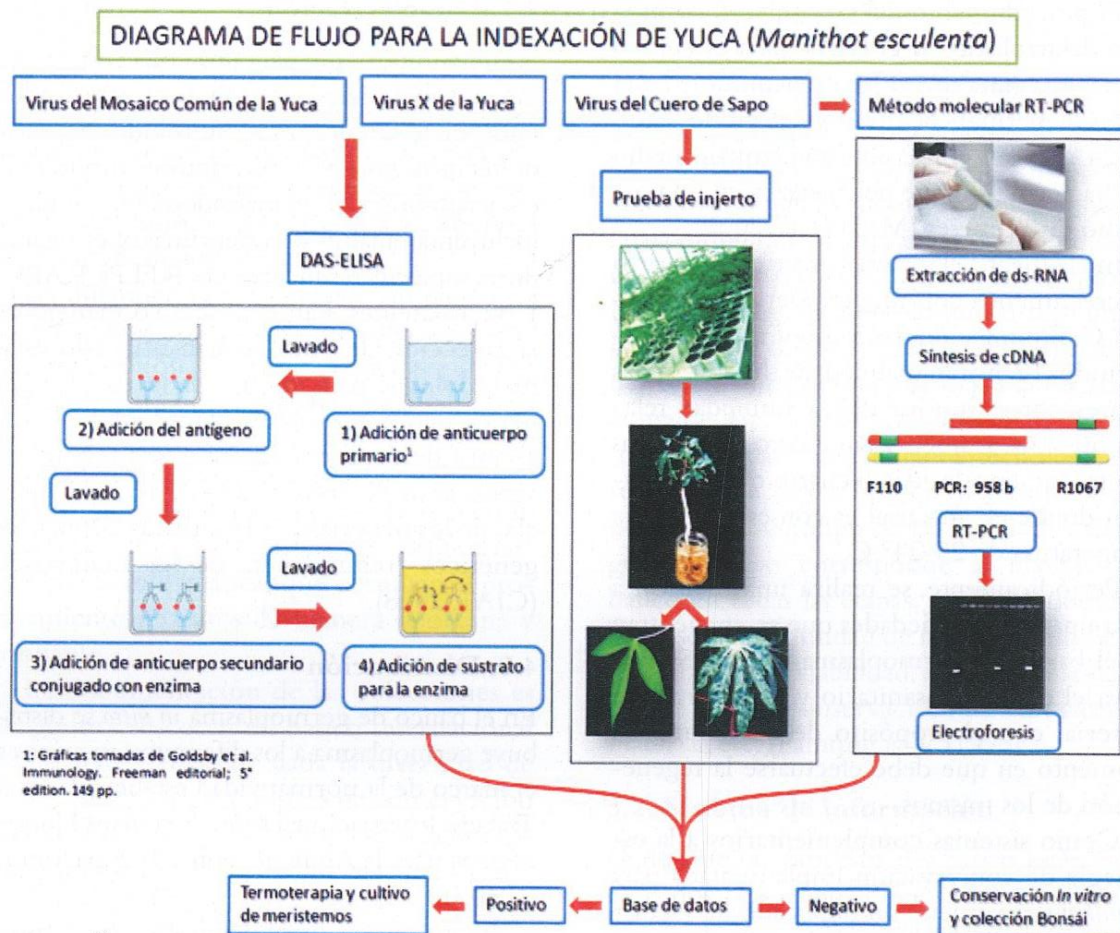


Figura 6. Diagrama de flujo indexación de yuca

4.5. Micropropagación

Es la multiplicación masiva de una especie a partir de tejidos u órganos, bajo condiciones *in vitro*, para obtener, mantener, y multiplicar los materiales genéticos. Los materiales que han resultado negativos en las diferentes pruebas de indización necesitan ser micropropagados con el fin de incrementar el número de explantes por cada clon y poder obtener posteriormente los 5 tubos por clon que se requieren para introducirlos al banco de germoplasma *in vitro*.

4.6. Conservación

El método de conservación *in vitro* consiste en mantener los cultivos en condiciones físicas o químicas que permiten extender al máximo el intervalo de transferencia a medios frescos sin que ello afecte la viabilidad y estabilidad de los cultivos (CIAT, 1984).

La tasa de crecimiento de los cultivos *in vitro* puede ser controlada empleando principalmente factores como temperatura, nutrientes orgánicos e inorgánicos, intensidad de la luz y fotoperiodo, reguladores de crecimiento, reguladores osmóticos e inhibidores de etileno.

El procedimiento del crecimiento controlado desarrollado en el CIAT para el cultivo de la yuca (medio NP) ha permitido que el material permanezca por un periodo entre 18-24 meses y el método tradicional (medio 8S) ha permitido que permanezca en un promedio de 11 meses (Mafla *et al.*, 2000).

Inicialmente, el material crece en un cuarto de crecimiento con una temperatura de 27-28° C, iluminación 18,5 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fotoperiodo 12 horas (calidad de luz lámparas fluorescentes, tipo luz día), y humedad relativa 50-70%. Transcurridas cuatro semanas las plantas son transferidas al cuarto de conservación donde el material es conservado a una temperatura de 23-24° C.

Periódicamente, se realiza una revisión a cada una de las variedades que se encuentran en el banco de germoplasma *in vitro*. Se observa el estado fitosanitario y fisiológico del material con el propósito de determinar el momento en que debe efectuarse la regeneración de los mismos.

Como sistemas complementarios a la estrategia de conservación implementada para *Manihot* se mantiene un duplicado de seguridad. Un total de 3 tubos por material son enviados (en el medio de crecimiento mínimo, NP) al Centro Internacional de la Papa (CIP) en Perú, como parte de un 'Black box' de yuca (un duplicado no activo). La colección núcleo de yuca (630 accesiones) es también conservada como duplicado de seguridad en nitrógeno líquido.

4.7. Caracterización

Resulta importante para una colección *ex situ* que sus materiales estén bien caracterizados, esto puede ser alcanzado utilizando una serie de técnicas como: a) descriptores morfológicos y agronómicos, b) marcadores bioquímicos, incluyendo análisis de isoenzimas, y c) marcadores moleculares incluyendo RFLPs, RAPDs y microsatélites. Para un efectivo manejo de la colección de yuca, se han utilizado estas metodologías para verificar la integridad genética de los materiales mantenidos bajo la técnica de conservación *in vitro* (después de varios años de conservación), detectar mezclas de los materiales, e identificar duplicados genéticos (redundancia de los materiales) (CIAT, 2008).

4.8. Distribución

En el banco de germoplasma *in vitro* se distribuye germoplasma a los diferentes usuarios en el marco de la normatividad establecida en el Tratado Internacional sobre Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura (BIBLIO).

El proceso de distribución de germoplasma *in vitro* comprende la solicitud del germoplasma, la aceptación del SMTA y el trámite del permiso de importación (cuando éste es requerido) por parte de usuario o solicitante; y por parte de los funcionarios del CIAT, la selección de los materiales, la propagación y preparación de la documentación (certificado fitosanitario, listado de materiales, manuales entre otros). Se envía 5 tubos con plántulas *in vitro* por cada una de las accesiones solicitadas, y el envío es libre de costo.

5. Documentación y sistema de información

Los bancos de recursos genéticos que se encuentran en la capacidad de mantener y disponer información suficiente y necesaria de sus colecciones, tendrán la ventaja de fomentar su utilización y beneficiar a numerosos usuarios alrededor del mundo.

La dinámica de procesos de un banco de recursos genéticos genera un flujo constante de información que requiere ser registrada, clasificada, organizada, y analizada con el fin de conocer las colecciones y manejar eficientemente el banco. Para ello, se debe contar con una actividad de documentación inherente a los procesos, y soportada por herramientas informáticas que permitan el procesamiento de datos de manera oportuna y confiable.

La documentación de las colecciones es un punto crítico en un banco internacional de recursos genéticos, dada la diversidad de los materiales, los propósitos de conservación establecidos, y los compromisos legales adquiridos con el Tratado Internacional sobre los Recursos Fitogenéticos. Además, enmarca un direccionamiento que permite el acceso a los recursos genéticos y su información.

Es imprescindible que el manejo de la documentación se encuentre estrechamente ligado a los objetivos y actividades del banco, porque permite planificar, priorizar y desarrollar estrategias entorno a la conservación del germoplasma. Los datos de pasaporte, caracterización y evaluación agregan valor a las colecciones, y contribuyen a ampliar la base de conocimiento sólo si están debidamente documentados y disponibles en una base de datos centralizada para su consulta (Engels y Visser, 2007).

5.1 Clasificación de la documentación

La documentación generalmente se clasifica en dos grupos: Un primer grupo corresponde a la documentación sobre las colecciones, la cual comprende en primera instancia los datos de pasaporte que identifican a las accesiones (identificación, nombre común o sinónimos, origen, etc.), datos de caracterización (hábito de crecimiento, número de días a la floración, altura de la planta, etc.), y datos de evaluación (características nutricionales y tecnológicas, y reacciones a estrés biótico y abiótico), que describen el fenotipo de las accesiones. El segundo grupo corresponde al manejo del banco en todas las etapas, donde se obtienen datos sobre la cantidad de material, sitio de almacenamiento, viabilidad, calidad fitosanitaria, propósitos de conservación, distribución de material, etc. (Painting *et al.*, 1993).

5.2. Sistema de información

Dado que los procesos del banco están relacionados es necesario que la información se encuentre integrada y centralizada. Compartir la información y poner a disposición el germoplasma conservado trae consigo el establecimiento de una plataforma que permita la visibilidad de la documentación sobre colecciones. Un sistema de información bien establecido debe mantener la integridad de los datos para evitar duplicaciones innecesarias, garantizando el estado de los mismos al realizar procesamientos, facilitar el acceso a la información con la debida seguridad a fin de evitar modificaciones accidentales o pérdidas. El sistema debe ser flexible, que permita adaptar nuevos requerimientos debido a cambios o mejoras en los procesos, o adicionar nuevos descriptores relevantes, además debe contar con funcionalidades que permitan al usuario

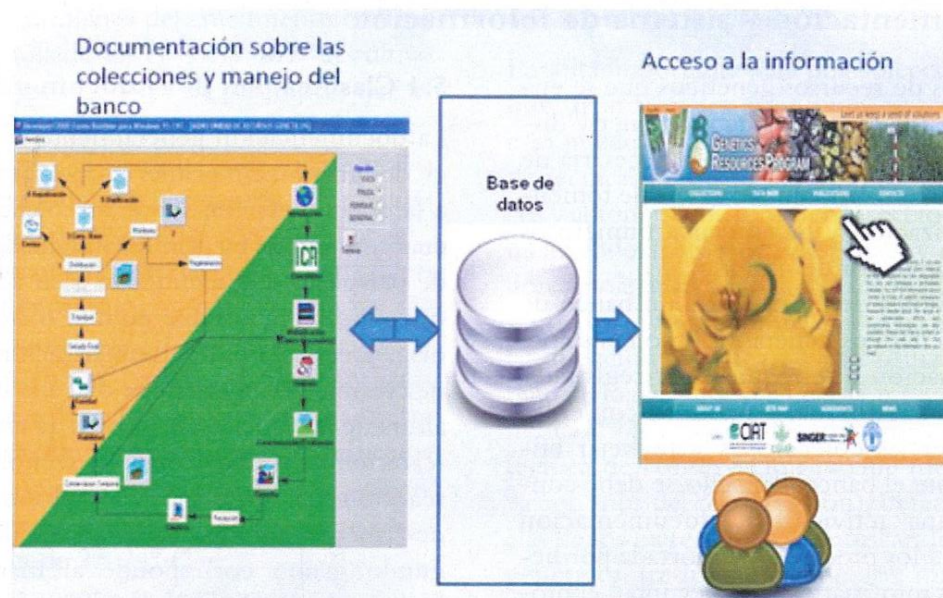


Figura 7. Arquitectura general del sistema de información del banco de recursos genéticos del CIAT

interactuar de manera sencilla y eficientemente con la información.

La arquitectura de un sistema de información en un banco de recursos genéticos generalmente está compuesta por una base de datos central, un software de gestión de información del banco y un sitio de internet que permita la visibilidad y solicitud de material a la comunidad de usuarios alrededor del mundo. Sobre este último, cabe resaltar que la información sobre colecciones debe ser filtrada y verificada por el curador o curadores del banco, mediante la utilización de funcionalidades del propio sistema informático. En la figura 7 se muestra la arquitectura general del sistema de información del banco de recursos genéticos del CIAT.

5.3. Código de barras

Manejar e identificar una cantidad considerable de materiales en las rutinas del banco, es un factor crucial que incide en tiempo, costos y calidad del trabajo. Por ello es nece-

sario tener un mecanismo que minimice errores en la marcación y lectura de las accesiones. El código de barras es una solución que ha sido empleada para abordar esta situación y para el caso del banco de recursos genéticos del CIAT ha impactado favorablemente como apoyo al sistema de información (Figura 8).

5.4. Sitio web

El compromiso que tiene el banco de recursos genéticos del CIAT con la comunidad de usuarios para poner a disposición bienes públicos internacionales, ha permitido establecer un sitio web (<http://www.ciat.cgiar.org/urg>) que permite el acceso a la información a través de un motor de búsqueda sobre la base de datos; a su vez, también ha servido como medio para la solicitud de materiales en línea, empleando la funcionalidad comúnmente conocida como 'carrito de compras' con el enlace al acuerdo de transferencia de material o también llamado por su sigla en inglés como SMTA. Además de

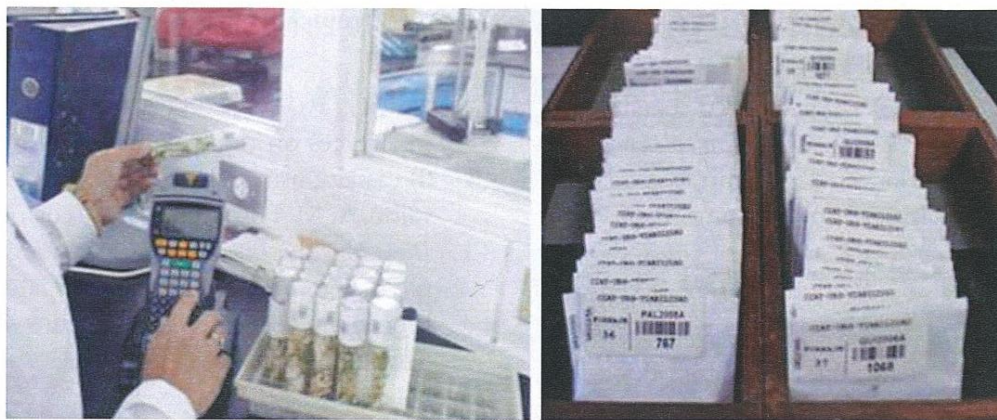


Figura 8. Sistema de código de barras utilizado en el banco de recursos genéticos del CIAT

la información de pasaporte y caracterización se ha logrado vincular datos de evaluaciones, imágenes de semillas, plantas, flores y geles (información bioquímica), igualmente se ha hecho un esfuerzo en la recuperación de informes originales de colectas de material que han sido escaneados y publicados.

El sitio web del banco del CIAT continúa su evolución con el objetivo de satisfacer las necesidades de información a los usuarios, mediante la disposición de más documentación y de nuevos descriptores relevantes, aumentando el material visual (banco de imágenes) y mejorando sus funcionalidades.

6. Referencias bibliográficas

- CIAT. 1982. *El cultivo de meristemas para el saneamiento de clones de yuca. Guía de estudio*. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia. 45 pp.
- CIAT. 1984. *El cultivo de meristemas para la conservación de germoplasma de yuca in vitro. Guía de estudio*. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia. 41 pp.
- CIAT. 2008. «Improving the efficiency of conservation Duplicate Identification. A summary of deliberations and recommendations». *Workshop «A Global Conservation Strategy for Cassava (Manihot esculenta) and Wild Manihot Species»*. CIAT, Santiago de Cali: 57-59.
- CIAT. 2011a. *Bases de datos del PRG-CIAT* (<http://isa.ciat.cgiar.org/urg/language.do>).
- CUERVO, M.; BALCÁZAR, M. S.; RAMÍREZ, J. L.; MEDINA, C. A.; DEBOUCK, D. G. 2009. *Manual de procedimientos Laboratorio Sanidad de Germoplasma. Programa Recursos Genéticos*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Palmira, Colombia. 68 pp.
- CUERVO, M.; MORENO, M. G.; FLOR, N. C.; RAMÍREZ, J. L.; MEDINA, C. A.; DEBOUCK, D. G. 2009. *Manual de procedimientos del Laboratorio de Sanidad de Germoplasma. Certificación sanitaria del germoplasma de yuca*. Programa Recursos Genéticos. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Palmira, Colombia. 26 pp.
- DEBOUCK, D. G. 2009. *Flujograma de operaciones del banco de germoplasma de CIAT*. Programa Recursos Genéticos. Centro Internacional

- de Agricultura Tropical (CIAT), Palmira, Colombia. 12 pp.
- ENGELS, J. M. M.; VISSER, L. 2007. *Guía para el manejo eficaz de un banco de germoplasma*. Manuales para Bancos de Germoplasma No. 6. Bioversity International, Roma, Italia.
- FRISON, E. A.; BOS, L.; HAMILTON, R. I.; MATHUR, S. B.; TAYLOR, J. D. (eds.). 1990. *FAO/IBPGR Technical Guidelines for the Safe Movement of Legume Germplasm*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy/International Board for Plant Genetic Resources, Rome, Italy. 88 pp.
- FRISON, E. A.; FELIU, E. 1991. *FAO/IBPGR Technical guidelines for the safe movement of Cassava germplasm*. Food and Agriculture Organization of the United Nations -FAO- and International Board for Plant Genetic Resources, Rome, Italy.
- INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. 2009. *International Rules for Seed Testing*. ISTA, Switzerland.
- KAMESWARA RAO, N.; HANSON, J.; DULLOO, M. E.; GHOSH, K.; NOWELL, D.; LARINDE, M. 2006. *Handbooks for genebanks No. 8 Manual of seed handling in genebanks*. Biodiversity International, Rome, Italy.: 50-82.
- KAMESWARA RAO, N.; HANSON, J.; DULLOO, M. E.; GHOSH, K.; NOWELL, D.; LARINDE, M. 2006. *Handbooks for genebanks No. 8 Manual of seed handling in genebanks*. Biodiversity International, Rome, Italy.: 50-82.
- LIMA, M. C.; VELÁSQUEZ, H.; SANTOS, L. G.; DEBOUCK, D. G. 2009. *Manual de procedimientos del Banco de Germoplasma. Conservación de semillas, Presecado*. Programa Recursos Genéticos. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Palmira, Colombia, 10 pp.
- MAFLA, G.; ROA, J. C.; GUEVARA, C. L. 2000. «Advances on the in vitro growth control of cassava, using silver nitrate». En: L. Carvalho, A. M. Thro, A. Duarte (eds). *Cassava Biotechnology: International Scientific Meeting-CBN (IV, 1998, Salvador, Bahia, Brazil)*. Proceedings. EMBRAPA-Recursos Genéticos e Biotecnología. Brasília, Brazil.: 439-446.
- MAFLA, G. M.; ROA, J. C.; ARANZALES, E.; DEBOUCK, D. G. 2010. *Manual de procedimientos para la conservación in vitro del germoplasma del género Manihot*. Programa Recursos Genéticos. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Palmira, Colombia. 56 pp.
- OCAMPO, C.; HERNÁNDEZ, A. 2011. *Manual de Procedimientos de Laboratorio de Calidad Genética -Parte Bioquímica* (<http://isa.ciat.cgiar.org/urg/language.do>), en proceso.
- PAINTING, K. A.; PERRY, M. C.; DENNING, R. A.; AYADA, W. G. 1993. *Guía para la Documentación de Recursos Genéticos*. Consejo Internacional de Recursos Genéticos, Roma.
- RAO, N. K.; HANSON, J.; DULLOO, M. E.; GHOSH, K.; NORWELL, D.; LARINDE, M. 2007. *Manual para el manejo de semillas en Bancos de Germoplasma*. Bioversity, International. Roma, Italia. 165 pp.
- ROCA, W. M.; NOLT, B.; MAFLA, G.; ROA, J. C.; REYES, R. 1991. «Eliminación de virus y propagación de clones en la yuca (*Manihot esculenta* Crantz)». En: W. M. Roca y L. A. Mroginski (eds.). *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y Aplicaciones*.: 403-421.