

TRABAJO ESPECIAL

ESTRATEGIAS BIOTECNOLÓGICAS PARA LA CONSERVACIÓN DE GERMOPLASMA EN EL INIA-CENIAP VENEZUELA. CASO YUCA Y MUSÁCEAS

BIOTECHNOLOGICAL STRATEGIES FOR GERMOPLASM CONSERVATION IN THE INIA-CENIAP, VENEZUELA. CASE: CASSAVA AND MUSA

José G. Albarrán*, Francia Fuenmayor*, Morela Fuchs*, Gustavo Martínez*, Adrián Rodríguez**, Edward Manzanilla**, Ezequiel Díaz**, Rommel León** y María Torrealba***

*Investigador, **Técnicos Asociados a la Investigación y ***Asistente Agropecuario. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA-CENIAP). Maracay, estado Aragua, Venezuela.

Correo electrónico: jgalbarran@inia.gov.ve, ffuenmayor@inia.gov.ve, mfuchs@inia.gov.ve, gmartinez@inia.gov.ve

RESUMEN

El Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA) de Venezuela tiene entre sus objetivos la conservación y utilización de los recursos fitogenéticos de interés agrícola. En este trabajo se presentan resultados de las experiencias en conservación *ex situ* que se han llevado a cabo en los Bancos de Germoplasma de yuca, *Manihot esculenta* Crantz y musáceas, *Musa* sp., en el Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP), específicamente en la conservación *in vitro* de 82 clones de yuca, dulces y amargos, y 99 de musáceas. En el caso de la yuca el proceso de conservación comienza con la regeneración de plantas a partir de cultivo de meristemas, cultivándose en un medio de cultivo denominado MY que contiene: sales minerales de Murashige y Skoog (MS), sacarosa 20 g l⁻¹, bencilaminopurina (BAP) 0,05 mg l⁻¹, ácido giberélico (AG₃) 0,05 mg l⁻¹, ácido naftalen-acético (ANA) 0,02 mg l⁻¹, hidrolizado de caseína 0,1 g l⁻¹, pH 5,7-5,8 y agar 6 g l⁻¹. Posteriormente se cultivan las microestacas o segmentos nodales en el medio básico MS a la mitad de la concentración de las sales minerales, sacarosa 20 g l⁻¹, BAP 0,05 mg l⁻¹, AG₃ 0,05 mg l⁻¹, ANA 0,02 mg l⁻¹, pH 5,7-5,8; agar 6 g l⁻¹ o phytigel 2 g l⁻¹. En el caso de los clones de musáceas para la conservación los meristemas son cultivados en MS, BA 5 mg l⁻¹, ácido cítrico 0,7 g l⁻¹ y glicina 2 mg l⁻¹ y las vitroplantas son cultivadas en MS/2, la mitad de la concentración de vitaminas y sin reguladores de crecimiento.

Palabras Clave: *Manihot esculenta* Crantz; *Musa* sp.; biotecnología; conservación *ex situ*; cultivo *in vitro*.

SUMMARY

The Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), Venezuela, has as part of its objective evaluation, conservation and sustainable use of plant genetic resources of agricultural interest for the country. In this paper are presented experiences and results in the *ex situ* conservation carry out in the cassava, *Manihot esculenta* Crantz and musaceae, *Musa* sp. Gene Bank at National Center for Agricultural Research (CENIAP), specifically on *in vitro* conservation. 82 cassava clones and 99 musaceae. Clones are conserved *in vitro*. For cassava the conservation process begins with the plant regeneration from meristem culture in a Murashige Skoog (MS) culture medium, sucrose 20 g l⁻¹, BAP 0.5 mg l⁻¹, AG₃ 0.05 mg l⁻¹, NAA 0.02 mg l⁻¹, agar 6 g l⁻¹, called MY. The *in vitro* conservation consists of microcutting culture in MS to half concentration of mineral salts (MS/2), sucrose 20 g l⁻¹, benzyl amino purine (BAP) 0.05 mg l⁻¹, gibberellic acid (AG₃) 0.05 mg l⁻¹, naphthaleneacetic acid (NAA) 0.02 mg l⁻¹, pH 5.7-5.8; agar 6 g l⁻¹ or phytigel 2 g l⁻¹. In musaceae clones, the meristems are cultured in MS, BA 5 mg l⁻¹, Citric acid 0.7 g l⁻¹ and Glycine 2 mg l⁻¹, and for *in vitro* conservation, regenerated plantlets are cultured in MS/2, half concentration of vitamins and without growth regulators.

Key Words: *Manihot esculenta* Crantz; *Musa* sp.; biotechnology; *ex situ* conservation; tissue culture.

RECIBIDO: noviembre 19, 2008

APROBADO: enero 19, 2011

INTRODUCCIÓN

Desde la antigüedad el ser humano dispone de los recursos genéticos para su beneficio, usando de manera descontrolada la diversidad biológica existente en el mundo. El aumento de la población y la demanda de alimentos lo impulsan a ocupar nuevos espacios con la consecuente destrucción de las especies existentes, la manipulación de otras para domesticarlas y obtener variedades homogéneas para su alimentación, trayendo como consecuencia una alta erosión genética (Jaramillo y Baena, 2000).

Aunque no se ha hecho un inventario del total de la flora presente en el mundo, se estima que existen 300 000 especies, de las cuales muchas están en peligro de extinción. Esta situación genera la necesidad de implementar estrategias para preservar la biodiversidad del planeta, tales como, el plan de acción mundial para la conservación y uso sostenible de los recursos genéticos vegetales para la alimentación y la agricultura (FAO, 2005). En consecuencia, la mayoría de los países han prestado especial interés a mantener y ampliar la base genética de las especies que existen sobre sus territorios.

Es así como en Venezuela, el Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA) incluye en su misión la valoración, conservación y uso sostenible de los recursos fitogenéticos de interés agrícola para el país, además de incrementar el uso actual y potencial de los mismos, a través de las actividades relacionadas con la recolección, introducción, conservación, descripción, intercambio, documentación y utilización de especies vegetales cultivadas y potenciales (Pérez *et al.*, 1998).

Dentro de las colecciones de interés agrícola nacional se encuentran los cultivos de yuca, *Manihot esculenta* Crantz y musáceas. Antes de proceder a explicar las estrategias de conservación para estos dos cultivos, es importante aclarar algunos conceptos claves sobre el tema.

Conservación de Germoplasma

Es la preservación de la diversidad genética existente en una zona determinada y debe garantizar la máxima variabilidad posible, la continuidad de uso, el ahorro de tiempo, dinero y esfuerzo. Para ello es necesario contar con información útil como: distribución, peligro de extinción y variabilidad genética de las especies. La estrategia a seguir dependerá de la naturaleza del material vegetal, y está definida por la duración de su ciclo de vida, el modo de reproducción y el tamaño de

sus individuos. Las alternativas de conservación abarcan desde los bancos de semillas hasta las áreas de reserva (CIAT, 2007).

Este método involucra una alta inversión de tiempo, personal, instalación y operación, por lo que debe justificarse en términos de necesidad real, sin tomar en cuenta deseos y conveniencias particulares de conservar un material genético. En tal sentido, las razones se deben definir de acuerdo a criterios lógicos, científicos y socio-económicos, tales como, la necesidad, el valor y el uso de las especies (CIAT, 2007).

Aunque preservar la diversidad biológica es de gran interés para la humanidad, se justifica aún más cuando se trata de especies en vías de extinción, clones élite de variedades homogéneas (de interés alimenticio) mejoradas genéticamente o especies silvestres que posteriormente pueden ser utilizadas en cruces genéticos para la obtención de nuevas variedades, mejor adaptadas al ambiente y que contribuyan a alimentar la población.

Tipos de conservación

Conservación *ex situ*: es el mantenimiento del material biológico fuera de su ambiente natural, conservado en espacios acondicionados, tales como: bancos de semillas, bancos de cultivo *in vitro*, colecciones *in vivo* (en campo, viveros o jardines botánicos), banco de genes (ADN), crioconservación, plantas provenientes de ingeniería genética.

El banco de semillas es la forma más tradicional de preservar una gran variedad de especies vegetales por grandes períodos de tiempo, principalmente si se trata de semilla ortodoxa (cereales, leguminosas comestibles y oleaginosas). Cuando se trata de ‘semilla’ asexual o sexual recalcitrante (frutales, raíces y tubérculos), se debe recurrir a otros métodos como la conservación *in vitro* a partir de diferentes tipos de tejidos (CIAT, 2007).

Lo anterior implica la generación de una gran cantidad de información que debe ser registrada o almacenada de alguna forma, es decir, debe ser documentada y se entiende por documentación al proceso de identificar, adquirir, clasificar, almacenar y difundir la información del germoplasma (CIAT, 2007).

Conservación *in vitro*: se fundamenta en el uso de técnicas de cultivo de tejidos, las cuales consisten en aislar una porción de la planta (explante) y proporcionarle aséptica y artificialmente las condiciones físicas

y químicas apropiadas para que las células expresen su potencial de regenerar una planta nueva, la cual se desarrolla en un medio de cultivo que está compuesto por macronutrientes, micronutrientes, gelificantes y compuestos orgánicos, tales como: hidratos de carbono, vitaminas, aminoácidos y reguladores del crecimiento. Así, se puede lograr la propagación masiva de plantas genéticamente homogéneas, mejoradas y libres de microbios (Argenio, 2008).

Las técnicas de cultivo *in vitro* pueden ser útiles en las diferentes etapas de la conservación *ex situ*.

Los seis grandes pasos definidos en la conservación son los siguientes:

1. Colección o adquisición del germoplasma.
2. Cuarentena, indexación de enfermedades y erradicación.
3. Propagación o multiplicación rápida.
4. Caracterización, evaluación y monitoreo.
5. Almacenamiento.
6. Distribución y utilización del material vegetal.

De esta forma se puede realizar colecta *in vitro* para facilitar el transporte de material vegetal y disminuir su riesgo de deterioro. En la cuarentena, las técnicas *in vitro* pueden erradicar la presencia de virus, bacterias y hongos mediante el uso de termoterapia o quimioterapia, seguido del cultivo de meristemas, y de esta forma el material vegetal preservado *in vitro* es de mejor calidad que el conservado en campo (Ashmore, 1997).

La multiplicación permite la propagación clonal rápida de plantas conservadas por organogénesis o embriogénesis somática. En la caracterización y monitoreo, se pueden utilizar descriptores morfológicos similares a los utilizados en campo, así como marcadores moleculares y bioquímicos, además de evaluar el potencial de regeneración (Jaramillo y Baena, 2000).

El almacenamiento *in vitro*, es particularmente útil en plantas con semillas recalcitrantes y en especies de propagación asexual, ya que ofrece gran seguridad a las colecciones de germoplasma, al protegerlas del daño que pueden causar los desastres naturales, plagas y enfermedades que puedan ocurrir en los Bancos de Germoplasma en campo. La distribución de germoplasma *in vitro* es la mejor alternativa de movilización e intercambio entre agricultores, investigadores y otros, ya que el material vegetal a transportar está libre de enfermedades (Ashmore, 1997).

Por otra parte, la conservación *in vitro* en condiciones de mínimo crecimiento es utilizada en un gran número de especies, y se trata de disminuir las condiciones tanto físicas como químicas que promueven el crecimiento vegetal, reduciendo así su metabolismo sin causarle daño. Esto se logró en cultivos tropicales de gran importancia, tales como musáceas, papa, yuca y ñame, a cargo de centros internacionales de investigación, como: Red Internacional para el Mejoramiento del Banano y Plátano (siglas en inglés INIBAP), Centro Internacional de la Papa (CIP), Instituto Internacional de Agricultura Tropical (siglas en inglés IITA) y Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).

El éxito de la conservación *in vitro* depende de un eficiente sistema de propagación de plantas y del control de la uniformidad genética para preservar la identidad de la especie de interés durante largos períodos de tiempo.

Experiencias de conservación de germoplasma *ex situ* de yuca y musáceas en el INIA-CENIAP

El INIA posee los Bancos de Germoplasma de yuca y musáceas más importantes en Venezuela, diseñados para preservar la variabilidad genética.

Los de yuca están ubicados en los estados: Anzoátegui, Aragua, Barinas, Monagas y Zulia (Figura 1) y el de musáceas se encuentra en el Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP) del estado Aragua.

Banco de Germoplasma de yuca

La yuca constituye un rubro estratégico que puede contribuir a la seguridad alimentaria del país. En el año 2004 fue uno de los cultivos de importancia dentro del Plan Nacional de Semillas del INIA, y en el 2005 fue seleccionado para su mejoramiento genético, haciendo uso de técnicas biotecnológicas a través del Convenio entre el BID-FONACIT II, titulado: Fortalecimiento del Sector Biotecnológico en apoyo a la Seguridad Alimentaria del país.

En tal sentido, el INIA desarrolla y fomenta los bancos de Germoplasma de yuca, constituidos en su totalidad por 200 clones cultivados dulces y amargos producidas de colectas hechas en el país y 21 provenientes del CIAT-Colombia, sembrados en el Campo Experimental del CENIAP, con un clima seco tropical, latitud 10° 15'N, longitud 67° 36 W, altura 450 m.s.n.m., precipitación promedio anual 1 179,2 mm y se mantienen mediante plantaciones repetidas anualmente, utilizando el material vegetativo del año anterior.

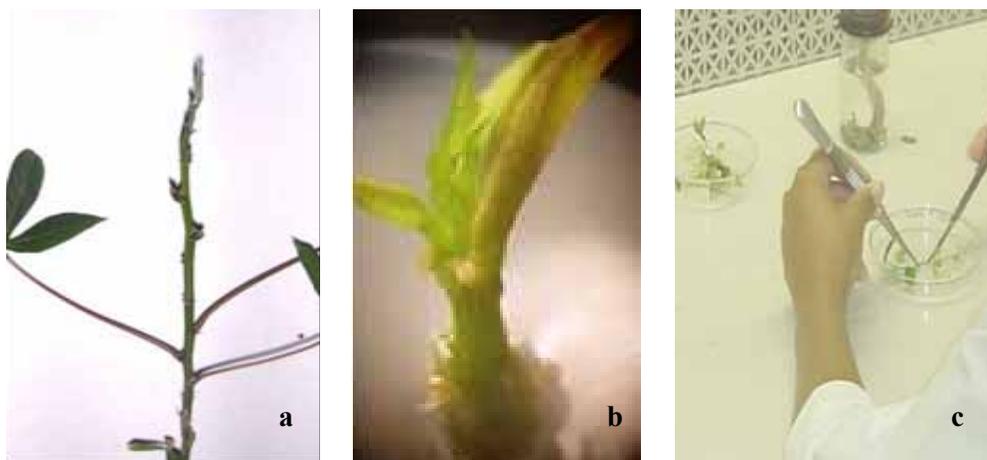


FIGURA 1. a) Zona apical de una planta de yuca utilizada como fuente de explante; b) brote obtenido a partir del cultivo de meristema *in vitro*; c) extracción de meristemas o microestacas en condiciones asépticas.

Los clones se caracterizaron y evaluaron a través de descriptores bioquímicos, moleculares y morfológicos, encontrándose que no existen duplicados en el Banco de Germoplasma de yuca del CENIAP (Schmidt *et al.*, 2003; Demey *et al.*, 2003).

Banco de Germoplasma *ex situ* de Musáceas

Musaceae es una familia de vital importancia, pues en los ámbitos comercial, agronómico y nutricional, representan una parte importante en el desarrollo de distintas comunidades de América. Específicamente en Venezuela, es considerada como un rubro estratégico y su importancia se refleja en las estimaciones del consumo por persona al año. En el caso del cambur (banano) es de aproximadamente 33 kg, mientras que en el plátano es de unos 20 kg per año⁻¹. Estos rubros aportan valores cercanos al 50% del volumen total de frutas producidas en el país y son considerados elementos primordiales en la dieta del pueblo venezolano (Martínez, 2003).

El banco de musáceas está compuesto por 110 clones: 12 diploides, 91 triploides y siete tetraploides. Estos clones son cultivados y silvestres, algunos de colectas hechas en el país y otros provenientes del intercambio de germoplasma con la Red para Mejoramiento del Banano y el Plátano (siglas en inglés INIBAP), reflejados en el Cuadro 1. Ambas colecciones están sembradas en el Campo Experimental del CENIAP, bajo las condiciones anteriormente descritas y caracterizadas morfológicamente a través de los descriptores del Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI-INIBAP, siglas en inglés).

CUADRO 1. Grupos genómicos, tipos y números de clones presentes en el Banco de Germoplasma de Musáceas.

Grupo genómico	Tipo	Nº de clones
Diploides	AA s	2
	AA cv	8
	BB s	2
Triploides	AAA	41
	AAB	37
	ABB	11
	BBB	2
Tetraploides	AAAA	2
	AAAB	3
	AABB	2
TOTAL		110

s= silvestre; cv= cultivado

Conservación *in vitro* de recursos fitogenéticos en la Unidad de Biotecnología del CENIAP

Conservación *in vitro* de yuca: la yuca es una especie perenne de gran importancia económica. La semilla es altamente heterocigota y la única forma de mantener un genotipo deseado es mediante propagación vegetativa. En tal sentido, es necesario resguardar los materiales seleccionados para cultivo y para futuros programas de mejoramiento genético. Las técnicas de conservación *in*

in vitro constituyen una buena alternativa de preservación para esta especie. Cerca de 5 000 estacas de yuca fueron resguardadas en medio de cultivo de lento crecimiento, constituyendo una fuente segura de plantas sanas que complementan las colecciones de campo (Ashmore, 1997).

Cultivo de meristemas: el primer paso para la conservación *in vitro* de yuca consiste en el cultivo de meristemas para el saneamiento de clones, realizado mediante la utilización de estacas entre 10 y 15 cm, provenientes de Bancos de Germoplasma de INIA Anzoátegui, Aragua, Barinas, Monagas o Zulia.

Las estacas colectadas son cortadas en secciones que contengan dos nudos, desinfectadas con fungicida y bactericida, sembradas en materos con sustrato de arena, tierra y aserrín de coco en la proporción 1:1:1; estas fueron regadas y fertilizadas cada 2 d. Transcurrido un mes se extraen los brotes apicales (Figura 1a y b), se desinfectan en el laboratorio con una solución jabonosa, alcohol al 70% por 3 min, hipoclorito de sodio 2,5% v/v por 30 min en una campana de flujo laminar, y por último se enjuagó tres veces con agua destilada estéril.

Se procedió a extraer el meristema bajo un microscopio estereoscópico (Figura 2c) y se sembraron en un medio de cultivo que contenía las sales minerales MS (Murashige y Skoog, 1962), sacarosa 20 g l⁻¹, Bencilaminopurina (BAP) 0,05 mg l⁻¹, Ácido Giberélico (AG₃) 0,05 mg l⁻¹, Ácido Naftalen-acético (ANA) 0,02 mg l⁻¹, Hidrolizado de caseína 0,1 g l⁻¹, pH 5,7-5,8 y agar 6 g l⁻¹, denominado MY. Luego se incubaron en un cuarto climático a 27 ± 1 °C de temperatura durante 15 d en oscuridad y posteriormente se coloca condiciones de fotoperíodo de 16 h diarias de iluminación. Todas estas condiciones específicas fueron determinadas en la Unidad de Biotecnología del CENIAP.

Después de dos meses de cultivo el porcentaje de regeneración de vitroplantas a partir de meristemas varió dependiendo del genotipo. De esta manera, Albarrán *et al.* (2006), obtuvieron brotes arrosados (0,6-1,3%), callos friables (1,4-7,0%) y plantas normales (21,0-42%). Se puede mejorar el crecimiento de las plantas arrosadas cultivándolas en el medio MY, aumentando 10 veces la concentración de BAP (0,5 mg l⁻¹) y eliminando el hidrolizado de caseína.

Cumplidos dos ciclos de cultivo, los clones de yuca V2, V3 y V4 provenientes del INIA-Monagas, así como Morichalera, UCV-2076 y C4-UCV-01 del Banco de Germoplasma del INIA-CENIAP, presentaron un 100%

de regeneración de plantas vigorosas con tallos verdes y hojas bien expandidas (Figura 2). Actualmente, mediante esta técnica se mantienen 61 clones de yuca de interés agronómico procedente de las cinco regiones, como se observa en el Cuadro 2. Estos clones están disponibles para su multiplicación *in vitro* y posterior distribución en fincas productoras del país.



FIGURA 2. Planta regenerada *in vitro* a partir del cultivo de meristemas.

El material vegetal obtenido por esta vía ofrece altas probabilidades de estar libre de virus y bacterias y constituye para el agricultor una ‘semilla’ de excelente calidad, siendo de gran interés preservarla tanto en colecciones de campo como *in vitro*.

Conservación a partir del cultivo *in vitro* de segmentos nodales en medio de mínimo crecimiento

Una vez obtenidas las vitroplantas a partir del cultivo de meristemas se puede conservar el material vegetal por tiempo indefinido, mediante el cultivo de segmentos nodales o microestacas en el medio básico MS a la mitad de la concentración de las sales minerales, sacarosa 20 g l⁻¹, BAP 0,05 mg l⁻¹, AG₃ 0,05 mg l⁻¹, ANA 0,02 mg l⁻¹, pH 5,7-5,8; agar 6 g l⁻¹ o phytigel 2 g l⁻¹. Luego se incuban en un cuarto climático a 26 ± 1 °C de temperatura, durante cuatro meses en condiciones de fotoperíodo con luz blanca a intensidad de 49 μmol m² s⁻¹ (Figura 3).

CUADRO 2. Clones de yuca conservados *in vitro* a partir de meristemas provenientes de varios estados del país.

Localidad	Clones de yuca		
Barinas	2596	M88	Sardina
	2576	Taguanes	
	12	Concha rosada	
Anzoátegui	8	36	30
	14	39	42
	18	61	32
	165-7	58	42
	44	40	29
Monagas	V1	4	8
	V2	6	3
	V3	17	14
	V4	15	13
	10	5	16
	7		
Zulia	3	10	8
	5	11	9
	6	13	21
Aragua	Lengua de pájaro	Motilona	C4-UCV-01
	Morichalera	Meven 160	Sardina
	Cubana	Meven 162	CIAT II
	Las Vegas	Bolívar 32	Tasajera
	UCV 2076	Bolívar 42	

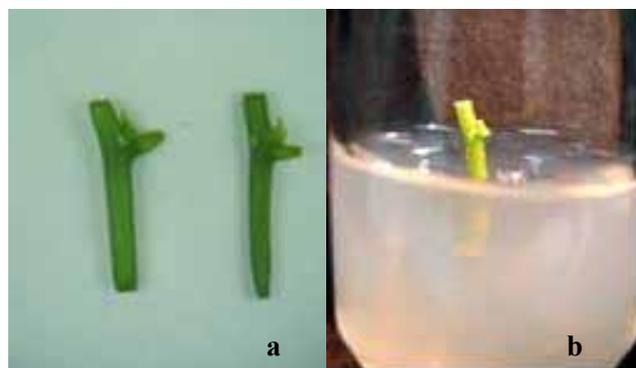


FIGURA 3. a. Microestacas o segmentos nodales de yuca utilizados para conservación *in vitro*; b. Microestacas cultivadas en tubo de ensayo con medio de cultivo de mínimo crecimiento.

Transcurridos cuatro a cinco meses, las plantas regeneradas son divididas en varios segmentos nodales para un nuevo ciclo de cultivo o renovación del Banco de Germoplasma *in vitro* (Figura 4).

Este procedimiento se fundamenta en un control químico donde se disminuye la concentración de las sales minerales y fuentes de carbono del medio de cultivo para reducir la tasa de crecimiento de las plantas. De manera complementaria se puede utilizar un control físico bajando la temperatura para retardar más el crecimiento. Sin embargo, en yuca, como se trata de un cultivo tropical, temperaturas inferiores a 24 °C pueden causar daño en el tejido vegetal en condiciones *in vitro*.

El Banco de Germoplasma de yuca *in vitro* se caracterizó morfológicamente en campo (Marín *et al.*, 2008), ofreciendo resultados interesantes para la selección de los mejores genotipos en cuanto a rendimiento y contenido de ácido cianhídrico en las condiciones agroclimáticas de Maracay. Igualmente, estos genotipos se utilizaron en los ensayos regionales con la finalidad de seleccionar aquellos que mejor se adapten en las condiciones agroclimáticas de las diferentes zonas productoras del país.



FIGURA 4. Banco de Germoplasma de cultivo *in vitro* de yuca.

Además de la conservación de los 61 clones colectados en el país y señalados en el Cuadro 2, se mantienen en conservación *in vitro* 21 clones de yuca provenientes del CIAT (Cuadro 3).

Uso de reguladores osmóticos para la conservación en condiciones de mínimo crecimiento

Con la finalidad de aumentar los períodos de tiempo de conservación *in vitro* del material vegetal de yuca

sin afectar su viabilidad o potencial de regeneración, se pueden utilizar reguladores osmóticos, que consisten en fuentes de carbono como la sacarosa y el manitol o sorbitol, a concentraciones que contribuyan a disminuir el metabolismo celular pero que no sea letal para los explantes en cultivo.

En los clones de yuca como el BRA-383, CM 7073-7 y C-17, se obtienen buenos resultados extendiendo el tiempo de conservación de cuatro a seis meses utilizando concentraciones de sacarosa 0,18 M, manitol y sorbitol 0,05 M agregados al medio de cultivo (Rengifo *et al.*, 2005).

CUADRO 3. Clones de yuca provenientes del CIAT (Colombia), conservados *in vitro* en el Banco de Germoplasma del CENIAP.

BRA 383	CM 4843-1	CM 7514-7
PER 183	CM5306-8	CM 7514-8
TAI 8	CM 6119-5	CM 8027-3
CM 507-37	CM 6438-14	SM 805-15
CM 523-7	CM 6740-7	SM 909-25
CM 3306-4	CM6921-3	SM 1565-15
CM 4574-7	CM7073-7	Mcol 2063

Multiplicación *in vitro* de clones promisorios de yuca

Para la multiplicación *in vitro* se utilizan segmentos nodales provenientes de las plantas conservadas *in vitro*. El medio de cultivo está compuesto por el medio básico de cultivo de MS (1962) con las siguientes modificaciones: la tiamina a la mitad de su concentración y se duplica la concentración de la solución de hierro; se agrega ANA 0,02 mg l⁻¹ y agar 7 g l⁻¹. El pH del medio de cultivo se ajusta a 5,8 previo a la adición del agar.

Después de dos meses de cultivadas las microestacas o segmentos nodales, se obtienen plantas desarrolladas (con vástagos y raíces) listas para ser aclimatadas. Las plantas regeneradas adquieren buen vigor y una longitud del tallo que varía entre 3 y 10 cm. Durante el período de cultivo se debe controlar la aparición de agentes contaminantes en los frascos de cultivo y eliminarlos inmediatamente.

Para la aclimatación, las vitroplantas se colocan en una solución nutritiva rica en nitrógeno, fósforo y potasio (Guo y Liu, 1994) durante 7 d y se colocan las bandejas en una zona del umbráculo con exposición indirecta a la luz solar. Esta solución nutritiva promueve el crecimiento vigoroso de las plantas.

Luego las plantas se siembran y se mantienen en condiciones de umbráculo durante 22 a 30 d en materos conteniendo sustrato estéril compuesto de aserrín de coco, tierra y arena en la proporción 1:1:1 y se le agrega fertilizante foliar. De esta manera se han propagado 30 clones élites con alto porcentaje de regeneración *in vitro* y en campo. Marín *et al.* (2009), uso combinaciones de ANA 0,02 mg l⁻¹ y AG₃ 0,05 mg l⁻¹ en cinco clones élites obteniendo buenos resultados de regeneración.

Conservación *in vitro* de Musáceas: Se mantiene un duplicado de la colección de musáceas presente en el campo experimental del CENIAP mediante el uso de técnicas de cultivo *in vitro*, con el objetivo de disponer de una réplica del Banco de Germoplasma en caso de pérdida de dichos materiales por la acción de factores ambientales, plagas y enfermedades, y para realizar la propagación acelerada de clones de interés que puedan ser utilizados en programas de mejoramiento genético y en el intercambio de germoplasma con otras instituciones nacionales e internacionales.

Metodología de regeneración *in vitro*

La regeneración de plantas se inicia con la siembra de meristemas *in vitro*, que son extraídos de los hijos más jóvenes entre 15 y 30 cm con tres hojas, tomados de los clones mantenidos en la colección de campo del CENIAP. Los hijos son llevados al laboratorio donde se corta la sección de tallo que contiene la yema apical, de un tamaño aproximado de 2 x 4 cm. Este explante se desinfecta con alcohol al 70% durante 1 min y posteriormente en una solución de hipoclorito de sodio al 5% durante 30 min. y por último se enjuagan tres veces con agua destilada estéril. La siembra de los meristemas se realiza en condiciones de asepsia, en un medio de iniciación M1.

Estos cultivos son mantenidos en condiciones de oscuridad durante una semana, luego son transferidos a condiciones de iluminación (16 h de luz y 8 h de oscuridad) a una temperatura de 26 ± 2 °C, donde se inicia el proceso de multiplicación de los brotes en el medio M1. Una vez observada la formación de brotes, estos son cultivados en un medio sin reguladores de crecimiento para inducir la formación de raíces (M2), mostrado en el Cuadro 4 utilizando el proceso de cultivo *in vitro*.

CUADRO 4. Medios de cultivo utilizados durante el proceso de regeneración y conservación de clones de *Musa*.

Medio de cultivo	Sales minerales	Vitaminas	Reguladores de crecimiento	Otros
Iniciación y multiplicación (M1)	Murashige y Skoog (1962)	Mio-inositol: 100 mg l ⁻¹ Tiamina: 0,2 mg l ⁻¹ Piridoxina: 0,5 mg l ⁻¹ Ácido nicotínico: 0,5 mg l ⁻¹	BA 5 mg l ⁻¹	Ácido cítrico 0,7 g l ⁻¹ Glicina 2 mg l ⁻¹
Enraizamiento (M2)	Murashige y Skoog (1962)	Ácido nicotínico: 0,5 mg l ⁻¹		Ácido cítrico 0,7 g l ⁻¹ Glicina 2 mg l ⁻¹
Conservación (M3)	½ Murashige y Skoog (1962)	Ácido nicotínico: 0,25 mg l ⁻¹		

El proceso de regeneración de plantas depende del tipo de explante y se logra a través de dos vías: organogénesis y embriogénesis somática, mediante el cultivo *in vitro* de flores masculinas y femeninas y yemas apicales (Schoff *et al.*, 1998; Novak *et al.*, 1989; Cronauer-Mitra, 1988; Coté *et al.*, 1996).

En el caso de los clones de Musáceas, la regeneración a partir de meristemas o yemas apicales es variable dependiendo del clon. Estos materiales inician el proceso de desarrollo del brote en un período que va entre 70 y 100 d en el medio de multiplicación, la presencia de abundante fenoles en el explante en algunos clones afecta el desarrollo de los brotes. Aproximadamente un 70% de los explantes sembrados desarrollan plantas (Figura 5).

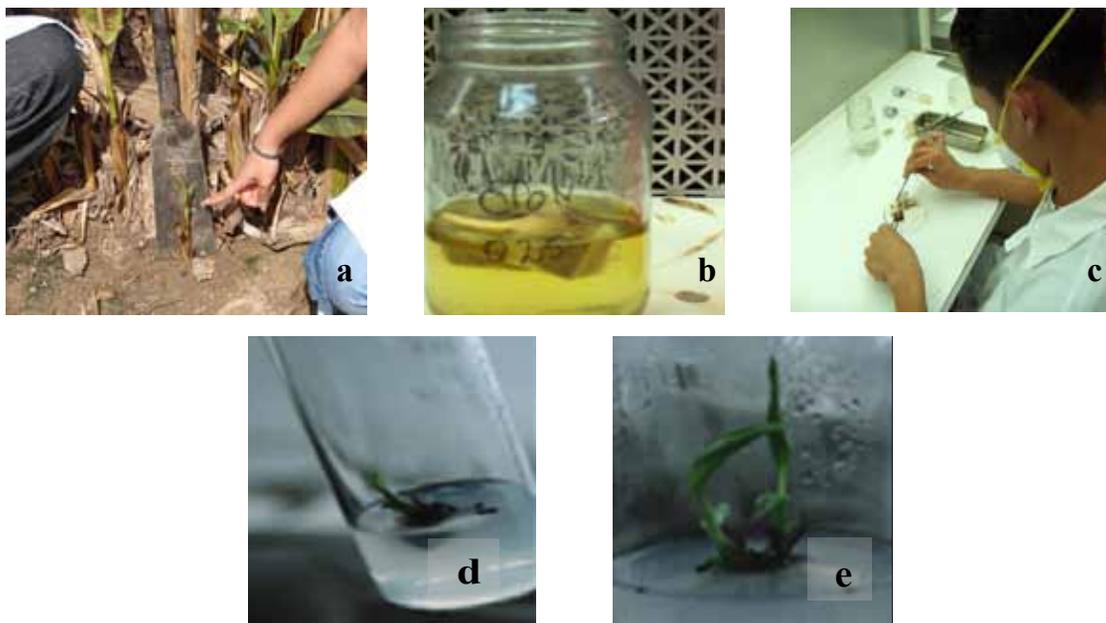


FIGURA 5. a. Hijo de musácea extraído en campo; b. desinfección de explantes; c. siembra en campana de flujo laminar; d. iniciación; e. multiplicación de brotes.

Conservación *in vitro*

La conservación *in vitro* de las plantas de los clones de Musáceas se realiza en un medio de cultivo con la mitad de la agrupación de las sales de MS (1962), y las vitaminas y sin reguladores de crecimiento (M3).

Las plantas son mantenidas en un cuarto de crecimiento a una temperatura entre 15 y 18 °C bajo las mismas condiciones de luz utilizadas durante el proceso de regeneración. Esta metodología permitió disminuir el desarrollo de los mismos, medio de cultivo por un período de hasta seis meses sin afectar su viabilidad. Igualmente, se conserva una réplica del 90% de los clones de musáceas del Banco de Germoplasma del CENIAP. Esta técnica permite mantener los cultivos en crecimiento restringido a corto y a largo plazo (Figura 6).



FIGURA 6. Brotes de musáceas enraizados y mantenidos en medio de conservación.

CONCLUSIONES

Las técnicas de conservación y multiplicación *in vitro* le han permitido al INIA:

- Mantener de manera segura los Bancos de Germoplasma de yuca y musáceas.
- Facilitar el intercambio seguro de germoplasma con otros centros de investigación nacional o internacional.
- Suministrar a los productores los mejores clones libres de patógenos a través del Plan Nacional de Semilla.

- Desarrollar metodologías de conservación y multiplicación *in vitro* en el Laboratorio de Biotecnología que permiten multiplicar masivamente plantas de musáceas y yuca; colocándolas a disposición del Plan Nacional de Semillas.

BIBLIOGRAFÍA

- Albarrán, J. G., F. Fuenmayor, A. Y. Zambrano, B. Delgado, L. Vaccarino, J. Montilla, L. Zarrameda, N. Moreno y M. Pérez. 2006. Cultivo *in vitro* de meristemas de yuca de interés agronómico provenientes de cinco regiones productoras de Venezuela. **In:** First International Meeting on Cassava Breeding, Biotechnology and Ecology. Book of abstracts. R. Ortiz y N. Nassir (eds.). Brasilia, Brasil. 47 p.
- Ashmore, S. 1997. Status report on the development and application of *in vitro* techniques for the conservation and use of plant genetic resources. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 67 p.
- Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 2007. Multi-Institutional Distance Learning Course on the *ex situ* Conservation of Plant Genetic Resources. (En línea). CIAT publication N° 360, Palmira, Colombia. 235 p. (Consultado en: 18 ago 2008). Disponible en: http://www.ciat.cgiar.org/ccc/pdf/Course_Ex_Situ/contents.pdf
- Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología (Argenbio). 2008. Por qué Biotecnología. (En línea). (Consultado en 20 ago. 2008). Disponible en: <http://www.argenbio.org>.
- Cotê, F., R. Domenguer, S. Monmarson, J. Schewendiman, C. Teisson and J. Escalant. 1996. Embryogenic cell suspensions from the male flower of *Musa* AAA. *Physiologia Plantarum* 97:285-290.
- Cronauer-Mitra, S. 1988. Plant regeneration via somatic embryogenesis in the seeded diploid banana *Musa Ornate* Roxb. *Plant Cell Reports*. 7:23-25.
- Demey, J., A. Y. Zambrano, F. Fuenmayor y V. Segovia. 2003. Relación entre caracterizaciones molecular y morfológica en una colección de yuca. *INTERCIENCIA*. 28(12):684-689.
- Food and Agriculture Organization (FAO). 2005. The global strategy for plant conservation. Commission

- on genetic resources for food and agriculture. Working group on plant genetic resources for food and agriculture (En línea). Third Session, Rome. (Consultado en 17 ago. 2008). Disponible en: <http://www.fao.org/WAICENT/FAOINFO/AGRICULT/AGP/AGPS/PGR/ITWG3RD/pdf/p3i3E.pdf>
- Hawkes, J. G., N. Maxted and B. V. Ford-Lloyd. 2000. The *ex situ* conservation of plant genetic resources. Kluwer Academic Publishers.
- Jaramillo, S. y M. Baena. 2000. Conservación *ex situ* de recursos fitogenéticos. Material de Apoyo a la Capacitación en Conservación *ex situ* de Recursos Fitogenéticos. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI). Grupo Américas. 102 p.
- Lemos, E., M. Ferreira and L. Alencar. 2002. *In vitro* conservation of sugarcane germplasm. Pesq. agropec. bras. (En línea). [Consultado en 26 abr. 2008], 37(10):1.359-1.364. Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X2002001000002&lng=en&nrm=iso
- Marín, A., D. Perdomo, J. G. Albarrán, F. Fuenmayor y C. Zambrano. 2008. Evaluación Agronómica, Morfológica y Bioquímica de clones élites de yuca a partir de Vitroplantas. INTERCIENCIA. 33(5):365-371.
- Martínez, G. 2003. Banco de germoplasma de musáceas del CENIAP (En línea). Seminarios CENIAP. (Consultado en 18 ago. 2008). Disponible en: <http://www.ceniap.gov.ve/seminarios/gmartinez.htm>.
- Murashige, T y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiology Plant. 15:473-497.
- Novak, F., R. Akza, V. Duren and M. Pera-Dallos. 1989. Somatic embryogenesis and plant regeneration in suspensions cultures of dessert (AA and AAA) and cooking (ABB) bananas (*Musa* spp.). Biotechnology 7:147-158.
- Pérez, D., M. Gutiérrez, E. Mazzani, T. Barreto, V. Segovia y C. Marín. 1998. Recursos fitogenéticos de Venezuela. Maracay, Venezuela, Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias. 93 p. (Serie C Nº 42).
- Schmidt, A., F. Fuenmayor y M. Fuchs. 2003. Caracterización de clones de yuca (*Manihot esculenta*) mediante marcadores protéicos e isoenzimáticos. INTERCIENCIA. Vol. 28(12):690-698.
- Rengifo, J., J. G. Albarrán, A. Y. Zambrano, F. Fuenmayor, E. Castillo, B. Delgado y P. González. 2005. Optimización de las condiciones de conservación *in vitro* en clones de yuca seleccionados por sus características agronómicas. **In:** Encuentro Red de Biotecnología Agroalimentaria de Venezuela (REDBIO Venezuela). Resumen. Maracay, Venezuela.
- Schoofs, H., B. Pains and R. Swennen. 1998. Competence of scalps for somatic embryogenesis in *Musa*. Proceedings International Symposium Banana in Subtopics. Ed. V. Galan Saucó. **In:** Acta Horticulturae. 490 p.