

## **CRIOBANCO: SU IMPORTANCIA PARA LA CONSERVACIÓN A LARGO PLAZO EN LOS BANCOS DE GERMOPLASMA.**

Ailé de la Caridad Vicente, María de los Ángeles Torres, Norma Marrero, Odalys Pérez Díaz, Lianne Fernández Granda y Tomás Shagarodsky Scull.

### **RESUMEN**

El cultivo y la conservación de muchas especies se dificulta debido a problemas asociados con la producción o manipulación de la semilla (botánica o agámica) y su almacenamiento, lo cual atenta contra la diversidad y riqueza de especies vegetales existentes. Por esta razón, uno de los objetivos estratégicos actuales se refiere al establecimiento y uso de las técnicas de conservación *in vitro* y crioconservación, como alternativa adicional a las colecciones de plantas enteras. En la actualidad, los bancos de germoplasma que conservan los recursos fitogenéticos de un país deben tener bancos de semilla, genobancos *in vitro* y criobancos para garantizar así la preservación de todos sus recursos fitogenéticos. Es por ello que el objetivo de este trabajo fue desarrollar un estudio para la implementación de un criobanco en el banco de germoplasma del INIFAT. Desde el 2006, en el INIFAT se ha avanzado en el desarrollo de técnicas y protocolos exitosos para crioconservar el ajo, lo cual constituye el primer paso para la preservación de una especie en un criobanco. Durante el año 2014 se realizó un estudio de factibilidad para realizar una inversión en la construcción de un nuevo banco de germoplasma que garantice la conservación de los recursos fitogenéticos del país, por lo que no quedó fuera la proyección de un criobanco. Entre los principales resultados de este trabajo se encuentran el diseño de un criolaboratorio, las medidas de seguridad y el equipamiento necesario para su establecimiento.

**Palabras clave:** recursos fitogenéticos, conservación, criobanco

---

Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt" (INIFAT)/ Cuba.

[genetica6@inifat.co.cu](mailto:genetica6@inifat.co.cu)

## **Cryobank: Their importance for preservation to long time in the germplasm bank.**

### **ABSTRACT**

Cultivation and preservation of many species becomes difficult due to problems correlated with production or manipulation of the seed (botany or agamic) and his storage, it acts against of diversity and riches of vegetable species existent. For this reason, one of current strategic objectives refers to the establishment and use of the techniques of preservation *in vitro* and cryopreservation, as an alternative additional to the collections of entire plants. In the present moment, germplasm's banks that preserve the plant genetic resources of any country it must have banks of seed, genebanks *in vitro* and cryobanks to guarantee the preservation of all its resources. The objective of this work was to develop a study for the implementation of a cryobank in germplasm's bank of INIFAT. From the 2006, in the INIFAT has advanced to develop of techniques and successful protocols for cryopreserver garlic, this it constitutes the first step for the preservation of a species in a cryobank. During the 2014, in the INIFAT it make a feasibility study to accomplish an investment at the construction of new germplasm's bank for the preservation of plant genetic resources of the country, so that a cryobank's projection was not left out . Enter the principal results of this work it was a cryolaboratorio's design, the security measures and the necessary equipment for this establishment.

**Keywords:** Plant genetic resources, preservation, cryobank

### **INTRODUCCIÓN**

En Cuba existe una amplia y rica biodiversidad de recursos fitogenéticos que pueden garantizar la seguridad alimentaria y el mejoramiento genético en el país. Para su conservación se emplean estrategias *in situ* como Reservas de la Biosfera, Parques Nacionales, Reservorios de genes y/o mediante los campesinos que permiten conservar

especies silvestres, paisajes y variedades tradicionales; además se utilizan las estrategias *ex situ* como los Genobancos de campo (Cultivos, *Arboretum*, Herbarios y Jardines Botánicos) y los Bancos de Germoplasma que contienen Bancos de semilla, Genobancos *in vitro*, Criobancos y Bancos de ADN. La selección de la estrategia de conservación adecuada

depende de: La biología de la especie, infraestructura y técnicas competentes, el uso o fin que tendrá y las consideraciones económicas. En la actualidad está demostrado que para garantizar la conservación adecuada de un recurso es necesaria la complementariedad de dos o más de estas estrategias de conservación.

Los criobancos son bancos de germoplasma para la conservación a largo plazo (más de 200 años) de recursos fitogénéticos. En ellos se conservan estos recursos mediante las técnicas de crioconservación en nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$  de temperatura. Estas técnicas se usan fundamentalmente en especies de reproducción vegetativa, especies arbóreas y en especies con semillas recalcitrantes; pero en la actualidad se ha demostrado que pueden ser empleadas para cualquier especie como una alternativa de duplicación.

En el año 2013 el INIFAT recibió la tarea del Ministerio de la Agricultura de Cuba de diseñar el Centro de Examen y el Banco de Germoplasma Nacional, para la cual se tuvo en cuenta la creación de un criobanco.

El objetivo de este trabajo fue diseñar un criobanco para la conservación a largo plazo en el Banco de Germoplasma del INIFAT.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Para el presente estudio se partió de las experiencias adquiridas en diferentes países como la India y México, los cuales cuentan con criobancos en los Bancos de Germoplasma Nacionales. Estos laboratorios son modernos y cuentan con la experiencia necesaria para el diseño de un criolaboratorio.

Primeramente se determinaron los objetivos a cumplir por el criobanco para luego determinar los requerimientos necesarios para cumplir dichos objetivos.

Entre los requisitos que se estudiaron para el diseño del criobanco se tuvo en cuenta: sistema de almacenamiento, material a conservar y cantidades, equipamiento necesario, fuente abastecedora de nitrógeno líquido, consideraciones de seguridad, medidas constructivas.

Todos los datos obtenidos de esta investigación fueron colegiados con el inversionista del INIFAT y los expertos de la ENPA.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para el diseño del criobanco se tuvo en cuenta que el objetivo principal que se persigue con la construcción del mismo es la conservación a largo plazo de los recursos fitogenéticos de Cuba, teniendo en cuenta a las especies de reproducción vegetativa, especies con semillas recalcitrantes, polen e incluso semillas ortodoxas.

Se tuvo en cuenta que no existe ninguna pauta internacional que establezca el número mínimo de material a crioconservar, pero que mediante el empleo de este método se puede conservar miles de accesiones en un pequeño espacio.

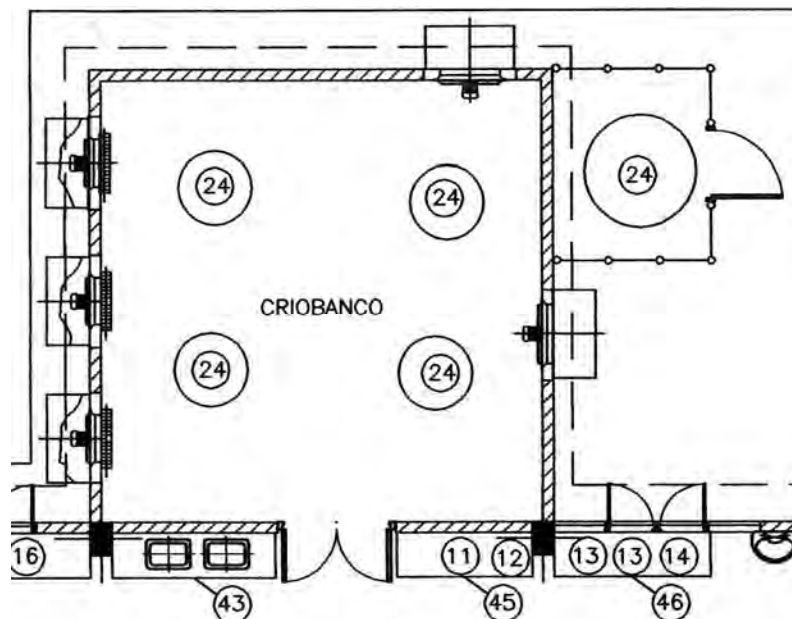
Para cumplir este objetivo es necesario contar con un criolaboratorio que posea 4 criotankes de tamaño mediano (aproximadamente  $1\text{m}^3$ ) para la conservación de estos materiales en nitrógeno líquido, como se muestra en la Figura 1. El tamaño del cuello de estos tanques debe ser superior a las 16 pulgadas para su llenado automático, con conexiones al tanque abastecedor y alarmas de baja intensidad para detectar los bajos niveles de nitrógeno líquido y la necesidad de rellenar; entre más grande

es el cuello del criotankes más confiable son las alarmas.

Una vez establecido el número de criotankes se pudo definir el tamaño del criolaboratorio, el cual contará con  $36\text{m}^2$  con paredes y techo y el acceso restringido y un área exterior de  $4\text{m}^2$  para el criotankes abastecedor (de 3 a 4 metros de alto y 1m de ancho) con cerca perimetral y techado para protegerlo del clima (Figuras 1 y 2). La fuente abastecedora de nitrógeno líquido será la Empresa de Inseminación Artificial Rosafé Signet, con la cual existe contrato para el abastecimiento de este producto.

Para determinar las medidas de seguridad se tuvo en cuenta que los riesgos en el laboratorio de criobiología pueden diferenciarse en físico-químicos y de contaminación.

Los riesgos físicos y químicos más importantes son los derivados del manejo del nitrógeno, tanto en fase líquida como gaseosa, como consecuencia del desplazamiento de oxígeno que provoca (riesgo de anoxia) y de las quemaduras ocasionadas por las bajas temperaturas que alcanza. Por ello, las consideraciones más importantes que se tuvieron en cuenta fueron:



**Figura 1:** Muestra el diseño del criobanco en una escala 1:100, con la ubicación de los cuatro criotanks (24) dentro del laboratorio y el criotank abastecedor (24) fuera del área del laboratorio.

- El área donde se ubicaran los criotanks dispondrá de buena ventilación; para lo que se instalarán en el área extractores y ventiladores de techo, como se muestra en la figura 2.
- Se contará con los equipos de protección adecuados para la manipulación del nitrógeno, como: pantallas faciales o gafas cerradas, guantes criogénicos y ropa de algodón que cubra brazos y piernas.
- La exposición a los vapores de nitrógeno será breve, ya que puede provocar lesiones en tejidos delicados, sobre todo ojos y piel de las manos.
- Debido a la evaporación constante del nitrógeno líquido los criotanks serán recargados periódicamente, por lo que se prevé utilizar sistemas automatizados para el control y rellenado de estos con nitrógeno líquido; en caso de no disponer de ellos para medir el nivel de nitrógeno, deberán usarse reglas de plástico resistentes a temperaturas extremas.
- La emisión de vapores produce hielo en la boca del criotank, por

lo que es necesario vaciarlos y limpiarlos (con agua destilada y una solución desinfectante) al menos una vez al año; cuando el criotankue vaya a ser llenado de nuevo de nitrógeno, debe rellenarse despacio para conseguir un enfriamiento gradual del recipiente.

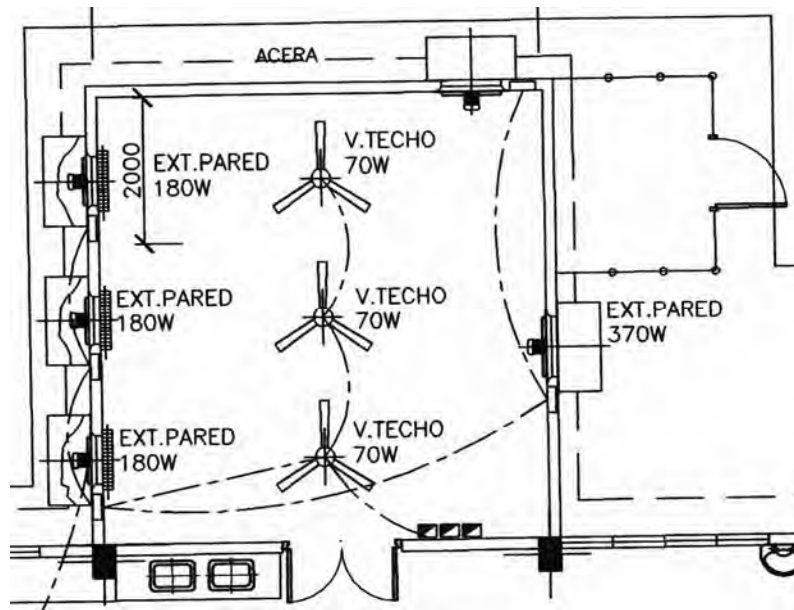
- Se mantendrá uno de los 4 criotankues como tanque de emergencia o limpieza, que se utilizará en caso de accidente o cuando algún contenedor deba ser limpiado.
- Los contenedores destinados al transporte de muestras deben llenarse de nitrógeno el día anterior a su utilización y rellenarse antes de introducir las mismas, para asegurar el mantenimiento de la temperatura óptima durante el transporte.
- Es necesario utilizar siempre materiales resistentes a las bajas temperaturas y pinzas largas para el almacenamiento y manejo del material sumergido en los contenedores.

Los riesgos de contaminación cruzada se deben a que el nitrógeno líquido puede

constituir una fuente de contaminación, ya que ciertos hongos, virus y bacterias pueden sobrevivir a la exposición directa a este producto y ser causantes de contaminación cruzada. Lo más importante para evitar este riesgo es el correcto envasado de las muestras a congelar, por lo que se recomienda el uso de crioviales, tubos de polietileno o cualquier envase a emplear que selle herméticamente. Además debe garantizarse la manipulación correcta de las muestras y la limpieza y desinfección de los envases antes de introducirlos en el nitrógeno líquido.

### **CONCLUSIONES**

- Se tuvo en cuenta las medidas de seguridad para el diseño del criolaboratorio.
- Se determinó un área de 4 m<sup>2</sup> para ubicar el criotankue abastecedor.
- Se diseñó el criobanco en el banco de germoplasma del INIFAT con un área de 36 m<sup>2</sup> donde se ubicarán cuatro criotankues para conservar a largo plazo los recursos fitogenéticos de Cuba.



**Figura 2:** Muestra la ventilación que tendrá el criobanco mediante los ventiladores de techo y los extractores como medidas de seguridad.

cryopreserved plant germplasm collections. Cryoletters 24:149-160.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Cryobank. Page compiled by: Bioersity International/ILRI, Addis Ababa, Ethiopia (Alexandra Jorge); ILRI, Addis Ababa, Ethiopia (Jean Hanson); Katholieke Universiteit Leuven, Belgium (Bart Panis).

Dussert S, Engelmann F, Noirot M. 2003. Development of probabilistic tools to assist in the establishment and management of

Fki L, Bouaziz N, Sahnoun N, Swennen R, Drira N and Panis B. (2011): Palm cryobanking. Cryoletters 32: 451-462.

Marco-Medina, A. y F. Serrano-Martínez (2012): Crioconservación: herramienta para la conservación *ex situ* de material vegetal. Cuadernos de Biodiversidad, 38: 9-12.

Panis B. (2008): Cryopreservation of monocots. En: Reed, BM (ed) Plant Cryopreservation: A Practical Guide (pp. 241-280), Springer, USA.