

GUÍA METODOLÓGICA PARA EL ESTABLECIMIENTO Y VALIDACIÓN DE COLECCIONES NÚCLEO EN EL GERMOPLASMA CONSERVADO *EX SITU*

Zoila Fundora Mayor¹, Tomás Shagarodsky Scull¹, Leonor Castiñeiras Alfonso¹, Odalys Barrios Govín¹, Violeta Puldón Padrón², María de los Ángeles Torres Mederos¹, María del Carmen López Báez³, Juan Gualberto Castillo Hernández⁴, Raúl Cristóbal Suárez¹, María Félix Pérez¹, Arlene Rodríguez Manzano¹, Yanisbel Sánchez¹, Juan A. Soto¹, Yamilet Rodríguez¹, Mayrim Cabezas¹ y Aida González¹.

¹*Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical “Alejandro de Humboldt” (INIFAT), MINAG. zfundora@infomed.sld.cu*

²*Instituto de Investigaciones del Arroz (IIA), MINAG.*

³*Instituto de Investigaciones del Tabaco (IIT), MINAG.*

⁴*Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), MES.*

RESUMEN

El mejoramiento del acceso y uso de las colecciones de germoplasma se ha convertido en una de las principales tareas de la actividad de recursos genéticos. El desarrollo del concepto de colecciones núcleo, así como la teoría de Frankel y Brown, ha tenido un importante papel en la promoción de este objetivo. Sobre la base de la experiencia adquirida, y apoyados por la experiencia acumulada a nivel mundial, se propone una Guía, que no pretende ser una metodología rígida a seguir para el establecimiento de colecciones núcleo, sino más bien un conjunto flexible de pasos que se deben tomar en consideración para lograr con éxito el propósito de mejorar el acceso al germoplasma de los cultivos y sus parientes silvestres. El esquema seguido comprende cinco etapas (conveniencia, análisis de la información, selección del núcleo, manejo del núcleo y uso del mismo), las que se discuten ampliamente en el trabajo.

Palabras clave: colección núcleo, metodología, germoplasma.

METHODOLOGICAL GUIDE FOR THE ESTABLISHMENT AND VALIDATION OF CORE COLLECTIONS IN THE *EX SITU* PRESERVED GERMOPLASM

ABSTRACT

The improvement of the access and use of germoplasm collections has become one of the main tasks of the activity of genetic resources. The development of the concept of core collections, as well as the theory of Frankel and Brown, has had an important paper in the promotion of this objective. On the base of the acquired experience, and supported by the experience accumulated at the international level, a Guide is proposed that doesn't seek to be a rigid methodology for the establishment of core collections, but rather a flexible group of steps that should be taken into consideration to achieve with success the purpose of improving the access to crops germoplasm and their wild relatives. The followed outline, has five stages (convenience, analysis of the information, selection of the core, handling of the core and its use), that are are discussed thoroughly in the work.

Key words: core collection, methodology, germoplasm.

INTRODUCCIÓN

El mejoramiento del acceso y uso de las colecciones de germoplasma se ha convertido en una de las principales tareas de la actividad de recursos genéticos. El desarrollo del concepto de colecciones núcleo por Frankel y Brown y su teoría, ha tenido un importante papel en la promoción de este objetivo. La selección de un pequeño número de accesiones de la colección completa, que sean representativas de

la mayor diversidad genética posible de un cultivo y sus parientes silvestres, o sea, la **colección núcleo**, parece ser la solución del problema. Sobre la base de la experiencia adquirida en este particular, y apoyados por la experiencia acumulada a nivel mundial, se plantea la siguiente Guía, que no pretende ser una metodología rígida a seguir para el establecimiento, sino más bien un conjunto flexible de pasos que se deben tomar en consideración para lograr con éxito el propósito de mejorar el acceso al germoplasma de los cultivos y sus parientes silvestres.

MATERIALES Y METODOS

El esquema metodológico para el establecimiento incluye tres pasos fundamentales (Fig. 1):

- 1) Establecer la conveniencia de formar una colección núcleo.
- 2) Estudiar la disponibilidad de información en la colección base.
- 3) Seleccionar la colección núcleo
- 4) Manejar la colección núcleo.
- 5) Usar la colección núcleo

RESULTADOS Y DISCUSION

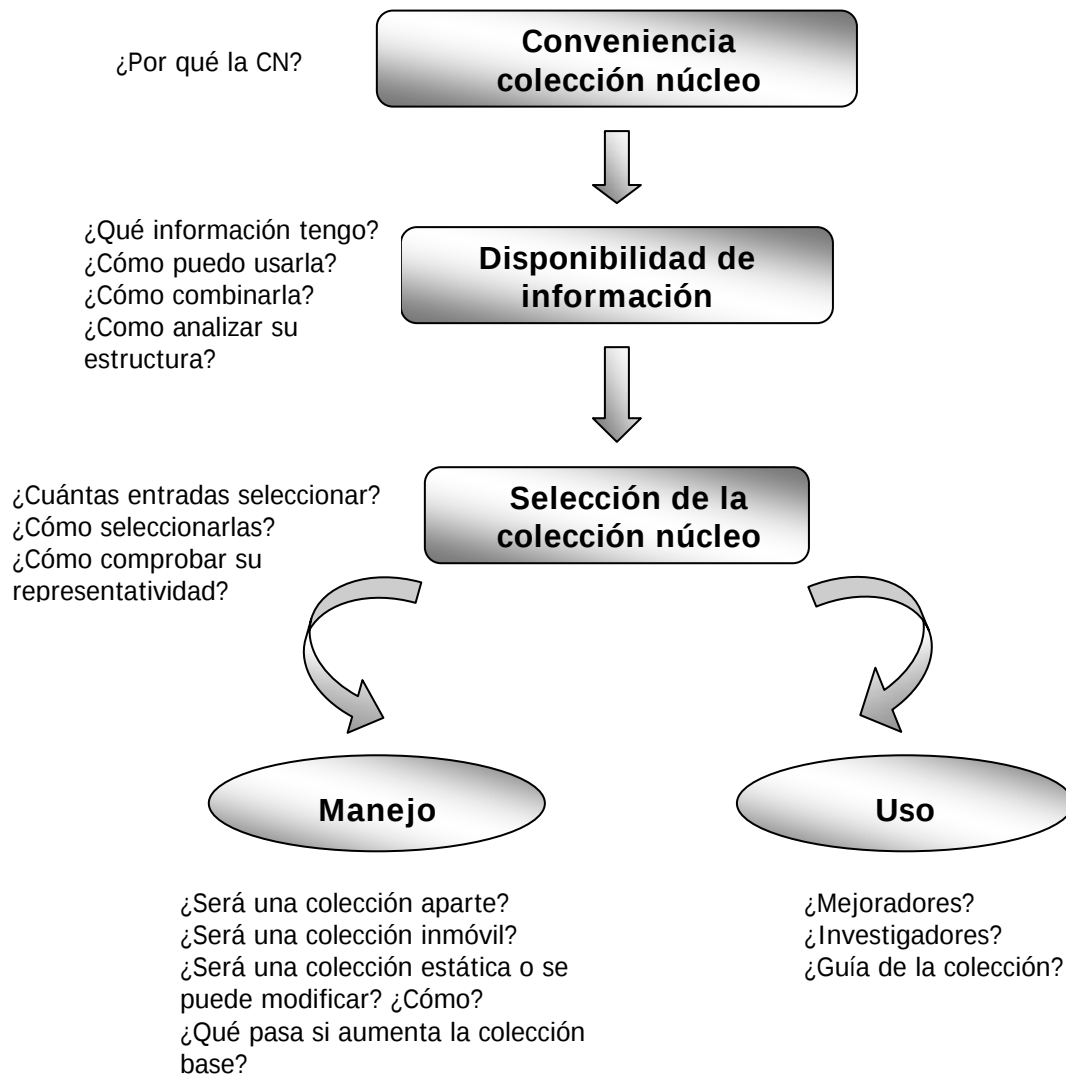
Establecimiento de la conveniencia de la formación de una colección núcleo.

Es importante analizar los aspectos relacionados con el manejo de un banco de germoplasma, en lo tocante a la conservación, regeneración, duplicación, documentación y evaluación de los recursos filogenéticos, así como en el uso que se les da a las colecciones

¿Es la colección de gran tamaño, de manera que es difícil manejarla en los aspectos antes mencionados? ¿El uso de la colección es limitado por la falta de información acerca de la estructura de la variabilidad en la misma? ¿Se dificulta establecer prioridades de manejo y de trabajo con la misma?

Si alguna de estos aspectos es válido para su caso, puede ser necesario formar una colección núcleo. *Como una colección núcleo es una muestra estructurada de una colección completa, pero de un tamaño más manejable, y está estructurada de tal manera que representa la diversidad de la colección completa, constituye un conjunto de referencia que destaca automáticamente prioridades que requieren atención para la toma de decisiones.*

Fig. 1. Pasos a seguir en el establecimiento de una colección núcleo.



Realmente, el objetivo final de una colección núcleo es lograr que la colección de la cual se deriva se conserve mejor y se utilice más eficazmente. Una colección núcleo que no logre contener una fracción significativa de la diversidad de la colección completa no cumpliría su finalidad.

Estudio de la disponibilidad de información en la colección base.

La documentación de las colecciones de germoplasma comprende los llamados datos pasaporte, los datos de almacenamiento e intercambio y los de caracterización y evaluación. Toda esta información es necesaria para poder hacer un uso efectivo de las mismas.

Entre las informaciones de más variada naturaleza asociadas a las colecciones de germoplasma, están los datos de caracterización. La caracterización de colecciones de germoplasma se realiza a nivel internacional, utilizando diferentes tipos de descriptores, que pueden ser de naturaleza morfológica, agronómica y molecular, por lo que la extensión del registro de las mismas depende de las posibilidades de recursos materiales y de personal capacitado en los bancos de germoplasma. Por esta razón, en los bancos de germoplasma que albergan colecciones *ex situ*, la disponibilidad de datos de caracterización y evaluación de las colecciones es extraordinariamente variada, y esto es un reto, cuando se trata de acceder a ellos para cualquier propósito.

Por otra parte, como los fitomejoradores utilizan los materiales de los bancos de germoplasma en su quehacer, necesitan conocer con mayor detalle las características morfoagronómicas de las accesiones existentes, y enfocarán mejor su actividad en la búsqueda de nuevas variedades, independientemente de los métodos de mejoramiento que se utilicen.

Los productores también necesitan de los caracteres morfoagronómicos para la identificación de las variedades que cultivan. Para ellos, los caracteres más importantes son: rendimiento agrícola, calidad del grano, resistencia al acame, tolerancia a la sequía, a las bajas temperaturas y resistencia a enfermedades e insectos. Las variedades utilizadas por los pequeños productores, son seleccionadas durante varios ciclos para un carácter determinado que prevalece en esas condiciones, lográndose una buena adaptación. Estas variedades son comúnmente "bautizadas" con nombres locales y difieren de las variedades originales.

Por último, existen caracteres que tienen una marcada influencia sobre la capacidad agroproductiva de las especies cultivadas. En la medida que el productor los domine, puede alcanzar resultados superiores de eficiencia y producción.

Todo esto sugiere que es muy importante esclarecer el uso que se le dará a la información disponible, y el enfoque de establecimiento de una colección núcleo sería muy útil en este sentido.

El establecimiento de una colección núcleo está al alcance de cualquier banco de germoplasma. No requiere tener información sobre marcadores genéticos o conocimientos especializados en matemáticas, ni es necesario esperar a tener la información de toda la colección. Lo que se necesita es una colección de germoplasma, conocimientos básicos acerca de la colección y de las especies que contiene, y tiempo para seleccionar el material que constituirá el núcleo. Es conviene de cualquier manera considerar la opinión de los responsables de las unidades de conservación, los fitomejoradores de los respectivos cultivos y otros investigadores interesados en ellos y en el uso que se hará de su diversidad genética.

Este aspecto inicia con la recopilación de datos (Fig. 2), y entonces se debe pensar en:

- ¿Cuán completo deben ser los datos?
- ¿Cuántos y cuáles tipos de datos usar?
- ¿Cómo se pueden combinar los diferentes tipos de datos?

El enfoque más lógico será organizar los datos pasaporte, de caracterización, y en algunos casos de evaluación, en una clasificación jerárquica de las accesiones. Podrán ser considerados en orden descendente: información taxonómica, origen geográfico, origen ecológico, datos agromorfológicos y marcadores genéticos, por ejemplo. Esta es la Etapa 1, o *definición del dominio* (cobertura de datos de la colección núcleo).

Los datos pueden utilizarse combinados, o independientemente, si se definen uno o varios dominios. Si al final se desea tener una sola colección núcleo que sea representativa de lo más importante de la diversidad, se pueden combinar todos los enfoques independientes, e integrar los fondos más importantes de diversidad de cada dominio. La decisión de definir varios dominios puede obedecer a dos razones fundamentales:

- 1) Que se desee tener más rápidamente accesible la diversidad de la colección total para un atributo o grupo de atributos de interés muy específicos, para mejoradores y otros investigadores (Ejemplo, la resistencia a estreses bióticos y abióticos).
- 2) Que la información de caracterización/evaluación para esos atributos no tenga la misma cobertura en la colección base, es decir, que no estén caracterizados para la misma muestra que el resto de ellos.

Una vez establecido el dominio, se procede a la reducción de la dimensionalidad de los datos, en dependencia de la cantidad de descriptores que se hayan utilizado. Para ello se puede utilizar cualquier análisis de ordenamiento multivariado, que concentre la variabilidad de todos los descriptores en unas pocas variables independientes que sean una combinación lineal de las variables originales (las que tendrán una ponderación definida en la función), y que permita a su vez un ordenamiento previo de los datos de las accesiones. La selección del análisis estadístico más adecuado dependerá de la naturaleza de los datos y de la disponibilidad del paquete estadístico.

La reducción de la dimensionalidad se efectúa por aproximaciones o iteraciones sucesivas, acumulando cada vez mayor variabilidad en menos componentes o factores, e identificando en cada iteración las variables de mayor peso en la variabilidad explicada por la función que representa el eje respectivo.

Cuando los datos de caracterización correspondan a muchos descriptores, y esto produzca un conflicto con la capacidad de análisis de los diferentes paquetes de estadística disponibles, se recomienda agrupar los descriptores considerando, o bien la naturaleza de los datos, o bien la fase en que fueron registrados, o cualquier otro tipo de agrupación que corresponda con la estructura del listado (el que generalmente los incluye agrupados por fases fenológicas o por órganos de la planta). Una vez realizado esto, se procede a efectuar las iteraciones sucesivas en cada grupo de atributos, de la misma forma que se explica en el párrafo anterior, y cuando la cantidad de descriptores seleccionados en cada grupo de atributos (sumados) sea lo suficientemente pequeño para que ya se adecue a la capacidad del paquete en cuestión, se analizarán de conjunto a partir de ahí, continuando el proceso de reducción. Una vez acumulada las tres cuartas partes aproximadamente de la variabilidad total en las tres o cuatro primeras funciones, se

puede considerar terminado el proceso y se han identificado los descriptores mínimos, que son los que servirán para el análisis de la estructura de variabilidad de la colección.

Con las variables independientes (componentes o factores) establecidas, sobre la base de los descriptores mínimos, o sobre los valores originales de los descriptores mínimos, se construirán agrupamientos jerárquicos discontinuos, que deberán tener la mayor diferenciación entre ellos posible y la menor variabilidad posible dentro de ellos. Para realizar este proceso, se utilizarán análisis de conglomerados (cluster analysis), pudiéndose emplear diversos algoritmos aglomerativos, así como diversos índices de distancia/similitud, dependiendo esto último de la naturaleza de los datos. Se recomienda la estandarización de los atributos cuantitativos continuos, como manera de asegurar una participación equitativa de todos en el análisis. Los criterios aglomerativos más recomendados son el de el promedio de distancias no ponderadas (UPGMA), el ligamiento completo o del vecino más alejado y el método de Ward. La selección de este criterio depende de que el espectro de distancias entre las entradas sea mayor o menor. El método de Ward resultó apropiado para las colecciones núcleo que se presentan.

Para la selección del umbral de distancias en la formación de los grupos, se recomienda utilizar una regla de decisión variable, de manera que se puedan tener grupos lo suficientemente diferentes entre sí, lo que se puede comprobar realizando un análisis discriminante entre ellos, con base en los descriptores mínimos preferentemente estandarizados, o sobre las coordenadas de los componentes para cada accesión. El procedimiento descrito sobre la base del análisis combinado de los métodos de ordenamiento y de aglomeración jerarquizante, son denominados *análisis de patrón*, porque descubre la estructura subyacente en la colección.

Selección de la colección núcleo.

La selección de las entradas que constituirán la colección núcleo se debe efectuar estratificadamente, es decir, seleccionando en cada sub-cluster subyacente dentro de cada grupo del dendrograma resultante del análisis de conglomerado y sobre la base de los descriptores mínimos identificados en la etapa anterior (Fig. 3). Esto constituye la Etapa 4 del proceso.

La selección estratificada puede hacerse de manera aleatoria, o de forma dirigida, incorporando criterios del mejorador o especialista de germoplasma, buscando representatividad geográfica, taxonómica, ecológica, origen evolutivo de los cultivares, grado de domesticación, etc., así como su valor para el mejoramiento u otros propósitos de investigación.

A menudo se combina un conjunto de criterios para realizar la selección, pues no es usual que se haga la elección de las entradas sólo a partir de una selección asistida por métodos estadístico-genéticos o estadístico-matemáticos, ya que la inclusión del conocimiento de la estructura poblacional de la muestra base hace mucho más alta la representatividad de la colección núcleo. El tamaño del núcleo puede variar, en dependencia del tamaño de la colección base, fundamentalmente, y considerando que constituya un avance en la facilitación de su manejo con respecto a la colección base. El 10% recomendado por los clásicos de la Genética Poblacional, puede ser superior (hasta un 40%), si la colección base es pequeña. El número de entradas que deberá tener cada grupo se puede decidir utilizando uno de tres enfoques (por tamaño del grupo donde se selecciona, por diversidad de marcadores o basado en el conocimiento informal), o los tres combinados.

Una vez seleccionado el núcleo, durante la Etapa 5, se procede a describir el núcleo y a comprobar cuan representativo es con respecto a la colección base. La comprobación se puede efectuar sobre la base de múltiples procedimientos, aunque teniendo en cuenta que la colección núcleo debe tener una media similar a la colección base y una varianza similar o mayor. Por eso se puede emplear casi cualquier procedimiento que permita establecer esta comparación. Una retención de los valores de estos parámetros por encima de un 80%, es considerado como muy positivo, e indicará una efectividad alta en la selección del núcleo representativo de la colección base.

Manejo de la colección núcleo.

El conjunto de entradas de la colección núcleo puede mantenerse en **almacenamiento**, separado de las demás accesiones del banco de germoplasma o, aunque se conserven como parte de la colección completa, puede dársele tratamiento especial (Fig. 4). Esto dependerá de las instalaciones del Banco de Germoplasma, en cuanto a las instalaciones y la capacidad de almacenamiento o de mantenimiento. Pero hay que considerar que es probable que se requieran cantidades adicionales de semilla o de material de propagación de las entradas de la colección núcleo, lo que haría necesaria la asignación de espacio aparte o de nuevas instalaciones.

Tener la colección núcleo aparte es muy útil porque: a) Se reduce al mínimo la posibilidad de cometer errores, porque se garantiza el uso de una sola fuente de germoplasma; b) se simplifica la distribución y el uso de los materiales; c) se simplifica el trabajo de monitoreo; y d) se mantiene la colección núcleo en un sitio más seguro.

Es conveniente mantener duplicado en otros Bancos el núcleo seleccionado, así como conservado a largo plazo, o por métodos alternativos como *in vitro* (si procede).

En cuanto a la *regeneración*, como es probable que la demanda que tengan las entradas de la colección núcleo sea mucho mayor que la ejercida sobre otras accesiones de la colección completa, podrá tenerse mayor cantidad de semillas de estas accesiones, por lo que la regeneración de este sub-conjunto debe contemplar este elemento, o podrá hacerse la regeneración “a solicitud”, si fuera muy engorrosa. Por otra parte, el número relativamente pequeño de entradas de una colección núcleo permite que las actividades de prueba, cuarentena y eliminación de agentes patógenos se hagan con relativa frecuencia, ya que su ejecución en una colección completa es casi impracticable.

Las entradas de la colección núcleo serán las primeras que se tomen para evaluar caracteres nuevos (como marcadores bioquímicos o moleculares), lo que permitirá que la información disponible sobre las entradas de una colección núcleo sea más completa que la que se pueda suministrar sobre otras accesiones, por lo tanto debe estar completamente documentada. El proceso mismo de establecer la colección núcleo y de seleccionar sus entradas, debe documentarse. Es necesario que la información sobre los procedimientos que se siguieron y sobre los datos que se utilizaron esté disponible, para que pueda usarse en la validación, la sustitución, la enmienda o la investigación de las propiedades de accesiones provenientes del núcleo básico. Publicar los procedimientos empleados para establecer la colección núcleo es una parte importante de este proceso. La información sobre las entradas de la colección núcleo servirá para proporcionar datos adicionales muy valiosos sobre la colección completa.

Una vez constituida la colección núcleo, ésta debe ser bastante estable. Su manejo se dificultará más si su conformación cambia continuamente y su uso se verá restringido si las entradas están expuestas constantemente al cambio. Es posible que sea necesario cambiar de vez en cuando, el número y la identidad de las entradas de una colección núcleo. Debe tratarse de que estos cambios sean leves, pero a veces tienen que ser un poco más serios. En ese caso, se deberán considerar los siguientes aspectos: a) identificar las accesiones que deban incluirse en la colección núcleo, por ejemplo, nuevas formas de resistencia tanto a enfermedades específicas como a determinadas causas de estrés; b) atender solicitudes de los usuarios de incluir accesiones específicas porque tienen características importantes para la comunidad de usuarios, por ejemplo, cultivares estándar para pruebas específicas o genotipos fijos de apoyo que se emplean para elaborar mapas genéticos moleculares o para descifrar secuencias de un genoma; c) adquirir otras accesiones cuya nueva diversidad deba estar representada en la colección núcleo; d) aumentar los conocimientos sobre el alcance y la distribución de la diversidad genética en el material del cual fue extraída la colección núcleo; el hallazgo de que unos grupos tienen mucha más diversidad que otros haría pensar en la posibilidad de alterar el número de entradas tomadas de los grupos en cuestión.

De cualquier manera, si fuese necesario este proceso, debe planificarse y organizarse cuidadosamente, de manera que no comprometa la integridad de la colección núcleo o cause problemas a los usuarios, y sobre todo, informarlo. Puesto que un aspecto sobresaliente de una colección núcleo es su tamaño limitado, el objetivo del administrador de ésta debe ser remplazar materiales en vez de agregar otros nuevos.

Uso de las colecciones núcleo.

La estrategia para el uso está muy íntimamente ligada a las particularidades de cada colección, en relación a su tamaño, el tipo de reproducción del cultivo, y las condiciones materiales de cada banco en particular. Para las siete colecciones que se presentan en el informe técnico, se preparó una estrategia, que es una salida independiente del proyecto.

BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

Fundora Mayor, Z., L. Castiñeiras y L. Fernández (2001): Lecciones avanzadas sobre conservación y manejo de recursos fitogenéticos. *Serie de Documentos de Capacitación No. 1*, Edit. INIFAT, 328 pp. ISBN 959-7121-05-0.

Fundora Mayor, Z.; M. Hernández, R. López, L. Fernández, A. Sánchez, J. López e I. Ravelo. (2004). Analysis of the variability in collected peanut (*Arachys hypogaea* L.) cultivars for the establishment core collections. *PGR Newsletter* 137: 1-8.

Hintum, Th.J.L., A.H.D. Brown, C. Spillane y T. Hodgkin (2003): Colecciones Núcleo de Recursos Fitogenéticos. *IPGRI Boletín Técnico No. 3*: 42 pp.

Hodgkin, T., A. H. D. Brown, T. J. L. van Hintum y E. A. V. Morales (1995): *Core collections of plant genetic resources*: John Wiley & Sons, 269 pp.

Hodgkin, T.; G. Qingyuan ; Z. Xiurong; Z. Yingzhong; F. Xiangyun; P.L. Gautam; R.K. Majan; Bisht, I.S., T.R. Loknathan; P.N. Mathur & Z. Mingde. (1999): Developing sesame core collections in China and India. In: *Core Collections for Today and Tomorrow* (Eds) R.C. Johnson and T. Hodgkin. IPGRI, Roma, Italia 74-81p.

Rodríguez Manzano A., A. Rodríguez Nodals, Z. Fundora Mayor y L. Castiñeiras. (1999). Descriptores mínimos para la caracterización y formación de colección núcleo en el germoplasma de *Colocasia esculenta* (L.) Schott en Cuba. *CONVENCION TROPICO´99*. (Agricultura Tropical) PSM. Soft Cal. N° 16.

Fig. 4. Guía para el manejo de la colección núcleo.

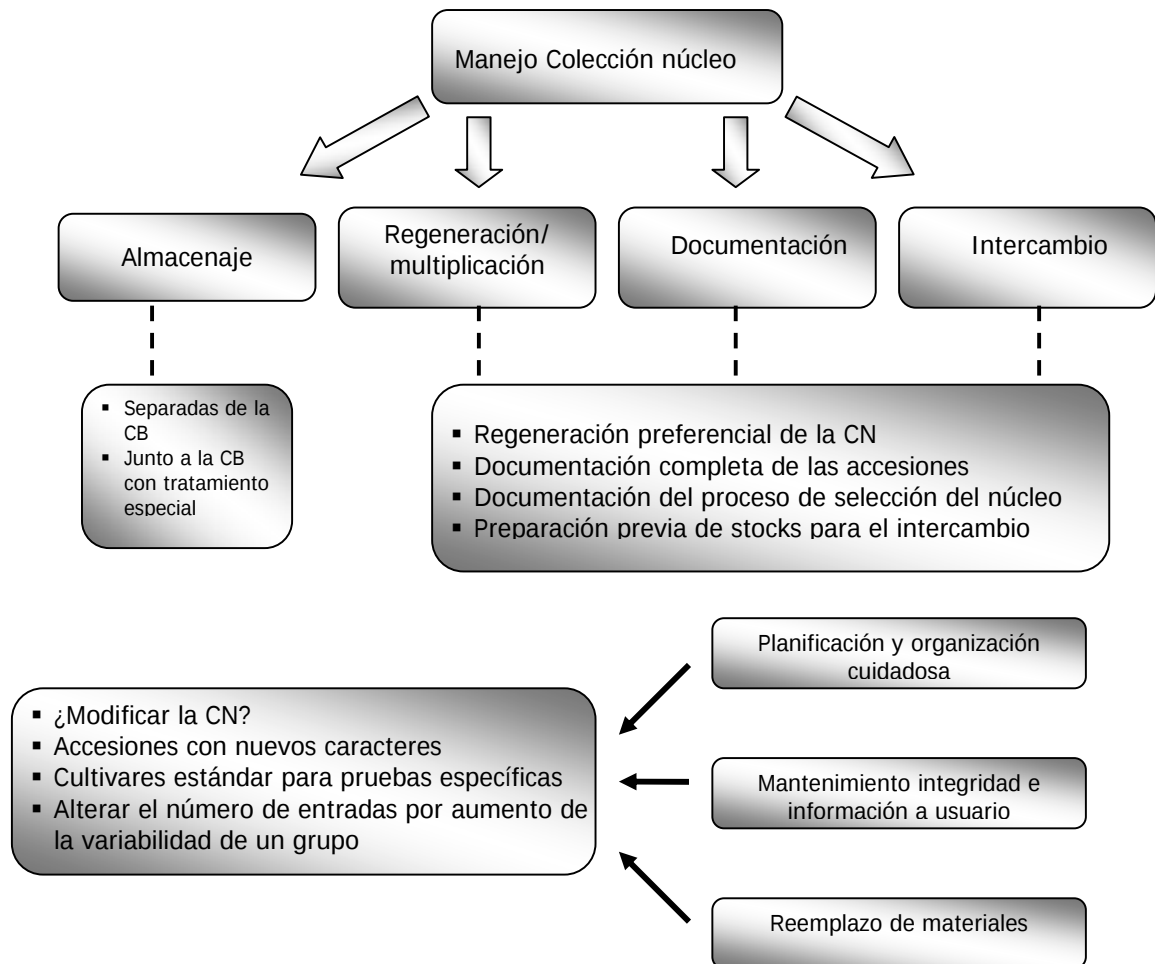


Fig. 3. Guía para la selección de las entradas de la colección núcleo.

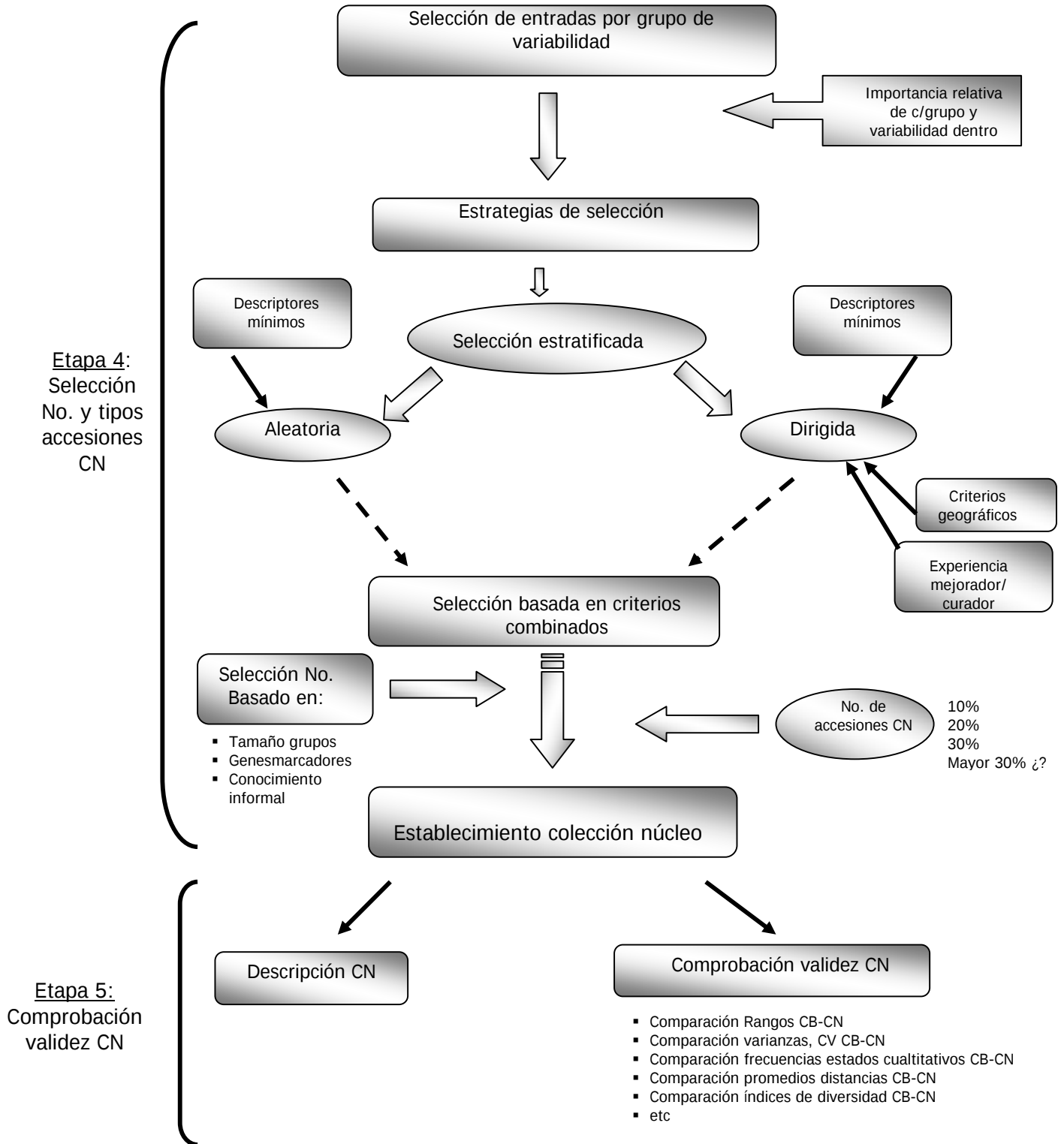


Fig. 2. Guía para el establecimiento del dominio y la estructura genética de la población.

