



Congelamiento de semillas: Una alternativa para la conservación del germoplasma de café

Ricardo Acuña Zornosa
Disciplina de Fisiología



©FNC-Cenicafé 2020



Contenido

- I. Definiciones y características del germoplasma**
- II. Formas de conservación del germoplasma**
- III. El germoplasma de Café**
- IV. Congelamiento de semillas: Una alternativa de conservación del germoplasma de café**



I. Definiciones y características del germoplasma



Qué es el germoplasma?

- El germoplasma se refiere al material hereditario transmitido a la descendencia a través de una célula germinal.
- Cualquier material biológico mediante el cual es posible generar nuevos individuos.
- El germoplasma es la colección de recursos genéticos asociados a un cultivo agrícola.



Definiciones de la Decisión Andina 391 de 1996

RECURSOS GENÉTICOS

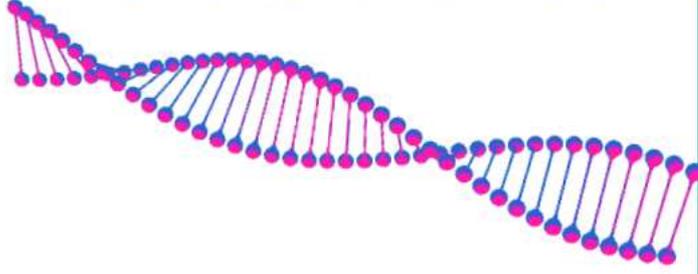
Todo material de naturaleza biológica que contenga información genética de valor o utilidad real o potencial

INTERPRETACIÓN

- Material de la herencia
- Contiene toda la información necesaria para generar un organismo y mantenerlo vivo
- En el caso de virus, viroides y similares: material hereditario que permite su replicación.

Unidades funcionales y no funcionales de la herencia: ADN (ácido desoxirribonucleico) y ARN (ácido ribonucleico)

EN TODAS LAS FORMAS QUE SE ENCUENTREN EN LA NATURALEZA



LA PAZ ESTÁ EN NUESTRA NATURALEZA



El germoplasma es la base de la agricultura



Germoplasma de papa



Germoplasma de maíz

La diversidad genética del germoplasma es el insumo utilizado en la producción de nuevas variedades

Germoplasma de café



CONSERVACION DEL GERMOPLASMA

El estudio de los métodos mediante los cuales es posible coleccionar, caracterizar y conservar el germoplasma



Picture 2.35 *In vitro* plantlets conservation
C. canephora (IRD). From: A. Rival.



Picture 2.36 *In vitro* plantlets conservation
C. peruviana (IRD). From: A. Rival.

Accesión o espécimen: Todo organismo que compone una colección biológica con la información básica de su taxonomía, localidad de su colecta, y del colector

ITC0609 - Pahang

Passport Data



Accession number:	ITC0609	PDCI _m Score:	7.5
Accession name:	Pahang	PDCI Score:	5.55
DOI:	10.18730/9K93B	Available for distribution:	
Biological status of accession:	wild		
Taxonomic classification:	Musa > Eumusa > acuminata > subsp. malaccensis		
Institute code:	BEL084 (ITC)		
Acquisition date:	1989/05/25		
Status:	active		
Type of storage:	 Lyophilized Leaves	 In Vitro Collection	 Cryopreserved Collection



Características del germoplasma

- **Representa la variabilidad genética disponible en un cultivo agrícola**
- **Incluye especies silvestres, especies emparentadas, variedades actuales, variedades obsoletas,**
- **Es conservado en: centros de diversidad genética , bancos de germoplasma, santuarios de plantas, fincas de agricultores, empresas de semillas.**
- **Es el material básico para los programas de mejoramiento genético.**
- **El germoplasma puede ser autóctono (colectado dentro del país) o exótico (colectado en países extranjeros)**



II. Formas de Conservación del Germoplasma

Dos métodos:

- ❖ **Conservación in-situ:** expresión latina que significa 'en el sitio, en su lugar'
- ❖ **Conservación ex-situ:** expresión latina que significa 'fuera de su lugar, fuera de su sitio'

Conservación ex-situ

- Se logra en condiciones no naturales.
 - Bancos de germoplasma
- Es el método más utilizado de conservación
- Pros y Contras



Formas de conservación ex-situ



Plant pot of money to represent green banking - Copyright Unsplash

1. **Banco de semillas: (Refrigeradas o congeladas)**
2. **Banco de germoplasma en campo: plantas sembradas en Estaciones Experimentales.**
3. **Banco de Tejidos: meristemos conservados el laboratorio (in vitro o congelados).**
4. **Banco de células: embriones, polen, células embriogénicas (congelados)**
5. **Bancos de ADN: genomas o segmentos de ADN (congelados)**



1. Banco de Semillas

Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo
CIMMYT, Mexico- Veracruz , MX.

Trigo
170.000 accesiones

Maiz
28.000 accesiones



GLOBAL CROP DIVERSITY TRUST/USED UNDER CREATIVE COMMONS CC BY-NC-SA 2.1



1. Banco de Semillas

International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics (ICRISAT)

Patancheru, Telangana, India

**126.830
acciones**

144 países

**Sorgo, mijo,
garbanzo,
cacahuete,
guandul.**





1. Banco de Semillas (congeladas)

Conservación de semillas usando tanques de nitrógeno líquido



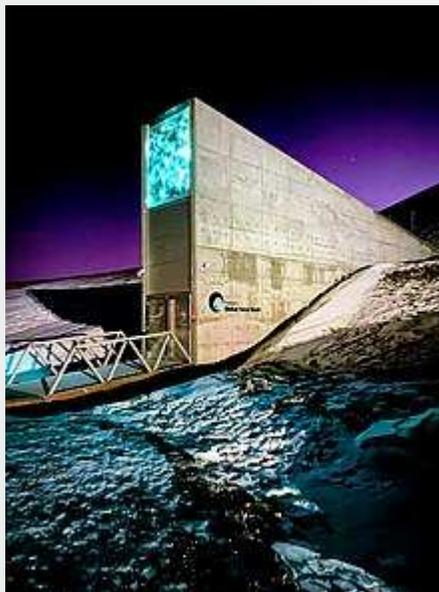
(Foto: Bioversity/ILRI, Centro Nacional de Agrobiodiversidad, Suwon, Republica de Korea)

(Foto: J Hanson, Oficina Nacional de Recursos Genéticos Vegetales, Delhi, India)



Mantenimiento de un banco de semillas: Control del nivel de nitrógeno líquido

1. Banco de Semillas (Congeladas)



Banco Mundial de Semillas de Svalbard

Refrigeración Artificial -18 °C
 Refrigeración Natural -3° a -6° C
 Humedad Relativa < (130 msnm)



Capacidad del Banco

Area: 1.000 mt²

Muestra: 500 semillas

Número de muestras: 4.5 millones

Año	Especies	Total muestras
2008		>187.000
2010		500.000
2013		770.000
2014		820.619
2015	4.000	840.000
2019		983.524

2. Banco de Germoplasma en campo

Colección Germoplasma de Taro (*Colocasia sp*)

Universidad de Hawaii, Honolulu (EEUU)



300 Accesiones

Photo: University of Hawaii Taro Germplasm collection after heavy pruning and EM•1® drip irrigation application prior to March 2018 Taro Field Day event.

2. Banco de Germoplasma en campo



500 accesiones

Colección Nacional de germoplasma de olivo (*Olea sp.*), Mirto, Cosenza, (Italia).

DOI: [10.3390/biology8030062](https://doi.org/10.3390/biology8030062); License [CC BY](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

2. Banco de Germoplasma en campo



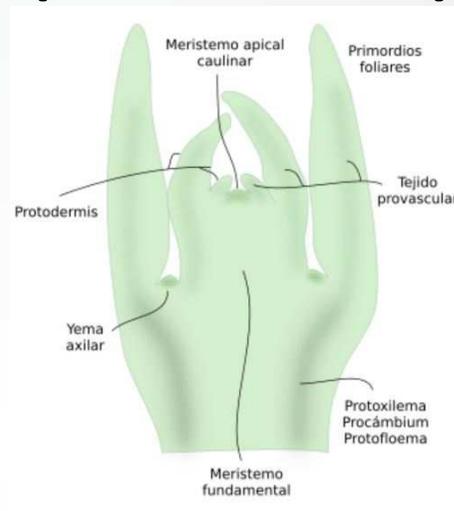
243 accesiones

Banco de germoplasma en campo de banano (*Musa sp*)
Universidad de Tamil Nadu, Madras, India

3. Banco de Tejidos (meristemos)



**Colección de germoplasma de papa
Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima,
Perú. (Foto: M.E. Dulloo)**



**Colección de germoplasma de banano
(Foto: Bioersity Internacional)**

<https://cgkb.cgiar.croptrust.org/index.php/procedures-mainmenu-242/conservation-mainmenu-198/in-vitro-bank-mainmenu-200>



11.000 accesiones



David Ellis, head of CIP's Genebank, Lima facility

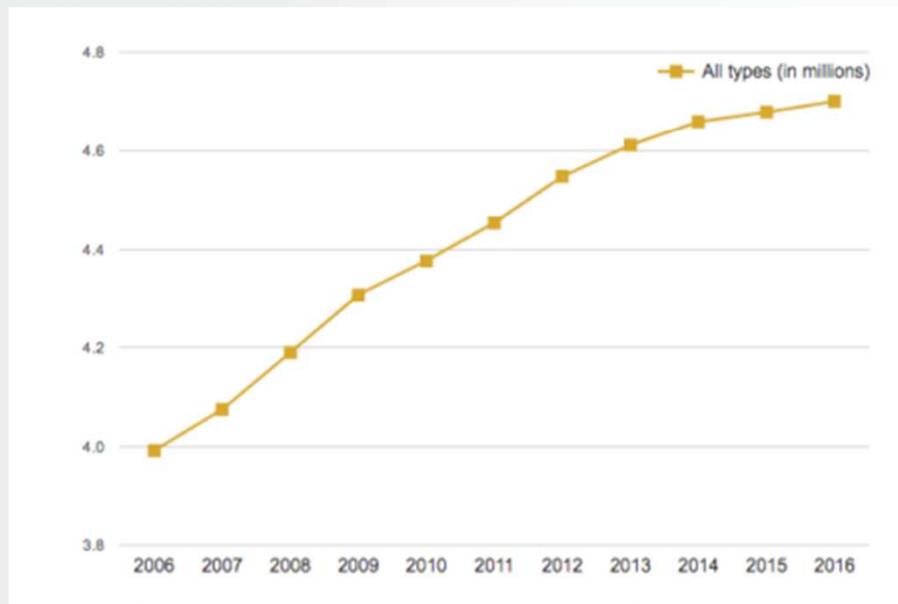
<https://cipotato.org/genebank-2/cips-genebank-backups-provide-more-layers-of-food-security/>



CIP In vitro genebank for potato and sweet potato (photo: A Jorge)

<https://cgb.cgiar.croptrust.org/index.php/procedures-mainmenu-242/conservation-mainmenu-198/in-vitro-bank-mainmenu-200>

Cuántos bancos de germoplasma hay?



Número de Accesiones de recursos genéticos vegetales, conservados bajo condiciones de mediano o largo plazo, (millones)



Inventario 2016

- 4.7 millones de accesiones
- 602 bancos
- 82 países
- 14 Centros de Investigación



III. EL GERMOPLASMA DE CAFE

PAIS	N° Accesiones	PAIS	N° Accesiones
Australia		Kenia	
• Queensland Government Department of Agriculture	67	• Coffee Research Foundation (CRF)	800
Benin		Madagascar	
• Unite de Recherche café et cacao (URCC)	28	• Centre National de Recherche Appliquee au Developpement (FOFIFA)	407
Brasil		Malasia	
• Instituto Agronomico do Parana (IAPAR)	2015	• Rice and Industrial Crop Research Center, MARDI (RIC, MARDI)	15
• Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG)	1596	Méjico	
• IAC, Instituto Agronómico de Campinas	4152	• Banco Nacional de Germoplasma Vegetal, Departamento de Fitotecnia, Universidad Autonoma de Chapingo (UACH)	250
• Embrapa Café/ Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistencia Technica e Extensao Rural (INCAPER)	375	• INIFAP, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agricolas y Pecuarias	73
• Universidade Federal de Vicosa (UFV)	1036	Nigeria	
• Embrapa Café/ Fundacao Procafe	1518	• National Center for Genetic Resources and Biotechnology (NACGRAB)	10
• Embrapa Rondonia	981	Nueva Guinea-Papua	
Camrun		• CIC, Coffee Industry Corporation Limited	90
• IRAD, Institut de la Recherché Agronomique	1552	Perú	
Colombia*		• Estacion Experimental Agraria Tulumayo (INIA-EEA.TUL)	169
• Centro Nacional de Investigaciones de Café Pedro Uribe Mejia (CENICAFE)	800	Portugal	
Congo		• CIFC-IICT, Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro	71
• INERA, Institut National pour l'Etude et la Recherche Agronomique	58	Puerto Rico	
Costa Rica		• UPR, Estacion Experimental Agrícola in Adjuntas, Universidad de Puerto Rico	70
• Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE)	1960	Reunion	
• Instituto del Café - Costa Rican Coffee Institute (ICAFE)	58	• Laboratoire des Ressources Génétiques et Amélioration des Plantes Tropicales, ORSTOM (ORSTOM-MONTP)	742
Costa de Marfil		Ruanda	
• Centre National de la Recherche (CNRA)	6900	• RAB, Station Rubona	182

BANCOS DE GERMOPLASMA DE CAFE

- ☐ Países: **38**
- ☐ Total de Bancos: **51**
- ☐ Total de Accesiones: **45.360**

PAIS	N° Accesiones	PAIS	N° Accesiones
Cuba		Sri Lanka	
• ECICC, Estación Central de Investigaciones de Café y Cacao	1797	• Department of Export Agriculture (DEA)	15
Republica Dominicana		Taiwan	
• Centro Norte de Investigaciones Agropecuarias y forestales (CENIAF)	14	• Chiayi Agricultural Experiment Station (TARI)	33
Ecuador		Tanzania	
• DENAREF, Departamento Nacional de Recursos Fitogenéticos y Biotecnología	229	• Tanzania Coffee Research Institute (TaCRI)	10
• Estacion Experimental Pichilingue (EETP)	163	Tailandia	
Etiopia		• Horticultural research Institute, Department of Agriculture (HRI-DA)	300
• Ethiopian Biodiversity Institute (EBI)	4631	Reino Unido	
• Jimma Agricultural Research Center (JARC)	4780	• Millenium Seed Bank, KEW, Wakehurst (RBG)	33
Gana		Estados Unidos	
• CRIG, Cocoa Research Institute of Ghana	500	• Subtropical Horticultural Research Station., USDA-ARS, Miami	120
Alemania		• USDA ARS - Kona HAWAII, US Department of Agriculture, gricultural Research Service	51
• Greenhouse for Tropical Crops, Institute for Production and Nutrition of World Crops, Kassel University (GHK)	10	Uganda	
Guinea		• NACORI, Coffee Research Center (COREC) part of National Crop Resources Research Institute (NaCRR)	120
• CRAS-IRAG, Centre de Recherche Agronomique de Seredou	104	Venezuela	
Guyana		• INIA-Monages	51
• CIRAD, Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement	3800	• INIA - Táchira	254
India		Vietnam	
• Central Coffee Research Institute (CCRI)	353	• Ba Vi Coffee Center (CRC)	70
Indonesia		• Coffee and Cocoa Research Institute	56
• Indonesian Coffee and Cocoa Research Institute (ICCRI)	1637		

Bramel, P., Krishnan, S., Horna, D., Lainoff, B., & Montagnon, C. (2017). Global conservation strategy for coffee genetic resources. *Crop Trust, World Coffee Res., Portland, OR.*

Conservación de germoplasma de café



C. racemosa

C. canephora

C. arabica

C. liberica

- Las semillas de *Coffea sp.* son tolerantes a la deshidratación parcial y sensibles a la temperatura.
- La Colección Colombiana de Café se conserva en condiciones de campo.
- El mantenimiento de la CCC es de \$ 200M/año.

Colección Colombiana de Café (CCC)

Conserva en campo la variabilidad genética de *Coffea sp*

Colección Internacional (28,7%)

Clase	Número de Accesiones	Part. (%)
<i>Coffea arabica</i>	885	85,26
<i>Coffea canephora</i>	93	9,32
<i>Coffea liberica</i>	19	1,54
<i>Coffea congensis</i>	5	0,58
<i>Coffea eugenioides</i>	2	0,19
<i>Coffea kapakata</i>	2	0,19
<i>Coffea racemosa</i>	5	0,48
<i>Coffea salvatrix</i>	1	0,10
<i>Coffea stenophylla</i>	1	0,10
<i>Coffea benghalensis</i>	1	0,10
Híbridos Interespecíficos	17	1,83
Total Introducciones	1031	
Área	4.24 ha	

Colección de Trabajo (71,3%)

Clase	Número de Accesiones	Part. (%)
Selecciones dentro Introducciones	797	30,87
Cruzamientos Intervarietales (H1000)	62	2,40
Cruz. Fuentes de Res. <i>C. arabica</i> (H2000)	195	7,55
Cruzamientos con el H de T (H3000)	476	18,44
Híbridos Interespecíficos (H4000)	542	20,99
Clones Elite (Colombia, Castillo®, Cenicafé 1)	354	13,87
Otros	152	5,89
Total Selecciones	2578	
Área	4.29 ha	

**Total Accesiones
3609**

IV. Congelamiento de Semillas de café



Semillas Ortodoxas

Tolerancia a la deshidratación, baja T°. Leguminosas, cereales, manzana, Dátil



Semillas Recalcitrantes

Intolerancia a la deshidratación, baja T°. Mangostino, Aguacate, Cítricos, Mango..

IV. Congelamiento de Semillas de café



Semillas Ortodoxas

Tolerantes a la deshidratación, baja T°. Leguminosas, cereales, manzana, Datil



Semillas Intermedias

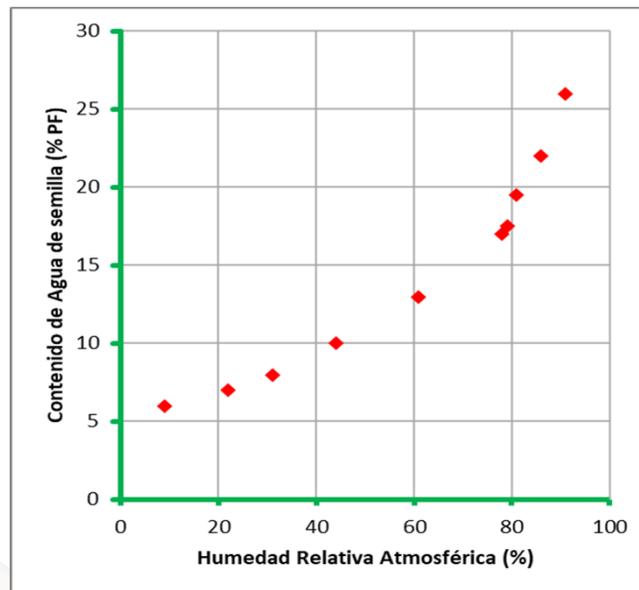
Parcialmente tolerantes a la deshidratación, baja T°. Macadamia, Papaya, **Café...**



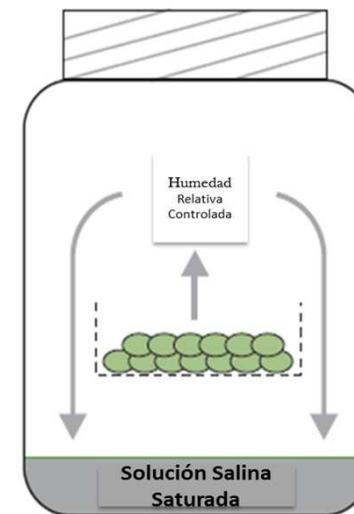
Semillas Recalcitrantes

Intolerantes a la deshidratación, baja T°. Mangostino, Aguacate, Cítricos, Mango....

Deshidratación controlada de la semilla de *C. arabica*

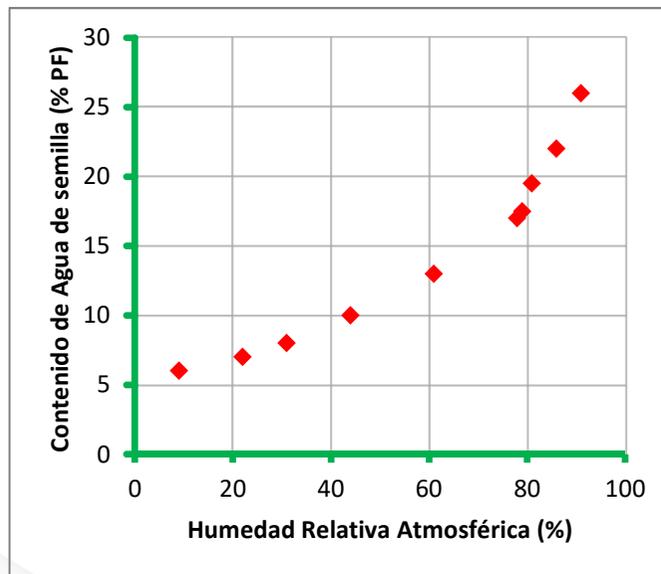


Isoterma de Adsorción

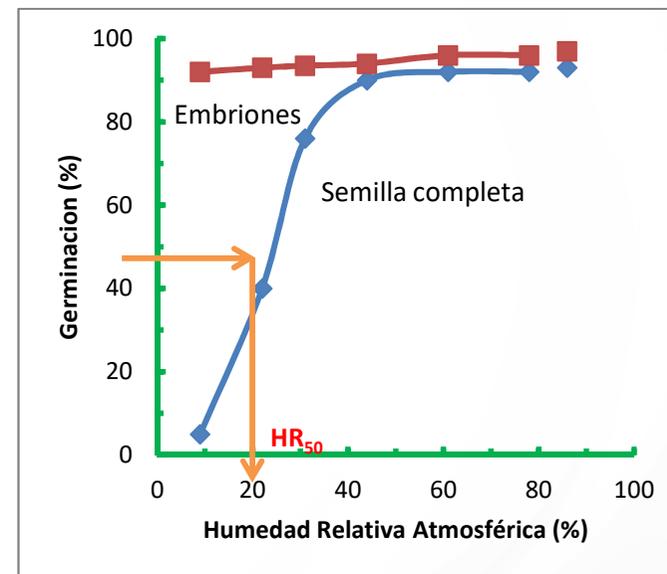


Cámara para deshidratación controlada de semillas

Efecto fisiológico de la Deshidratación de la semilla de *C. arábica*

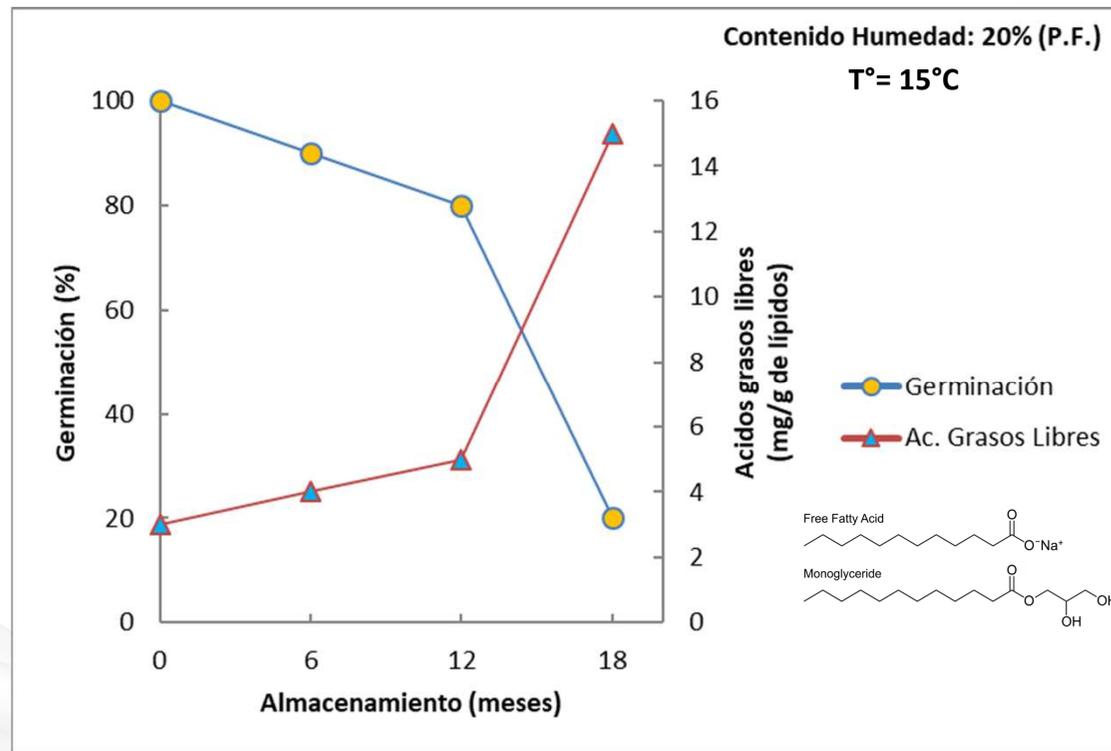


Isoterma de Adsorción

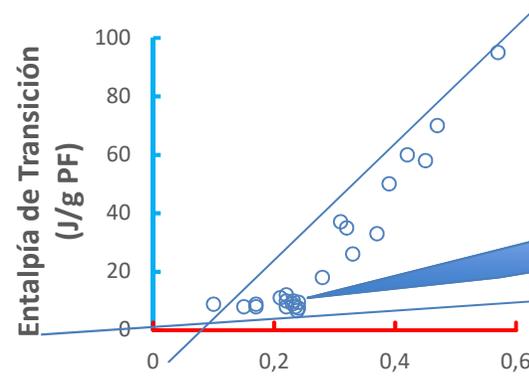


Efecto de la deshidratación sobre la germinación

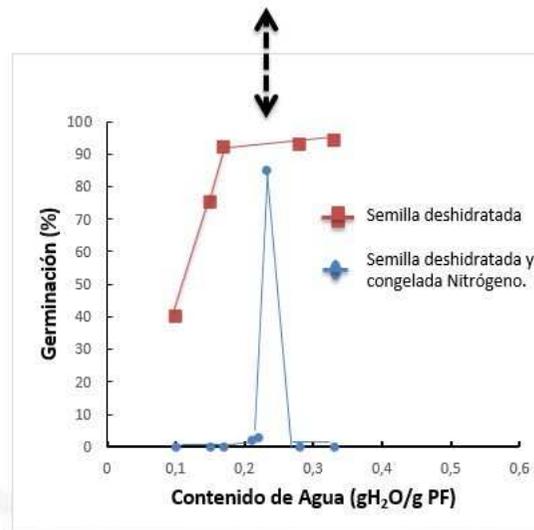
Fisiología del envejecimiento de semilla almacenada de *C. arabica*



Congelamiento de semillas de *C. arabica*:

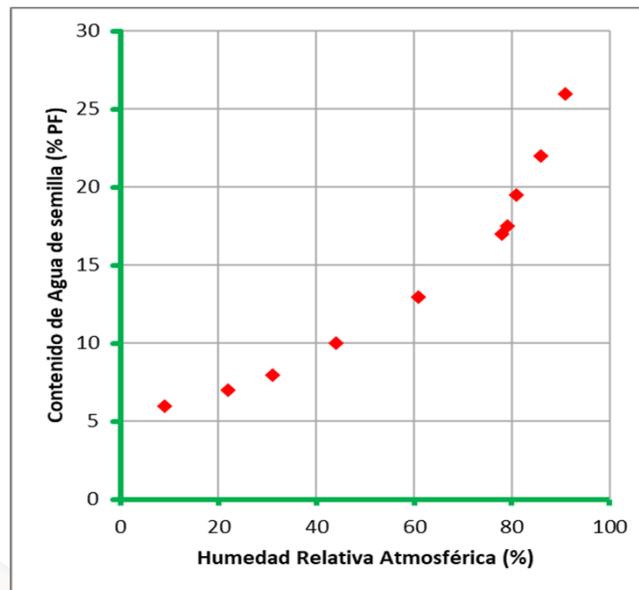


TECNICA:
Calorimetría diferencial de Barrido mide el flujo de calor en el tejido durante su enfriamiento.

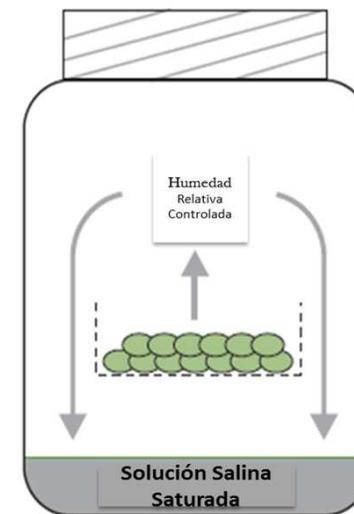


Dussert et al. 2001, *Physiologia Plantarum* 112:495-504.
Dussert et al. 2003, *Physiologia Plantarum* 119:534-543.

Deshidratación controlada de la semilla de *C. arabica*



Isoterma de Adsorción



Cámara para deshidratación controlada de semillas

Protocolo para el Congelamiento de semillas de *Coffea arabica*

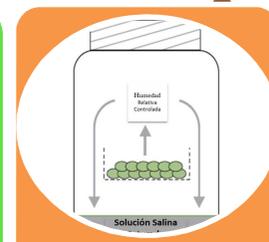
Dussert & Engelmann, 2006, *CryoLetters* 27(3):169-178.



Colecta de Semilla



Beneficio Manual



Deshidratación a HR 81%

← **Preparación de la semilla** →



Pre-congelamiento en Hielo Seco



Congelamiento En Nitrógeno Líquido (*)

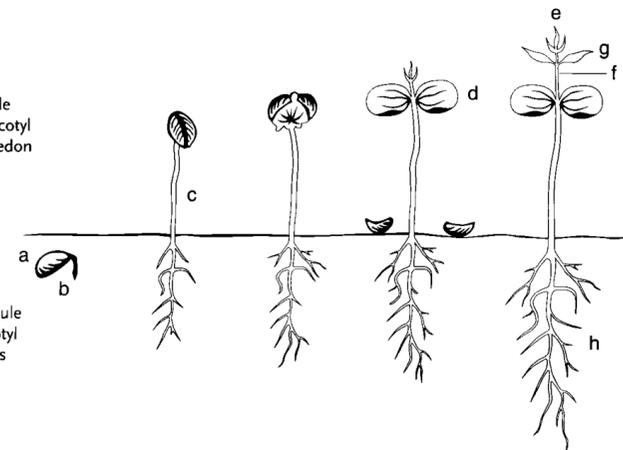


Rehidratación en Baño de Agua 37°

← **Congelación de la semilla** →

- a. seed
- b. radicle
- c. hypocotyl
- d. cotyledon

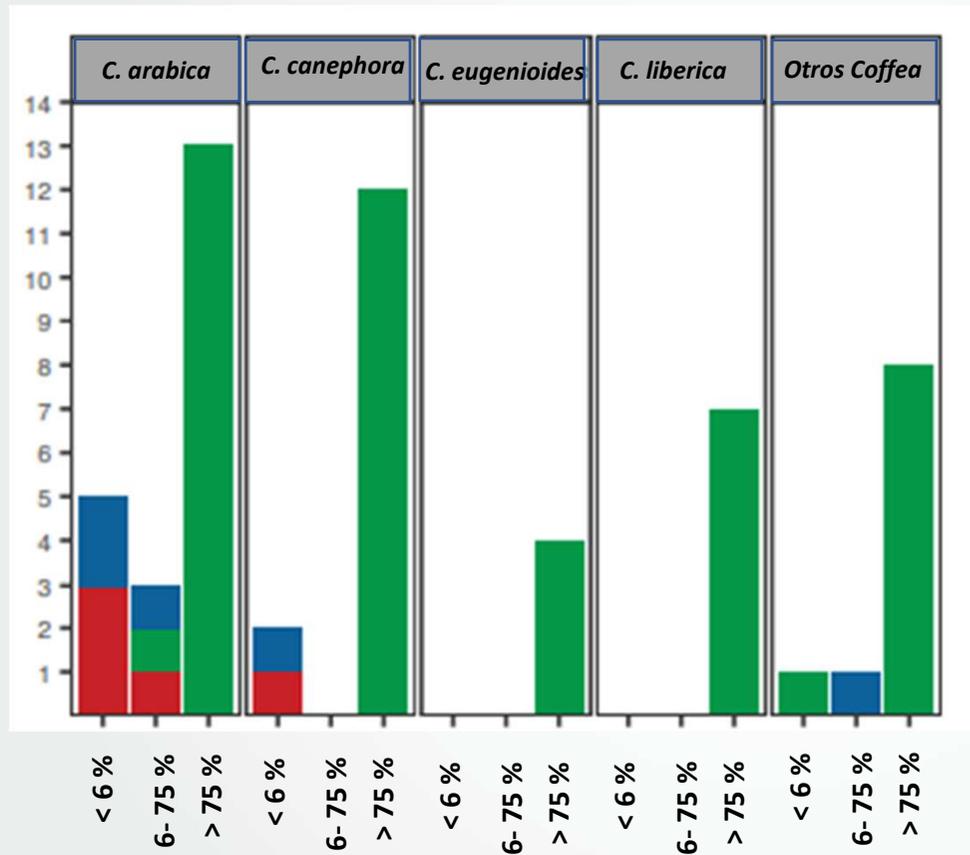
- e. plumule
- f. epicotyl
- g. leaves
- h. roots



(*) Fuente de transición vítreo del agua es -150 °C

Banco de germoplasma de café congelados

Número de Bancos de Germoplasma



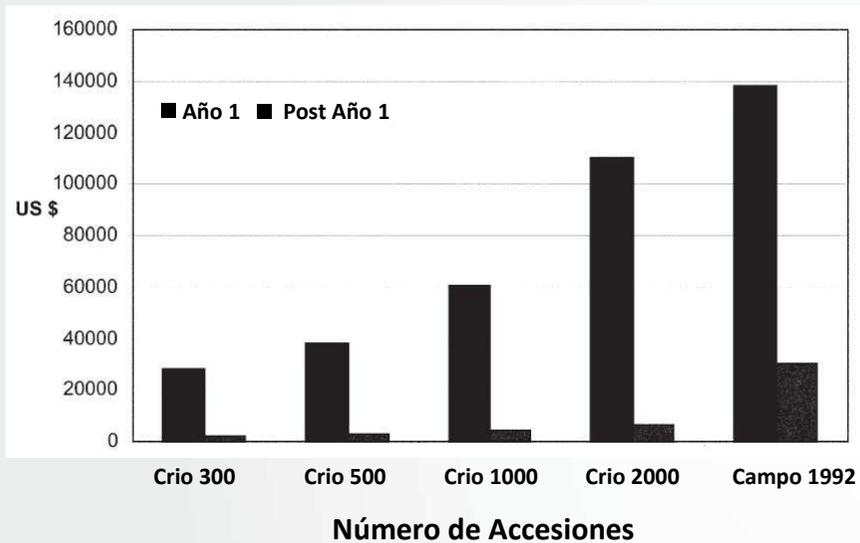
-  Crioconservación semillas y embriones
-  Colecciones en Campo
-  Semilla refrigerada

COSTOS DE LA CONSERVACION DE GERMOPLASMA DE CAFÉ EN NITROGENO LIQUIDO

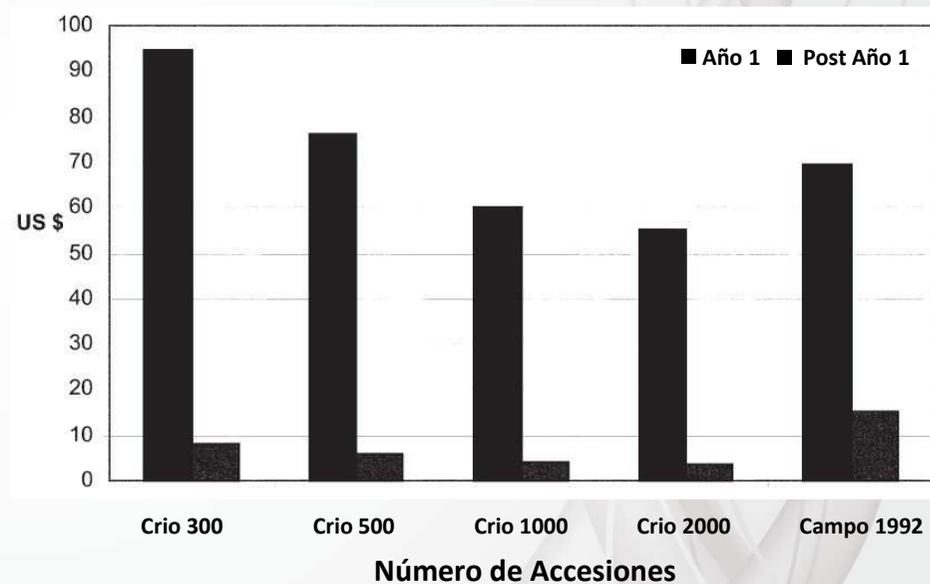
COSTOS	Número de Acciones congeladas											
	300			500			1000			2000		
	#	V/r Und	Total	#	V/r Und	Total	#	V/r Und	Total	#	V/r Und	Total
Manejo Semilla												
			12.050			15.010			21.140			36.390
			6.627			8.255			11.627			20.014
			6.900			11.300			22.450			44.850
AÑO 1												
			1.500			2.250			3.750			7.500
			1.300			1.300			1.300			1.300
			28.377			38.115			60.267			110.055
			95			76			60			55
Llenado de Tanque de Congelamiento												
			1.300			1.300			1.300			1.300
			1.100			1.650			2.750			5.500
			2.400			2.950			4.050			6.800
			8			6			4			3

Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba, Costa Rica

COSTO TOTAL



COSTO POR ACCESION



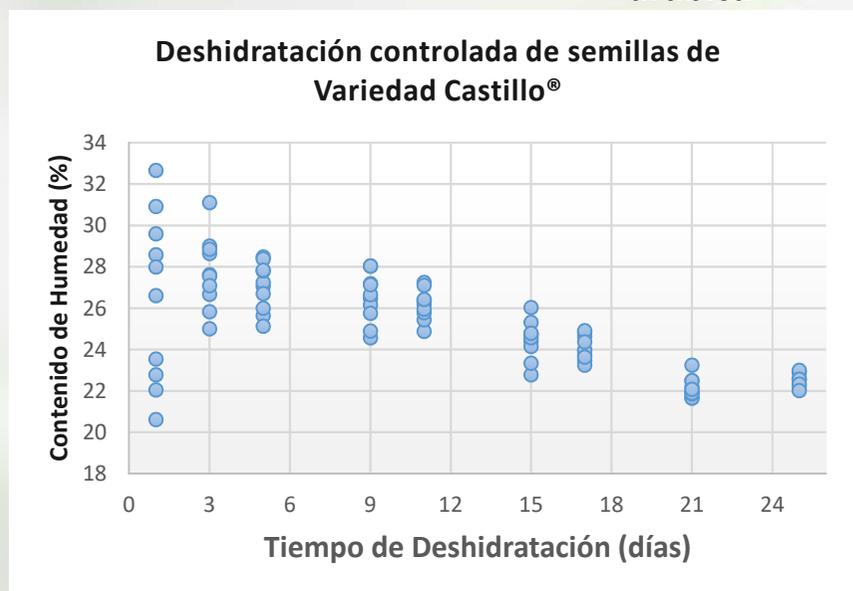
Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba, Costa Rica



Materiales y Métodos



RESULTADOS: Deshidratación controlada de la semilla de *C. arabica*

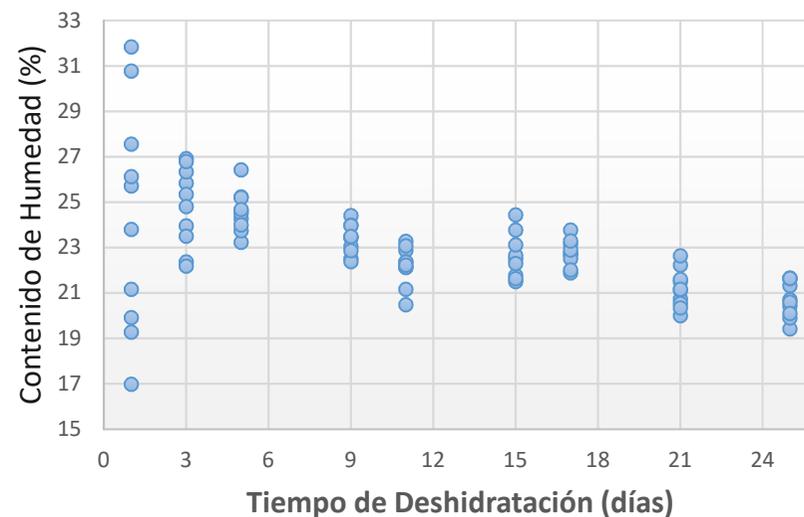


Contenido de humedad de semillas de la Variedad Castillo® a los 3, 5, 9, 11, 15, 17, 21 y 25 días de deshidratación.

RESULTADOS: Deshidratación controlada de la semilla de *C.*

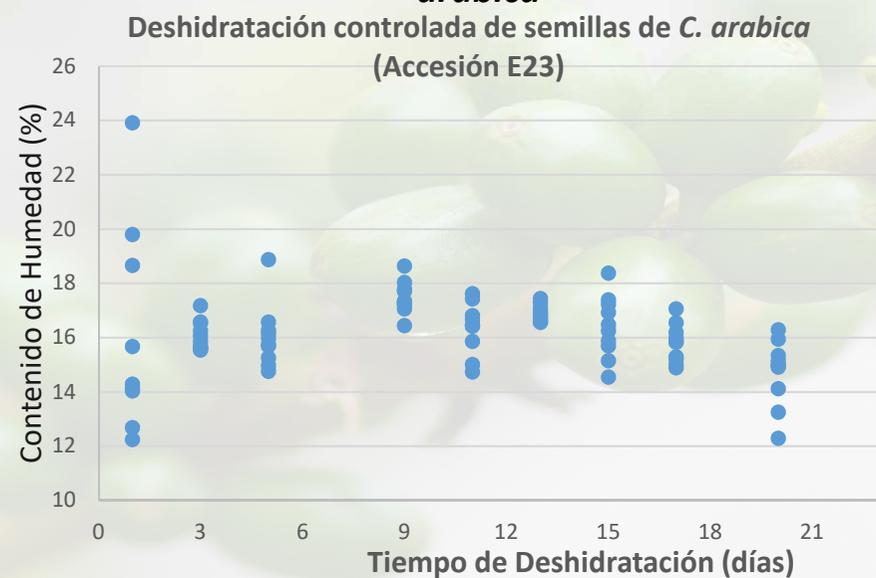
arabica

Deshidratación controlada de semillas de *C. arabica* (Accesión E33)



Contenido de humedad de semillas de *Coffea arabica* (Accesión E33) a los 3, 5, 9, 11, 15, 17, 21 y 25 días de deshidratación

RESULTADOS: Deshidratación controlada de la semilla de *C. arabica*



Contenido de humedad de semillas de *Coffea arabica* (Accesión E23) a los 3, 5, 9, 11, 13, 15, 17, 20 días de deshidratación.

Congelamiento

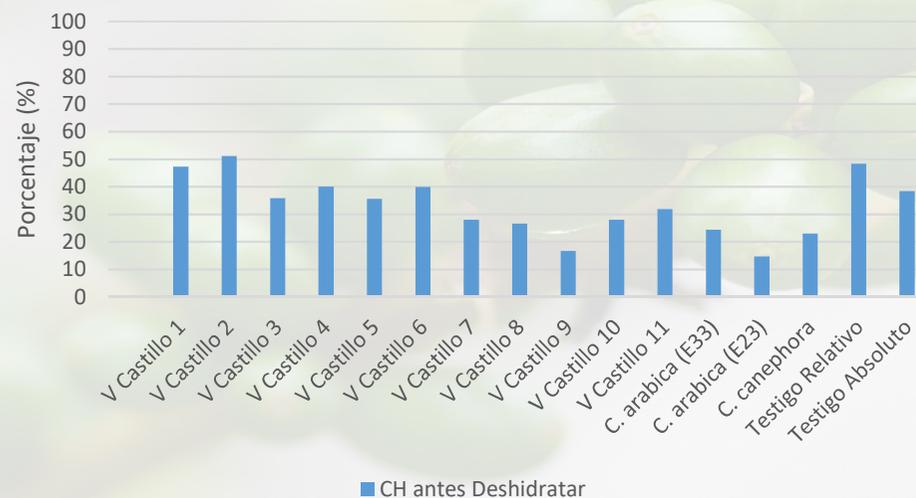
Alternativa de almacenamiento de semillas



- Nitrógeno Líquido
- Temperatura de ebullición: -196° C

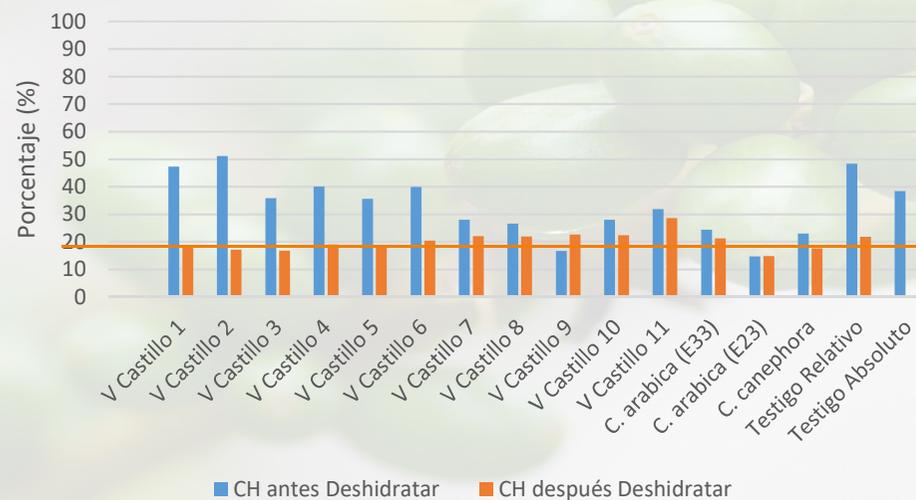
Punto de transición vítreo del agua es -136° C

Germinación de semillas de *Coffea sp* almacenadas en nitrógeno líquido (-196 °C)



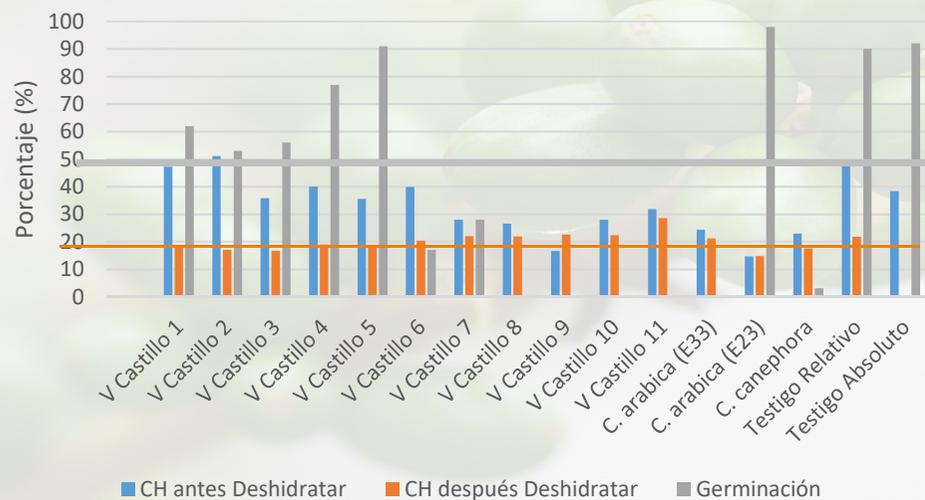
Contenido de humedad (**CH**) y porcentaje de germinación de semillas de la Variedad Castillo (Lotes 1 al 11), de las accesiones de *Coffea arabica* E33 y E23 y de *Coffea canephora*.

Germinación de semillas de *Coffea sp* almacenadas en nitrógeno líquido (-196 °C)



Contenido de humedad (**CH**) y porcentaje de germinación de semillas de la Variedad Castillo (Lotes 1 al 11), de las accesiones de *Coffea arabica* E33 y E23 y de *Coffea canephora*.

Germinación de semillas de *Coffea sp* almacenadas en nitrógeno líquido (-196 °C)



Contenido de humedad (CH) y porcentaje de germinación de semillas de la Variedad Castillo (Lotes 1 al 11), de las accesiones de *Coffea arabica* E33 y E23 y de *Coffea canephora*.

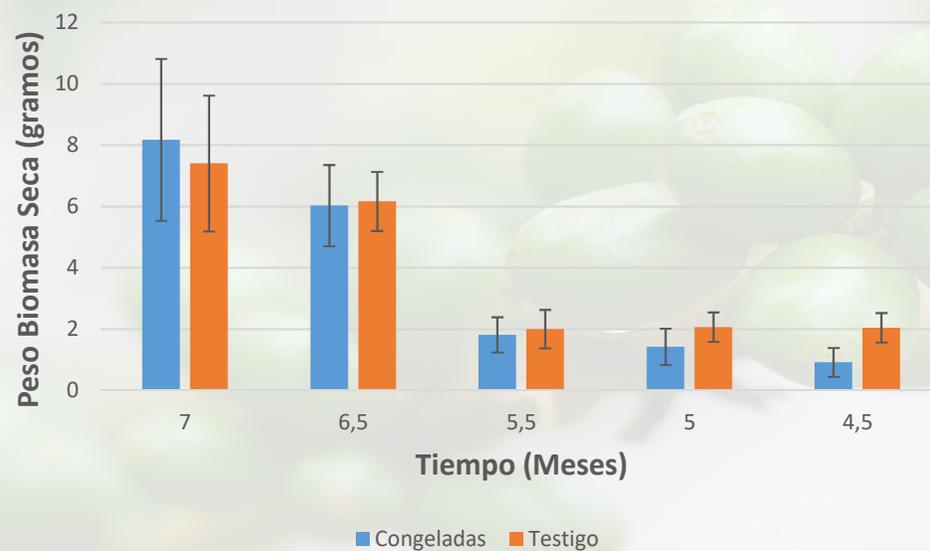
Chapolas provenientes de semillas congeladas de *C. arabica*



Germinador en contenedor Jiffy®

160 días

Almácigo proveniente de semillas congeladas de *C. arabica*



Peso de biomasa seca de colinos de Variedad Castillo ® sembrados a partir de semillas congeladas en nitrógeno líquido.

CONCLUSIONES

- ✓ **El contenido de humedad con el cual las semillas son congeladas es un factor determinante en la germinación de las semillas, siendo valores menores al 20% los que permitieron la congelación sin afectar en más del 50% la germinación.**
- ✓ **Las semillas congeladas de *C. arabica* formaron chapolas normales, aunque su desarrollo en colinos se retrasó con relación al control en los primeros 5 meses.**



AGRADECIMIENTOS

- ❖ Sebastián Quiceno. Estudiante de Pasantía. Biología Universidad de Caldas.
- ❖ Bibiana Escobar, Claudia Valencia, Marcela Mora, y Mario Franco. Disciplina de Fisiología Vegetal
- ❖ Claudia Florez, Juan Carlos Arias, Esteban Quintero y Carlos Augusto Vera. Disciplina de Mejoramiento Genético
- ❖ Aristófeles Ortiz y Natalia Flechas. Disciplina de Fisiología Vegetal
- ❖ Carlos Gonzalo Mejía y Jhon Felix Trejos, Disciplina de Experimentación

Síguenos

www.cenicafe.org

agroclima.cenicafe.org

@cenicafe

cenicafé



Federación Nacional de
Cafeteros de Colombia



Cenicafé



FNC © 2020

