

## Aspectos básicos de la conservación *in vitro* de germoplasma vegetal

Leyanis García-Águila<sup>1\*</sup>, Manuel de Feria, Karen Acosta<sup>2</sup>. \*Autor para la correspondencia.

<sup>1</sup> Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Carretera a Camajuaní km. 5.5. Santa Clara, Villa Clara. Cuba. CP 54 830. e-mail: leyanis@ibp.co.cu

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias Agropecuarias. Centro Universitario Vladimir I. Lenin. Las Tunas, Cuba.

### RESUMEN

La conservación *in vitro* constituye parte esencial de la estrategia general de conservación y el intercambio de recursos genéticos en todo el mundo. Entre otras ventajas, ofrece la posibilidad de almacenar un gran número y variedad de muestras en un área reducida, además de garantizar la sanidad de las muestras e incrementa la posibilidad del intercambio de materiales vegetales. Existen dos métodos de conservación *in vitro*, cuya utilización varía en dependencia de la duración que requiera el almacenamiento. El método de crecimiento mínimo se emplea con más frecuencia para conservar durante un período de tiempo corto, mientras que la criopreservación garantiza la conservación *in vitro* por largos períodos de tiempo. En particular, la criopreservación ha sido aplicada en muchas especies para la conservación de polen, meristemos, ápices, embriones cigóticos, embriones somáticos y suspensiones celulares. Se reconocen dos grupos de técnicas en la criopreservación: las técnicas clásicas basadas en la deshidratación química parcial con el congelamiento programado y las técnicas basadas en la vitrificación con congelamiento rápido. Esta última técnica evita la formación de cristales de hielo en el interior de los tejidos, los cuales son los responsables del daño mecánico que se produce a las membranas celulares durante la congelación. Es por ello, que el éxito de la conservación *in vitro* se encuentra estrechamente relacionado con el período de tiempo requerido para el almacenamiento y con la adecuada selección del método de conservación. Este trabajo resume algunos aspectos básicos de la conservación *in vitro* de germoplasma vegetal, así como los principales resultados descritos por la comunidad científica nacional e internacional en la conservación *in vitro* de diferentes especies vegetales.

Palabras clave: crecimiento mínimo, criopreservación, deshidratación, vitrificación

### ABSTRACT

The *in vitro* conservation constitutes essential part of the general strategy for the conservation and the exchange of genetics resources in the entire world. It offers the possibility to store a great number and variety of samples in a reduced area. It guarantees the sanity of the samples and it increases the exchange of plant materials. Two conservation methods *in vitro* exist, whose use varies in dependence of the duration that requires the storage; the method of minimum growth is used with more frequency to conserve a little time, while, the cryopreservation guarantees the *in vitro* conservation for long periods of time. In particular, the cryopreservation has been applied in many species for the conservation of pollen, meristems, apices, zygotic embryos, somatic embryos and cellular suspensions. Two groups of techniques in the cryopreservation are recognized: the classic techniques based on the partial chemical dehydration and the programmed freezing and the new techniques based on the vitrification that consist on the change from the liquid state to a vitreous denominated intermediate state and that it avoids the formation of glasses of ice responsible for the mechanical damage to the cellular membranes during the freezing. It is known that the membranes of the vegetable cells can be damaged by the action of different biophysical and biochemical factors and they need a special chemical protection during the cycle of freezing-unfreezing with treatments cryoprotectors with substances of a heterogeneous group of compounds that have great affinity for the water and that to certain concentrations they are not toxic. Some basic aspects of plant germplasm *in vitro* conservation and the main results described by the national and international scientific community about *in vitro* conservation of different plant species are summarized in this research.

Key words: cryopreservation, dehydration, minimum growth, vitrification

### INTRODUCCIÓN

La conservación de germoplasma vegetal como actividad científica fue propuesta en los años 70 del siglo XX con el objetivo de prevenir la erosión genética y mejorar la productividad agrícola de muchas especies a partir de la conservación de diferentes especies y genes de interés. Existen dos estrategias

básicas para la conservación de germoplasma vegetal, la conservación *in situ* y la conservación *ex situ* (Nodarse *et al.*, 1998).

En la conservación *in situ* las especies se mantienen en su hábitat natural, generalmente en parques nacionales, reservas biológicas y reservas ecológicas. Mientras que, en la conservación *ex situ*

las especies se preservan fuera de su hábitat natural, en bancos de semillas botánicas, bancos de plantas en campo o en bancos de plantas *in vitro*.

Los bancos de semillas botánicas resultan de gran utilidad en especies que se propagan sexualmente y cuyas semillas se mantienen viables durante un largo período de almacenamiento, pero no deben aplicarse para conservar especies de plantas con semillas botánicas de corta supervivencia, ni pueden emplearse en caso de trabajar con plantas autoincompatibles, o plantas de propagación vegetativa obligada. En estos casos, la diversidad genética de estas especies se puede conservar mediante bancos de plantas en campo o mediante técnicas de conservación *in vitro* (Graudal *et al.*, 1997).

Los bancos en condiciones de campo tienen como limitante que se necesitan grandes extensiones de tierra, los costos por mantenimientos asociados a las labores agrotécnicas son altos, se hace necesario controlar plagas y enfermedades y además son vulnerables a los desastres climáticos. Es por ello, que el desarrollo de nuevas técnicas de conservación, han permitido preservar mejor los recursos genéticos importantes para muchos países (Ortiz, 2000).

En particular, los avances alcanzados en el cultivo *in vitro* en diferentes especies vegetales dieron la posibilidad de desarrollar nuevas alternativa para la conservación *ex situ*, al permitir disponer de suficientes individuos en períodos de tiempo relativamente cortos y facilitar la manipulación del material vegetal al ser plantas con un desarrollo fisiológico homogéneo. Desde entonces, la conservación *in vitro* de germoplasma vegetal constituyó una herramienta de trabajo que apoyó la conservación de semillas botánicas y la conservación en campo, ya que permitió tener duplicados seguros de aquellos genotipos de particular interés (Engelmann y Takagi, 2000).

Esta vía de conservación puede efectuarse a través de dos métodos: el crecimiento mínimo y la crioconservación.

El método basado en el crecimiento mínimo es el más generalizado, se basa en modificar las condiciones óptimas de cultivo, para disminuir la velocidad de crecimiento normal de la especie objeto de estudio, con lo cual se reduce la frecuencia de transferencia de las plantas a medio de cultivo fresco.

A mediados de los años 90 del siglo XX, la conservación de germoplasma vegetal implicó además, la inmersión directa de los explantes en nitrógeno líquido (crioconservación) y dentro de este método de conservación, el procedimiento de vitrificación demostró ser el más efectivo y empleado por muchos autores (Lambardi *et al.*, 2000; Tsukazaki

*et al.*, 2000; Hirai y Sakai, 2003; Wang *et al.*, 2004; Caccavale *et al.*, 2005).

Teniendo en cuenta los aspectos anteriormente descritos este trabajo tuvo como objetivo mostrar a través de una descripción bibliográfica aspectos básicos de la conservación *in vitro* de germoplasma vegetal, así como los principales resultados descritos por la comunidad científica nacional e internacional en la conservación *in vitro* de diferentes especies vegetales.

## IMPORTANCIA DE LA CONSERVACIÓN *IN VITRO* DE GERMOPLASMA VEGETAL

La conservación *in vitro* constituye parte esencial de la estrategia general para la conservación y el intercambio de recursos fitogenéticos a nivel mundial. La misma ofrece la posibilidad de almacenar un elevado número y variedad de muestras en un área reducida y facilita el acceso a ellas para su evaluación. Sus condiciones asépticas garantizan mayor sanidad de las muestras y en consecuencia permiten incrementar el intercambio de materiales vegetales sanos. Sin embargo, para establecer cualquier estrategia de conservación *in vitro*, se hace indispensable el dominio de una metodología de propagación que garantice altos porcentajes de supervivencia.

El principal objetivo de los bancos de germoplasma *in vitro* es conservar las especies que presentan semillas botánicas de corta y poca viabilidad, cultivos de propagación vegetativa o clonal, o que son altamente heterocigóticos y requieren ser propagados vegetativamente para conservar su integridad genética. También se han incluido raíces y tubérculos de corta vida en el proceso de almacenamiento, como *Solanum tuberosum* L. (papa), *Ipomoea batata* L. (boniato) y *Manihot esculenta* Crantz (yuca) (Frankel, 1995).

## Características fisiológicas de los tejidos vegetales para la conservación *in vitro*

El origen del material vegetal a conservar puede ser *in vivo* o *in vitro*, especialmente este último ofrece la ventaja de estar en condiciones asépticas, libres de microorganismos contaminantes (Dereuddre y Engelmann, 1987). Como regla general, debe ser escogido en estado juvenil. Las células meristemáticas en activa división son más resistentes a las bajas temperaturas por tener un tamaño pequeño, citoplasma denso y pocas vacuolas, razones por las cuales el contenido de agua intracelular es bajo, aspecto importante a tener en cuenta para evitar daños durante el proceso de congelación (Engelmann, 2000).

Las plantas cultivadas *in vitro* para ser conservadas deben haber sido objeto de un subcultivo reciente a

medio de cultivo fresco. En este sentido, Harding y Staines (2001) expresaron que la susceptibilidad de los ápices de papa a la congelación aumentó a medida que las plantas *in vitro* tenían un mayor número de días de subcultivadas a medio de cultivo fresco.

### MÉTODOS DE CONSERVACIÓN *IN VITRO*

Existen dos métodos de conservación *in vitro* cuya utilización varían en dependencia de la duración que requiera el almacenamiento. Para corto o mediano plazo el objetivo es reducir la velocidad de crecimiento del material vegetal, en este caso, puede ser empleado el método de crecimiento mínimo, por su parte la crioconservación garantiza la conservación *in vitro* por períodos prolongados de tiempo.

#### Método de crecimiento mínimo

El método de crecimiento mínimo ha sido ampliamente utilizado en la práctica para la conservación de germoplasma, existen varios ejemplos de su aplicación en la creación de bancos *in vitro*. Entre otros, se pueden mencionar los casos de *Saccharum* sp. (caña de azúcar) (Taylor y Dukin, 1993), yuca (Roca *et al.*, 1994) y papa (Toledo y Golmirzaie, 1998).

Este método constituye una de las principales variantes que puede garantizar el éxito de un programa de conservación, debido a que es relativamente sencillo y puede ser establecido con facilidad con el equipamiento que normalmente existe en un laboratorio de cultivo de tejidos.

Para reducir la velocidad de crecimiento de las plantas *in vitro* es necesario alterar las condiciones óptimas de cultivo. Para ello se realizan modificaciones en la composición del medio de cultivo, como pueden ser la disminución del contenido mineral (Rayas *et al.*, 2002), la adición de agentes osmóticos activos y/o la incorporación de retardadores de crecimiento (Espinosa *et al.*, 2002).

Este método es conocido también como crecimiento reducido pues como se ha explicado se basa en la disminución de la división celular y el metabolismo de la planta. Tiene como objetivos incrementar la longevidad *in vitro* de los cultivos sin que se produzcan cambios genéticos, por tanto, no hay una detención total de los procesos celulares sino una disminución en la velocidad con que ocurren los mismos y así se reduce la frecuencia de transferencia de las plantas a medio de cultivo fresco (Roca *et al.*, 1994).

La modificación en la composición de los medios de cultivo es una forma de limitar el crecimiento, por ejemplo, el crecimiento *in vitro* de plantas de yuca disminuyó proporcionalmente con el contenido de

nitrógeno total del medio de cultivo; concentraciones por debajo de 10mM, en término de número de tallos y nudos por tallos resultaron perjudiciales (Roca *et al.*, 1994).

Autores como García *et al.* (2004) conservaron, con calidad y durante seis meses sin realizar subcultivos, plantas *in vitro* de caña de azúcar, con la reducción de las sales propuestas por Murashige y Skoog (1962) entre 25 y 50% de su concentración normal.

La limitación del crecimiento por efecto de la concentración osmótica se debe a la reducción de la adsorción de agua y nutrientes del medio de cultivo. La sacarosa como es altamente metabolizable, puede actuar como agente osmótico en concentraciones elevadas. Otros agentes osmóticos no metabolizables, como el manitol y el sorbitol, son más efectivos en la limitación del crecimiento, porque interactúan con el contenido de sacarosa y la temperatura de conservación (Bhat y Chandel, 1993).

Autores como Bertrand *et al.* (1992), estudiaron la respuesta de microesquejes de cafeto en presencia de diferentes concentraciones de sacarosa y su interacción con la temperatura, ellos observaron que las bajas concentraciones redujeron el crecimiento, enraizamiento y porcentaje de supervivencia, después de siete meses de conservados a 20 °C. Los mejores resultados los obtuvieron en un medio de cultivo que contenía como mínimo 20 g.l<sup>-1</sup> de sacarosa y una temperatura para el crecimiento de 20 °C.

Por su parte, Panis *et al.* (1996) trabajando con *Musa* sp. indujeron la formación de brotes meristemáticos en presencia de altas concentraciones de 6-bencilaminopurina (6-BAP) y estas estructuras fueron más resistentes a las bajas temperaturas que los propios meristemas.

Suksa *et al.* (1997), lograron altos porcentajes de supervivencia en ápices *in vitro* de *Carica papaya* L. (papaya), después de 12 meses de conservación a 16 °C y comprobaron que la adición 5.0 µM de ácido absísico al medio de cultivo influyó satisfactoriamente en la disminución del crecimiento de los ápices. Estos autores observaron además, una severa suculecencia de los ápices de papaya conservados en medio de cultivo que contenía manitol y comprobaron que la adición de altas concentraciones de sacarosa al medio de cultivo no mejoró la resistencia de los ápices al frío.

De igual forma, García *et al.* (2004) redujeron el crecimiento en longitud de plantas *in vitro* de caña de azúcar con el incremento de la concentración de manitol en el medio de cultivo, de esta forma las plantas se pudieron conservar durante 12 meses consecutivos a una temperatura de 15 °C.

Eventualmente en los cultivos conservados *in vitro*, debido a las bajas temperaturas, la alta concentración osmótica, la reducción de la concentración de sales inorgánicas y la presencia de inhibidores del crecimiento, se puede producir un oscurecimiento de los tejidos, seguido por desfoliación. Esto se atribuye a la oxidación fenólica y a la inducción de senescencia por la presencia de determinadas concentraciones de gases como el etileno, especialmente cuando se utilizan frascos pequeños o han sido sellados herméticamente. Roca *et al.* (1994), observaron una disminución de la desfoliación y una reducción de la tasa de crecimiento a la mitad, en dos variedades de yuca, al adicionar al medio de cultivo un 0.25% de carbón activado.

La intensidad y calidad de la luz, son otros factores importantes en el control de la velocidad de crecimiento, especialmente en su interacción con la temperatura, que como ya se ha expresado, es otro de los factores más utilizados en la conservación mediante el método de crecimiento mínimo.

#### Método de crioconservación

Para conservar a largo plazo se emplea la crioconservación (almacenamiento en nitrógeno líquido a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), ya que se detienen todos los procesos metabólicos y la división celular, además, el material vegetal crioconservado se puede preservar en espacios reducidos, en condiciones seguras, sin variabilidad genética y sin grandes costos de mantenimiento (Hirai y Sakai, 2000).

Según Engelmann y Takagi (2000), se reconocen dos grupos de técnicas en la crioconservación: las técnicas clásicas basadas en la deshidratación química parcial con osmoprotectantes y congelamiento programado y las nuevas técnicas basadas en la vitrificación, que consisten en el cambio del estado líquido a un estado intermedio llamado vítreo que evita la formación de cristales de hielo, los cuales son la principal causa del daño mecánico a las membranas durante la congelación (Towill, 1996).

Dentro de estas nuevas técnicas se reconocen siete procedimientos que incluyen: encapsulación-deshidratación, vitrificación *per se*, encapsulación-vitrificación, desecación, precrecimiento, precrecimiento-desecación y técnica de la microgota (Engelmann, 2000).

La crioconservación en nitrógeno líquido, ha sido aplicada en muchas especies para la conservación de polen, meristemas, ápices, embriones cigóticos y somáticos, suspensiones celulares (Huarte y Rigato, 2001; Baek *et al.*, 2003; Martínez *et al.*, 2004; Keller *et al.*, 2005; Ochatt, 2005).

Existen mecanismos que determinan cómo los sistemas biológicos responden ante la disminución de las temperaturas y la solidificación del agua líquida, por ello, es necesario conocer los aspectos básicos que tienen lugar durante la congelación del agua como evento decisivo para desarrollar una metodología de crioconservación. En este sentido, se destacan los procesos de nucleación y vitrificación.

#### Nucleación

Diferentes autores han realizado definiciones aclaratorias sobre los fenómenos que ocurren durante la formación de los cristales de hielo a bajas temperaturas. Por ejemplo, Zachariassen y Kristiansen (2000) explicaron que para ellos la definición de punto de congelación de una solución, es la temperatura donde el último y más pequeño cristal de hielo se derrite cuando una solución congelada se calienta lentamente, a este momento también se le denomina temperatura de congelación en equilibrio o punto de fusión.

Estos autores plantearon que el fenómeno por el cual las soluciones se encuentran aún en estado líquido a la temperatura de congelación en equilibrio se le conoce como subenfriamiento y la temperatura es denominada como punto de subenfriamiento de la solución. Además, diferencian que de manera no generalizada pueden aparecer cristales de hielo a determinada temperatura sin afectar el punto de fusión de la solución y denominan a este fenómeno como histéresis térmica y la temperatura a la que ocurre como punto de congelación de histéresis.

Otros autores como Belous *et al.* (1987) plantearon que existen diferencias entre los procesos de nucleación homogénea (formación espontánea de núcleos de cristales de hielo) y heterogénea (adición de algún catalizador para inducirlos). Zachariassen y Kristiansen (2000) apoyan estas diferencias y definen que la nucleación homogénea es causada por las propiedades de atracción electrostática entre las partes polares de las moléculas de agua para formar agregados en forma de cristales de hielo a medida que disminuye la temperatura y que la nucleación heterogénea es cuando la agregación de las moléculas de agua se cataliza por sustancias diferentes a estas moléculas.

Posteriormente, Wilson *et al.* (2003) se oponen a esta diferenciación y demostraron que la nucleación en las soluciones biológicas son todas heterogéneas y el término de nucleación homogénea debe ser evitado. Estos autores plantean que en la práctica la nucleación homogénea es poco probable de lograr en condiciones de laboratorio y solamente el término

debe utilizarse en situaciones muy precisas como en el caso de pequeñas muestras de agua ultra-pura emulsionadas en aceite que tiene una temperatura alrededor de los  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### Vitrificación

Cuando una solución está altamente concentrada y por ende viscosa, ésta no permitirá la iniciación de cristales de hielo ni su crecimiento. Si se disminuye rápidamente la temperatura a valores muy bajos, la solución puede llegar a convertirse en un sólido amorfo (vítreo) sin la formación de cristales de hielo (Franks, 2003). Este proceso se denomina vitrificación y tiene lugar a la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ).

Para realizar la crioconservación mediante la vitrificación, Fahy *et al.* (2000) propusieron que se requiere de una congelación por debajo de la temperatura de transición vítrea de la mezcla crioprotectora y un recalentamiento sin la formación de hielo. Ellos plantean además, que el problema de la toxicidad del crioprotector se minimiza cuando se utiliza la menor concentración posible de la mezcla crioprotectora y que esta concentración mínima se determina por la concentración donde la temperatura de nucleación homogénea ( $T_h$ ) se intercepta con la temperatura de transición vítrea.

A concentraciones más bajas, la muestra debe atravesar la zona entre  $T_h$  y  $T_g$  donde la nucleación homogénea del hielo es inevitable. A concentraciones altas, la vitrificación es teóricamente posible a cualquier velocidad de congelación o recalentamiento si la nucleación heterogénea no está presente.

Sin embargo, según Franks (2003), en la práctica la nucleación heterogénea siempre está presente como obstáculo a la vitrificación. Este autor explica, además, que después de la vitrificación se necesita una velocidad de calentamiento rápida para evitar el crecimiento de los cristales de hielo (desvitrificación) que comienza a temperaturas cercanas a la terminación de la congelación e inicio del recalentamiento.

El proceso de vitrificación es de gran importancia para la supervivencia de las células vegetales congeladas hasta  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ya que previene la formación intracelular de cristales de hielo. El sólido amorfo (vítreo) presenta una menor presión de vapor de agua que el correspondiente sólido cristalino, y no permite la sobre-deshidratación causada por la congelación extracelular. Como consecuencia, el sólido amorfo además disminuye la contracción celular, el aumento de la concentración de solutos internos y las alteraciones en el pH de la célula. Además, como la formación vítrea es muy viscosa, ésta puede detener todas las reacciones químicas que requiere una difusión molecular, de esta forma, la vitrificación de las células vegetales garantiza la

dormancia y estabilidad durante el tiempo de almacenamiento en nitrógeno líquido (Franks, 2003).

#### Estrategia de deshidratación del material vegetal

Una metodología única de crioconservación que sea aplicable de manera exitosa para los diferentes tipos de tejidos vegetales aún no se ha desarrollado. Sakai (2000) distinguió cuatro estrategias posibles: I) deshidratación osmótica del material vegetal previa a la congelación; II) deshidratación del material vegetal por congelación lenta; III) deshidratación del material vegetal por vitrificación completa; IV) deshidratación del material vegetal por secado al aire. De las cuales, las más utilizadas se describen a continuación:

#### Estrategia de deshidratación del material vegetal por vitrificación completa

Se refiere a la formación tanto intracelular como extracelular de una estructura sólida amorfa estable (vítreo) cuando se someten las células a la temperatura del nitrógeno líquido (Sakai, 2000).

Ello se logra al deshidratar el material vegetal y de forma rápida por la acción de una solución vitrificadora altamente concentrada la temperatura del mismo se hace variar de  $25\text{ a }0\text{ }^{\circ}\text{C}$  antes de colocar las muestras directamente en nitrógeno líquido. Las soluciones vitrificadoras no sólo reducen el contenido de agua en la célula sino que también penetran en los espacios intersticiales y contribuyen a inhibir la formación de los cristales de hielo en el medio intra y extra-celular durante el enfriamiento rápido (Panis, 1995). Sin embargo, el problema fundamental de la vitrificación completa radica en la necesidad de controlar la duración del tiempo de exposición a las soluciones vitrificadoras ya que pueden causar daños por una deshidratación excesiva o por toxicidad debido a una alta concentración de la misma (Reed, 2001).

Los primeros estudios sobre la crioconservación de plantas basada en la vitrificación completa fueron realizados por Uragami *et al.* (1989) con embriones somáticos de *Asparagus officinalis* L. y Langis *et al.* (1989) con suspensiones celulares de *Brassica campestris*. Desde entonces, la aplicación de esta estrategia ha permitido que hayan sido almacenados un elevado número de materiales vegetales como células nucleares de *Citrus sinensis* (Sakai *et al.*, 1990) y protoplastos de *Secale cereale* (Langis y Steponkus, 1991), ápices vegetativos de *Ananas comosus* (piña) (González *et al.*, 1998), yuca (Charoensub *et al.*, 1999), boniato (Pennycooke y Towill, 2000) y *Anigozanthos humilis* (Turner *et al.*, 2001), entre otros.

Diferentes soluciones vitrificadoras se han utilizado, pero la reconocida como *Plant Vitrification Solution #2* que contiene 30% de glicerol, 15% de etilenglicol,

15% de dimetilsulfóxido y 0.4 mol.l<sup>-1</sup> de sacarosa ha sido la más empleada (Sakai, 2000).

#### *Estrategia de deshidratación del material vegetal por congelación lenta*

Se basa en la disminución de la temperatura mediante un enfriamiento lento hasta una temperatura de precongelación (-40 °C), seguido de la inmersión rápida de las muestras en nitrógeno líquido (Sakai, 2000).

La reducción lenta de la temperatura durante el enfriamiento conduce a la deshidratación de las células por la aparición de cristales de hielo extracelulares, que causan la disminución del volumen celular isotónico y producen el incremento de la concentración de solutos.

Generalmente una velocidad entre 0.5-2.0 °C.min<sup>-1</sup> se considera como lenta aunque en ocasiones velocidades tan bajas como 0.1°C.min<sup>-1</sup> o tan rápidas como 10°C.min<sup>-1</sup> también se aplican (Withers, 1980). Cuando se obtienen temperaturas entre -35 ó -40°C, el material vegetal se transfiere al nitrógeno líquido y se asume que en estas condiciones toda el agua congelable abandonó la célula y el medio intracelular está altamente concentrado (Sakai, 2000).

La principal limitante para aplicar la estrategia de deshidratación por congelación lenta en un gran número de laboratorios a nivel internacional radica en que se necesita un equipamiento programable de la velocidad de enfriamiento con un alto costo, por lo que los centros de investigación-desarrollo con escasos recursos no pueden utilizar esta modalidad criogénica (Reed *et al.*, 2001).

#### *Tratamientos crioprotectores*

La mayoría de los tejidos vegetales hidratados necesitan una protección química especial durante el ciclo de congelación-descongelación, para ello se emplean tratamientos crioprotectores con sustancias de un grupo heterogéneo de compuestos que tienen gran afinidad por el agua y que a determinadas concentraciones no resultan tóxicos al sistema (Chen y Kartha, 1986). Estos tratamientos pueden aplicarse mediante pre-cultivos en base semisólida o líquida que sirven de medio de suspensión para las células y los tejidos durante la congelación.

Han sido descritas dos categorías de sustancias crioprotectoras: penetrantes y no penetrantes (Panis, 1995). En el primer grupo se encuentran el dimetilsulfóxido, metanol y el glicerol y en el segundo están presentes los azúcares, alcoholes azucarados y aditivos de alta masa molecular.

La aplicación de los crioprotectores penetrantes incrementa el volumen de la solución intracelular,

evitan una excesiva concentración de electrolitos tóxicos en la fase no congelable o aumentan la permeabilidad de la membrana citoplasmática contribuyendo a la deshidratación. Adicionalmente, a los crioprotectores penetrantes se les atribuye la acción de disminuir el punto de fusión de la solución intracelular, factor decisivo para evitar la formación de cristales de hielo en el medio intracelular (Mazur, 1984).

Los compuestos no penetrantes actúan fundamentalmente como agentes osmóticos desde el medio externo y contribuyen a reducir la cantidad de agua intracelular que puede congelarse. Sin embargo, según Panis (1995), no existía una explicación convincente de cómo funcionaban las sustancias crioprotectoras o dónde se encontraban los sitios críticos de protección. Estas interrogantes aún no cuentan con respuestas comprobadas.

Generalmente, se han empleado con buenos resultados las mezclas de sustancias crioprotectoras. Esto se debe a las ventajas que ofrece la combinación de las sustancias clasificadas como penetrantes y las no penetrantes, como por ejemplo, la mayor estabilidad física de las mezclas a las bajas temperaturas en relación con la de un componente simple y la acción protectora ante la toxicidad de unos compuestos con respecto a otros (Kartha *et al.*, 1988). Sin embargo, según Reed *et al.* (2001) hasta entonces, la selección del tipo y concentración de los agentes crioprotectores aún se realizaba de manera empírica en dependencia de la tolerancia de las células a crioconservar.

#### *Descongelación*

La descongelación es un proceso sencillo, pero está considerado como el paso más crítico durante la crioconservación. Mazur (1984) explicó que el objetivo fundamental es evitar la fusión de los microcristales de hielo formados durante la congelación, fenómeno conocido como re-cristalización. Si tal fusión llegara a ocurrir, entonces se podrían formar grandes cristales de hielo que dañarían la integridad celular.

#### *Tratamientos de post-congelación*

Se basan en cultivar el material vegetal descongelado en condiciones que permitan una correcta recuperación. En general, es importante tomar todas las medidas para recuperar la especie vegetal en cuestión en esta etapa del proceso, por ejemplo, incubar a niveles bajos de luz o en algunos casos en la completa oscuridad (Benson, 2000); atenuar el choque osmótico causado por una inmediata transferencia a un medio de cultivo con bajo potencial osmótico mediante la sucesiva transferencia a medios de cultivo con menos concentración de sacarosa (Schrijmakers y Van Iren, 1995); utilizar cambios de medio de cultivo semisólido a líquidos para mejorar el recrecimiento (Dussert *et al.*, 1992)

y eliminar progresivamente las sustancias crioprotectoras mediante lavados (Gnanapragasam y Vasil, 1992).

Se recomienda que posterior a la descongelación los explantes se cultiven sobre papel de filtro colocado en un medio de cultivo semisólido. Esto posibilita la transferencia simple del material vegetal hacia un medio de cultivo fresco y la lenta difusión de los crioprotectores, lo cual es beneficioso para la recuperación celular ya que evita un estrés osmótico (Withers, 1987).

#### *Efecto del genotipo*

Autores como Reed *et al.* (2001) plantearon que se necesita siempre tener en cuenta el factor genotipo para validar cualquier protocolo de crioconservación. Turner *et al.* (2001) demostraron que resultó eficiente utilizar primero una especie indicadora (en su caso *Anigozanthos viridis* que tenía un alto coeficiente de multiplicación *in vitro*) para mejorar un protocolo de crioconservación y después aplicarlo a otras especies relacionadas, pero clasificadas como material vegetal de gran valor. Engelmann (2000) explicó que en una metodología de crioconservación se debe tener en cuenta el genotipo y que existe un rango de temperatura en que la especie vegetal se puede conservar mejor y que sobre esa base podría ser conveniente mejorar la eficiencia del procedimiento para un genotipo élite, lo cual justificaría la realización de ajustes al protocolo de crioconservación.

### **CRIOCONSERVACIÓN DE ÁPICES**

#### **Método de vitrificación**

El principio del método por vitrificación es deshidratar un ápice por la exposición de este a una solución de vitrificación con alto potencial osmótico (Wang y Deng, 2004). El método incluye básicamente los siguientes pasos: 1) Preparar y seleccionar los ápices; 2) precultivar los ápices para el desecado con agentes osmóticos; 3) tratamientos con soluciones con crioprotectores; 4) deshidratar por exposición a una solución de vitrificación con una disminución de la temperatura desde 25 hasta 0.0°C; 5) inmersión directamente en nitrógeno líquido y almacenaje; 6) descongelación rápida; 7) remover la solución de vitrificación y finalmente poner los ápices en condiciones apropiadas para su recuperación.

Este método ha sido descrito para la crioconservación de cultivos embriogénicos de especies de coníferas (Cyr, 2000; Häggman *et al.*, 2000; Touchell *et al.*, 2002).

#### **Método de encapsulación-deshidratación**

Este método se basa en la encapsulación del ápice para protegerlo y precultivarlo en un medio de cultivo

enriquecido con agentes osmóticos lo cual lo hace más tolerante al desecado con aire (Wang *et al.*, 2005).

El método consiste básicamente en: 1) preparar y seleccionar los ápices; 2) encapsular los ápices de brotes desecados en gotas de alginato; 3) precultivar en presencia de agentes osmóticos (sacarosa, sorbitol, glicerol, entre otros); 4) desecar en una cabina de flujo laminar o con sílica gel; 5) inmersión rápida en nitrógeno líquido y almacenar; 6) descongelación rápida y 7) colocar los ápices en condiciones apropiadas para su recuperación.

Este método ha sido aplicado para suspensiones celulares, embriones somáticos y ápices de numerosas especies vegetales de orígenes templado y tropical (Shibli *et al.*, 2001).

#### **Otros métodos desarrollados y aplicados con éxito**

Existen otros métodos que a pesar de ser operacionalmente simples, han sido aplicados a un limitado número de casos para ápices de brotes. Ejemplo de ello es el método de precrecimiento-desecación descrito en *Asparagus officinalis* L. por Uragami *et al.* (1990) que consistió en: 1) Precultivo con agentes osmóticos, 2) deshidratado en cabina de flujo laminar, (3) inmersión directa en nitrógeno líquido, (4) descongelación rápida y 5) cultivo en condiciones apropiadas de recuperación, o el método mejorado por Escobar *et al.* (1997) para ápices de brotes de yuca que combinó además de los pasos anteriores, una lenta congelación en sustitución del tercer paso anteriormente descrito.

Con la aplicación de otros métodos como la encapsulación-vitrificación se han podido crioconservar brotes apicales de plantas *in vitro* de boniato (Pennycooke y Towill, 2001) y yuca (Danso y Ford, 2003; Charoensub *et al.*, 2004). Otros autores como Wang *et al.* (2005) se han referido a este método de encapsulación-vitrificación como el procedimiento de mayores resultados en la crioconservación de brotes apicales *in vitro* para la especie *Rubus idaeus* L. (frambuesa) donde obtuvieron una alta supervivencia (85%) y regeneración (75%) de los brotes apicales crioconservados.

La papaya (*Carica papaya* L.) es uno de los cultivos en los que se han experimentado notables avances. Autores como Ashmore *et al.* (2000) desarrollaron técnicas y procedimientos para la conservación *in vitro* y crioconservación de brotes axilares y yemas apicales de plantas *in vitro* través de un simple protocolo de vitrificación. Igualmente, Buerhing (2003) desarrolló un protocolo de crioconservación para el suministro continuo de cultivos embriogénicos para realizar transformación genética y Wang *et al.* (2004)

emplearon ápices de cuatro a seis semanas de cultivo de plantas *in vitro* de seis cultivares que fueron crioconservados con éxito también por vitrificación.

#### **DETERMINACIONES ANALÍTICAS COMO INDICADORES DE LOS DAÑOS INDUCIDOS POR LA CRIOCONSERVACIÓN EN LAS MEMBRANAS CELULARES**

Durante la crioconservación, las membranas celulares de las células vegetales pueden dañarse por la acción de diferentes factores (Leunufna y Keller, 2005) entre los que se encuentran la exposición de las células a las bajas temperaturas, la formación de cristales de hielo y una severa deshidratación durante la congelación. Además, puede ocurrir la formación de radicales libres, desacoplamiento metabólico y peroxidación lipídica.

Para todas las células, Mazur (1970) propuso la hipótesis de dos factores de daño por congelación basado en los efectos biofísicos de la formación de los cristales de hielo y en los efectos dinámicos de la velocidad de enfriamiento. Al utilizar una velocidad de enfriamiento rápida aparecen cristales de hielo intracelulares de un tamaño considerable que causan daños irreversibles y por lo tanto, constituyen el primer factor de esta hipótesis.

El segundo factor se atribuye a la deshidratación causada por la formación de los cristales de hielo. Si se emplea una velocidad lenta de enfriamiento, la formación de los cristales de hielo se induce primero en el compartimiento extracelular, el daño se atribuye entonces a una extrema deshidratación osmótica (también denominada efecto de solución), provocada por la salida del agua hacia el exterior de la célula para compensar el déficit de vapor que produce el evento de congelación (Steponkus y Webb, 1992).

La respuesta de las células a la congelación, depende de las propiedades de las membranas celulares. Los lípidos de las membranas sufren una transición de fase desde líquida-cristalina hasta gel. La coexistencia de ambas fases, en la estructura de las membranas, causa la pérdida de electrolitos y por lo tanto, las células mueren (Steponkus y Webb, 1992). Debido a que no todos los lípidos tienen la misma temperatura de transición de fase, la separación de las fases puede tener lugar, formando dominios ricos en fases en estado de gel.

Durante el calentamiento, estos dominios pasarán a formar estructuras no-lamelares, lo cual causa también la pérdida de electrolitos y la muerte celular (Quinn, 1985). Según Usami *et al.* (1995) durante la exposición a las bajas temperaturas, las proteínas de las membranas se pueden inactivar.

Una crioconservación exitosa durante una congelación lenta de las células vegetales con

sustancias crioprotectoras puede ser posible, si se evita la formación del hielo en las células con la nucleación en el medio extra-celular. Sin embargo, las membranas pueden sufrir daños por las fuerzas mecánicas de los cristales de hielo en crecimiento y su adhesión a la superficie de las membranas (Grout, 1995).

La etapa de deshidratación es necesaria para evitar la formación de hielo intracelular, que provoca el aumento de la concentración de solutos en las células y una fuerte plasmólisis de éstas (Towill, 1990). Los problemas asociados a las plasmólisis aumentan durante la congelación, cuando las células se desplasmolizan. Por ejemplo, la contracción osmótica conlleva a la formación de vesículas endocitóticas, lo cual provoca la lisis celular durante la expansión osmótica debido a que el material membranoso no está disponible rápidamente para facilitar la desplasmólisis. También, las membranas pueden sufrir fusiones cuando están en contacto cercano durante la plasmólisis (Steponkus y Webb, 1992).

Eventos bioquímicos tales como la formación de radicales libres, desacoplamiento metabólico y peroxidación lipídica promueven varios cambios subletales como el desacoplamiento metabólico que conlleva a la producción de radicales libres tóxicos. Estas moléculas tienen electrones impares que causan daño por la extracción de electrones en macromoléculas esenciales como lípidos, proteínas y ácido desoxirribonucleico. El acoplamiento metabólico estable y una protección antioxidante eficiente, bajo condiciones fisiológicas normales para las células, aseguran que los daños por los radicales libres no ocurran (Dumet y Benson, 2000).

El estrés a que está sujeto el material vegetal durante la crioconservación puede promover la producción de radicales libres (Benson, 2000). Los más importantes son el radical hidroxilo, el radical superóxido y el peróxido de hidrógeno. Estos radicales libres atacan la fracción lipídica de las membranas, lo que trae como resultado la formación de los peróxidos de lípidos y éstos a su vez son inestables y forman productos tóxicos de la oxidación secundaria (Esterbauer *et al.*, 1988). Los productos de la peroxidación lipídica son aldehídos muy citotóxicos, entre los más dañinos se encuentran el malondialdehído y el hidroxi-2-nonenoal (Adams *et al.*, 1999).

Existen evidencias que sugieren la presencia de los radicales libres mediados por el estrés oxidativo durante la aplicación de protocolos de crioconservación, desecación y manipulación en el cultivo de tejidos (Benson, 2000). Esto se ejemplifica por la detección indirecta (Benson y Dutra, 1988) y directa (Magill *et al.*, 1994) de los radicales libres en células vegetales que han sufrido tratamientos de

congelación, crioconservación y desecación. También, se han detectado productos de peroxidación lipídica secundaria en suspensiones celulares (Benson *et al.*, 1995) y en tejidos estresados por el cultivo *in vitro* (Robertson *et al.*, 1995).

Debido a la pérdida de agua, los componentes celulares se concentran y se convierten en agentes tóxicos, que coagulan o se precipitan. Varios trabajos sobre el estudio del comportamiento de las proteínas durante la deshidratación por la congelación convergen en que las enzimas solubles, las proteínas asociadas a la membrana y al citoesqueleto y las subunidades ribosomales se encuentran sujetas a cambios con el incremento de los solutos celulares (Guy, 1999).

#### **Importancia de las técnicas analíticas para elucidar las bases biofísicas y bioquímicas de los daños inducidos por la crioconservación**

Como se ha mencionado, los daños a la membrana durante la congelación-descongelación son numerosas; por lo tanto, un estudio mediante técnicas analíticas ayudaría a comprender y elucidar las bases biofísicas y bioquímicas de los daños inducidos por la crioconservación. Sin embargo, hasta la fecha las investigaciones realizadas no son numerosas y algunas que se ejecutaron son caras y complejas (Dumet y Benson, 2000) y tuvieron como objetivo detectar y visualizar en tiempo real los daños celulares, razón por la cual, la mayoría de las investigaciones solo hacen uso de técnicas analíticas indirectas.

Entre estas técnicas utilizadas para evaluar el efecto del estrés de la deshidratación y las bajas temperaturas, se encuentran la determinación de la pérdida de electrolitos (Sun, 1999), de la peroxidación lipídica (Ait Barka *et al.*, 2000) y la de cambios en el metabolismo de las proteínas (Sun *et al.*, 2002; Svensson *et al.*, 2002).

La pérdida de electrolitos, se ha utilizado para estudiar la sensibilidad a la desecación y al frío en semillas botánicas poco viables de *Quercus rubra* (Sun, 1999). Además, se han usado para evaluar los daños en las membranas por las bajas temperaturas a diferentes genotipos de *Coffea* sp. (Scotti *et al.*, 2003).

Los cambios de peroxidación lipídica por su parte, traen asociado la formación de aldehídos tóxicos durante una oxidación secundaria (Cassells y Curry, 2001; Gaspar *et al.*, 2002). Entre los aldehídos más citotóxicos se encuentra el malondialdehído (Adams *et al.*, 1999).

Otras investigaciones han involucrado también los cambios en el metabolismo de las proteínas, los

cuales pueden resultar en la adquisición de tolerancia al proceso de crioconservación (Thierry *et al.*, 1999; Watanabe *et al.*, 1999). Además, se ha informado que las plantas poseen proteínas anticongelantes que son potentes inhibidores de los cristales de hielo (Clarke *et al.*, 2002).

#### **ESTABILIDAD GENÉTICA EN EL FENOTIPO DE MATERIALES VEGETALES CRIOCONSERVADOS**

Harding (2004) manifestó que el concepto de estabilidad genética aún no tiene una correcta definición científica cuando se refiere a juzgar la estabilidad de las plantas después de la crioconservación. Este autor propone el término de Criobionómica a la ciencia biológica que estudia el comportamiento de los organismos crioconservados y su hábitat después de su reintroducción a las condiciones naturales del medio ambiente.

Esto se debe básicamente a que existe poca información sobre los efectos de la crioconservación en la estabilidad genética del material vegetal y las diferentes técnicas utilizadas para medirla poseen algunas limitaciones lo que hace muy difícil una evaluación acertada (Engelmann, 2000; Turner *et al.*, 2001; Helliott *et al.*, 2002a; Harding, 2004).

Además, Harding (2004) plantea que son necesarias las investigaciones sobre la estabilidad genética de las plantas regeneradas a partir del material vegetal crioconservado para que se inicien las bases aceptables de un consenso internacional donde sea aprobada su liberación y reintroducción en el medio ambiente y su uso en las diferentes aplicaciones tecnológicas.

Autores como Fukai *et al.* (1994) encontraron modificaciones fenotípicas que afectaron el color en las flores del crisantemo después de la regeneración de ápices crioconservados. Sin embargo, la mayoría de los estudios realizados indicaron que las plantas no presentaron cambios morfológicos después de la crioconservación.

De igual forma, plantas regeneradas *in vitro* a partir de ápices de plantas del género *Prunus* mostraron un desarrollo competente normal y crecieron iguales al progenitor (Helliott *et al.*, 2002b).

En otras muchas especies como caña de azúcar (Paulet *et al.*, 1993), café (Dussert *et al.*, 1998), papa (Benson *et al.*, 1998), arroz (Al-Forkan *et al.*, 2001), kiwi (Wu *et al.*, 2001), uva (Zhao *et al.*, 2001) y *Eucalyptus* (Blakesley y Kiernan, 2001), tampoco se han observado diferencias en el desarrollo de los caracteres morfológicos y agronómicos entre las plantas derivadas de un control no crioconservado y las obtenidas de ápices crioconservados.

Sin embargo, la mayoría de los estudios fenotípicos carecen de exámenes detallados cuando se comparan las plantas controles y las obtenidas del material vegetal crioconservado y se caracterizan como análisis cualitativos sin realizar análisis estadísticos de los aspectos morfológicos (Harding y Staines, 2001). La aplicación de estudios biométricos de conjunto con los caracteres fenotípicos se ha utilizado por pocos autores para evaluar las variaciones genéticas, aunque éstos son más indicadores de los cambios fenotípicos como resultado de las interacciones totales del genotipo y de los cambios temporales en la expresión génica (Harding, 2004).

## CONCLUSIONES

La aplicación de diferentes métodos de conservación *in vitro* se ha convertido en una alternativa para la preservación de material vegetal con fines investigativos, para la propagación masiva de plantas e intercambio de germoplasma y han permitido el fomento y desarrollo de bancos de germoplasma *in vitro* que han tributado a la comunidad científica y al mantenimiento de una importante biodiversidad.

## REFERENCIAS

- Adams, LK, Benson EE, Staines HJ, Bremmer DH, Millam S, Deighton N (1999) Effects of the lipid peroxidation products 4-hydroxy-2-nonenal and malondialdehyde on the proliferation and morphogenetic development of *in vitro* plants cells. *J. Plant Physiol.* 155: 376-386
- Ait Barka, E, Kalantari S, Makhoulouf J, Arul J (2000) Effects of UV-C irradiation on lipid peroxidation markers during ripening of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) fruits. *Aust. J. Plant Physiol.* 27: 147-152
- Al-Forkan, M, Anthony P, Power JB, Davey MR, Lowe KC (2001) Effect of *Erythroglucan*™ on post-thaw recovery of cryopreserved cell suspensions of indica rice (*Oryza sativa* L.). *Cryo-Letters* 22: 367-374
- Ashmore, SE, Saunders R, Drew R (2000) *In vitro* conservation and cryopreservation of papaya. En: Engelmann F Takagi H, (eds). *Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application.* Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Tsukuba, Japan. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy
- Baek, HJ, Kim HH, Cho EG, Chae YA, Engelmann F (2003) Importance of explant size and origin and of preconditioning treatments for cryopreservation of garlic shoot apices by vitrification. *Cryo-Letters* 24: 389-396
- Belous, AM, Gordienko EA, Rozanov LF (1987) Congelación y crioprotección. *Bioquímica de las membranas.* Moscú, Editorial Escuela Superior, p 80
- Benson, EE (2000) Do free radicals have a role in plant tissue culture recalcitrance? *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 36: 163-170
- Benson, EE, Dutra N (1988) Chemiluminescence in cryopreserved plant tissue cultures. The possible role of singlet oxygen in cryoinjury. *Cryo-Letters* 9: 120-131
- Benson, EE, Lynch PT, Stacey GN (1998) Advances in plant cryopreservation technology: current applications in crop plant biotechnology. *Ag Biotech News and Information* 10(5): 133-142
- Bertrand, A, Noirot M, Charrier A (1992) Slow growth *in vitro* conservation of coffee (*Coffea* spp.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 31: 105-110
- Bhat, SR, Chandel R (1993) *In vitro* conservation of *Musa* germplasm: effects of manitol and temperature on growth and storage. *Journal of Horticultural Science* 68: 841-845
- Blakesley, D, Kiernan RJ (2001) Cryopreservation of axillary buds of a *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus camaldulensis* hybrid. *Cryo-Letters* 22: 13-18
- Buerhing, G (2003) Cryopreservation studies in *Carica papaya*. Effect of some cryoprotectants on regrowth and somatic embryogenesis in sunrise sola papaya. *In Vitro Cellular and Developmental Biology* 39:54-A
- Caccavale, A, Lambarri M, Fabbri A (2005) Cryopreservation of woody plants by axillary bud vitrification: a first approach with poplar. (ISHS) *Acta Horticulturae* 457: Symposium on Plant Biotechnology as a tool for the Exploitation of Mountain Londs
- Cassells, AC, Curry RF (2001) Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 64: 145-157
- Charoensub, R, Hirai D, Sakai A (2004) Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of cassava by encapsulation-vitrification method. *Cryo-Letters* 25(1):51-8
- Charoensub, R, Phansiri S, Sakai A, Yongmenitchai W (1999) Cryopreservation of cassava *in vitro* grown shoot tips cooled to -196 °C by vitrification. *Cryo-Letters* 20: 89-94
- Chen, THH, Kartha KK (1986) Cryopreservation of plant cells and organs. En: FA Valentine (ed). *Forest and Crop Biotechnology: Progress and prospects*, pp. 217-240. Springer-Verlag, Heidelberg
- Clarke CJ, Buckley SL, Lindner N (2002) Ice structuring proteins a new name for antifreeze proteins. *Cryo-Letters* 23: 15-21
- Cyr, D (2000) Cryopreservation: roles on clonal propagation and germplasm conservation in conifers. En: Engelmann F, Takagi (eds) *Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application*, pp. 261-268. Japan International Research Centre for Agricultural Sciences, Tsukuba/ International Plant Genetic Resources Institute. Rome
- Danso, KE, Ford BV (2003) Encapsulation of nodal cuttings and shoot tips for storage and exchange of cassava germplasm. *Plant Cell Rep* 21:718-725
- Dereuddre, J, Engelmann F (1987) The use of cryoprotection for setting up banks of plant germplasm. *Porc. Coll. Franco-Britannique IAPTC, Angers, France.*
- Dumet, D, Benson EE (2000) The use of physical and biochemical studies to elucidate and reduce cryopreservation induced damage in hydrated/desiccated plant germplasm. En: F Engelmann, H Takagi (eds.). *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm: Current Research Progress and Application*, pp. 43-56. JIRCAS, Tsukuba, Japan/IPGRI, Rome
- Dussert, S, Chabrilange N, Engelmann F, Anthony F, Hamon S (1998) Cryopreservation of seeds of four coffee species: importance of water content and cooling rate. *Seed Science Research* 8: 9-15
- Dussert, S, Mauro MC, Engelmann F (1992) Cryopreservation of grape embryogenic cell suspensions: Influence of post-

- thaw culture conditions and application to different strains. *Cryo-Letters* 13: 15-22
- Engelmann F, Takagi H (2000) Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application. JIRCAS, Tsukuba, Japón/IPGRI, Roma.
- Engelmann, F (1991) *In vitro* conservation of tropical plant germplasm. *Euphytica* 57: 227-243
- Engelmann, F (2000) Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources. En: F Engelmann, H Takagi (eds.). *Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application*, pp. 8-20. JIRCAS, Tsukuba, Japón/IPGRI, Roma
- Escobar, RH, Mafla G, Roca WM (1997) A methodology for recovering cassava plants from shoot tips maintained in liquid nitrogen. *Plant Cell Reports* 16: 474-478
- Espinosa, A, Hernández LS, Paneque OG, Pupo JJ (2002) Empleo del ácido abscísico, manitol y la disminución de la concentración de las sales del medio de cultivo en la conservación *in vitro* de *Ipomoea batatas*. *Biotecnología Vegetal* 2(1): 39-42
- Esterbauer, H, Zollner H, Schauer RJ (1988) Hydroxyalkenals: Citotoxic products of lipid peroxidation. *ISI Atlas of Sciences: Biochemistry*.
- Fahy, GM, Mc Farlane DR, Angell CA, Meryman HT (2000) Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* 21: 407-426
- Frankel, OH (1995) Genetic perspectives of germplasm conservation. En: Arber WK, Imensee K, Peacock WJ and Starlinger D (eds), *Genetic Manipulations: Impact on man and society*, pp. 161-170. Cambridge University Press. Cambridge
- Franks, F (2003) Scientific and technological aspects of aqueous glasses. *Biophysical Chemistry* 105: 251-261
- Fukai, S, Goi M, Tanaka M (1994) The chimeric structure of the apical dome of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitam.) is affected by cryopreservation. *Scientia Horticulturae* 57: 347-351
- García, L, Pérez J, Rodríguez M, Pérez B, Martínez Y, Sarría Z (2004) Conservación *in vitro* de plantas de caña de azúcar. *Biotecnología Vegetal* 4(2): 101-105
- Gaspar, T, Franck T, Bisbis B, Kevers C, Jouve L, Hausman JF, Dommes J (2002) Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *Plant Growth Regulation* 37: 263-285
- Gnanapragasam, S, Vasil IK (1992) Cryopreservation of immature embryos, embryogenic callus and cell suspension cultures of gramineous species. *Plant Science* 83: 205-215
- González, MT, Ravelo MM, Urrea C, Martínez ME, Engelmann F (1998) Cryopreservation of pineapple (*Ananas comosus*) apices. *Cryo-Letters* 19: 375-382
- Graudal, L, Kjaer E, Thomden N, Larsen AB (1997) Planning national programmes of forest genetic resources. Technical Note N° 48. Danida Forest Seed Centre.
- Grout, BWW (1995) Introduction to the *in vitro* preservation of plants cells, tissues and organs. En: BWW Grout (ed.). *Genetic preservation of plants cells in vitro*, pp. 1-20. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg
- Guy, C (1999) Molecular responses of plants to cold shock and cold acclimation. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1(2) 231-242
- Häggman, HM, Aronen TS, Ryyanen LA (2000) Cryopreservation of embryogenic cultures of conifers. En: Jain SM, Gupta PK, Newton RJ (eds) *Somatic embryogenesis in woody plants.*, pp. 707-728. Kluwer, Academic Dordrecht
- Harding, K (2004) Genetic integrity of cryopreserved plants cells: A Review. *Cryo-Letters* 25: 3-22
- Harding, K Staines H (2001) Biometric analysis of phenotypic characters of potato shoot tips recovered from tissue culture, dimethyl sulphoxide treatment and cryopreservation. *Cryo-Letters* 22: 255-262
- Helliot, B, Madur D, Dirlwanger E, De Boucaud MT (2002a) Evaluation of genetic stability in cryopreserved *Prunus*. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 38: 493-500
- Helliot, B, Panis B, Poumay Y, Swennen R, Lepoivre E (2002b) Cryopreservation for the elimination of cucumber mosaic and banana streak viruses from banana (*Musa* spp.) *Plant Cell Report* 20: 1117-1122
- Hirai, D, Sakai A (2000) En: Engelmann, F y Hiroko Takagi (ed)., pp. 205-211 JIRCAS/IPGRI, Rome
- Hirai, D, Sakai A (2003) Simplified cryopreservation of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L) Lam) by optimizing conditions for osmoprotection. *Plant Cell Report* 21(10): 961-966
- Huarte, D, Rigato A (2001) Crioconservación de variedades nativas de *Solanum tuberosum* var. andigena [en línea]. Disponible en: <http://www.inta.gov.ar/balcarce/ResumenesPG/PGPV2002/resudigilio.htm>. [Consulta 17 de Septiembre del 2004]
- Kartha, KK, Fowke LC, Leung NL, Caswell KL, Hakman I (1988) Induction of embryos and plantlets from cryopreserved cell cultures of white spruce (*Picea glauca*). *J Plant Physiol* 132: 529-539
- Keller, ERJ, Grube M, Senula A (2005) Crioconservación en el Banco de germoplasma de Gatersleben. Estado del arte en papa, ajo y menta. Taller Internacional sobre Biotecnología Vegetal. *Biotecnología Vegetal y Agricultura Sostenible*. Resúmenes. pp15
- Lambardi, M, Fabbri A, Caccavale A (2000) Cryopreservation of white poplar (*Populus alba* L.) by vitrification of *in vitro* grown shoot tips. *Plant Cell Report* 19: 213-218
- Langis, R, Schnabel B, Earle ED, Steponkus PL (1989) Cryopreservation of *Brassica campestris* L. cell suspensions by vitrification. *Cryo-Letters* 10: 421-428
- Langis, R, Steponkus PL (1991) Vitrification of isolated rye protoplasts: Protection against dehydration injury by ethylene glycol. *Cryo-Letters* 12: 107-112
- Leunufna, S, Keller ERJ (2005) Influence of various factors on the survival and regrowth of cryopreserved yams (*Discorea* ssp.) apical nodes. [en línea] Disponible en: <http://www.bibcouncil.de/ISSM2002/Proceedings/paperPDF/c05.pdf>. [Consulta 17 de Enero del 2006]
- Martínez, ME, Martínez J, Engelmann F, González MT (2004) Cryopreservation of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr) apices y calluses. *Acta Horticulturae (ISHS)* 666: IV International Pineapple Symposium. [en línea] 2005. Disponible en: <http://www.actahort.org/> [Consulta 10 de Octubre del 2005]
- Mazur, P (1970) *Cryobiology: The freezing of biological systems*. Science, 168: 939-949
- Mazur, P (1984) Freezing of living cells: Mechanisms and implications. *Am. J. Physiol.* 247: 125-142

- Murashige, T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. *Plant Physiology* 15: 473 – 497
- Nodarse, O, Santana I, Cornides MT, Figueredo Y, Héctor E, Rodríguez R (1998) Comparación de probaciones de caña de azúcar conservadas *in vitro* e *in situ*. Libro de resúmenes. III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. Palacio de las Convenciones. Ciudad de la Habana
- Ochatt, S (2005) Plant cryopreservation. Taller Internacional sobre Biotecnología Vegetal. Biotecnología Vegetal y Agricultura Sostenible. Resúmenes. Ciego de Avila. Cuba.
- Ortiz, R (2000) Conservación de células, tejidos y órganos vegetales a bajas temperaturas: Crioconservación [en línea] 2000. Disponible en: <http://www.hannover2000.net/expo2000hannover/es/tecnologia/proyectos/crioconservacion/largo.htm>. [Consulta 20 de Septiembre del 2004]
- Panis, B (1995) Cryopreservation of banana (*Musa* spp.) germplasm. Dissertationes de Agricultura 272. Catholic University of Leuven, Bélgica
- Panis, B, Totte N, Van Nimmen K, Withers LA, Swennen R (1996) Cryopreservation of banana (*Musa* spp.) meristem cultures after preculture on sucrose. *Plant Science* 121: 95-106
- Paulet, F, Engelmann F, Glaszmann JC (1993) Cryopreservation of apices of *in vitro* plantlets of sugarcane (*Saccharum* spp.) Hybrids using encapsulation/dehydration. *Plant Cell Report* 12: 525-529
- Pennycooke, JC, Towill LE (2000) Cryopreservation of shoot tips from *in vitro* plants of sweet potato by vitrification. *Plant Cell Report* 19: 733-737
- Pennycooke, JC, Towill LE (2001) Medium alterations improve regrowth of sweet potato (*Ipomoea batatas* L. Lam.) shoot tips cryopreserved by vitrification and encapsulation-dehydration. *Cryo Letters*, 22(6):381-9
- Quinn, PJ (1985) A lipid phase separation model of low temperature damage to biological membranes. *Cryobiology* 22: 128-146
- Rayas, A, Mederos V, García M, López J, Cabrera M, Ventura J, Martínez M, Gutiérrez V, Álvarez M, Bauta M (2002) Estudio de medios de cultivo para la conservación *in vitro* de la yuca. *Biotecnología Vegetal* 2(4): 249-251
- Reed, BM (2001) Implementing cryogenic storage of clonally propagated plants. *Cryo Letters* 22: 97-104
- Reed, BM, Dumet D, Denoma JM, Benson EE (2001) Validation of cryopreservation protocols for plant germplasm conservation: a pilot study using *Ribes* L. *Biodiversity and Conservation* 10: 939-949
- Robertson, L, Magill WJ, Benson EE, Bremmer DH, Buultjens TEJ (1995) Oxidative in the plant tissue culture environment. *Biochem. Soc. Transactions* 23:525-529
- Roca, WM, Escobar R, Mafía G (1994) Conservación de germoplasma de yuca *in vitro*. Principios y técnicas. CIAT, Cali.
- Sakai, A (2000) Development of cryopreservation techniques. En: Engelmann F, Takagi H (eds.). *Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application*, pp. 1-7. JIRCAS, Tsukuba, Japón/IPGRI, Roma
- Sakai, A, Kobayashi S, Oiyama I (1990) Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. Var. brasiliensis Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Report* 9: 30-33
- Schrijmakers, EWM, Van Iren F (1995) A two-step or equilibrium freezing procedure for the cryopreservation of plant cell suspensions. En: Day JG, MR McLellan (eds.). *Methods in Molecular Biology*, Vol.38: Cryopreservation and freezing drying protocols, pp. 103-111. Humana Press Inc.
- Scotti, P, Quartín V, Cochicho J, Nunes MA (2003) Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of *Coffea* sp. plants. *J. Plant Physiol.* 160: 283-292
- Shibli, RA, Haagensohn DM, Cunningham SM, Berg WK, Volenec JJ (2001) Cryopreservation of alfalfa cells by encapsulation-dehydration. *Plant Cell Report* 20: 445-450
- Staritsky, G, Dekkers AJ, Louwaars NP, Zandvoort EA (1986) *In vitro* conservation of aroid germplasm at reduced temperatures and under osmotic stress. En: Withers LA y Alderson PG (eds.), *Plant Tissue Culture and Agriculture Applications*, pp. 277-283. Butterworth's
- Steponkus, PL, Webb MS (1992) Freeze induced dehydration and membrane destabilization in plants. En: Somero GN, Osmond CB, Bolis CL (eds.). *Water and life, comparative analysis of water relationship at the organism cellular and molecular level*, pp. 338-362. Springer Verlag
- Suksa, PA, Kataoka I, Fujime Y, Subhadrabandhu S (1997) Effect of temperature, growth retardants and osmotic potential on growth of papaya shoots conserved *in vitro*. *Tropical Agriculture* 41 (1): 7-13
- Sun, W, Montagu MV, Verbruggen N (2002) Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. *Biochem et Biophys Acta* 1577: 1-9
- Sun, WQ (1999) State and phase transition behaviors of *Quercus rubra* seed axes and cotyledonary tissues: relevance to the desiccation sensitivity and cryopreservation of recalcitrant seeds. *Cryobiology* 38: 372-385
- Svensson, J, Ismail AM, Palva ET, Close TJ (2002) Dehydrins. En: KB Storey y JM Storey (eds.). *Sensing Signaling and Cell Adaptation*, pp. 155-171. Elsevier Science
- Taylor, PWJ, Dukin S (1993) Development of an *in vitro* culture technique for conservation of *Saccharum* ssp. hybrid germplasm. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 34: 217-222
- Thierry, C, Florin B, Petiard V (1999) Changes in protein metabolism during the acquisition of tolerance to cryopreservation of carrot somatic embryos. *Plant Physiol. Biochem.* 37: 145-154
- Toledo, J, Golmirzaie A (1998) Conservación *in vitro* de *Solanum* spp bajo condiciones de estrés osmótico y ambiental. Centro Internacional de la Papa, Lima, Perú. Libro de Resúmenes III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal REDBIO 98. Junio/1-5. Palacio de Convenciones. Habana. Cuba.
- Touchell, DH, Chiang VL, Tsai CJ (2002) Cryopreservation of embryogenic cultures of *Picea mariana* (black spruce) using vitrification. *Plant Cell Report* 21: 118-124
- Towill, LE (1990) Cryopreservation of isolated mint shoots tips by vitrification. *Plant Cell Report* 9: 178-180
- Towill, LE (1996) *Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Tsukazaki, H, Mii M, Tokuhara K, Ishikawa K (2000) Cryopreservation of *Doritaenopsis* suspension culture by vitrification. *Plant Cell Report* 19: 1160-1164
- Turner, SR, Senaratna T, Bunn E, Tan B, Dixon KW, Touchell DH (2001) Cryopreservation of shoot tips from six endangered

- Australian species using a modified vitrification protocol. *Annals of Botany* 87: 371-378
- Uragami, A, Sakai A, Nagai M (1990) Cryopreservation of dried axillary buds from plantlets of *Asparagus officinalis* L. grown *in vitro*. *Plant Cell Reports* 9: 328-331
- Uragami, A, Sakai A, Nagai M, Takahashi T (1989) Survival of cultured cells and somatic embryos of *Asparagus officinalis* L. cryopreserved by vitrification. *Plant Cell Report* 8: 418-421
- Usami, S, Ohta S, Korami T, Burnell JN (1995) Cold stability of pyruvate, orthophosphate di-kinase of *Flaveria brownii*. *Plant Molecular Biology* 27: 969-980
- Wang, Q, Laamanen J, Uosukainen M, Valkonen JP (2005) Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of raspberry (*Rubus idaeus* L.) by encapsulation-vitrification and encapsulation-dehydration. *Plant Cell Report*, 24(5):280-8
- Wang, YL, Fan MJ, Liaw SI (2004) Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of papaya (*Carica papaya* L.) by vitrification. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* (46): 29-34
- Wang, Z, Deng X (2004) Cryopreservation of shoot tips of citrus using vitrification: effect of reduced form of glutathione. *Cryo-Letters* (25): 51-58
- Watanabe, K, Kuriyama A, Kawai F, Kanamori M (1999) Effect of cryoprotectant treatment and post-thaw washing on the survival of cultured rice (*Oryza sativa* L.) cells after cryopreservation. *Cryo-Letters* 20: 377-382
- Wilson, PW, Heneghan AF, Haymet ADJ (2003) Ice nucleation in nature: supercooling point (SCP) measurements and the role of heterogeneous nucleation. *Cryobiology* (46): 88-98
- Withers, LA (1980) Low temperature storage of plant tissue cultures. En: A Fiechter (ed.). *Advances in biochemical engineering, Plant Cell Cultures II*, Vol. 18., pp. 101-149. Springer-Verlag, Basel
- Withers, LA (1987) The low temperature preservation of plant cell, tissue and organ cultures and seed for genetic conservation and improved agriculture practice. En: Grout BWW, Morris GJ (eds.). *The effects of low temperature on biological systems*, pp. 389-409. Edward Arnold Ltd, London
- Wu, Y, Zhao Y, Engelmann F, Zhou M, Zhang D, Chen S (2001) Cryopreservation of apple dormant buds and shoots tips. *Cryo-Letters* 22(6):375-80
- Zachariassen, KE, Kristiansen E (2000) Ice nucleation and antinucleation in nature. *Cryobiology* (41): 257-279
- Zhao, C, Wu Y, Engelmann F, Zhou M (2001) Cryopreservation of axillary buds of grape (*Vitis vinifera*) *in vitro* plantlets. *Cryo Letters* 22(5): 321-328