

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

TÉCNICAS DE CONSERVACIÓN *IN VITRO* PARA EL ESTABLECIMIENTO DE BANCOS DE GERMOPLASMA EN CULTIVOS TROPICALES¹

Neiva Sánchez-Chiang², Víctor M. Jiménez³

RESUMEN

Técnicas de conservación *in vitro* para el establecimiento de bancos de germoplasma en cultivos tropicales. El objetivo de esta revisión bibliográfica fue describir las principales técnicas para conservación *in vitro* de germoplasma por corto y largo plazo. Estas técnicas permiten el establecimiento de bancos de germoplasma. Este trabajo se centra en su uso en cultivos tropicales. Las técnicas de conservación *in vitro* han permitido la preservación de recursos fitogenéticos para su uso ulterior con fines de mejoramiento genético, investigación y de seguridad alimentaria. En muchos centros de investigación se han utilizado estas técnicas para almacenar tejidos y semillas de cultivos tropicales, los cuales de forma convencional son difíciles de preservar.

Palabras clave: Crioconservación, cultivo de tejidos, recursos fitogenéticos.

ABSTRACT

Techniques for *in vitro* conservation and their use for establishing germplasm banks of tropical crops. The aim of this literature review is to describe the main techniques for short and long term germplasm conservation. These techniques allow establishment of germplasm banks. This article focuses on their use in tropical crops. *In vitro* preservation techniques have allowed conservation of plant genetic resources for further use in plant breeding, research and food security purposes. Several research centers have used these techniques for tissue and seed storage of tropical crops, mainly for those that are difficult to preserve conventionally.

Key words: Cryopreservation, tissue culture, phyto-genetic resources.



INTRODUCCIÓN

Los recursos fitogenéticos son la base de la seguridad alimentaria mundial. Por ello es de suma

importancia mantener la diversidad genética de las variedades tradicionales y regionales, de los cultivos mejorados y de plantas silvestres (Rao 2004). La diversidad genética provee a los agricultores y

¹ Recibido: 2 de julio, 2009. Aceptado: 17 de junio, 2010.

² Centro de Investigaciones en Protección de Cultivos (CIPROC), Universidad de Costa Rica, 2060 San Pedro, Costa Rica. neiva.sanchez@ucr.ac.cr

³ Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS), Universidad de Costa Rica, 2060 San Pedro, Costa Rica. victor.jimenez@ucr.ac.cr

mejoradores genéticos con opciones para desarrollar nuevos cultivares o híbridos, los cuales pueden ser más productivos, tener mejores características de fruto, flor o estructura de planta, resistencia o tolerancia a patógenos y/o tolerancia a condiciones ambientales desfavorables (Rao 2004, Keller *et al.* 2006).

Anualmente se pierden más de 15 millones de hectáreas de bosque tropical por deforestación causada por diversas actividades de desarrollo, como proyectos hidroeléctricos, caminos, urbanizaciones y ciertas prácticas agrícolas (como extensas áreas de monocultivos) (Rao 2004). En estos bosques se pueden encontrar la diversidad genética necesaria para el mejoramiento genético de muchos cultivos tropicales. El papel de los bancos de germoplasma para reducir esta pérdida y poder conservar muchas especies silvestres, cultivares locales tradicionales, así como variedades mejoradas, puede ser fundamental (Rao 2004, Wang *et al.* 2005). El concepto de conservación de los recursos fitogenéticos en bancos de germoplasma incluye la utilización de métodos que capten la máxima diversidad de genotipos, así como el uso de técnicas de conservación y posterior regeneración que mitiguen sus pérdidas a través del tiempo (Rao 2004).

La conservación de germoplasma de cultivos tropicales se ha tratado de realizar *ex situ* e *in situ* (Rao 2004). La vía *ex situ* se realiza en repositorios especiales (en sitios fuera del centro de origen de la especie) que proveen las condiciones adecuadas para la conservación de material propagativo por largo tiempo (Withers *et al.* 1990). Los métodos de conservación *ex situ* incluyen el almacenamiento de semillas, bancos de genes en campo, colecciones *in vitro* y jardines botánicos (Withers *et al.* 1990, Rao 2004, Quirós *et al.* 2008, Soengas *et al.* 2009).

El método más utilizado en la vía *ex situ* son los bancos de semillas. Estos presentan la ventaja de que se pueden almacenar muchos genotipos en espacios reducidos y es apto para la conservación de especies con semillas ortodoxas (semillas que pueden deshidratarse y almacenarse entre 0 y -20 °C por largo tiempo) (Withers *et al.* 1990, Soengas *et al.* 2009). Sin embargo, este método es poco adecuado para la conservación de especies con semillas recalcitrantes (semillas que no soportan la deshidratación, por lo que deben ser almacenadas en ambientes húmedos y conservan su capacidad germinativa únicamente por corto tiempo). Esto es crítico porque muchos de los cultivos tropicales

de importancia económica, como palma aceitera (*Elaeis guineensis*), cacao (*Theobroma cacao*), coco (*Cocos nucifera*), aguacate (*Persea americana*), mango (*Mangifera indica*) y café (*Coffea* spp.), poseen este tipo de semilla (Withers *et al.* 1990, Engelmann 1991, 2000). Otra desventaja del uso de semillas en programas de conservación por medio de bancos de germoplasma es la dificultad para obtener este tipo de estructuras en algunas especies que tienen un largo periodo juvenil, como el pèrsimon (*Dyospiros kaki*) (Matsumoto *et al.* 2001). Por otro lado, existen plantas que se propagan principalmente de forma vegetativa, como yuca (*Manihot* spp.), papa (*Solanum* spp.), ñame (*Colocasia esculenta*), cebolla y ajo (*Allium* spp.), y banano y plátano (*Musa* spp.), en las cuales no es tan fácil la obtención de semillas sexuales (Withers *et al.* 1990, Engelmann 1991, Bessembinder *et al.* 1993, Sant *et al.* 2008).

Los bancos de genes en campo y los jardines botánicos presentan los inconvenientes de tener altos costos de mantenimiento, de necesitar de condiciones especiales para ciertas plantas que se encuentran fuera de su hábitat natural (por ejemplo, plantas tropicales que son llevadas a jardines botánicos en climas templados, donde es necesario proveerles de condiciones con alta humedad y regulación de la temperatura). Esto implica un riesgo por pérdida de materiales a causa de factores ambientales. Además, se requieren de grandes extensiones y gran cantidad de muestras representativas (20 a 30 plantas de una sola población) por lo que su uso se ha visto limitado en cierta medida (Withers *et al.* 1990, Engelmann 1991, Matsumoto *et al.* 2001, Popova *et al.* 2003, Wang *et al.* 2005).

La vía de conservación *in situ* involucra el mantenimiento de los recursos genéticos en el centro de origen (sitios donde se dio la especiación y generalmente se encuentra la mayor diversidad genética) o cultivo en campos de productores agrícolas en sistemas de agricultura tradicional (Rao 2004). Sus requerimientos, en cuanto a espacio y mantenimiento, son similares a los indicados para los bancos de genes en campo.

Para solucionar los inconvenientes de las vías mencionadas anteriormente se puede recurrir a la conservación de especies tropicales en condiciones *in vitro*. En esta revisión bibliográfica se presentan las técnicas para la conservación *in vitro* de germoplasma en el corto y el largo plazo, que permiten el establecimiento de bancos de germoplasma en cultivos tropicales y se hace un listado de ejemplos de estos últimos.

BANCOS DE GERMOPLASMA *IN VITRO*

Los bancos de germoplasma *in vitro* son sitios para la conservación de los recursos genéticos en condiciones controladas de laboratorio y que involucran diversas técnicas de cultivo y almacenamiento *in vitro*. En los mismos se busca maximizar la diversidad de ejemplares recolectados de poblaciones en campo o en su centro de origen. La unidad de colección que se mantiene en condiciones controladas puede ser la semilla botánica o explantes vegetativos, dependiendo principalmente del hábito de crecimiento de la especie (Rao 2004, Wang *et al.* 2005, Tyagi *et al.* 2007).

Para proveer a los explantes y semillas las condiciones adecuadas de almacenamiento *in vitro* se han desarrollado técnicas que permiten mantener una alta diversidad en espacios reducidos, en condiciones asépticas y a salvo de los riesgos ambientales que podrían provocar su pérdida (Withers *et al.* 1990; Dixit *et al.* 2004, Wang *et al.* 2005, Tyagi *et al.* 2007). Por ejemplo, embriones y cotiledones de *Arachis retusa* fueron conservados *in vitro* para superar los problemas de baja viabilidad en el almacenamiento de la semilla sexual, debido al alto contenido lipídico (Gagliardi *et al.* 2007).

Además, con el cultivo *in vitro* se facilita el intercambio de material genético, ya que muestras pequeñas pueden ser enviadas en condiciones asépticas, incluso a países con regulaciones fitosanitarias muy estrictas (Withers *et al.* 1990, Engelmann 1991, Dixit *et al.* 2004).

TIPOS DE ALMACENAMIENTO *IN VITRO*

El almacenamiento *in vitro* se puede clasificar, según su duración, en “**almacenamiento por corto plazo**” (conocido en inglés como “short-term storage”) y en “**almacenamiento por largo plazo**” (conocido en inglés como “long-term storage”). En el primer tipo, generalmente se utilizan técnicas de cultivo *in vitro* que fomenten el crecimiento reducido, mientras que en el segundo se utiliza principalmente la criopreservación (Withers *et al.* 1990, Wilkinson *et al.* 2003, Wang *et al.* 2005, Keller *et al.* 2006, Cousins y Adelberg 2008).

Almacenamiento por corto plazo y principales factores involucrados

En el almacenamiento por corto plazo los explantes permanecen *in vitro* hasta por 12 meses, manejando condiciones de cultivo para retrasar el crecimiento y aumentar los intervalos entre subcultivos (Withers *et al.* 1990, Wilkinson *et al.* 2003, Wang *et al.* 2005, Cousins y Adelberg 2008). Por ejemplo, Marin y Duran-Vila (1991) conservaron segmentos nodales juveniles enraizados de naranja dulce (*Citrus sinensis*), naranja trifoliada (*Poncirus trifoliata*), lima mexicana (*C. aurantifolia*), toronja (*C. paradisi*) y limón Eureka (*C. limon*) durante un año mediante esta técnica.

Como parte de las estrategias empleadas para disminuir el crecimiento de los explantes y aumentar los intervalos entre subcultivos, está el reducir la temperatura de los cuartos de crecimiento, modificar los medios de cultivo y otros factores ambientales que se deben tomar en cuenta para optimizar el almacenamiento (Withers *et al.* 1990, Engelmann 1991). A continuación se hará referencia a los principales factores que se deben tomar en consideración para el almacenamiento por corto plazo.

Temperatura

Se produce una reducción en la actividad metabólica y, en consecuencia, en el crecimiento de los explantes, al disminuir la temperatura de cultivo (esta temperatura depende de los requerimientos de cada especie) (Engelmann 1991). Generalmente se utilizan temperaturas alrededor de los 4 °C para cultivos de clima templado y entre 10 y 15 °C para el germoplasma tropical (Keller *et al.* 2006). El control de la temperatura se combina usualmente con otros factores para lograr un crecimiento reducido. En banano, temperaturas reducidas se han combinado con reducción en la intensidad lumínica o la completa supresión de luz. La propagación vegetativa de los tallos de banano normalmente se realiza a 22 °C con una intensidad lumínica de 3000 lux. Sin embargo, para su almacenamiento por corto plazo, se colocan a 15 °C bajo una intensidad lumínica de 1000 lux (Banerjee y Sharma 1988).

Si se mantienen los explantes a temperaturas bajas (inferiores a 4 °C) por períodos prolongados, pueden presentarse daños fisiológicos, causados por el frío, que inciden en cambios en el metabolismo, en el

contenido de proteínas, y en la composición y funcionamiento de las membranas (Engelmann 1991). Estos problemas pueden ser reversibles cuando no hay exposición prolongada a esta condición. Generalmente, las plantas tropicales son sensibles a daños por frío y la temperatura de almacenamiento depende de la sensibilidad particular de cada especie (Engelmann 1991). Por ejemplo, Gangopadhyay *et al.* (2005) determinaron que la temperatura de almacenamiento óptima para microtallos encapsulados de piña (*Ananas comosus* L.) era de 8 °C para un periodo de 45 a 60 días.

En las especies no tropicales, la reducción de temperatura actúa, muchas veces, como señal para romper el estado de reposo de los explantes e inducir la activación de su crecimiento. Por ejemplo, el almacenamiento de lirio (*Lilium longiflorum* L.) a bajas temperaturas (0-10 °C) indujo la ruptura del estado de reposo que llevó, consecuentemente, a su germinación y floración. Por lo tanto, su almacenamiento *in vitro* debió ser realizado a 25 °C, en medio de cultivo con todas las sales minerales (a un cuarto de su concentración) y vitaminas del medio Murashige y Skoog (1962) (MS) y una concentración alta de sacarosa (9%) por 28 meses. Esta medida permitió mantener una viabilidad superior al 84% (Bonnier y Van Tuyt 1997). Además, en ese trabajo, el manejo de la temperatura se combinó con una reducción de los nutrientes disponibles en el medio de cultivo, aspecto que también es de gran importancia, como se discutirá a continuación. Ambas medidas permitieron retardar el proceso de crecimiento y prolongar el almacenamiento.

Medio de cultivo

La reducción en la concentración de elementos minerales y/o carbohidratos metabolizables (por ejemplo, sacarosa) en el medio de cultivo puede ser una estrategia importante para la reducción del crecimiento del explante (Engelmann 1991, Rao 2004). Otras medidas pueden ser el aumentar el potencial osmótico del medio (especialmente mediante el uso de carbohidratos no metabolizables, como el manitol), el uso de concentraciones mayores de gelificantes, la adición de ciertos reguladores de crecimiento (como el ácido abscísico [ABA]), o de otras sustancias (como el cloruro de magnesio) para reducir daños en el explante. Como consecuencia de las medidas anteriores, el explante absorbe los nutrientes más lentamente y ocurre una reducción en el crecimiento (Engelmann 1991). Por

ejemplo, para disminuir un problema de necrosis en explantes de banano *in vitro*, se suplementó el medio de cultivo con 50-100 mg/l de cloruro de magnesio. Con esta medida se logró la recuperación del 90% de los explantes que se encontraban en estados iniciales de necrosis (Martin *et al.* 2007).

En el caso de *Curcuma longa*, una planta aromática tropical utilizada en la cocina del medio oriente y asiática, el uso de agar y altas concentraciones de sacarosa (10%) en el medio de cultivo permitió su almacenamiento durante 23 semanas (Tyagi *et al.* 2007).

Recipiente de cultivo

El volumen del recipiente de cultivo puede ser determinante para definir la frecuencia de subcultivos y el almacenamiento óptimo de los explantes (Engelmann 1991, Keller *et al.* 2006). Por ejemplo, en *Curcuma longa* se utilizaron envases con capacidad de 180 ml para el almacenamiento a corto plazo (durante seis semanas) y de 2,5 l para el almacenamiento más prolongado (durante 23 semanas). Esto permitió una optimización en el almacenamiento de esta especie al utilizar eficientemente al volumen del recipiente según las necesidades de crecimiento del explante (Cousins y Adelberg 2008).

Modificación del ambiente gaseoso

La reducción del crecimiento se puede lograr también al disminuir el nivel de oxígeno disponible para los explantes. Sin embargo, bajo esas condiciones de almacenamiento, a menudo se desarrollan tejidos hiperhídricos, necróticos y con crecimiento más lento (Engelmann 1991). La hiperhidricidad es un desorden fisiológico que se caracteriza por la apariencia vidriosa e hinchada en los tejidos, tallos turgentes, acuosos e hipolignificados y órganos translúcidos, verdes, quebradizos y con deformaciones en la cutícula y epidermis (Debergh *et al.* 1992, Chakrabarty *et al.* 2003, 2005). Cabe mencionar que la necrosis de explantes, a causa de la reducción de oxígeno, se ha logrado disminuir al adicionar nitrato de plata, giberelinas, fructuosa, calcio, ácido ascórbico y/o carbón activado al medio de cultivo (Engelmann 1991, Chakrabarty *et al.* 2005).

Un método para la modificación del ambiente gaseoso consiste en bajar la presión parcial del oxígeno usando atmósferas controladas o disminuyendo la presión atmosférica de la cámara. Esto ha permitido

el almacenamiento *in vitro* de especies tropicales sensibles a bajas temperaturas (Engelmann 1991). Otro método para limitar el nivel de oxígeno disponible es el uso de una capa de aceite mineral o medio líquido para cubrir los explantes (Rao 2004).

Encapsulación

En la técnica de encapsulación se recubren embriones somáticos, yemas gametofíticas (en briófitas) o ápices, con una cubierta gelatinosa, como por ejemplo de alginato de calcio, para formar “semillas sintéticas”. La protección que provee el encapsulamiento confiere, a la vez, resistencia contra la deshidratación y las bajas temperaturas durante el almacenamiento por corto plazo (Engelmann 1991, Mallón *et al.* 2007). Por ejemplo, ápices de fresa de la variedad comercial “Senga Sengana” y moras de la variedad comercial “Norma” permanecieron encapsulados durante nueve meses. El medio de encapsulación contenía alginato de calcio y el medio nutritivo con todas las sales minerales y vitaminas de MS. Cada ápice permaneció dentro de la estructura gelatinosa en forma de perla, almacenado en oscuridad a 4 °C (Lisek y Orlikowska 2004). Otros ejemplos fueron realizados con microtallos (2-5 mm) de piña encapsulados también con alginato de calcio y almacenados a 4 °C. Estos mantuvieron la viabilidad y la capacidad de brotación hasta por 45 días (Soneji *et al.* 2002). Embriones somáticos encapsulados de *Citrus reticulata* Blanco cv. Mandarin Tardivo di Ciaculli se mantuvieron viables por 60 días a 4 °C (Germanà *et al.* 2007). En el caso de la papaya (*Carica papaya* L.), Castillo *et al.* (1998) mencionaron el potencial que presenta la encapsulación de embriones somáticos para el almacenamiento de germoplasma, la producción y la propagación de clones, el fácil manejo, y la facilidad para implementar la automatización a gran escala.

Almacenamiento por largo plazo y principales factores involucrados

El almacenamiento por largo plazo es muy seguro por lo que se usa extensivamente en agricultura, horticultura, y forestería para la investigación y el monitoreo ambiental (Benson *et al.* 2006). Esta técnica permite almacenar semillas (Berjak *et al.* 2000, Dussert *et al.* 2000), semillas sintéticas (Paulet y Engelmann

1994), meristemas y ápices (Escobar *et al.* 2000, González-Arno *et al.* 2000, Hirai y Sakai 2000, Panis *et al.* 2000b, Pennycooke y Towill 2000, Takagi 2000, Thinh *et al.* 2000), polen (Inagaki 2000, Ng y Daniel 2000, Towill y Walters 2000), células (Reinhold *et al.* 2000), callos y suspensiones celulares (Panis *et al.* 2000a). Además, requiere de poco espacio y mantenimiento (Paulet y Engelmann 1994, Matsumoto *et al.* 2001, Wang *et al.* 2005).

Se considera que el almacenamiento por largo plazo es una práctica útil para evitar la variación somaclonal en plantas con propagación vegetativa y permite mantener los explantes sin alteración alguna bajo estas condiciones, prácticamente por tiempo indefinido (Engelmann 1991). Papa (Zhao *et al.* 2005) y café (Kumar *et al.* 2006) son dos especies difíciles de almacenar por otros métodos. El café produce semillas recalcitrantes, las cuales pierden viabilidad con rapidez durante el almacenamiento convencional y los bancos de germoplasma *ex situ* presentan altos costos de mantenimiento. Es por esto que el almacenamiento por largo plazo es una alternativa adecuada. Los embriones de café pueden preservarse en nitrógeno líquido (NL) hasta por un año, sin que estos sufran pérdida de viabilidad o alteraciones por variación somaclonal (Kumar *et al.* 2006, Santana-Buzzy *et al.* 2007).

Para el almacenamiento por largo plazo, generalmente se utiliza la criopreservación, aunque existe también la posibilidad de utilizar otras técnicas de cultivo *in vitro* en condiciones de crecimiento reducido. La criopreservación permite el almacenamiento de células, tejidos u órganos vegetales vivos a temperaturas extremadamente bajas (-80 °C). Esta técnica permite el almacenamiento durante períodos prolongados (mayores a un año) utilizando NL, el cual normalmente se encuentra a -196 °C. En algunas ocasiones, se combina el NL con otros gases inertes (como el helio y el argón) (Wilkinson *et al.* 2003, Benson *et al.* 2006, García-Águila *et al.* 2007).

El nitrógeno líquido se utiliza porque detiene todas las actividades metabólicas, inmediatamente al hacer contacto con el explante (Withers *et al.* 1990, Engelmann 1991) y, a la vez, permite que los tejidos conserven la viabilidad sin que ocurran alteraciones fisiológicas (Benson *et al.* 2006).

El proceso de criopreservación se inicia con el acondicionamiento criogénico, que incluye el enfriamiento (como se describió anteriormente con el

uso de temperaturas bajas durante el almacenamiento por corto plazo) y la aplicación de sustancias crioprotectantes, luego el almacenamiento a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y por último el proceso de recuperación (Pennycooke y Towill 2000).

El tratamiento con sustancias crioconservantes o crioprotectantes previene el daño por frío en los tejidos al desplazar el agua que se encuentra intra e intercelularmente. Esta remoción de agua evita la ruptura de las membranas en las células (Matsumoto *et al.* 2001, Wilkinson *et al.* 2003, Sant *et al.* 2008). Estas sustancias crioprotectantes contienen concentraciones altas de sacarosa (0,4 M), glicerol (15%), dimetil sulfoxido (DMSO) (15%), etilenglicol y/o polivinil alcohol (Zhao *et al.* 2005). Sin embargo, la plasmólisis excesiva y el choque osmótico también pueden tener efectos negativos sobre el tejido, provocando daños después de la descongelación y durante la regeneración (Wilkinson *et al.* 2003, Wang *et al.* 2005).

Técnicas de crioconservación

La crioconservación clásica incluye la deshidratación inducida en condiciones estériles en una cámara de flujo laminar, el pre-enfriamiento paulatino de los materiales (se utilizan diferentes gradientes de temperatura, por ejemplo: 10, 8, 4, -20 y $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, así como diferentes tiempos de permanencia en esas temperaturas), la inmersión en NL sin crioprotectantes y, posteriormente, el almacenamiento a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sin embargo, nuevas técnicas basadas en la eliminación parcial de agua en los tejidos y el congelamiento inmediato de los explantes han desplazado parcialmente a la técnica clásica (Dixit *et al.* 2004, Wang *et al.* 2005). Estas nuevas técnicas son: (1) vitrificación, (2) encapsulación – deshidratación, (3) encapsulación – vitrificación, (4) precrecimiento, (5) precrecimiento – deshidratación, (6) desecación y (7) enfriamiento de gotas (Engelmann 2000, Dixit *et al.* 2004).

1) Vitrificación

La vitrificación es un proceso que promueve la deshidratación celular y “solidificación” de líquidos en ausencia de cristalización (se evita la formación de cristales de hielo intracelulares que dañan los tejidos). Con la “solidificación” se induce un estado con una estructura molecular aleatoria pero que posee propiedades físicas y mecánicas similares a un sólido.

Esta transición del agua líquida a una fase amorfa cambia la conformación estructural celular hacia una apariencia vidriosa (Matsumoto *et al.* 2001, Dixit *et al.* 2004, Wang *et al.* 2005, Benson *et al.* 2006). La vitrificación es realizada previa al congelamiento por medio de una sustancia crioprotectante (Matsumoto *et al.* 2001, Dixit *et al.* 2004, Wang *et al.* 2005).

Esta técnica se recomienda para órganos complejos, como ápices de tallos, tejidos embriogénicos y cultivos de células (Dixit *et al.* 2004, Zhao *et al.* 2005). Además de los compuestos usuales, mencionados anteriormente, en la solución crioprotectante se han adicionado también otras sustancias. Por ejemplo, proteínas anticongelantes como albúmina de suero bovino (BSA), epinefrina o el aminoácido prolina (PRO) para incrementar la sobrevivencia, una vez terminada la fase de crioconservación, en meristemas apicales de papa (Zhao *et al.* 2005). Wang y colaboradores (2005) desarrollaron un protocolo donde se utilizó PRO en la solución crioprotectante y se obtuvo una sobrevivencia de alrededor de 80% para explantes de los cultivares taiwaneses de papaya “Tai-nung, Red Lady y Florida”. Otro agente crioprotectante es el Supercool X1000 (21st Century Medicine, Inc. USA), que es un polímero de alcohol de polivinilo, el cual tiene una función similar a las proteínas anticongelantes al inhibir la formación de hielo durante la crioconservación (Zhao *et al.* 2005).

Se ha encontrado que soluciones crioprotectantes, con productos como DMSO, pueden ser tóxicas para algunas especies tropicales. Por lo tanto, la mezcla de la solución crioprotectante y el producto debe ser cuidadosamente seleccionada (Dixit *et al.* 2004, Zhao *et al.* 2005). Una vez aplicada la solución líquida crioprotectante e inducida la vitrificación, los tejidos se congelan con NL. Posterior al tratamiento con la solución crioprotectante y el NL, los explantes son almacenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Engelmann 2000, Dixit *et al.* 2004, Wang *et al.* 2005, Sant *et al.* 2008).

Pennycooke y Towill (2000) utilizaron una mezcla crioprotectante de DMSO, sacarosa y glicerol durante 26 minutos a $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ para conservar ápices de tallo de camote (*Ipomoea batatas*) y lograron la regeneración, ocho semanas después del descongelamiento, con una sobrevivencia mayor al 80%.

Durante el descongelamiento, los explantes generalmente se colocan en un baño de María a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ por uno a dos minutos y luego son lavados con medio de cultivo suplementado con sacarosa (0,4–1,2 M).

Posteriormente, los explantes se colocan en el mismo medio de cultivo para su recuperación y regeneración en condiciones de adecuadas luz (Engelmann 2000, Dixit *et al.* 2004, Wang *et al.* 2005, Sant *et al.* 2008).

La vitrificación en este contexto no debe ser confundida con el fenómeno de hiperhidricidad descrito anteriormente, ya que en artículos anteriores a 1992 se usaba el mismo término. Debergh *et al.* (1992) sugirieron el uso de la palabra hiperhidricidad en el segundo caso para evitar confusiones.

2) Encapsulación – deshidratación

La encapsulación - deshidratación se ha utilizado con ápices de tallo y tejidos embriogénicos. Los explantes se precultivan en una solución con concentración alta de sacarosa (0,5-0,75 M) y luego son encapsulados en alginato de calcio o en polioxietileno glicol (PEG); después se les aplica una deshidratación en la cámara de flujo laminar (cuatro a cinco horas), se congelan con NL y se mantienen a -80 °C por el período de almacenamiento. El descongelamiento se realiza en baño de María a 40 °C por uno a dos minutos y se cultivan en medio para la recuperación del crecimiento y regeneración (Ara *et al.* 2000, Dixit *et al.* 2004).

(3) Encapsulación – vitrificación

La encapsulación - vitrificación es similar al anterior en cuanto al uso de alginato de calcio para la encapsulación. Se diferencia del mismo por no utilizar el precultivo de los explantes en una solución con alta concentración de sacarosa, sino más bien por el uso de una solución crioprotectante (como se menciona en la primera técnica) a 0 °C por unas horas, en su lugar, y por haber sido usado específicamente para meristemas. Los meristemas son encapsulados en medios que contienen altas concentraciones de azúcares (glicerol 2 M y/o sacarosa 0,4 M). Se congelan inmediatamente con NL y se mantienen a -80 °C (Hirai y Sakai 2003, Dixit *et al.* 2004). El proceso de descongelamiento es similar al utilizado en la técnica de encapsulación – deshidratación.

(4) Precrecimiento

El precrecimiento se ha utilizado específicamente para embriones cigóticos y somáticos. La técnica involucra el cultivo *in vitro* previo de los embriones

en presencia de crioprotectantes por varios días. Posteriormente, los embriones se congelan directamente en NL, para luego almacenarlos a -80 °C. El proceso de descongelamiento es similar a la técnica de encapsulación – deshidratación (Engelmann 2000, Dixit *et al.* 2004).

(5) Precrecimiento – deshidratación

En el precrecimiento - deshidratación se utilizan segmentos de tallo previamente cultivados en un medio alto en sacarosa, ABA o PRO. Posteriormente estos se desecan en flujo de aire y se congelan directamente en NL. El proceso de descongelamiento es similar a la técnica mencionada para la vitrificación (Engelmann 2000, Dixit *et al.* 2004). Esta técnica también ha sido utilizada con callos embriogénicos de yuca (*Manihot esculenta*) provenientes del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) en Colombia y del Instituto Internacional de Agricultura Tropical (International Institute of Tropical Agriculture [IITA]) en Nigeria. Los callos se trataron previamente con una solución crioprotectante alta en sacarosa, se deshidrataron y, posteriormente se congelaron con NL (Danso y Ford-Lloyd. 2004).

6) Desección

La desección se ha utilizado sólo con semillas recalcitrantes y estructuras haploides como polen y óvulos. En ella se realiza primero la desección de los tejidos o semillas en una cámara de flujo laminar o en un aparato con aire comprimido estéril o en sílica gel y, luego se congelan las estructuras con NL (Engelmann 2000, Dixit *et al.* 2004). Por ejemplo, en el caso de café, esta técnica permitió mantener la viabilidad de los embriones durante al menos un año (Kumar *et al.* 2006). En el caso de tejidos haploides, como por ejemplo el polen de palma aceitera, la desección fue realizada por medio de vacío. El polen fue mantenido en almacenamiento durante ocho años y, posteriormente, se observó que al germinar presentó una viabilidad del 62%. Como comparador, este mismo polen se almacenó en frío (entre -10 y -20 °C) y a temperatura ambiente. En el primer caso, el polen permaneció viable durante un año y en el segundo caso, permaneció viable solamente durante siete días (Tandon *et al.* 2007).

7) Enfriamiento de gotas

En enfriamiento de gotas se ha realizado con ápices de tallos, los cuales son pretratados con una solución crioprotectante y luego colocados sobre papel aluminio, de manera que se formen gotas pequeñas de crioprotectante con el ápice en el centro. Los explantes se congelan directamente con NL (Dixit *et al.* 2004). Un ejemplo exitoso fue realizado con ápices de tallo de 18 cultivares de *Colocasia esculenta* (ñame). Los ápices fueron desecados previamente con flujo de aire estéril y colocados en un medio de cultivo MS suplementado con glicerol (2 M) y sacarosa (0,4 M). Luego, estos se colocaron en una solución crioprotectante que consistió de medio líquido MS con glicerol (3,26 M), etilén glicol (2,42 M), DMSO (1,9 M) y sacarosa (0,4 M). Gotas de este medio con los ápices de *C. esculenta* se colocaron sobre una superficie plana con papel de aluminio y fueron congeladas con NL. En esta investigación se obtuvo una tasa de regeneración de entre 73 y 100% (Sant *et al.* 2008).

Técnicas de cultivo de tejidos para el almacenamiento por largo plazo

Además de la crioconservación, también existe la posibilidad de almacenar tejidos *in vitro* por largo plazo sin el uso de NL, retrasando el crecimiento al controlar factores como el estrés osmótico del medio (Bessembinder *et al.* 1993). Esto se logra utilizando azúcares no metabolizables por las plantas como el manitol o el sorbitol. Adicionalmente, se puede usar reguladores de crecimiento que reduzcan la tasa de crecimiento y bajas temperaturas. Bessembinder *et al.* (1993) mantuvieron clones de *C. esculenta* durante ocho años a 9 °C, con ciclos de transferencia cada tres años. En otro ejemplo, se mantuvieron los meristemas de cultivares comerciales de banano almacenados entre 28 y 30 meses en medios de cultivo con la mitad de la concentración de las sales minerales, a 22 °C con un fotoperiodo de 16 horas luz y transferencia cada dos meses (Banerjee y Sharma 1988). Sin embargo, es importante señalar que tiempos mayores de cultivo *in vitro* podrían inducir tasas más altas de variación somaclonal (Sánchez-Chiang y Jiménez 2009).

BANCOS DE GERMOPLASMA *IN VITRO* EN CULTIVOS TROPICALES

La mayoría de los bancos de germoplasma *in vitro* especializados en plantas tropicales se encuentran asociados a centros internacionales de investigación o conservación y, en menor grado, a universidades. Un ejemplo es el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), en Costa Rica, donde se ha trabajado en el desarrollo de protocolos adecuados para el almacenamiento *in vitro* de embriones cigóticos, embriones somáticos, ápices y semillas de diferentes genotipos de café, así como de suspensiones celulares de esta misma especie y de *Musa* spp. Esto, además, ha facilitado el intercambio de recursos fitogenéticos con productores y con organismos internacionales (Etienne *et al.* 2002, Ebert 2008).

El CIAT ha conservado maíz (*Zea mays*) (CIAT 2008), el Centro de Internacional de la Papa (CIP) variedades locales de papa, el IITA frijol ñame (*Sphenostylis stenocarpa*), caupí (*Vigna unguiculata*), maní bambara (*Vigna subterranea*), soya (*Glicine max*) y yuca (Ebert 2008, IITA 2008). También, institutos miembros del Grupo Consultivo de Investigación en Agricultura Internacional (The Consultative Group on International Agricultural Research [CGIAR]), que colaboran con organismos oficiales en diferentes zonas de Medio Oriente, América, Asia y África, se dedican principalmente a la investigación científica para fomentar el crecimiento agrícola sostenible que fortalezca la seguridad alimentaria y como tarea fundamental tienen el mantener bancos de germoplasma internacionales que preservan y facilitan el acceso a los recursos genéticos (CGIAR 2009).

También, el grupo Biodiversidad Internacional (Biodiversity International [BI], anteriormente conocido como "The International Board for Plant Genetic Resources" [IBPGR]), con sus diferentes sedes de América, Asia, el Pacífico, Oceanía, Europa y África, se ha centrado en la conservación *in vitro*, por medio del crecimiento lento, de tallos de cacao, mango, banano, plátano, aguacate, papa (proveniente del CIP por intercambio de materiales), yuca, especies de *Allium*, minitubérculos de ñame (*Dioscorea* spp.) (provenientes del IITA), tiquisque (*Xanthosoma* spp.) y malanga,

taro, chamol o ñampí (*C. esculenta*) y algunas especies forrajeras (*Cynodon* spp. y *Digitaria* spp.). Además, BI ha empleado la crioconservación para almacenar embriones cigóticos de coco, semillas de cacao, semillas de aguacate, meristemas de camote y papa, explantes de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) y *Citrus* spp. (Withers *et al.* 1990, Engelmann 1991, Biodiversity International 2008a, 2008b, CIAT 2008). En cuanto a cultivos básicos para la alimentación en África y Asia, se ha trabajado principalmente con *Allium* spp., maíz y arroz (Withers *et al.* 1990).

La Red Internacional para el Mejoramiento de Banano y Plátano (por su nombre en inglés "International Network for the Improvement of Banana and Plantain [INIBAP/IPGRI], Bélgica) se especializa en mantener un banco de germoplasma *in vitro* de banano y ha hecho esfuerzos por eliminar enfermedades durante su almacenamiento. Por ejemplo, por medio de la crioconservación se eliminó el virus del mosaico del pepino en meristemas apicales de esta especie (Helliot *et al.* 2003).

Las universidades de Taiwán y Camboya establecieron un banco de germoplasma *in vitro* de cítricos, en conjunto con el Centro Long Dinh de Investigación en Fruticultura (LDFRC, por sus siglas en inglés) en Vietnam (Su 2006). A partir de recursos fitogenéticos conservados en este banco se generaron nuevas variedades con tolerancia y resistencia a varias enfermedades. El banco posee 15 variedades de naranja, 11 variedades y cinco especies silvestres de limón, 45 variedades de pomelo y más de 27 variedades pertenecientes a seis especies e híbridos (Food and Fertilizer Technology Center 1997). Un año después, dicho proyecto se amplió hacia la producción de banano libre de virus (Food and Fertilizer Technology Center 1998, Hwang y Su 1998).

En Asia, el Centro de Tecnología en Alimentos y Fertilizantes (Food and Fertilizer Technology Center [FFTC]) utiliza un banco de germoplasma para salvar de la extinción materiales silvestres de arroz y banano y así poder utilizarlos en programas de mejoramiento genético (Food and Fertilizer Technology Center 2001).

El Gobierno de India, por su parte, ha establecido una red entre tres bancos de germoplasma nacionales: el Jardín Botánico e Instituto de Investigación Tropical (TBGRI, por sus siglas en inglés) en Thiruvananthapuram, el Instituto Central de Medicina y Plantas Aromáticas (CIMAP, por sus siglas en inglés) en Lucknow y la Oficina Nacional de Recursos Genéticos Vegetales

(NBPGR, por sus siglas en inglés) en Nueva Delhi, los cuales tienen programas de conservación en especies de plantas medicinales, enfocados fuertemente en la crioconservación (Dixit *et al.* 2004).

Existen otros esfuerzos más pequeños y limitados, que también se enfocan en cultivos tropicales y que procuran la seguridad alimentaria y el desarrollo de metodologías para especies poco investigadas, como la crioconservación de varias especies del género *Dioscorea* (con potencial como sustituto de la papa) en el Instituto de Genética de Plantas e Investigación en Cultivos Vegetales, Gatersleben, Alemania (Leunufna y Keller 2003), meristemas apicales de camote en el Instituto de Biotecnología Kagoshima, Japón (Hirai y Sakai 2003), y tallos de caña de azúcar provenientes de embriones somáticos por medio de crecimiento lento *in vitro* con subcultivos cada dos meses en el laboratorio de conservación de germoplasma de la Escuela de Biología y Ciencias de la Conservación de la Universidad de KwaZulu-Natal, en África del Sur (Watt *et al.* 2009).

Los bancos de germoplasma *in vitro* también permiten la conservación de semillas de ciertos híbridos tropicales. Por ejemplo, Popova *et al.* (2003) crioconservaron, en el Jardín Botánico de la Academia Rusa de Ciencias, semillas del género híbrido de orquídeas *Bratonia* (*Miltonia* x *Brassia*) y encontraron que esta metodología fue beneficiosa para el desarrollo de los protocormos y que las semillas no perdieron viabilidad. También, en el Instituto Embrapa Gado de Leite en Brasil, se logró el almacenamiento por 90 días en cultivo *in vitro* de algunas variedades de las gramíneas forrajeras *Pennisetum purpureum* (Cameroon, Mineiro, Pioneiro) y un híbrido triploide - *P. purpureum* x *P. glaucum* (Souza sobrinho *et al.* 2007).

Como se destaca en esta revisión de literatura, los bancos de germoplasma *in vitro* son una herramienta útil para la conservación de recursos genéticos de cultivos tropicales de importancia agrícola y alimenticia.

LITERATURA CITADA

- Ara, H; Jaiswal, U; Jauswal, V.S. 2000. Synthetic seed: Prospects and limitations. *Current Science* 78:1438-1444.
- Banerjee, N; Sharma, AK. 1988. *In vitro* response as a reflection of genomic diversity in long-term cultures of *Musa*. *Theoretical and Applied Genetics* 76:733-736.
- Benson, EE; Johnston, J; Muthusamy, J; Harding, K. 2006.

- Physical and engineering perspectives of *in vitro* plant cryopreservation. *In: Gupta, DS; Ibaraki, Y. eds. Plant Tissue Culture Engineering. Springer. Holanda. p. 441-476.*
- Berjak, P; Walker, M; Mycock, DJ; Wesley-Smith, P; Pammenter, NW. 2000. Cryopreservation of recalcitrant zygotic embryos. p. 141-155. *In: Engelmann, F. Takagi, H. eds. Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current progress and application. Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Tsukuba, Japan. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 496 p.*
- Bessembinder, JJE; Staritsky, G; Zandyoort, EA. 1993. Long-term *in vitro* storage of *Colocasia esculenta* under minimal growth conditions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 33:121-127.
- Biodiversity International. 2008a. Genebanks - Overview (en línea). International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI) - the International Network for Improvement of Banana and Plantain (INIBAP). Rome, Italy. Consultado: 16 nov. 2008. Disponible en: http://www.biodiversityinternational.org/scientific_information/themes/genebanks/overview.html
- Biodiversity International. 2008b. Germplasms collection (en línea). International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI) - the International Network for Improvement of Banana and Plantain (INIBAP). Rome, Italy. Consultado 16 nov. 2008. Disponible en: http://www.biodiversityinternational.org/scientific_information/themes/germplasm_collection.html
- Bonnier, FJM; Van Tuyl, JM. 1997. Long-term *in vitro* storage of lily: effects of temperature and concentration of nutrients and sucrose. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 49:81-87.
- Castillo, B; Smith, MAL; Yadava, UL. 1998. Plant regeneration from encapsulated somatic embryos of *Carica papaya* L. *Plant Cell Reports* 17:172-176.
- Chakrabarty, D; Hahn, EJ; Yoon, YJ; Paek, KY. 2003. Micropropagation of apple rootstock M.9 EMLA using bioreactor. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 78:605-609.
- Chakrabarty, D; Park, SY; Ali, MB; Shin, KS; Paek, KY. 2005. Hyperhydricity in apple: ultrastructural and physiological aspects. *Tree Physiology* 26:377-388.
- CGIAR. 2009. Una alianza estratégica para la agricultura sostenible en el mundo en desarrollo (en línea). Consultative Group on International Agricultural Research (CGIAR). Consultado 29 jun. 2008. Disponible en <http://www.cgiar.org/languages/lang-spanish.html>
- CIAT. 2008. Unidad de Recursos Fitogenéticos (en línea). Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Colombia. Consultado 16 nov. 2008. Disponible en: <http://isa.ciat.cgiar.org/urg/main.do?language=en>
- Cousins, MM; Adelberg, J. 2008. Short-term and long-term time course studies of tumeric (*Curcuma longa* L.) microrrhizome development *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 93:283-293.
- Danso, KE; Ford-Lloyd, BV. 2004. Cryopreservation of embryogenic calli of cassava using sucrose cryoprotection and air desiccation. *Plant Cell Reports* 22: 623-631.
- Debergh, P; Aitken-Christie, J; Cohen, D; Grout, B; von Arnold, S; Zimmerman, R; Ziv, M. 1992. Reconsideration of the term "vitrification" as used in micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 30:135-140.
- Dixit, S; Ahuja, S; Narula, A; Srivastava, PS. 2004. Cryopreservation: a potential tool for long-term conservation of medicinal plants. p. 278 - 288. *In: Srivastava, PS; Narula, A; Srivastava, S. eds. Plant biotechnology and molecular markers. Kluwer Academic Publishers, Holanda - Anamaya Publishers, Nueva Delhi, India. 400 p.*
- Dussert, S; Chabrilange, N; Engelmann, F; Anthony, F; Hamon, S. 2000. Cryopreservation of coffee (*Coffea arabica* L.) seeds: toward a simplified protocol for routine use in coffee genebanks. p. 161 - 166. *In: Engelmann, F. Takagi, H. eds. Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current progress and application. Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Tsukuba, Japan. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 496 p.*
- Ebert, A. 2008. Colecciones de germoplasma (en línea). Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). San José, Costa Rica. Consultado: 16 nov. 2008. Disponible en: http://www.catie.ac.cr/BancoConocimiento/L/laboratorio_de_biotecnologia_cultivo_de_tejidos/laboratorio_de_biotecnologia_cultivo_de_tejidos.asp?CodIdioma=ESP&CodMagazin=82&CodSeccion=269&IntMenu=3&MagSigla=
- Engelmann, F. 1991. *In vitro* conservation of tropical plant germplasm - a review. *Euphytica* 57:227-243.
- Engelmann, F. 2000. Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources. p. 8 - 20. *In: Engelmann, F. Takagi, H. (eds). Cryopreservation*

- of tropical plant germplasm. Current progress and application. Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Tsukuba, Japan. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 496 p.
- Escobar, RH; Debouck, D; Roca, W. 2000. Development of cassava cryopreservation. p. 222 - 226. *In: Engelmann, F. Takagi, H. eds. Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current progress and application. Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Tsukuba, Japan. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 496 p.*
- Etienne, H; Anthony, F; Dussert, D; Fernandez, D; Lashermes, P; Bertrand, B. 2002. Biotechnological applications for the improvement of coffee (*Coffea arabica* L.). *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 38:129-138.
- FFTC (Food and Fertilizer Technology Center). 1997. Nursery systems for disease-free *Citrus* plants (en línea). Food and Fertilizer Technology Center (FFTC). Taiwan, ROC – Tailandia - Malasia. Consultado 10 Marzo, 2008. Disponible en: <http://www.agnet.org/library/ac/1997d/>
- FFTC. 1998. Virus diseases in orchards in the tropics, and the production of virus-free seedlings (en línea). Food and Fertilizer Technology Center (FFTC). Taiwan, ROC – Tailandia - Malasia. Consultado 10 marzo, 2008. Disponible en: <http://www.agnet.org/library/ac/1998g/>
- FFTC. 2001. New research in the production of seeds and seedlings (En línea). Food and Fertilizer Technology Center (FFTC). National Taiwan University, Rural Development Foundation (RDR), Taiwan, ROC - Tailandia. Consultado 10 mar. 2008. Disponible en: <http://www.agnet.org/library/nc/133b/>
- Gagliardi, RF; Hanai, LR; Pacheco, G; Oliveira, CA; Carneiro, LA; Montenegro-Valls, JF; Mansur, E; Carneiro-Vieira, ML. 2007. Assesment of genetic stability among *in vitro* plants of *Arachis retusa* using RAPD and AFLP markers for germplasm preservation. *Journal of Integrative Plant Biology* 46:307-312.
- Gangopadhyay, G; Bandyopadhyay, T; Poddar, R; Gangopadhyay, SB; Mukherjee, KK. 2005. Encapsulation of pineapple microshoots in alginate beads for temporary storage. *Current Science* 88:972-977.
- García-Águila, L; De Fera, M; Acosta, K. 2007. Aspectos básicos de la conservación *in vitro* de germoplasma vegetal. *Biotecnología Vegetal* 7:67-79.
- Germanà, MA; Hafiz, IA; Micheli, M; Standardi, A. 2007. Preliminary research on conversion of encapsulated somatic embryos of *Citrus reticulata* Blanco, cv. Mandarin Tardivo di Ciaculli. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 88:117-120.
- González-Arno, T; Engelmann, F; Urra-Villavicencio, C; Morenza, M; Ríos, A. 2000. Cryopreservation of citrus apices using the encapsulation-dehydration technique. p. 217 - 221. *In: Engelmann, F. Takagi, H. eds. Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current progress and application. Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Tsukuba, Japan. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 496 p.*
- Helliot, B; Swennen, R; Poumay, Y; Frison, E; Lepoivre, P; Panis, B. 2003. Ultrastructural changes associated with cryopreservation of banana (*Musa* spp.) highly proliferating meristems. *Plant Cell Reports* 21:690-698.
- Hirai, D; Sakai, A. 2000. Cryopreservation of *in vitro*-grown meristems of potato (*Solanum tuberosum* L.) by encapsulation-vitrification. p. 205 - 211. *In: Engelmann, F; Takagi, H. eds. Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current progress and application. Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Tsukuba, Japan. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 496 p.*
- Hirai, D; Sakai, A. 2003. Simplified cryopreservation of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] by optimizing conditions for osmoprotection. *Plant Cell Reports* 21:961-966.
- Hwang, SC; Su, J. 1998. Production of virus-free banana plantlets in Taiwan. (en línea) National Taiwan University, Food and Fertilizer Technology Center, Taiwan, ROC. Consultado 10 Marzo, 2008. Disponible en: <http://www.agnet.org/library/eb/460/>
- IITA. 2008. IITA Germplasm Collections, major crops maintained in IITA genebank (en línea). International Institute of Tropical Agriculture (IITA). Benin – Camerún – Congo – Ghana – Kenya – Malawi – Mozambique – Nigeria – Tanzania – Uganda, Africa. Consultado 16 nov. 2008. Disponible en: <http://www.iita.org/cms/details/genebank.aspx?articleid=1486&zoneid=358>
- Inagaki, M. 2000. Use of stored pollen for wide crosses in wheat haploid production. p. 130 - 135. *In: Engelmann, F. Takagi, H. eds. Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current progress and application. Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Tsukuba, Japan. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 496 p.*
- Keller, ERJ; Senula, A; Leunufna, S; Grube, M. 2006. Slow growth storage and cryopreservation — tools

- to facilitate germplasm maintenance of vegetatively propagated crops in living plant collections. *International Journal of Refrigeration* 29:411-417.
- Kumar, V; NAidu, M; Rayishankar, GA. 2006. Developments in coffee biotechnology - *in vitro* plant propagation and crop improvement. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 87:49-65.
- Leunufna, S; Keller, ERJ. 2003. Investigating a new cryopreservation protocol for yams (*Discorea* spp.). *Plant Cell Reports* 21:1159-1166.
- Lisek, A; Orlikowska, T. 2004. *In vitro* storage of strawberry and raspberry in calcium-alginate beads at 4 °C. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 78:167-172.
- Mallón, R; Barros, P; Luzardo, A; González, ML. 2007. Encapsulation of moss buds: an efficient method for the *in vitro* conservation and regeneration of the endangered moss *Splachnum ampullaceum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 88:41-49.
- Marin, ML; Duran-Vila, N. 1991. Conservation of *Citrus* germplasm *in vitro*. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 116:740-746.
- Martin, KP; Zhang, CL; Slater, A; Madassery, J. 2007. Control of shoot necrosis and plant death during micropropagation of banana and plantains (*Musa* spp.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 88:51-59.
- Matsumoto, T; Mochida, CL; Itamura, H; Sakai, A. 2001. Cryopreservation of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) by vitrification of dormant shoot tips. *Plant Cell Reports* 20:398-402.
- Murashige, T; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- Ng, NQ; Daniel, IO. 2000. Storage of pollen for long-term conservation of yam genetic resources. p. 136 - 139. *In: Engelmann, F. Takagi, H. eds. Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current progress and application. Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Tsukuba, Japan. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 496 p.*
- Panis, B; Schoofs, H; Remy, S; Sági, L; Swennen, R. 2000a. Cryopreservation of banana embryogenic cell suspensions: an aid for genetic transformation. p. 103 - 109. *In: Engelmann, F. Takagi, H. eds. Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current progress and application. Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Tsukuba, Japan. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 496 p.*
- Panis, B; Schoofs, H; Think, NT; Swennen, R. 2000b. Cryopreservation of proliferating meristem cultures of banana. p. 238 - 244. *In: Engelmann, F. Takagi, H. eds. Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current progress and application. Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Tsukuba, Japan. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 496 p.*
- Paulet, F; Engelmann, F. 1994. Cryoconservation of apices of sugar cane. *In: Teisoon, C. ed. p. 11-13. In vitro culture of tropical plants, Repères, Cirad. Francia.*
- Pennycooke, JC; Towill, LE. 2000. Cryopreservation of shoot tips from *in vitro* plants of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] by vitrification. *Plant Cell Reports* 19:733-737.
- Popova, EV; Nikishina, TV; Kolomeitseva, GL; Popov, AS. 2003. The effect of seed cryopreservation on the development of protocorms by the hybrid orchid *Bratonia*. *Russian Journal of Plant Physiology* 50:672-677.
- Quirós, W; Guevara, AL; Sánchez, P; Aguilar, ME; Bonilla, N; Quesada, P; Barrantes, W; Jiménez, ML; Castro, M; González, MG; Noches, L. 2008. Costa Rica, el estado de los recursos fitogenéticos 2008. Segundo informe nacional. Ministerio de Agricultura y Ganadería, Oficina Nacional de Semillas, Comisión Nacional de Recursos Filogenéticos. Costa Rica. Ed. Columna Artes Gráficas S.A. p. 131.
- Rao, NK. 2004. Plant genetic resources: Advancing conservation and use through biotechnology. *African Journal of Biotechnology* 3:136-145.
- Reinhold, PJ; Van-Iren, F; Kijne, W. 2000. Cryopreservation of undifferentiated plant cells. p. 91 - 102. *In: Engelmann, F. Takagi, H. eds. Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current progress and application. Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Tsukuba, Japan. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 496 p.*
- Sánchez-Chiang, N; Jiménez, VM. 2009. Técnicas moleculares para la detección de variantes somaclonales. *Agronomía Mesoamericana* 20:135-151.
- Sant, R; Panis, B; Taylor, M; Tyagi, A. 2008. Cryopreservation of shoot-tips by droplet vitrification applicable to all taro (*Colocasia esculenta*) accessions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 92:107-111.
- Santana-Buzzy, N; Rojas-Herrera, R; Galaz-Ávalos, RM; Ku-Cauich, JR; Mijangos-Cortés, J; Gutiérrez-Pacheco, LC; Canto, A; Quiroz-Figueroa, F; Loyola-Vargas, VM. 2007. Advances in coffee tissue culture

- and its practical applications. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 43:507-520.
- Soengas, P; Cartea, E; Lema, M; Velasco, P. 2009. Effect of regeneration procedures on the genetic integrity of *Brassica oleracea* accessions. *Molecular Breeding* 23:389-395.
- Soneji, JR; Rao, PS; Mhatre, M. 2002. Germination of synthetic seeds of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.). *Plant Cell Reports* 20:891-894.
- Souza sobrinho, F; Vander Pereira, A; Silva Ledo, JF; Silva Oliveira, J; Vargas, SM. 2007. Aclimatização de germoplasma de capim-elefante, pós cultivo *in vitro*. *Ciência e Agrotecnologia, Lavras* 31:11-15.
- Su, HJ. 2006. Establishment of pathogen free *Citrus* germplasm repository for the improvement of the citrus industry in ASPAC (Year 1) (en línea). Food and Fertilizer Technology Center (FFTC). National Taiwan University, Rural Development Foundation (RDR), Taiwan, ROC. Consultado 10 marzo 2008. Disponible en: <http://www.agnet.org/library/ac/2006/>
- Takagi, H. 2000. Recent developments in cryopreservation of shoot apices of tropical species. p. 178-193. *In: Engelmann, F. Takagi, H. eds. Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current progress and application. Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Tsukuba, Japan. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 496 p.*
- Tandon, R; Chauhury, R; Shivanna, KR. 2007. Cryopreservation of oil palm pollen. *Current Science* 92:182-183.
- Thinh, NT; Takagi, H; Sakai, A. 2000. Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of some vegetatively propagated tropical monocots by vitrification. p. 227-232. *In: Engelmann, F. Takagi, H. eds. Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current progress and application. Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Tsukuba, Japan. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 496 p.*
- Towill, LE; Walters, C. 2000. Cryopreservation of pollen. p. 115-129. *In: Engelmann, F. Takagi, H. eds. Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current progress and application. Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Tsukuba, Japan. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 496 p.*
- Tyagi, RK; Agrawal, A; Mahalakshmi, C; Hussain, Z; Tyagi, H. 2007. Low-cost media for *in vitro* conservation of turmeric (*Curcuma longa* L.) and genetic stability assessment using RAPD markers. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 43:51-58.
- Wang, YL; Fan, MJ; Liaw, SL. 2005. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of papaya (*Carica papaya* L.) by vitrification. *Botanical Bulletin of the Academia Sinica* 46:29-34.
- Watt, MP; Banasiak, M; Reddy, D; Albertse, EH; Dnyman, SJ. 2009. *In vitro* minimal growth storage of *Saccharum* spp. hybrid (genotype 88H0019) at two stages of direct somatic embryogenic regeneration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 96:263-271.
- Wilkinson, T; Wetten, A; Prychid, C; Fay, M. 2003. Suitability of cryopreservation for the long-term storage of rare and endangered plant species: a case history for *Cosmos atrosanguineus*. *Annals of Botany* 91:65-74.
- Withers, LA; Wheelans, SK; Williams, JT. 1990. *In vitro* conservation of crop germplasm and the IBPGR databases. *Euphytica* 45:9-22.
- Zhao, MA; Xhu, YZ; Dhital, SP; Khu, DM; Song, YS; Wang, MY; Lim, HT. 2005. An efficient cryopreservation procedure for potato (*Solanum tuberosum* L.) utilizing the new ice blocking agent, supercool X1000. *Plant Cell Reports* 24:477-481.

