Cultivos Tropicales 16(2):74-78, 1995

Revisión bibliográfica
ALMACENAMIENTO A LARGO PLAZO DE ÓRGANOS VEGETALES MEDIANTE MÉTODOS DE CRIOCONSERVACIÓN

M. Martínez

INTRODUCCIÓN

La erosión genética causada por la destrucción de los habitats, la selección natural y los agentes bióticos ha acrecentado en los últimos años el interés por la conservación del germoplasma vegetal. En la agricultura, paradójicamente, el éxito de los fitomejoradores en la obtención de cultivares de mayor rendimiento, así como en la adopción de tecnologías de avanzada, son factores que contribuyen a destruir la diversidad genética (Hawkes, 1981). La conservación del germoplasma mediante el cultivo de tejidos se basa en la limitación del crecimiento, conseguida generalmente con el empleo de temperaturas de incubación y de medios de cultivos subóptimos, o bien en la utilización de la denominada crioconservación a las temperaturas ultrabajas del nitrógeno líquido (-196°C). **Crioconservación** (griego kryos = congelado) es literalmente la conservación en el estado de congelación.

La principal ventaja del almacenamiento a muy bajas temperaturas, es obviamente la habilidad para detener totalmente los procesos metabólicos y el deterioro biológico.

La crioconservación de las plantas superiores, si bien se encuentra en un estado menos desarrollado que la del reino animal, ofrece técnicas muy promisorias para la conservación de germoplasma a largo plazo. Este tipo de conservación a temperaturas ultrabajas detiene por completo el metabolismo, pudiéndose recuperar posteriormente las células, los tejidos y(o) los órganos vegetales, siempre que seamos capaces de evitar los daños que por congelación o por deshidratación se producen al congelar. De esta forma, se pueden conservar por un período indefinido sin la necesidad de realizar subcultivos.

Veamos a continuación qué sucede en una célula expuesta a bajas temperaturas: las células están rodeadas de soluciones extra e intracelulares. Al bajar la temperatura se llegará a la temperatura de congelación de la solución extracelular antes que la de congelación intracelular, al estar la primera menos concentrada. Por agitación o por nucleación se induce la formación de cristales de hielos y se evita el subenfriamiento. Si la pérdida de calor -en el enfriamiento- no es un proceso muy rápido, al aumentar la concentración de la solución extracelular -por congelación del agua-, la célula -por ósmosis- pierde agua o sea se deshidrata; con esta deshidratación se concentra la solución intracelular, bajando así la temperatura de congelación.

Con el descenso gradual de la temperatura, la célula se va deshidratando.

Solo se congelará el agua en el interior de la célula, si la velocidad de pérdida de calor es superior a la velocidad de deshidratación.

Si la congelación es algo más rápida y se alcanza el punto de congelación del líquido intracelular, se producirán cristales de hielo intracelulares, con el consiguiente daño mecánico para la célula.

Si la congelación es ultrarrápida, se formarán cristales de hielo en el interior y el exterior de la célula, pero el tamaño de estos es muy pequeño aunque siempre produce algun daño por insignificante que sea.

Hasta ahora hemos considerado una sola célula, pero se van a congelar sistemas multicelulares, con células de distintas características, por lo que estos procesos pueden variar. Por lo tanto, son necesarios estudios empíricos para cada caso y determinar así el método de crioconservación adecuado.

Otro factor a tener en cuenta es el de la descongelación. Las células deshidratadas pasarán al punto de descongelación de las soluciones extra e intracelulares y se hidratarán posteriormente. La velocidad de descongelación puede que no sea un factor crítico, pero si hay cristales de hielo en el interior de las células (como en el caso de la congelación ultrarrápida), la descongelación rápida es más aconsejable.

O, por el contrario, si la deshidratación ha sido muy extrema -congelación lenta-, una rehidratación muy rápida puede producir daños por excesiva turgencia (Withers, 1979).

Las células con cristales muy pequeños (producidos en la congelación ultrarrápida) deben ser descongeladas rápidamente para evitar que estos cristales se descongelen momentáneamente y se recristalicen de nuevo con un mayor tamaño. Esta temperatura a la que se recristalizan puede ser tan baja como -80°C (Sakai, Kobayashi y Oyiama, 1990) y pueden persistir a temperaturas relativamente altas, demandando por lo tanto un rápido aporte de calor a lo largo de toda la descongelación.

Además de estos problemas de formación de cristales de hielo, hay que tener en cuenta los problemas derivados de la deshidratación, debido a una mayor concentración de solutos o a los efectos mecánicos sobre la membrana (Teoría de volumen mínimo). Estos efectos están aún siendo estudiados.

Los daños en la congelación se producen fundamentalmente en la membrana.

M. Martínez, Investigador del Departamento de Genética y Mejoramiento Vegetal, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal No. 1, San José de las Lajas, La Habana, Cuba.

Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, hay dos métodos básicos de congelación a temperaturas ultrabajas (crioconservación):

- Ultrarrápida.
- Lenta, a una velocidad que debe tener en cuenta los efectos por concentración de solutos, por lo que se debe estudiar empíricamente.

PROTOCOLO GENERAL

Pretratamiento. En ocasiones, el cultivo de los sistemas biológicos previo a la congelación en ciertas condiciones, puede mejorar la supervivencia de los mismos. Los tratamientos varían considera- blemente según el tipo de sistema biológico. Algunos de estos pueden ser:

- Inducción de la tolerancia al frío mediante diversos métodos (precultivo a bajas temperaturas, crioprotectores, etcétera).
- Utilización de compuestos como prolina o glicina betaína, que son acumulados por algunas plantas en condiciones de estrés. Estos productos podrían ser utilizados como crioprotectores o se podrían aplicar condiciones de estrés con anterioridad a la congelación. De hecho, la prolina se utiliza como crioprotector o en mezclas crioprotectoras.
- Es efectivo en suspensiones celulares el uso de prolina y manitol en el medio de cultivo, con el fin de inducir la deshidratación osmótica conveniente para evitar la cristalización intracelular.

También conviene tener en cuenta el tipo de explante empleado y las condiciones fisiológicas en las que se encuentran. En suspensiones celulares, los mejores resultados se obtienen cuando se encuentran en crecimiento exponencial (Withers, 1985), los embriones somáticos en estado globular (Engelmann y Dereuddre, 1988); en el caso de la crioconservación de meristemos, conviene un período de crecimiento previo (Harding, Benson y Smith, 1991; y Dereuddre, Fabre y Bassaglia, 1988).

Tratamientos crioprotectores. Estos se refieren básicamente a los tratamientos químicos que contemplan el uso de sustancias crioprotectoras, como las que se mencionan posteriormente. La deshidratación que se lleva a cabo en la congelación es también crioprotectora, pero no se considera dentro de estos tratamientos.

Son varios los mecanismos por los que actúan los crioprotectores:

- reducción de la velocidad de crecimiento y tamaño de los cristales de hielo,
- acción coligativa,
- deshidratación osmótica antes de la congelación, bajando la temperatura de congelación de las soluciones intra y extracelulares,
- aumento de la permeabilidad de las membranas, facilitando la pérdida de agua del interior de la célula y
- estabilización de macromoléculas y membranas.

Los crioprotectores que más han sido utilizados son el DMSO (dimetilsulfóxido) y el glicerol, a razón de 5-15 y 5-20 % respectivamente. También se emplean otras sustancias como los azúcares (sacarosa, glucosa), azúcares alcoholes (manitol, sorbitol), aminoácidos (prolina, glicina) y polímeros de alto peso molecular (polietilen glicol-6 000), según Meryman, Williams y Duglas (1977).

Los crioprotectores se preparan en el medio que se va a utilizar en el precultivo o en el cultivo posterior. La solución debe esterilizarse por filtración. Si el espécimen es relativamente grande, puede ser transferido a una serie de soluciones con una concentración ascendente del crioprotector.

El tipo y la concentración de las sustancias crioprotectoras deben determinarse para cada material vegetal y es necesario, además, subrayar la citotoxicidad de la mayor parte de estas sustancias en concentraciones altas (Kartha *et al.*, 1982). Aunque su aplicación puede hacerse de varias formas, es conveniente aplicarlas gradualmente en crioviales de polipropileno o eventualmente en vidrio, que contengan un medio de cultivo y material vegetal colocadas en un recipiente con hielo.

Congelación. El éxito de la crioconservación de material vegetal depende, en gran medida, de la acertada elección del método de congelación que se utilice. Básicamente se pueden distinguir tres métodos:

- Congelacion rápida: El materia vegetal se coloca directamente en nitrógeno líquido. La velocidad de disminución de la temperatura puede ser hasta de 1 000°C/min. Uno de los riesgos de este procedimiento es la formación de cristales intracelulares de hielo que pueden dañar el material vegetal.

Este efecto se evita utilizando sustancias crioprotectoras adecuadas y procurando que la congelación se produzca tan rápido como sea posible (a mayor velocidad de congelación, menor tamaño de los cristales de hielo). También es conveniente emplear un volumen pequeño de material vegetal, cuyo contenido de agua sea bajo (Nitzsche, 1983). Con este procedimiento se han crioconservado explantes de varias especies. Si el explante no está incluido en un vial, sino que se sumerge directamente en NL, la congelación es aún más rápida. Los meristemos de papa han sido sumergidos directamente en NL, sujetos en una aguja hipodérmica después de la crioprotección (Grout y Henshaw, 1979).

- Congelación lenta: El material vegetal se congela de modo gradual con un congelador programable, donde la disminución de la temperatura oscila entre 0.1 y 3°C/min.

Este procedimiento permite una deshidratación celular protectora, de manera que los cristales de hielo se forman extracelularmente. Sin embargo, es conveniente insistir que una excesiva deshidratación de las células puede exponerlas a una alta concentración interna de solutos. Generalmente, el material se congela lentamente a una velocidad adecuada, hasta que alcance una temperatura determinada, usualmente -40°C, punto en que la mayor parte del agua ha sido congelada extracelularmente, y luego se coloca directamente en NL.

También puede mantenerse durante un período de tiempo a esa temperatura, antes de introducirlo en NL.

Existen formas más baratas de conseguir un descenso gradual y controlado de la temperatura: por

ejemplo, suspendiendo los viales sobre el nitrógeno líquido y reduciendo paulatinamente la distancia entre ellos. Colocando el explante en un frasco al vacío en el interior de un congelador a -70°C, se pueden obtener descensos de aproximadamente 0.1°C /min (Sala, Cella y Rollo, 1979). La congelación lenta ha sido empleada en la crioconservación de materiales vegetales de numerosas especies.

- Congelación escalonada: Según este procedimiento (*step-wise freezing*), el material vegetal se somete sucesivamente a varias temperaturas por debajo de 0°C y se mantiene en cada una de ellas durante cierto tiempo; posteriormente se sumerge en NL.

Almacenamiento. Para un almacenamiento a corto plazo se pueden utilizar congeladores de -70 a -78°C (Nag y Street, 1973). Para largo plazo es necesario congelar a -196°C, lo que posibilita el cese de toda la actividad metabólica o a -150°C en vapor de nitrógeno, no resultando caro este proceso (Engelmann, 1991; Zakri *et al.*, 1991).

Descongelación. En general, cualquiera que sea el procedimiento empleado para la congelación del material vegetal, su descongelación puede llevarse a cabo en forma rápida por medio de baños de uno a dos minutos de duración en agua a 40°C , teniendo la precaución de agregar gradualmente medio de cultivo para diluir las sustancias crioprotectoras y evitar la desplasmólisis celular.

También puede aplicarse la descongelación lenta por simple exposición del material crioconservado (contenido en crioviales) a la temperatura del laboratorio (Withers, 1979 y 1980) o colocándolo en una corriente de aire caliente (Withers, 1979 y Marin *et al.*, 1990).

Recuperación. Después de la descongelación, es necesario retirar la solución del crioprotector, ya que puede resultar tóxica (Engelmann, Duval y Dereuddre, 1985).

Se ha estudiado poco acerca de los daños de las condiciones de cultivo, después de la congelación en la recuperación de los explantes; existen indicaciones que una intensidad luminosa baja favorece la recuperación (Benson, Harding y Smith, 1989).

Prueba de viabilidad. Existen distintos *tests* para determinar la viabilidad de los sistemas biológicos después de la congelación. El más preciso es quizás la observación del crecimiento normal. Otras pruebas más rápidas son:

- Diacetato de fluoresceína (FDA): Las células vivas tienen intacta la actividad de las esterasas que rompe este tinte, por lo que aparecen iluminadas al ser observadas con luz ultravioleta. Es un método adecuado para suspensiones celulares y cultivos de células (Widholm, 1972).
- Cloruro de trifenil tetrazolio (TTC): Las deshidrogenasas y el NADH reducen el TTC formando formazán de color rojo, pudiéndose medir la intensidad de color en un espectrofotómetro (Steponkus y Lanphear, 1967).
- Ácido tiobarbitúrico (TBA): Uno de los daños producidos por la congelación es la peroxidación de las membranas, pudiendo ser detectada por la reacción del TBA con los productos procedentes de la ruptura de aldehídos (producidos por la peroxidación de lípidos).

Prueba de variabilidad. Deben realizarse pruebas bioquímicas (isoenzimas...), genéticas (conteo de cromosomas...), o moleculares (RFLP, PCR...), para asegurar la estabilidad genética de las plantas crioconservadas.

NUEVAS TÉCNICAS DE CRIOCONSERVACIÓN

El objetivo de estas nuevas técnicas de congelación es buscar simplificaciones para los protocolos de crioconservación estándar.

Encapsulación-deshidratación. Esta técnica está adaptada a partir de experimentos de almacenaje a mediano plazo llevados a cabo por Bapat, Mathre y Rao (1987). Esta ha sido desarrollada por un grupo de investigadores franceses usando meristemos de papa (Fabre y Dereuddre, 1990), uva (Plessic, Leddet y Dereuddre, 1991), pera (Scottez *et al.*, 1991), embriones somáticos de zanahoria (Dereuddre, Blandin y Hassen,1991; y Dereuddre, 1992), caña de azúcar (González *et al.*, 1993; Paulet, Engelmann y Glaszmann, 1993), café (Mari *et al.*, 1993) y yuca (Benson, Chabrillange y Engelmann, 1992). Esta técnica está basada en el desarrollo de la tecnología de producción de semillas artificiales, donde la encapsulación protege las estructuras embebidas y las hace resistentes a tratamientos, los cuales de otra manera pudieran ser letales. Las cuentas de alginato que contienen los explantes son cultiva-

Tabla I. Algunos ejemplos de especies crioconservadas

Especie y explante	Crioprotector	Congelación	Viabilidad
Arachis hypogea (meristemos)	glicerol 5 % DMSO 5 % sacarosa 5 %	Rápido	21-31 % Vástagos y raíces
Capsicum annum (suspensiones)	Glicerol 10 % DMSO 5 %	1°C/min hasta -100°C	25 % (FDA)
Cicer arietinum (meristemos)	DMSO 4 %	0.6°C/min hasta -40°C	100 % meristemos crecen
Daucus carota (embriones somáticos y plántulas)	DMSO 2.5 - 20 %	1°C/min hasta -40°C	40 % plantas
Glicine max (suspensiones)	DMSO 7 %	2°C/min hasta 100°C	52 % (FDA)
Lycopersicon sp. (plántulas)	DMSO 10 %	Rápido	30 % callos

das por muchas horas durante días en un medio líquido con unos altos niveles de sacarosa; estos son entonces parcialmente disecados bajo una corriente de flujo laminar y congelados lenta o rápidamente. Después de una lenta descongelación, las cuentas son tranferidas a un medio estándar. La recuperación de los explantes es satisfactoria, en el caso de la papa 26 % de los ápices congelados pudieron convertirse en plantas.

Vitrificación. Esta técnica fue desarrollada recientemente por varios autores (Uragami *et al.*, 1989; Langis *et al.*, 1989; Langis y Steponkus, 1990; Sakai, Kobayasi y Oyiama,1990; Towill, 1990; y Dereuddre,1992) usando suspensiones celulares, protoplastos, embriones somáticos y meristemos de varias especies. En un proceso de vitrificación, el material es congelado ultrarrápidamente, con el objetivo de que el agua vitrifique para formar una estructura de sólido amorfo, lo que evita los problemas causados por la formación de hielo dentro de la célula. Con el fin de llevar a cabo la vitrificación, es necesario un tiempo de pretratamiento rápido y muy preciso en presencia de concentraciones muy altas de crioprotectores. La dilución del medio crioprotector después de la congelación es también muy precisa. Esto parece que al menos para células en suspensión, la complejidad de la fase de congelación en el procedimiento estándar es transferida a la fase de pretratamiento, lo que hace que esta técnica sea muy usada en un futuro cercano.

Uso de congeladores domésticos. Esta técnica fue desarrollada recientemente por Tessereau *et al.*, 1990, usando suspensiones celulares embriogénicas y embriones somáticos de café. Después del pretratamiento estándar con altas concentraciones de sacarosa, los crioviales que contenían las suspensiones fueron colocados en un congelador comercial a -20°C por 24 horas, entonces sumergidos en NL. Un 50 % en la tasa de viabilidad (medido por reducción del TTC) se obtuvo inmediatamente después de la descongelación.

Después de 42 días en cultivo, el desempeño de la línea crioconservada, en términos de la densidad final de células, la productividad de embriones y el porcentaje de embriones en estado de torpedo, fueron similares al control sin congelación.

Esta técnica ha sido empleada para congelar embriones somáticos de zanahoria (Lecoutex *et al.*, 1991), y células embriogénicas y callos de cítricos (Engelmann *et al.*, 1993). El uso de estos congeladores por diferentes autores, no implica necesariamente la aplicación de la técnica descrita (Tessereau *et al.*, 1990).

Desecación. Esta técnica es preferentemente empleada con embriones zigóticos o ejes embrionarios de varias especies. Los embriones son extraídos de la semilla, deshidratados y colocados bajo una corriente de flujo laminar o en cajas cerradas que contienen sílica gel y congelados después rápidamente por inmersión directa en nitrógeno líquido. La duración del período de desecación varía en dependencia del tamaño de los embriones o de su contenido de agua inicial. Usualmente el contenido de agua de los embriones después de la congelación es de un 15-20 % (respecto a su peso fresco). La desecación debe ser suficiente para asegurar la supervivencia después de la congelación, pero no tan intensa que le pueda producir daños al embrión. Por ejemplo, embriones de *Coffea arabica* tienen un contenido inicial de agua de un 64 y 100 % de viabilidad sin ningún tratamiento, pero no toleran la congelación en nitrógeno líquido (Abdelnour *et al.*, 1992).

Precultivo y desecación. Los procesos de crioconservación que combinan el precultivo en medios con crioprotectores y la desecación, han sido desarrollados con embriones zigóticos de coco (Assay-Bah y Engelmann, 1992) y embriones somáticos de palma de aceite (Engelmann, Duval y Dereuddre, 1985; y Dumet *et al.*, 1993). En el caso de coco, los embriones maduros de cuatro variedades comerciales fueron desecados por cuatro horas bajo un flujo laminar y colocados de 11 a 20 horas en un medio que contenía 600 g de glucosa y 15 % de glicerol. La congelación y descongelación fueron llevadas a cabo rápidamente.

USO POTENCIAL PARA ESTAS NUEVAS TÉCNICAS

Estas nuevas técnicas, vitrificación, encapsulación-deshidratación y uso de congeladores domésticos, ciertamente no reemplazarán los procesos convencionales, aunque ellos presentan dos intereses fundamentales: primeramente, ellos pueden ofrecer posibilidades adicionales para las plantas que son recalcitrantes a los procesos de congelación tradicionales; segundo, ellos pueden evitar o dar la posibilidad de evitar el uso de congeladores programables, lo cual pudiera simplificar el proceso, así como hacer menos costosa y factible su utilización.

BIBLIOGRAFÍA

Abdelnour, A., V. Villalobos y F. Engelmann. Cryopreservation of Zygotic Embryos of Coffea spp. Cryo Lett. 13: 297-302, 1992.

Assay-Bah, B. y F. Engelmann. Cryopreservation of Mature Embryos of Coconut (Cocos nucifera L.) and Subsequent Regeneration of Plantlets. Cryo Lett. 13: 117-126, 1992.

Bapat, V. A., M. Mathre y P.S. Rao. Propagation of Morus indica L. (Mulberry) by Encapsulated Shoot Buds. Plant Cell Rep, 6: 393-395, 1987.

Benson, E. E., K. Harding y H. Smith. Variation in Recovery of Cryopreserved Shoot-Tips of Solanum tuberosum Exposed to Different Pre - and Post Freeze Light Regimes. Cryo Lett. 10: 323 - 344, 1989.

Benson, E. E. A Comparison of Cryopreservation Methods for the Long-Term In Vitro Conservation of Cassava. /E. E. Benson, N. Chabrillange, F. Engelmann.-**En**: Proc. SLTP Autumn Meeting (1992 sep. 8-9 : Stirling).

Dereuddre J., J. Fabre y C. Bassagna. Resistance to Freezing in Liquid Nitrogen of Carnation (Dianthus caryophyllus L. var. Eolo) Apical and Axillary Shoot Tips Excised from Different Aged In Vitro Plantlets. Plant Cell Rep. 7: 170-173, 1988.

Dereuddre, J., S. Blandin y N. Hassen. Resistance of Alginate Coated Somatic Embryos of Carrot (Daucus carota L) to Desiccation and Freezing in Liquid Nitrogen: 1. Effects of Preculture. Cryo Lett. 12: 125-134, 1991.

Dereuddre, J. Cryopreservation of In Vitro Cultures of Plant Cells and Organs by Vitrification and Dehydration. /J. Dereuddre.- **En**: Reproductive Biology and Plant Breeding.- New York : Springer Verlag, 1992.

Dumet, D. /et al./. Cryopreservation of Oil Palm Somatic Embryos (Elaeis guineensis Jacq.) Involving a Desiccation Step. Plant Cell Rep. 12: 352-355, 1993.

Engelmann, F. y J. Dereuddre. Effets du milieu de culture sur la production d' embryoides destinés a la cryoconservation chez li palmier a' huile (Elaies guineensis Jacq.). C. R. Acad. Sci. Paris, Ser.III 306:515-520, 1988a.

Engelmann,F. y J. Dereuddre. Cryopreservation of Oil Palm Somatic Embryos: Importance of the Freezing Process. Cryo Lett. 7: 220-235, 1988b.

Engelmann, F. /et al./. Interest de la cryoconservation de suspensions cellulaires et de cals embryogenes pour l' amélioration génétique des Citrus. Fruits (in press).1993.

Engelmann, F., Y. Duval y J. Dereuddre. Survie et proliferation d' embryons somatiques de palmier a' huile (Elaies guinnensis Jacq.) aprés congelation dans l' azte liquide. C.R. Acad. Sci. Paris, Ser . III 301:111-116, 1985.

Fabre, J. y J. Dereuddre. Encapsulation-Dehydration: a New Approach to Cryopreservation of Solanum Shoot Tips. Cryo Lett. 11:413-426,1990.

González, M. T. /et al./. Cryopreservation of Encapsulated Apices of Sugarcane: Effect of Freezing Procedure and Histology. Cryo Lett 14:303-308, 1993.

Grout, B. W. W. y G. G. Henshaw. Freeze-Preservation of Potato Shoot Tip Cultures. Ann. Bot.. 42:1227-1229, 1979.

Harding, K., E. E. Benson y H. Smith. The Effects of In Vitro Culture Period on the Recovery of Cryopreserved Shoot Tips of Solanum tuberosum. Cryo Lett. 12: 17-22, 1991.

Hawkes, J. G. Germoplasm Collection, Preservation and Use. /J. G. Hawkes.- **En**: Plant Breeding.- Iowa : Iowa State University Press, Ames, 1981.- p. 57-83.

Kartha, K. K. /et al./. Cryopreservation of Periwinkle (Catharantus roseus) Cells Cultured In Vitro. Plant Cell Rep. 1:135-138, 1982.

Langis, R. /et al./. Cryopreservation of Brassica napus Suspensions by Vitrification. Cryo Lett. 10:421-428, 1989.

Langis, P. y P. L. Steponkus. Cryopreservation of Rye Protoplasts by Vitrification. Plant Physiol. 92:666-671, 1990.

Lecoutex, B. /et al./. Cryopreservation of Carrot Somatic Embryos Using a Simplified Freezing Process. Cryo Lett. 12: 319-328, 1991.

Mari, S. /et al./. Cryopreservation of Apices of C. racemosa Using Encapsulation/Dehydration. /S. Mari.- **En**: Proc. Coll ASIC, (15:1992 jun 6-11: Montpellire), 1993.

Marin, M. L. /et al./. Cryopreservation of Cassava Zygotic Embryos and Whole Seeds in Liquid Nitrogen. Cryo Lett. 11: 257-264, 1990.

Meryman, H. T., R. J. Williams y M. S. J. Duglas. Freezing Injury from Solution Effects and Its Prevention by Natural or Artificial Cryoprotection. Cryobiology 14: 287-302, 1977.

Nag, K. K. y H. E. Street. Carrot Embryogenesis from Culture Frozen Cell. Nature 245: 270-272, 1973.

Nitzsche, W. Germplast Preservation. /W. Nitzsche.- **En**: Handbook of Plant Cell Culture.-New York : Mc Millan Publishing, 1983.- p. 782-805.

Paulet, F., F. Engelmann y J. C. Glaszmann. Cryopreservation of Apices of In Vitro Plantlets of Sugarcane (Saccharum sp.) Hybrids Using Encapsulation-Dehydration. Plant Cell Rep. 12:525-529, 1993.

Plessic, P., C. Leddet y J. Dereuddre. Cryopreservation of Algined-Coated Shoot Tips of Grape after a Progressive Increase of Sucrose Concentration in Preculture Medium. /P. Plessic, C. Leddet, J. Deureddre.- **En**: Proc. 28th Ann. Meeting of the Society of Cryobiology. (28:1991 jul 7-12 Leuven), 1991.

Sakai, A., S. Kobayashi e I. Oyiama. Cryopreservation of Nucellar Cells of Navel Orange (Citrus sinensis Osb. var. brasilensis tanaka) by Vitrification. Plant Cell Rep. 9: 30-33, 1990.

Sala, F., R. Cella y F. Rollo. Freeze Preservation of Rice Cells. Physiol. Plant. 45: 170-176, 1979.

Scottez, C. /et al./. Cryopreservation of Pear Shoot Tips after Encapsulation-Dehydration. /C. Scotezz.- **En**: Proc. Ann. Meeting of the Society of Cryobiology. (28:1991 jul 7-12: Leuven).1991.

Steponkus, P. L. y F. O. Lanphear. Refinement of the Triphenyl Tetrazolium Chloride Method of Determining Cold Injury. Plant Physiol. 42:1423-1426, 1967.

Towill, L. E. Cryopreservation of Shoot Tips by Vitrification. /L. E. Towill.- **En** Abstr. Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture (7:1990 : Amsterdam), 1990.- p. 379.

Uragami, A. /et al./. Survival of Cultured Cells and Somatic Embryos of Asparagus officinalis Cryopreserved by Vitrification. Plant Cell Rep. 8: 418-421, 1989.

Use of a Simplified Freezing Process and Dehydration for the Storage of Embryogenic Cell Lines and Somatic Embryos. /H. Tessereau.-**En**: Seeds: Genesis of Natural and Artificial Forms (1990 nov. 12-13 : Amiens), 1990.- p. 123-133.

Widholm, J. M. The Use of Fluorescein Diacetate and Phenosafranin for Determining Viability of Culture Plant Cell. Stain Technol. 47:189-194, 1972.

Withers, L. A. Freeze Preservation of Somatic Embryos and Clonal Plantlets of Carrot (Daucus carota) Plant. Physiol. 63: 460-467, 1979.

Withers, L. A. Storage of Plant Tissue Cultures. / L. A. Withers.- **En**: Crop Genetic Resources the Conservation of Difficult Material. Proceed. Intl. Meeting.- Londres : University of Reading, 1980.- p. 49-82.

Wither, L. A. Cryopreservation of Cultured Plant Cells and Protoplast. /L. A. Wither.- **En**: Cryopreservation of Plant cell and Organs.- Boca Ratón : CRC Press, 1985.- p. 243-267.

Zakri, A. H. /et al./. Conservation of Plant Genetic Resources through In Vitro Methods. Frim (ed), Kuala Lumpur, 270 p, 1991.

Recibido: 7 de febrero de 1995
Aceptado: 21 de abril de 1995