



Introducción a la conservación *ex situ* de los recursos genéticos vegetales

Florent Engelmann¹,
María Teresa González-Arno²

1. Instituto de Investigación para el Desarrollo (IRD), Montpellier, Francia, florent.engelmann@ird.fr.

2. Facultad de Ciencias Químicas de Orizaba, Universidad Veracruzana, Veracruz, México, mtgarnao1@hotmail.com, teregonzalez@uv.mx.

La conservación de la biodiversidad vegetal depende del uso de dos estrategias básicas de conservación, la *in situ* y la *ex situ*. De acuerdo con la Convención sobre la Diversidad Biológica (ONU 1992), la conservación *in situ* se refiere a la conservación de los ecosistemas y hábitats naturales y al mantenimiento y recuperación de poblaciones viables de especies, tanto cultivadas o domesticadas, en los alrededores en donde hayan desarrollado sus propiedades distintivas. La conservación *ex situ* se entiende como la conservación de los componentes de la diversidad biológica fuera de su hábitat natural. Este tipo de conservación es particularmente apropiada para especies cultivadas y sus parientes silvestres, mientras que la conservación *in situ* es especialmente apropiada para las especies silvestres y variedades locales de una granja, parcela agrícola o terreno.

Hasta hace poco tiempo, la mayoría de los esfuerzos dedicados a la conservación, aparte de los trabajos realizados en recursos genéticos forestales, se habían centrado en los métodos *ex situ*, particularmente en bancos de semillas. Entre 1950 y 1960, los avances logrados en el mejoramiento vegetal trajeron consigo la revolución verde, la cual resultó en la adopción a gran escala de variedades de alto rendimiento y cultivares genéticamente uniformes de cultivos básicos, particularmente trigo y arroz. En consecuencia, la preocupación mundial por la pérdida de la diversidad genética de estos cultivos aumentó, ya que los agricultores abandonaron el cultivo de sus variedades adaptadas localmente y variedades tradicionales, sustituyéndolas por otras mejoradas, modernas y genéticamente uniformes. En respuesta a esta preocupación, los centros de investigación agrícola internacional del Grupo Consultivo para la Investigación Agrícola Internacional (CGIAR) comenzaron a reunir colecciones de germoplasma de las especies cultivadas más importantes consideradas en sus respectivos mandatos. En ese contexto, en 1974 se estableció el Consejo Internacional para los Recursos Genéticos Vegetales (IBPGR, por sus siglas en inglés) para coordinar el esfuerzo conjunto de coleccionar sistemáticamente y conservar la diversidad genética vegetal amenazada a nivel mundial (Engelmann y Engels 2002).

Actualmente, como resultado de esa acción global, existen más de 1750 bancos de germoplasma a nivel internacional. Aproximadamente 130 de ellos mantienen más de 10 000 accesiones cada uno, lo que hace que se conserven aproximadamente 7.4 millones de accesiones (FAO 2009). Adicionalmente, en el mundo existen más de 2500 jardines botánicos, que mantienen importantes colecciones *ex situ* con cerca de 4 millones de accesiones de más de 80 000 especies. Los jardines botánicos y los bancos de germoplasma agrícolas deben jugar un rol complementario en el marco de la conservación *ex situ* de la biodiversidad vegetal (Engels y Engelmann 1998). Sin embargo, es importante resaltar que estas actividades de colecta y conservación se centraron en gran medida en algunos de los principales cultivos alimentarios, incluidos cereales y ciertas leguminosas; es decir, especies que se pueden conservar fácilmente como semilla. Esto ha dado lugar a una representación excesiva de estas especies en los bancos más importantes del mundo, así como al hecho de que las estrategias de conservación tiendan a favorecer a dichos materiales. Tan solo recientemente, con el establecimiento de bancos genéticos en el campo, se ha logrado conservar especies para las cuales el almacenamiento de semillas no es apropiado o es simplemente imposible. De igual manera, no fue sino hasta hace poco que la comunidad internacional ha prestado atención al desarrollo de nuevas tecnologías de almacenamiento, incluidas la conservación *in vitro* y la crioconservación (Engelmann y Engels 2002).



Materiales problemáticos para la conservación *ex situ* de la biodiversidad vegetal

Muchos de los alimentos que se consumen en el mundo provienen de plantas que producen semillas tolerantes a la desecación intensa y que pueden ser almacenadas, durante períodos muy prolongados, deshidratadas a bajas temperatura. Las semillas de ese tipo se denominan ortodoxas (Roberts 1973). Su almacenamiento es el método más practicado para la conservación *ex situ* de los recursos genéticos vegetales: alrededor del 90 % de los 7.4 millones de accesiones almacenadas *ex situ* se mantienen como semilla.

Sin embargo, un número considerable de plantas, predominantemente de origen tropical o subtropical, tales como el coco, el cacao y muchas especies forestales y árboles frutales, producen semillas que son incapaces de resistir la desecación y que a menudo también son muy sensibles al frío (Chin 1988). Por consiguiente, no pueden ser mantenidas bajo las condiciones de almacenamiento de semillas convencionales anteriormente descritas, o sea, almacenadas con un contenido bajo de humedad y a una baja temperatura. A las semillas de ese tipo se les llama recalcitrantes y deben mantenerse en condiciones relativamente cálidas y de altas humedades para que conserven su viabilidad (Roberts 1973, Chin y Roberts 1980). Además, aunque las semillas recalcitrantes sean almacenadas de una manera óptima, su vida útil se limita a semanas y ocasionalmente a meses.

Investigaciones más recientes también han identificado especies cuyas semillas exhiben un comportamiento intermedio frente al almacenamiento. Estas son semillas que pueden tolerar la desecación a un contenido considerablemente bajo de humedad, pero una vez secas se vuelven particularmente susceptibles al daño causado por la baja temperatura (Ellis *et al.* 1990, 1991). Dentro de la categoría de semillas con comportamiento intermedio, existe a su vez un grado muy variable de sensibilidad a la desecación, por lo que pueden encontrarse desde algunas muy sensibles hasta otras relativamente tolerantes (Berjak y Pammenter 1994). Por consiguiente, esto constituye un impedimento y se hace igualmente imposible lograr su conservación a largo plazo bajo el régimen de los bancos de semillas ortodoxas.

Hay otras especies vegetales para las cuales la conservación como semilla resulta problemática. En primer lugar, están aquellas que no producen semillas en absoluto y, por consiguiente, se propagan vegetativamente, como el banano y el plátano (*Musa* spp.). En segundo lugar, existen cultivos como la papa (*Solanum tuberosum*), otras raíces y tubérculos —como el ñame (*Dioscorea* spp.), la yuca (*Manihot esculenta*) y el camote (*Ipomoea batatas*)— y la caña de azúcar (*Saccharum* spp.) que tienen genotipos estériles y/o algunos que producen semillas ortodoxas. Sin embargo, estas semillas son altamente heterocigóticas y, por tanto, de una utilidad limitada para la conservación de genotipos específicos. Estos cultivos generalmente se propagan vegetativamente para mantenerse como clones.

Otras categorías de materiales problemáticos, en cuanto a las posibilidades de garantizar su almacenamiento, incluyen las especies amenazadas y raras, así como los productos biotecnológicos que resultan de los programas de hibridación somática e ingeniería genética (González-Arno *et al.* 2009, Engelmann 2010a).



Tradicionalmente, el banco de germoplasma en el campo ha sido el método de almacenamiento *ex situ* de elección para los materiales problemáticos antes mencionados. De acuerdo con el primer Reporte sobre el Estado Mundial de los Recursos Genéticos Vegetales para la Agricultura y la Alimentación (FAO 1996), alrededor de 527 000 accesiones han sido mantenidas en bancos de germoplasma en el campo hasta el momento, y aunque este número ha aumentado desde 1996, no se precisan los datos presentados en el segundo reporte de la FAO (FAO 2009). En cierto modo, este método ofrece un enfoque satisfactorio bajo este marco de conservación. Los recursos genéticos son accesibles y pueden ser fácilmente observados, lo que permite una evaluación sistemática y detallada de ellos.

Sin embargo, existen ciertos inconvenientes que limitan su eficacia y ponen en peligro su seguridad (Withers y Engels 1990, Engelmann 1997). Los recursos genéticos están expuestos a plagas, enfermedades y otros peligros naturales como la sequía, los daños climatológicos, los errores humanos y el vandalismo. Adicionalmente, no se encuentran en una condición que sea fácilmente propicia para el intercambio de germoplasma, debido a los grandes riesgos de transmisión de enfermedades a través del intercambio de material vegetativo. Por otra parte, los bancos de germoplasma en el campo son costosos de mantener, lo que los hace propensos a decisiones económicas que pueden limitar la replicación de las accesiones, incidir en la calidad del mantenimiento e incluso amenazar la propia supervivencia en tiempos de restricción económica. Bajo las mejores circunstancias, los bancos de germoplasma en el campo requieren el uso de grandes extensiones de tierra (a menudo necesitan varios sitios que se puedan utilizar en forma rotatoria), son muy laboriosos e implican muchas acciones de gestión, administración y adquisición de materiales. Además, su capacidad para garantizar el mantenimiento de tanta diversidad es limitada.

A la luz de los problemas descritos para las diferentes categorías de especies de plantas, no es de extrañar que se hayan hecho grandes esfuerzos por mejorar la calidad y la seguridad de la conservación que ofrecen los bancos de germoplasma en el campo, así como también por tratar de comprender y superar la recalcitrancia de las semillas para hacer más factible la opción del almacenamiento de semillas. Sin embargo, está claro que son necesarios diferentes enfoques alternativos para garantizar la conservación genética de estos materiales problemáticos. A partir de principios de los años setenta, la atención se centró en las posibilidades que ofrece la biotecnología y, específicamente, el cultivo de tejidos o cultivo *in vitro*.

Nuevos enfoques para la conservación

Durante los últimos 40 años, las técnicas de cultivo *in vitro* han sido ampliamente desarrolladas y aplicadas a más de 1000 especies diferentes (George 1996). Las técnicas de cultivo de tejidos son de gran interés para la recolección, multiplicación y almacenamiento del germoplasma vegetal (Engelmann 1991). Los sistemas de cultivo de tejidos permiten la propagación del material con altas tasas de multiplicación en un ambiente aséptico y la obtención de plantas libres de virus a través del cultivo de meristemas en combinación con la termoterapia, lo que a su vez garantiza la producción de reservas libres de enfermedades y simplifica los procedimientos de cuarentena para el



intercambio internacional de germoplasma. La “miniaturización” de los explantes *in vitro* permite reducir los requerimientos de espacio y, consecuentemente, los costos en mano de obra para el mantenimiento de grandes colecciones de germoplasma.

Sin embargo, las tasas de multiplicación que pueden alcanzarse mediante los procedimientos *in vitro* son elevadas y conducen regularmente a la producción abundante de material a corto plazo, lo que a su vez crea problemas para el manejo de extensas colecciones *in vitro*. Adicionalmente, en cada subcultivo existe el riesgo potencial de que se dé una pérdida por contaminación o un error humano y, más importante aún, de que se pierda la integridad genética del material debido a la variación somaclonal que se induce cuando se practica el cultivo de tejidos por periodos prolongados (Scowcroft 1984). Por consiguiente, la implementación de procedimientos *in vitro* para reducir esos inconvenientes y garantizar, de esa manera, el mantenimiento de la estabilidad genética se convirtió en un reto de imperiosa necesidad.

Diferentes métodos de conservación *in vitro* se han desarrollado y empleado dependiendo de la duración del almacenamiento requerida (Engelmann 1991). Para la conservación a corto y mediano plazos, el objetivo es reducir el crecimiento e incrementar los intervalos entre los subcultivos. Para el almacenamiento a largo plazo, la criopreservación —es decir, el almacenamiento de material a una temperatura ultra baja, por lo general inmerso totalmente en nitrógeno líquido (-196 °C)— es el único método utilizado actualmente. A esa temperatura, la división celular y todos los procesos metabólicos se detienen. El material vegetal puede así ser almacenado sin alteración o modificación por periodos de tiempos muy prolongados. Además, los cultivos se almacenan en una cantidad pequeña y protegidos de la contaminación, por lo que se requiere un mantenimiento muy limitado. Para atender una colección criopreservada, no se necesita mucho personal especializado ni una extensa superficie para crear un banco. La condición indispensable, una vez establecido el procedimiento criogénico, es simplemente mantener el nivel adecuado del nitrógeno líquido en los termos de almacenamiento. Para ello generalmente se acoplan alarmas a los contenedores que indican el momento en que deben ser rellenados (González-Arno *et al.* 2009). Es importante darse cuenta de que la criopreservación representa en la actualidad la única opción segura y rentable para la conservación a largo plazo de todas las categorías de especies problemáticas.

Criopreservación

Técnicas disponibles de criopreservación

La criopreservación vegetal es una disciplina científica relativamente nueva. De hecho, hace tan solo cincuenta años de que el profesor Akira Sakai demostró que ciertas yemas latentes podrían resistir la inmersión directa en el nitrógeno líquido (1960), y fue en 1968 cuando se publicó el primer reporte sobre criopreservación de material vegetal *in vitro* (Quatrano 1968). Las actividades de investigación en esta área fueron aumentando progresivamente, pero no fue sino hasta los años noventa cuando la criopreservación cobró mayor fuerza, gracias al desarrollo de nuevos protocolos de técnicas basadas en la vitrificación. Esos protocolos tienen la característica común de que el paso crítico para lograr la supervivencia del material criopreservado es la



etapa de la deshidratación, y no la etapa de congelación, como ocurre en los protocolos clásicos. Estos nuevos procedimientos reemplazan la deshidratación celular inducida por un régimen de congelación lento a temperaturas muy por debajo de 0 °C por la remoción a temperaturas positivas de la mayor parte o de toda el agua congelable de las células, a través de la deshidratación osmótica mediante el uso de soluciones altamente concentradas, en combinación o no con la deshidratación física. Después de esta extensa deshidratación, las muestras son directamente inmersas en nitrógeno líquido, lo que resulta en la vitrificación de los solutos internos, es decir, su transición directa del estado líquido a un estado de sólido amorfo, evitando al mismo tiempo la formación de cristales de hielo intracelular perjudiciales.

Los procedimientos basados en la vitrificación son apropiados para los órganos complejos como los meristemos apicales y los embriones, que contienen una gran variedad de tipos de células que presentan requerimientos específicos. Al excluir el uso de un régimen de enfriamiento lento, los procedimientos basados en la vitrificación son operativamente menos complejos que los clásicos (por ejemplo, no requieren el uso de congeladores programables) y tienen, por consiguiente, un mayor potencial para una aplicabilidad más amplia, pues solo requieren pequeñas modificaciones para los diferentes tipos de células (Engelmann 1997).

Se pueden identificar siete procedimientos diferentes basados en la vitrificación: (i) encapsulación-deshidratación, (ii) un procedimiento actualmente denominado vitrificación, (iii) encapsulación-vitrificación, (iv) deshidratación, (v) precrecimiento, (vi) precrecimiento-vitrificación y (vii) gota-vitrificación.

Gracias al desarrollo de esos nuevos protocolos, la cantidad de especies para las cuales los procedimientos de crioconservación ya se han publicado se ha incrementado notablemente en los últimos 10 años (Engelmann y Takagi 2000, Engelmann *et al.* 2008, Gonzalez-Arno y Engelmann 2006, Gonzalez-Arno *et al.* 2008, Reed 2008, Sakai y Engelmann 2007).

Desarrollo actual y uso de la crioconservación

El desarrollo actual de la crioconservación varía dependiendo de la categoría de las especies estudiadas. La crioconservación ha sido aplicada con éxito a una amplia gama de especies propagadas vegetativamente, tanto de climas templados como de origen tropical, y los protocolos desarrollados suelen ser muy eficientes (Engelmann 2010a). Tales resultados positivos pueden ser explicados por varias razones. En primer lugar, los ápices empleados para la crioconservación contienen células pequeñas, poco vacuoladas y en plena división celular, por lo que pueden resultar más tolerantes a la desecación. Además, mediante la crioconservación generalmente se preserva toda la estructura de los meristemos, lo que permite una regeneración directa después del descongelamiento. Por otra parte, los protocolos de cultivo de tejidos suelen ser funcionales para muchas especies de propagación vegetativa y el material cultivado *in vitro* es altamente homogéneo en términos de tamaño, composición celular, estado fisiológico y respuesta de crecimiento. De esta forma, aumentan las posibilidades de respuesta positiva y de uniformidad en el efecto de los tratamientos.



En comparación con las especies propagadas vegetativamente, las investigaciones para las especies con semillas recalcitrantes se encuentran todavía en una fase muy preliminar (Engelmann 2009b). La supervivencia es extremadamente variable, la regeneración frecuentemente está restringida a callos o al desarrollo incompleto de plántulas y generalmente el número de accesiones evaluadas por especie es muy bajo. Existen varias razones que explican el desarrollo limitado de la crioconservación en especies con semillas recalcitrantes (Engelmann 2000). Una de ellas es la carencia de información sobre la biología y aún más sobre el comportamiento de las semillas de muchas de estas especies frente al almacenamiento, las cuales en la mayoría de los casos suelen ser especies silvestres. A lo anterior se suman la heterogeneidad de las semillas en términos de la etapa de desarrollo y contenido de agua, su complejidad histológica y gran tamaño y la falta de protocolos adecuados de cultivo *in vitro*.

A pesar de que el uso rutinario de la crioconservación es todavía limitado, existe un número creciente de instalaciones, como los bancos de germoplasma, los jardines botánicos y los institutos de investigación públicos y privados, en que esta técnica se emplea a gran escala para los diferentes tipos de materiales que son tolerantes a la deshidratación o no lo son (Engelmann 2010a). Las categorías de material vegetal almacenado en dichas colecciones crioconservadas incluyen semillas ortodoxas con una longevidad limitada o de especies raras y en peligro de extinción; semillas intermedias; yemas latentes de especies de árboles frutales y forestales; polen de las especies hortícolas y ornamentales; y productos biotecnológicos, incluidos metabolitos secundarios de líneas celulares de cultivos embriogénicos empleadas para la producción masiva de material élite y de cultivos *in vitro* propagados vegetativamente por meristemas apicales.

La crioconservación impone una serie de condiciones de estrés en el material vegetal, que podrían inducir modificaciones en los cultivos crioconservados y en las nuevas plantas regeneradas. Por lo tanto, antes de utilizar esa técnica de forma rutinaria para la conservación a largo plazo de los recursos fitogenéticos, es necesario verificar que no se altere la estabilidad genética del material crioconservado. Sin embargo, hasta el presente, no hay ningún reporte que refleje la existencia de modificaciones en las características fenotípicas, a nivel bioquímico, cromosómico o molecular, que hayan sido atribuidas a la crioconservación (Engelmann 2010a).

En cuanto a la valoración económica de la introducción de esta tecnología, los pocos análisis preliminares realizados confirman un interés en la técnica de la crioconservación desde una perspectiva financiera (Engelmann 2010a). Un estudio detallado realizado recientemente en el que se compararon los costos del establecimiento y mantenimiento de una de las colecciones de café más grandes del mundo en el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Costa Rica, como colección en el campo y por crioconservación (Dulloo *et al.* 2009) demostró claramente que la crioconservación cuesta menos (en perpetuidad por accesión) que la conservación en bancos de germoplasma de campo. Un análisis comparativo de los costos de ambos métodos mostró que cuantas más accesiones estén almacenadas en crioconservación, menor será el costo por accesión.

Recientemente fue descubierta una utilidad adicional de la crioconservación para la eliminación de virus de plantas infectadas. Este procedimiento, denominado “crioterapia”,



ha servido de sustituto o de complemento a las técnicas clásicas de erradicación de virus mediante el cultivo de meristemos y la termoterapia. Mediante la crioterapia, ciertos patógenos vegetales, como los virus, los fitoplasmas y las bacterias, pueden ser erradicados de los meristemos apicales exponiéndolos brevemente al nitrógeno líquido (Wang *et al.* 2009).

Crioconservación: progreso mundial y las perspectivas regionales para América Latina y el Caribe

A pesar de que la crioconservación se emplea rutinariamente en solo un número limitado de casos, gracias al desarrollo de las nuevas técnicas basadas en la vitrificación ha sido posible ampliar su aplicación a un mayor número de especies. La ventaja más importante de estas nuevas técnicas es su simplicidad operacional, lo que ha facilitado su introducción y adaptación en varios países tropicales en vías de desarrollo, que es donde se encuentra la mayor parte de los recursos genéticos de las especies problemáticas.

En los últimos 10 años, la actividad de investigación sobre la crioconservación se ha incrementado significativamente a nivel mundial. Es importante destacar que se ha brindado apoyo financiero a cada vez más proyectos nacionales, regionales e internacionales, con el fin de avanzar en la investigación básica y aplicada de la crioconservación y lograr una mejor coordinación con los investigadores y usuarios mediante la creación y el funcionamiento de redes científicas y técnicas. Algunos ejemplos incluyen el proyecto CRYOVEG, dirigido a la crioconservación de colecciones de recursos genéticos vegetales franceses (Engelmann 2010b); la acción COST 871, financiada por la Unión Europea y dirigida a la crioconservación de especies de cultivos de Europa (Engelmann *et al.* 2009); y el proyecto titulado “Desarrollo y perfeccionamiento de protocolos de crioconservación para la conservación a largo plazo de cultivos de propagación vegetativa”, financiado por el Fondo Mundial para la Diversidad de Cultivos, con sede en Roma, Italia (Engelmann 2009a).

La investigación en crioconservación vegetal ha ido progresando paulatinamente en varios países de América Latina y el Caribe (ALC) desde hace aproximadamente 20 años. Sin embargo, se requiere aumentar en esta región el ritmo de desarrollo de esa actividad, con el fin de hacer frente a los desafíos planteados de conservar una gran cantidad de especies vegetales para las que la crioconservación es una opción relevante. A nivel regional también se necesita contar con un esquema de coordinación que refuerce la labor de los mecanismos de intercambio científico creados, lo que será de gran utilidad para apoyar y fortalecer los trabajos en el área de la crioconservación.

Es nuestra esperanza que esta publicación, la primera producida en español sobre la crioconservación, cumpla con el objetivo de brindar un panorama actualizado de esa disciplina científica y, en especial, de evidenciar la necesidad de conservar a largo plazo los recursos naturales vegetales.



Referencias

- Berjak, P; Pammenter, NW. 1994. Recalcitrance is not an all-or-nothing situation. *Seed Science Research* 4:263-264.
- Chin, HF. 1988. Recalcitrant seeds: a status report. Roma, IT, IPGRI.
- _____; Roberts, EH. 1980. Recalcitrant crop seeds. Kuala Lumpur, MY, Tropical Press Sdn. Bhd.
- Dulloo, ME; Ebert, AW; Dussert, S; Gotor, E; Astorga, C; Vásquez, N; Rakotomalala, JJ; Rabemiarafara, A; Eira, M; Bellachew, B; Omondi, C; Engelmann F; Anthony, F; Watts, J; Qamar, Z; Snook, L. 2009. Cost efficiency of cryopreservation as a long term conservation method for coffee genetic resources. *Crop Science* 49:2123-2138.
- Ellis, RH; Hong, T; Roberts, EH. 1990. An intermediate category of seed storage behaviour? I. coffee. *Journal of Experimental Botany* 41:1167-74.
- _____; Hong, T; Roberts, EH; Soetisna, U. 1991. Seed storage behaviour in *Elaeis guineensis*. *Seed Science Research* 1:99-104.
- Engelmann, F. 1991. *In vitro* conservation of tropical plant germplasm: a review. *Euphytica* 57: 227-243.
- _____. 1997. *In vitro* conservation methods. *In* Biotechnology and plant genetic resources: conservation and use. Ford-Lloyd, BV; Newbury, JH; Callow, JA. eds. Wallingford, UK, CABI. p. 119-162.
- _____. 2000. Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources. *In* Cryopreservation of tropical plant germplasm - current research progress and applications. Engelmann, F; Takagi, H. eds. Tsukuba, JP, JIRCAS; Roma, IT, IPGRI. p. 8-20.
- _____. 2009a. Plant germplasm cryopreservation: progress and prospects. *Cryobiology* 59:370-371.
- _____. 2009b. Use of biotechnologies for conserving plant biodiversity. *Acta Horticulturae* 812:63-82.
- _____. 2010a. Integration of cryopreservation in plant genetic resource conservation strategies in France. *CryoLetters* 31:82.
- _____. 2010b. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In* *In vitro* cellular and developmental biology – plant. DOI: 10.1007/s11627-010-9327-2.



- _____; Engels, JMM. 2002. Technologies and strategies for *ex situ* conservation. *In* Managing plant genetic diversity. Engels, JMM; Rao, VR; Brown, AHD; Jackson, MT. eds. Wallingford, UK, CABI; Roma, IT, IPGRI. p. 89-104.
- _____; Gonzalez-Arnao, MT; Wu, YJ; Escobar, RE. 2008. Development of encapsulation-dehydration. *In* Plant cryopreservation: a practical guide. Reed, BM. ed. Berlín, DE, Springer Verlag. p. 59-76.
- _____; Keller, J; Lynch, P; Panis, B; Pukacki, P; Revilla Bahillo, MA; Uosukainen, M. 2009. COST Action 871: Cryopreservation of crop species in Europe (CRYOPLANET). *Cryobiology* 59: 413.
- _____; Takagi, H. eds. 2000. Cryopreservation of tropical plant germplasm - current research progress and applications, Tsukuba, JP, JIRCAS; Roma, IT, IPGRI.
- Engels, JMM; Engelmann, F. 1998. Botanic gardens and agricultural genebanks: building on complementary strengths for more effective global conservation of plant genetic resources. *In* Fifth International Botanic Gardens Conservation Congress (1998, Kirstenbosch, ZA). Proceedings.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, IT). 1996. First Report on the World's Plant Genetic Resources for Food and Agriculture. Roma, IT.
- _____. 2009. Draft Second Report on the World's Plant Genetic Resources for Food and Agriculture. Roma, IT.
- George, EF. 1996. Plant propagation by tissue culture. Part 2 - In practice. 2 ed. Edington, UK, Exegetics.
- Gonzalez-Arnao, MT; Engelmann, F. 2006. Cryopreservation of plant germplasm using the encapsulation-dehydration technique: review and case study on sugarcane. *CryoLetters* 27:155-168.
- _____; Martínez-Ocampo, Y; Molina Torres, J. 2009. Para conservar la biodiversidad genética vegetal. *Revista Ciencia* 60(2):78-86.
- _____; Panta, A; Roca, WM; Escobar, RH; Engelmann, RH. 2008. Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 92:1-13.
- ONU (Organización de las Naciones Unidas, US). 1992. Convención sobre la Diversidad Biológica (en línea). *In* Conferencia de las Naciones Unidas sobre el Medio Ambiente y el Desarrollo (1992, Río de Janeiro, BR). Consultado 15 mar. 2012. Disponible en <http://www.cbd.int/doc/legal/cbd-es.pdf>.

- Quatrano, RS. 1968. Freeze-preservation of cultured flax cells utilizing DMSO. *Plant Physiology* 43:2057-2061.
- Reed, BM. 2008. *Plant cryopreservation: a practical guide*. Berlín, DE, Springer Verlag.
- Roberts, HF. 1973. Predicting the viability of seeds. *Seed Science and Technology* 1:499-514.
- Sakai, A. 1960. Survival of the twigs of woody plants at -196°C. *Nature* 185:392-394.
- _____; Engelmann, F. 2007. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review. *CryoLetters* 28:151-172.
- Scowcroft, WR. 1984. *Genetic variability in tissue culture: impact on germplasm conservation and utilization*. Roma, IT, IBPGR.
- Wang, Q; Panis, B; Engelmann, F; Lambardi, M; Valkonen, JPT. 2009. Cryotherapy of shoot tips: A technique for pathogen eradication to produce healthy planting materials and prepare healthy plant genetic resources for cryopreservation. *Annals of Applied Biology* 154:351-363.
- Withers, LA; Engels, JMM. 1990. The test tube genebank - a safe alternative to field conservation. *IBPGR Newsletter for Asia and the Pacific* 3:1-2.



Crioconservación de Plantas en América Latina y el Caribe



Editores
María Teresa González-Arno
Florent Engelman

Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura

CRIOCONSERVACIÓN DE PLANTAS EN AMÉRICA LATINA Y EL CARIBE

Editores:

María Teresa González-Arno
Facultad de Ciencias Químicas de Orizaba
Universidad Veracruzana, México

Florent Engelmann
Instituto de Investigación para el Desarrollo
(IRD-UMR DIADE), Francia

Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura
(IICA), 2013



Crioconservación de plantas en América Latina y el Caribe por IICA
se encuentra bajo una Licencia Creative Commons Atribución-
NoComercial-CompartirIgual 3.0 Unported.
Basada en una obra en www.iica.int.

El Instituto promueve el uso justo de este documento. Se solicita que sea citado apropiadamente cuando corresponda.

Las ideas y planteamientos expresados en este documento son propios de los autores y no representan necesariamente el criterio del IICA.

Esta publicación también está disponible en formato electrónico (PDF) en el sitio web institucional en <http://www.iica.int>.

Este documento contó con el apoyo editorial de Máximo Araya, María Elena Cedeño y Federico Sancho, todos del IICA.

Corrección de estilo: Máximo Araya

Diagramación: Carlos Umaña

Diseño de portada: Karla Cruz

Impresión: Imprenta del IICA

Crioconservación de plantas en América Latina y el Caribe / Editado
por María Teresa González-Arno y Florent Engelmann --
San José, C.R.: IICA, 2013.
XII, 204 p.; 15.24 x 22.86 cm.

ISBN 978-92-9248-446-0

1. Recursos genéticos vegetales 2. Biotecnología 3. Con-
servación biológica 4. Reserva genética. 5. Germoplasma
6. América Latina 7. Caribe I. IICA II. Título

AGRIS
F30

DEWEY
631.523.3

San José, Costa Rica
2013