



# **Consideraciones teóricas y prácticas para la crioconservación de germoplasma vegetal**

María Teresa González-Arno<sup>1</sup>,  
Florent Engelmann<sup>2</sup>

---

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

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

El frío tiene el gran poder de conservar, pero también el de destruir, y esto se debe fundamentalmente a la cristalización del agua presente a nivel intracelular. La cristalización (formación de hielo) es el paso de un estado líquido desorganizado a uno ordenado. En cambio, las soluciones muy concentradas inhiben la nucleación e iniciación del hielo, por lo que a temperaturas muy bajas se convierten en un sólido amorfo que contribuye a mantener la viabilidad de las células y los tejidos en general. Este proceso, denominado “vitrificación” (Fahy *et al.* 1984), constituye la base del éxito de la criopreservación y caracteriza a los métodos criogénicos más modernos que resultan los más adecuados para estructuras vegetales organizadas (Engelmann 1997).

En términos criobiológicos, el agua libre o congelable es la fracción que es necesario remover o inducir a formar un sólido amorfo. El agua libre, que se caracteriza por ser osmóticamente activa, constituye alrededor del 90 % del contenido total de un organismo (Crowe *et al.* 1990). Ella es la fracción efectiva disponible para varios procesos fisiológicos y, por lo tanto, su presencia a temperaturas positivas es sumamente importante para mantener la supervivencia de las plantas (Sun 2002). El agua libre o congelable no sale espontáneamente de las células, sino únicamente por daños o mecanismos bioquímicos específicos (Dumet y Benson 2000). Por lo tanto, si la base del éxito de la criopreservación de un material biológico radica en extraer la mayor fracción posible del agua congelable antes de realizar la inmersión en nitrógeno líquido, durante un proceso criogénico dicho material estará irremediablemente expuesto a severas condiciones de estrés, primero el hídrico, inducido por la deshidratación, y luego el térmico, provocado por el enfriamiento.

Muchas plantas y microorganismos acumulan osmolitos orgánicos en respuesta a condiciones ambientales de estrés como la sequía, la congelación y el choque osmótico. Se ha evidenciado que existe una estrecha interrelación entre los mecanismos de protección/tolerancia y la acumulación endógena de altos niveles de estos osmolitos denominados solutos compatibles (Buitink *et al.* 2002). Por consiguiente, las metodologías de criopreservación contemplan, como un modo de abatir el estrés, inducir el incremento de estos compuestos a nivel intracelular.

La utilización exógena de estas sustancias clasificadas como crioprotectoras puede tener lugar mediante su adición a los medios de cultivo *in vitro*, o realizando tratamientos con soluciones que las contengan, con lo cual se propicia la penetración de algunos de ellos a las células y, a su vez, se contribuye a regular el equilibrio osmótico, a incrementar la viscosidad y a remplazar las moléculas de agua eliminadas por la deshidratación. De esta forma, se ejerce un efecto coligativo protector que aumenta la osmolalidad celular, que disminuye el punto de congelación y que puede inducir la ocurrencia de la vitrificación (Benson 2008). Sin embargo, el ajuste osmótico a través de la biosíntesis y/o acumulación de osmolitos es muy disímil y no se puede definir por una concentración efectiva absoluta para todos los casos (Hare *et al.* 1998). Este es un aspecto que requiere ser ajustado para el establecimiento de un protocolo criogénico eficiente, en especial para aquellas especies tropicales y de interés en América Latina y el Caribe, las cuales presentan un comportamiento de menor tolerancia.

Por consiguiente, cuando se revisan todos los factores que intervienen en los daños letales que produce un proceso de criopreservación, se aprecia que los más significativos



pueden estar vinculados a la toxicidad química de los agentes crioprotectores que se adicionan, a la presión osmótica que se genera, a la pérdida de agua que se induce y, en especial, a la formación de cristales de hielo en el medio intracelular. Como se ha mencionado anteriormente, el evento físico capaz de inhibir la nucleación del agua a las bajas temperaturas es el fenómeno conocido como vitrificación. La transición vítrea es el paso directo de la fase líquida muy viscosa a la de un sólido amorfo (Fahy *et al.* 1984), pero el estado vítreo depende de tres factores importantes: el contenido de agua, la temperatura y la composición química (Buitink *et al.* 2008).

Se han formulado diferentes mezclas vitrificadoras para plantas (conocidas como PVS, que es la sigla para su denominación en inglés: *plant vitrification solutions*). Esas mezclas se aplican de forma exógena y combinan la capacidad penetrante y no penetrante de sus componentes al medio intracelular. Entre las sustancias que conforman las PVS destacan el glicerol, el dimetilsulfóxido (DMSO), el etilenglicol y la sacarosa (Sakai 2004).

El estudio del comportamiento del agua es igualmente crítico para comprender los eventos que involucra el proceso de crioconservación. Las propiedades fisicoquímicas de la fase acuosa son determinantes en los cambios de estado, en la transferencia de masa y calor, en la deshidratación y en la congelación. De igual manera, sus propiedades coligativas influyen en la presión de vapor, el punto de congelación, la viscosidad y la formación de gradientes osmóticos a través de membranas semipermeables. La calorimetría diferencial de barrido (DSC) ha sido la técnica más utilizada hasta el momento para identificar y cuantificar los eventos de cristalización y transición vítrea (Vertucci 1989). Los análisis por DSC constituyen una herramienta invaluable para optimizar las condiciones de congelación y desarrollar estrategias de protección a las bajas temperaturas (Dumet y Benson 2000).

La investigación en el campo de la tolerancia a factores ambientales adversos también está contribuyendo a lograr una mayor comprensión de las bases bioquímicas y moleculares asociadas a los mecanismos de respuesta frente a diversas condiciones de estrés. Se han identificado genes y proteínas con un rol asociado a la resistencia al frío, la sequía y la salinidad. Se ha avanzado en el conocimiento de genes inducidos bajo estrés, que codifican proteínas con funciones de señalización, transducción de señales y protección celular (Dure *et al.* 1989).

Gracias a todo lo anterior, hoy se dispone de más conocimientos criobiológicos para aplicar en la conservación de plantas y de un buen número de procedimientos que están plenamente clasificados y definidos. Adicionalmente, la combinación de algunos de esos procedimientos ha generado una mayor diversidad de protocolos criogénicos que en ocasiones pueden resultar más efectivos para especies ya crioconservadas por otros métodos, o incluso pueden garantizar la supervivencia de otras que no se habían logrado crioconservar. Sin embargo, como se ha explicado antes, no es posible diseñar un protocolo criogénico único que funcione satisfactoriamente para todos los sistemas biológicos, como tampoco se puede considerar que un mismo método necesariamente será exitoso para una misma forma de cultivo *in vitro* (células, ápices, embriones, etc).

No obstante lo anterior, para iniciar una investigación criogénica es muy importante conocer más en detalle los procedimientos “claves” y sus buenas prácticas. En este



contexto, se pueden considerar varios protocolos como básicos: a) los métodos convencionales o clásicos, que son por elección los más adecuados para crioconservar células y callos, y que también se han utilizado para congelar meristemos apicales, pero aislados, de especies de climas templados. Los resultados positivos obtenidos con sistemas diferenciados de especies tropicales son casi excepcionales (González-Arno *et al.* 2009); y b) la técnica de encapsulación-deshidratación y el método de vitrificación, los cuales han demostrado ser de gran utilidad para crioconservar estructuras organizadas como los ápices y los embriones.

Asimismo, esos métodos han contribuido a la crioconservación exitosa de diversos tejidos provenientes de especies tropicales y han sido el punto de partida para generar nuevas variantes de protocolos criogénicos, como la encapsulación-vitrificación, la gota-vitrificación y la crio-lámina, los que han permitido avanzar en la optimización de los tratamientos crioprotectores (Gámez-Pastrana *et al.* 2004), en la simplificación del procedimiento cuando se trata del manejo de grandes volúmenes de muestras (Yamamoto *et al.* 2012) y, más recientemente, en una mayor aplicación a nivel de banco de germoplasma (Panis *et al.* 2011). Igualmente importante es el método de la desecación, que es sencillo y resulta muy apropiado para crioconservar semillas, además de que, combinado con un precultivo anterior en medio suplementado con azúcares, deriva en el protocolo denominado precultivo-desecación y puede funcionar para crioconservar satisfactoriamente embriones cigóticos y somáticos (Pence 1995). En el cuadro 4.1 se presentan algunas premisas tecnológicas que se deben considerar para el inicio de una investigación criogénica.

**Cuadro 4.1. Recomendaciones para seleccionar un método adecuado (+) para la crioconservación de diferentes formas de cultivo *in vitro* de plantas.**

Método	Susp. celulares y callos	Ápices	Embriones somáticos/cigóticos	Semillas
1. Protocolos convencionales	+++	+	-	-
2. Encapsulación-deshidratación	-	+++	++	-
3. Vitrificación y protocolos derivados: gota-vitrificación, encapsulación/vitrificación y crio-lámina	-	+++	++	-
4. Precultivo-desecación	-	-	++	-
5. Desecación	-	-	-	++

Fuente: González-Arno 2012.

A continuación se describen los pasos que se deben seguir para aplicar los procedimientos criogénicos anteriormente indicados.

## Métodos convencionales

Cuando un material biológico se somete a una temperatura de congelación, mientras menor sea su contenido de agua, menor será la probabilidad de que ocurran daños letales

por la cristalización de la fase acuosa en el medio intracelular. Esto demuestra, que para cualquier proceso criogénico, el primer paso clave estará asociado a la reducción máxima posible de ese contenido de agua que puede congelar. Con los métodos convencionales (figura 4.1), la deshidratación de las muestras se alcanza fundamentalmente durante el proceso de descenso de la temperatura. Para ello, el enfriamiento se realiza de forma lenta hasta un nivel intermedio, usualmente  $-40^{\circ}\text{C}$ , antes de proceder a efectuar la inmersión rápida en el nitrógeno líquido. Para disminuir gradualmente la temperatura, se utilizan por lo regular equipos de congelación programable y se ajusta la tasa de enfriamiento al régimen deseado, más frecuentemente a  $0.5^{\circ}\text{C min}^{-1}$ .

Para lograr el éxito de este proceso se requiere también del uso de soluciones que contengan sustancias con propiedades crioprotectoras. Entre ellas se destacan el dimetilsulfóxido (DMSO), la sacarosa y el glicerol. Los crioprotectores pueden actuar desde el interior o el exterior de las células, pero entre sus funciones más importantes está la disminución del punto de congelación, la protección de la integridad de la membrana y el incremento de la viscosidad de la solución celular (González-Arno *et al.* 2008).

El material biológico inmerso en la solución crioprotectora se somete al enfriamiento y en un inicio, la muestra tiende a subenfriarse, o sea, puede permanecer sin congelar a una temperatura inferior a su punto de congelación. Para evitar el subenfriamiento se induce la formación de los primeros cristales de hielo mediante la nucleación heterogénea, y esto a su vez promueve el proceso fundamental de deshidratación. Como la membrana plasmática retarda la congelación del medio interno, y la presión de vapor de agua de las células subenfriadas es mayor a la de la solución externa que parcialmente ha comenzado a congelar, la continua disminución de la temperatura provoca que el equilibrio osmótico sólo se restablezca con la salida del agua intracelular. Bajo condiciones óptimas de congelación, se estima que la mayor parte del agua congelable ha logrado escapar de las células cuando las muestras son finalmente inmersas al nitrógeno líquido. En dependencia del agua intracelular remanente al momento de la inmersión, podrán ocurrir tres tipos de eventos físicos: la formación de grandes cristales si el contenido es alto, la formación de pequeños cristales no dañinos, si el contenido no es lo suficientemente alto, o la formación de un sólido amorfo, si la viscosidad celular es tan alta que el agua remanente experimenta entonces una transición vítrea (Benson *et al.* 2006; González-Arno *et al.* 2008). De esto se desprende, que un paso clave de los métodos convencionales, lo constituye la etapa de deshidratación por congelación.

Sin embargo, el retorno a la temperatura ambiente después del almacenamiento a  $-196^{\circ}\text{C}$ , es también de vital importancia. Un régimen lento de enfriamiento, genera la necesidad de un método de calentamiento rápido. De esta forma se evitaría la recristalización del agua remanente en las células o la formación de grandes cristales de hielo a expensas de otros más pequeños, cuando se atraviesa por una zona crítica de temperaturas durante el retorno a las condiciones establecidas para el cultivo normal. Por consiguiente, la optimización del proceso de cristalización extracelular durante el enfriamiento lento y la implementación de un régimen de calentamiento rápido, son aspectos críticos para prevenir daños letales cuando se aplica un protocolo convencional (González-Arno *et al.* 2008).



## Procedimiento

1. Colocar el material vegetal (células y/o callos) en crioviales de 2 ml, en baño de hielo aproximadamente a 0 °C.
2. Adicionar la solución crioprotectora fría a los crioviales con las muestras y mantenerlos durante una hora a 0 °C.
3. Colocar los crioviales con las muestras en el congelador programable (temperatura inicial de 0 °C).
4. Disminuir la temperatura para inducir la siembra de cristales o nucleación heterogénea (2 °C-3 °C inferiores al “punto de congelación” de la solución crioprotectora).
5. Mantener a la temperatura de inducción de la nucleación (ejemplo: a -10 °C, 10 minutos) o continuar con el programa de enfriamiento de disminución gradual de la temperatura hasta la pre congelación a -40 °C.
6. Realizar una inmersión rápida de las muestras en N<sub>2</sub>L.
7. Mantener las muestras almacenadas durante una hora a -196 °C.
8. Llevar a cabo una descongelación rápida (+37 °C-+40 °C).
9. Eliminar los crioprotectores colocando las muestras sobre papel filtro en placas de Petri.
10. Cultivo de recuperación en la oscuridad, si son células y callos. Cultivo al menos la primera semana en la oscuridad, si son estructuras organizadas.

Figura 4.1. Representación gráfica de un protocolo convencional.



Fuente: González-Arno 2012.

## Encapsulación-deshidratación

La técnica de encapsulación-deshidratación (figura 4.2) se utilizó por primera vez en 1990 con el objetivo de crioconservar ápices de pera (Dereuddre *et al.* 1990) y papa (Fabre y Dereuddre 1990). Más tarde probó también su utilidad en ápices de cultivos tropicales como yuca (*Manihot esculenta*) (Benson *et al.* 1992), café (Mari *et al.* 1995) y caña de azúcar (González-Arno *et al.* 1993, Paulet *et al.* 1993). A la fecha, diversos

protocolos de encapsulación-deshidratación se han adaptado para más de 20 especies vegetales, mediante los cuales se han obtenido resultados repetitivos y generalmente altos índices de recuperación después del almacenamiento en nitrógeno líquido (González-Arno y Engelmann 2006).

La encapsulación-deshidratación tiene la ventaja de ser relativamente simple, ya que facilita manipular al unísono una gran cantidad de tejidos atrapados en cápsulas de alginato de calcio y utiliza solamente la sacarosa como agente osmótico, además de que reemplaza el uso de equipos de congelación programable por la inmersión rápida al nitrógeno líquido. Acorde a este método, para el enfriamiento se colocan solamente en los crioviales las muestras encapsuladas, sin necesidad de adicionar la solución crioprotectora como en los métodos convencionales (González-Arno y Engelmann 2006). Otra ventaja de tipo práctico es que, después de la crioconservación, el retorno a la temperatura de cultivo normal se realiza generalmente de forma lenta, para lo cual se expone el material encapsulado al aire corriente en una campana de flujo laminar en lugar de utilizar un baño María a +40 °C. La selección del método de calentamiento rápido o lento dependerá del nivel de deshidratación que se logre alcanzar en las muestras, pues si no están lo suficientemente deshidratadas, puede ocurrir el fenómeno de la recrystalización, al elevarse la temperatura y provocar un efecto letal en esta etapa del procedimiento.

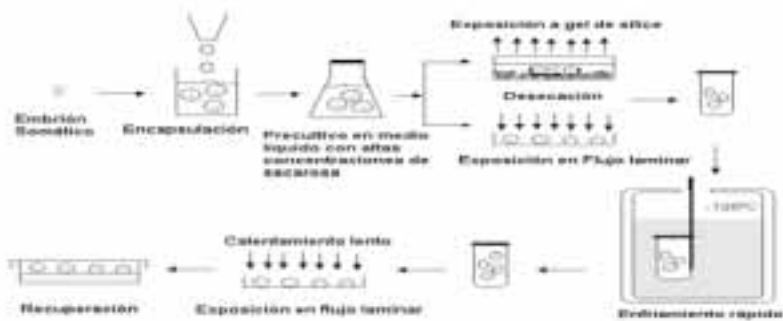
### ***Procedimiento***

1. Disección del tejido (ápices o embriones) en condiciones asépticas: Utilizar un estereomicroscopio en una campana de flujo laminar.
2. Recuperación del tejido: Colocar el material explantado por 16-24 horas sobre el medio de cultivo sólido estándar o el medio suplementado con sacarosa (por ejemplo, con 0.3 M de sacarosa).
  1. Preparación para la encapsulación:
    - a) Preparar la solución de alginato de sodio (baja viscosidad) al 3 %, en el medio de cultivo que contiene los macros y micronutrientes, pero desprovisto de calcio; luego ajustar el pH de la solución y esterilizarla bajo las mismas condiciones del medio de cultivo.
    - b) Preparar una solución de cloruro de calcio a 0.1 M, ajustar el pH de la solución y esterilizarla bajo las mismas condiciones del medio de cultivo.
    - c) Preparar puntas de micropipetas estériles con el extremo inferior cortado a un diámetro aproximado de 4-5 mm.
  2. Encapsulamiento:
    - a) Colocar los tejidos en la solución de alginato de sodio.
    - b) Succionar los tejidos embebidos en el alginato y gotearlos progresivamente sobre abundante solución de cloruro de calcio.
    - c) Mantener las gotas en la solución de calcio por 20 minutos después de la última gota, para lograr un buen grado de gelificación durante la formación de las cápsulas de alginato de calcio.
    - d) Decantar la solución de calcio y transferir las cápsulas a una caja de Petri sobre papel filtro para la siguiente manipulación.



3. Precultivo: Transferir el tejido encapsulado a un erlenmeyer que contiene medio de cultivo líquido suplementado con sacarosa (por ejemplo, 0.5, 0.75 ó 1 M de concentración de sacarosa por 24 h).
4. Deseccación: Decantar el medio líquido de precultivo y secar superficialmente las cápsulas colocándolas en cajas de Petri sobre papel filtro. Seguidamente exponerlas en cajas destapadas a la corriente de aire de la campana del flujo laminar o en desecadores que contienen gel de sílice. Determinar con antelación el tiempo de desecación requerido, para garantizar la reducción del contenido de humedad en las cápsulas hasta alrededor de 20-25 %.
5. Enfriamiento: Transferir las muestras encapsuladas a crioviales (hasta 10 cápsulas por criovial), y realizar la inmersión rápida al nitrógeno líquido.
6. Calentamiento: El calentamiento puede ser rápido, para lo cual se sumergen los crioviales con las muestras en un baño María a +40 °C, o lento (más usual), para lo cual se extraen las muestras del criovial y se exponen a la corriente de aire del flujo laminar por dos a tres minutos.
7. Recultivo: Transferir el material encapsulado a los frascos de cultivo, colocando las cápsulas sobre el medio sólido y manteniendo las muestras la primera semana a la oscuridad con el posterior pase a las condiciones de fotoperíodo establecidas.

**Figura 4.2. Representación gráfica de un protocolo de encapsulación-deshidratación.**



Fuente: González-Arno 2012.

## Método de vitrificación

El método de vitrificación (figura 4.3) se caracteriza por inducir una intensa deshidratación osmótica mediante la exposición del material biológico a mezclas crioprotectoras muy concentradas conocidas como formulaciones PVS. El tratamiento con las PVS facilita la ocurrencia de la transición vítrea durante el enfriamiento rápido de las muestras por la inmersión directa al nitrógeno líquido (Sakai y Engelmann 2007). Para que los tejidos adquieran mayor tolerancia frente a la deshidratación con la PVS y a la crioconservación, antes de estos dos procesos se realiza un tratamiento breve, el cual se denomina “tratamiento de carga” y en que se utiliza una mezcla de sacarosa-



glicerol, usualmente de 0.4 M de sacarosa+ 2 M de glicerol. El proceso de calentamiento y retorno a la temperatura normal de cultivo se realiza siempre de forma rápida, como se indicó para los protocolos convencionales, con la finalidad de evitar que ocurra una recristalización. El lavado de los crioprotectores se lleva a cabo con una solución que contiene las sales minerales del medio de cultivo y suplementada con 1.2 M de sacarosa (Sakai y Engelmann 2007).

### ***Procedimiento***

1. Disección del tejido (ápices o embriones) en condiciones asépticas: Utilizar un estereomicroscopio en una campana de flujo laminar.
2. Recuperación del tejido: Colocar el material explantado por 16-24 horas sobre el medio de cultivo sólido estándar o el medio suplementado con sacarosa (por ejemplo, con 0.3 M de sacarosa).
3. Tratamiento de carga: Colocar los tejidos sobre papel filtro en una caja de Petri que contiene la solución de carga a temperatura ambiente y durante 20-30 minutos (por ejemplo, 0.4 M de sacarosa + 2 M de glicerol).
4. Exposición a la solución vitrificadora (PVS) posterior al tratamiento de carga: Transferir los tejidos a una caja de Petri que contiene la solución vitrificadora para estudiar diferentes tiempos de exposición o colocar los tejidos directamente en crioviales que contienen 1 ó 2 mL de la PVS (por ejemplo, PVS3: 50 % de glicerol + 50 % de sacarosa; PVS2: 30 % de glicerol + 15 % de etilenglicol + 15 % DMSO en medio de cultivo con 0.4 M de sacarosa). Los tratamientos pueden realizarse a temperatura ambiente o a 0 °C por períodos generalmente breves (hasta una hora).
5. Enfriamiento: Realizar la inmersión rápida de los crioviales con las muestras al nitrógeno líquido.
6. Calentamiento: Extraer los crioviales del nitrógeno líquido y sumergirlos en un baño María a +40 °C por dos a tres minutos.
7. Lavado de crioprotectores: Extraer la solución vitrificadora y adicionar la solución de lavado por 20 minutos (medio de cultivo líquido suplementado con 1.2 M de sacarosa).
8. Recultivo: Secar superficialmente los tejidos lavados sobre papel filtro en una caja de Petri y luego transferirlos al medio de cultivo sólido. Mantener las muestras durante la primera semana a la oscuridad y transferirlas posteriormente a las condiciones de fotoperíodo establecidas.



**Figura 4.3. Representación gráfica de un protocolo de vitrificación.**



Fuente: González-Arno 2012.

## Gota-vitrificación

Este protocolo ha derivado del método de vitrificación y se diferencia del procedimiento que le dio origen, en que se logra una ultra rápida velocidad de enfriamiento y de calentamiento de las muestras, dado que en lugar de usar crioviales, los tejidos se transfieren a una gota o a un volumen muy reducido de la solución vitrificadora colocada sobre una pequeña lámina de papel aluminio, en la que son inmersas directamente al nitrógeno líquido (Panis *et al.* 2005). Para el calentamiento, la lámina con las muestras se sumerge directamente en abundante medio de cultivo líquido suplementado con 1.2 M de sacarosa y a temperatura ambiente. La magnífica conductividad térmica de la lámina de aluminio, aunada al poco volumen de solución crioprotectora en contacto con los tejidos, propicia que tanto el enfriamiento como el calentamiento transcurran a una velocidad muy elevada (Sakai y Engelmann 2007).

### Procedimiento

1. Disección del tejido (ápices o embriones) en condiciones asépticas: Utilizar un estereomicroscopio en una campana de flujo laminar.
2. Recuperación del tejido: Colocar el material explantado por 16-24 horas sobre el medio de cultivo sólido estándar o el medio suplementado con sacarosa (por ejemplo, con 0.3 M de sacarosa).
3. Tratamiento de carga: Colocar los tejidos durante 20-30 minutos sobre papel filtro en una caja de Petri que contiene la solución de carga (por ejemplo, 0.4 M de sacarosa + 2 M de glicerol).
4. Exposición a la solución vitrificadora (PVS) posterior al tratamiento de carga: Transferir los tejidos a una caja de Petri que contiene la solución vitrificadora para estudiar diferentes tiempos de exposición o colocar los tejidos directamente sobre gotas de PVS (por ejemplo, PVS3: 50 % de glicerol + 50 % de sacarosa; PVS2: 30 % de glicerol + 15 % de etilenglicol + 15 % DMSO en medio de cultivo con 0.4 M sacarosa). Los tratamientos se realizan generalmente a temperatura ambiente.

5. Preparación de las láminas con las gotas:
  - a) Recortar láminas de papel de aluminio de aproximadamente 20 x 7 mm.
  - b) Colocar gotas de la PVS de aproximadamente 15  $\mu$ l por cada lámina.
  - c) Colocar los tejidos en las gotas.
6. Enfriamiento: Realizar la inmersión rápida de las láminas de papel de aluminio con las muestras directamente al nitrógeno líquido.
7. Calentamiento: Extraer las láminas del nitrógeno líquido y sumergirlas directamente en abundante medio de cultivo líquido suplementado con 1.2 M de sacarosa a temperatura ambiente durante 15-30 minutos.
8. Recultivo: Secar superficialmente los tejidos lavados sobre papel filtro en una caja de Petri y luego transferirlos al medio de cultivo sólido. Mantener las muestras durante la primera semana a la oscuridad y transferirlas posteriormente a las condiciones de fotoperíodo establecidas.

## Encapsulación-vitrificación y método de crio-lámina

Estos dos protocolos criogénicos involucran primeramente la encapsulación de los tejidos en alginato de calcio, pero en la encapsulación-vitrificación las cápsulas sintéticas tienen forma redondeada, al igual que las obtenidas con la técnica de encapsulación-deshidratación. En cambio, en el método de crio-lámina, la encapsulación se refiere a una capa fina de alginato de calcio que gelifica en la superficie de una lámina de papel aluminio e inmoviliza los tejidos sobre ella (Yamamoto *et al.* 2011). Los tratamientos de carga y de deshidratación con la solución PVS se realizan acorde a lo descrito para el método de vitrificación, pero el enfriamiento y el calentamiento con el protocolo de crio-lámina se llevan a cabo como lo contempla el método de gota-vitrificación (inmersión directa de las láminas al nitrógeno líquido para el enfriamiento y transferencia a la solución con 1.2 M de sacarosa a temperatura ambiente, para el calentamiento y descarga de los crioprotectores, respectivamente). Una característica común de las dos metodologías es que se benefician de las facilidades que proporciona la manipulación de abundante material inmovilizado en alginato de calcio, a diferencia del método de vitrificación, que implica el manejo directo de cada tejido. Otro beneficio es que se logra acortar la duración del protocolo criogénico completo, en comparación con el requerido para la encapsulación-deshidratación (Yamamoto *et al.* 2012).

## Precultivo-desección

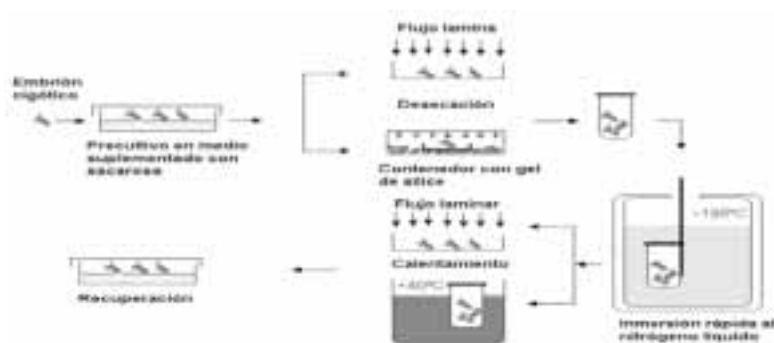
El método de precultivo-desección (figura 4.4) es un protocolo poco laborioso y de fácil transferencia a cualquier laboratorio de biotecnología; sin embargo, la etapa de precultivo anterior a la desección y al enfriamiento puede prolongarse por varios días o semanas, lo que incrementa considerablemente la duración del procedimiento completo. Para la crioconservación de semillas la fase de precultivo se omite y, por lo tanto, implicará el uso de un protocolo más simplificado y corto.



## Procedimiento

1. Realizar el precultivo de los embriones en medio sólido suplementado generalmente con azúcares como agente crioprotector.
2. Efectuar la desecación mediante la exposición de los embriones al aire corriente en una campana de flujo laminar o a cantidades definidas de gel de sílice en contenedores herméticamente cerrados o logrando atmósferas controladas con soluciones salinas sobresaturadas.
3. Realizar el enfriamiento rápido de las muestras contenidas en crioviales mediante la inmersión al nitrógeno líquido.
4. Llevar a cabo el calentamiento rápido, para lo cual los crioviales se sumergen en un baño María a +37 °C-+40 °C, o lento, mediante la exposición de los embriones al aire corriente en una campana de flujo laminar.
5. Realizar la recuperación en el medio de cultivo normal, la primera semana a la oscuridad, y luego realizar la transferencia a las condiciones de fotoperiodo establecidas.

**Figura 4.4. Representación gráfica del procedimiento de precultivo-dsecación.**



**Nota:** Para crioconservar semillas de pequeñas dimensiones, el protocolo excluye el paso correspondiente al precultivo en el medio con el agente crioprotector. El protocolo se realiza a partir del proceso de desecación aplicando cualquiera de los métodos de desecación indicados.

**Fuente:** González-Arnao 2012.

## Algunas recomendaciones adicionales para la crioconservación de germoplasma vegetal

### Selección del material

- Para la congelación de suspensiones celulares, las células deben tomarse cuando se encuentran en la fase exponencial de crecimiento.
- Para la congelación de callos y estructuras organizadas, el material generalmente se toma 15 días posteriores al último subcultivo en medio fresco. En el caso de

las especies de crecimiento lento (por ejemplo, algunas especies de orquídeas), lo importante es que el material de partida refleje un estado vigoroso.

- Los embriones cigóticos inmaduros y los somáticos (globular-torpedo-corazón) son más tolerantes a la congelación que a otras fases de desarrollo.
- El material proveniente de cultivos *in vitro* (por ejemplo, ápices aislados de vitroplántulas) es más homogéneo y permite estandarizar mejor las condiciones de crioconservación que el material obtenido de plantas *in vivo*.

### ***Protección y crioconservación de germoplasma***

- Los tratamientos con soluciones crioprotectoras muy concentradas son menos nocivos si se realizan a 0 °C.
- En la utilización de protocolos convencionales de crioconservación es muy importante inducir la nucleación heterogénea en una etapa temprana del enfriamiento dependiendo del punto de congelación de la solución crioprotectora.
- La descongelación rápida generalmente resulta más apropiada, sobre todo si el material no está suficientemente deshidratado.
- La crioconservación de ápices de especies de propagación vegetativa asegura el mantenimiento de la estabilidad genética y la manipulación del material libre de virus; además, puede ser una estrategia apropiada para el saneamiento por crioterapia.
- Para la crioconservación de ápices, después de la disección los tejidos deben recuperarse en un medio de cultivo al menos de un día para otro, a fin de que superen el estrés del corte.
- Temperaturas muy superiores (por ejemplo, de entre -20 °C y -70 °C) a la temperatura del nitrógeno líquido (-196 °C) con el transcurso del tiempo provocan el deterioro del material biológico almacenado.
- Luego de la crioconservación, el material debe recuperarse en la oscuridad por al menos una semana, con el fin de evitar la fotooxidación.
- Las pruebas colorimétricas de supervivencia pueden falsear los resultados. La verdadera forma de medir la supervivencia y recuperación del material crioconservado es mediante la regeneración de nuevos brotes y/o de plantas.

A continuación se presentan los avances logrados en la investigación y la aplicación de la crioconservación vegetal en diferentes países de América Latina y el Caribe. Se muestra cómo se iniciaron en esta importante región los trabajos en ese campo. También se brinda información sobre las actividades que grupos de especialistas han llevado a cabo en diferentes instituciones de diversos países, las especies vegetales en que han trabajado, las técnicas criogénicas desarrolladas o adaptadas y su aplicación en ciertos bancos de germoplasma.

## **Referencias**

Benson, EE. 2008. Cryopreservation theory. *In* Plant cryopreservation. A practical guide. Reed, B. ed. Springer. p. 23-29.

\_\_\_\_\_; Chabrillange, N; Engelmann, F. 1992. A comparison of cryopreservation methods for the long-term *in vitro* conservation of cassava. *In* The Society for Low Temperature Biology Autumn Meeting (1992, Stirling, UK). Proceedings.



- \_\_\_\_\_; Johnston, J; Muthusamy, J; Harding, K. 2006. Physical and engineering perspectives of *in vitro* plant cryopreservation. *In* Plant tissue culture engineering. Gupta, S; Ibaraki, Y. eds. Springer Verlag. Vol. 6, parte 5. p. 441–476.
- Buitink, J; Hoekstra, FA; Leprince, O. 2002. Biochemistry and biophysics of tolerance systems. *In* Desiccation and survival in plants. Drying without dying. Black, M; Pritchard, HW. eds. Oxford, UK, CABI Publishing. p. 293-318.
- Crowe, HJ; Carpenter, JF; Crowe, LM; Anchordoguy, TY. 1990. Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules. *Cyobiology* 27: 213-219.
- Dereuddre, J; Scottez, C; Arnaud, Y; Duron, M. 1990. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Paris, t. 310, Série III, 317-323.
- Dumet, D; Benson, E. 2000. The use of physical and biochemical studies to elucidate and reduced cryopreservation-induced damage in hydrated/desiccated plant germplasm. *In* Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application. Tsukuba, JP, JIRCAS-IPGRI. p. 43-56.
- Dure, L; Crouch, M; Harada, J; Ho, T-HD; Mundy, J; Quatrano, R; Thomas, T; Sung, ZR. 1989. Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Molecular Biology* 12:475-486.
- Engelmann, F. 1997. *In vitro* conservation methods. *In* Biotechnology and plant genetic resources: conservation and use. Ford-Lloyd, BV; Newbury, JH; Callow, JA. eds. Wellingford, UK, CABI. p.119-162.
- Fabre, J; Dereuddre, J. 1990. Encapsulation-dehydration: A new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot-tips. *CryoLetters* 11:413-426.
- Fahy, GM; MacFarlane, DM; Meryman, HT. 1984. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* 21:407-426.
- Gámez-Pastrana, R; Martínez-Ocampo, Y; Beristain, CI; González-Arno, MT. 2004. An improved cryopreservation protocol for pineapple apices using encapsulation-vitrification *CryoLetters* 25(6):405-414.
- González-Arno, MT; Engelmann, F. 2006. Cryopreservation of plant germplasm using the encapsulation-dehydration technique: Review and case study on sugarcane. *CryoLetters* 27:155-168.
- \_\_\_\_\_; Engelmann, F; Huet, C; Urrea, C. 1993. Cryopreservation of encapsulated apices of sugarcane: effect of freezing procedure and histology. *CryoLetters* 14:303-308.
- \_\_\_\_\_; 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, F. 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.
- Hare, PD; Cress, WA; Staden, J van. 1998. Dissecting the role of osmolyte accumulation during stress. *Plant, Cell and Environment* 21: 535-553.
- Mari, S; Engelmann, F; Chabrilange, N; Huet, C; Michaux-Ferrière, N. 1995. Histocytological study of apices of coffee (*Coffea racemosa* and *C. sessiliflora*) *in vitro* plantlets during their cryopreservation using the encapsulation-dehydration technique. *CryoLetters* 16:289-298.
- Panis, B; Piette, B; André, E; Houwe, I van den; Swennen, R. 2011. Droplet vitrification: the first generic cryopreservation protocol for organized plant tissues? *Acta Horticulturae (ISHS)* 908:157-162.
- \_\_\_\_\_; Piette, B; Swennen, R. 2005. Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all *Musaceae*. *Plant Science* 168:45-55.
- Paulet, F; Engelmann, F; Glaszmann, JC. 1993. Cryopreservation of apices of *in vitro* plantlets of sugarcane (*Saccharum* sp. hybrids) using encapsulation/dehydration. *Plant Cell Reports* 12:525-529.
- Pence, VC. 1995. Cryopreservation of recalcitrant seeds. *In* *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 32, Cryopreservation of plant germplasm I. Bajaj, YPS. ed. Berlín, DE, Springer Verlag. p. 29-52.
- Sakai, A. 2004. Plant cryopreservation. *In* *Life in the frozen state*. Fuller, BJ; Lane, N; Benson, EE. Eds. Boca Raton, US, CRC Press. p. 329-345.
- \_\_\_\_\_; Engelmann, F. 2007. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review. *CryoLetters* 28:151-172.
- Sun, WQ. 2002. Methods for the study of water relations under desiccation stress. *In* *Drying without dying*. Black, M; Pritchard, HW. eds. Oxford, UK, CABI Publishing. 2:47-83.
- Vertucci, CB. 1989. Effects of cooling rates on seeds exposed to liquid nitrogen temperatures. *Plant Physiology* 90:1478-1485.
- Yamamoto, S; Rafique, T; Fukui, K; Sekizawa, K; Niino, T. 2012. V-cryo-plate procedure as an effective protocol for cryobanks: case study of mint cryopreservation. *CryoLetters* 33(1):12-23.
- \_\_\_\_\_; Rafique, T; Priyantha, WS; Fukui, K; Matsumoto, T; Niino, T. 2011. Development of a cryopreservation procedure using aluminium cryo-plates. *Cryo Letters* 32(3):256-65.



# 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](http://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