

Capítulo 32

Crioconservación del germoplasma

L. A. Mroginski*

W. M. Roca**

K. K. Kartha***

* Facultad de Ciencias Agrarias, Instituto de Botánica del Nordeste, Corrientes, Argentina.

** Unidad de Investigación en Biotecnología (UIB), Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia.

*** National Research Council of Canada, Plant Biotechnology Institute, Saskatoon, Saskatchewan, Canadá.

Introducción

La erosión genética causada por la destrucción de los hábitat, por la selección natural, y por 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 tecnología de avanzada, son factores que contribuyen a destruir la diversidad genética (Hawkes, 1981).

Los métodos para la conservación del germoplasma de plantas superiores se adecúan a los sistemas de propagación de las especies. Para aquéllas que se propagan por semilla y cuya viabilidad no se altera en mayor grado luego de un largo período de almacenamiento a bajas temperaturas y con un bajo contenido de humedad, resulta eficiente y económica su conservación en los denominados bancos de semillas. Sin embargo, este método no se puede aplicar a numerosas especies propagadas por semilla, pues la longevidad de ésta, aun en las mejores condiciones de conservación, es muy reducida; tampoco puede emplearse el método en las especies de propagación vegetativa obligada, ni en aquellas autoincompatibles. El germoplasma de estos grupos de plantas se debe conservar manteniendo colecciones vivas, las cuales son costosas y están sometidas a peligros ambientales como plagas, enfermedades y factores climáticos adversos, y a errores humanos.

Las técnicas del cultivo in vitro de tejidos aparecen en la actualidad como una alternativa interesante para la conservación y el intercambio de germoplasma; además, son las técnicas obligadas para la conservación de valiosos genotipos derivados de la ingeniería genética y la manipulación de protoplastos, células o callos, siempre y cuando se consiga su regeneración como plantas enteras. Si bien la conservación del germoplasma puede lograrse mediante el cultivo de diferentes explantes, el de meristemas es el más adecuado por las siguientes razones:

- las probabilidades de ocurrencia de cambios genéticos son menores;
- dentro de ciertos límites, el germoplasma conservado está libre de patógenos;
- los meristemas son frecuentemente explantes adecuados para la micropropagación.

La conservación del germoplasma mediante el cultivo de tejidos se basa bien sea en la limitación del crecimiento, conseguida generalmente con el

empleo de temperaturas de incubación y de medios de cultivo subóptimos (ver Capítulo 8), o bien en la utilización de la denominada crioconservación a las temperaturas ultrabajas (-196 °C) del nitrógeno líquido que causan el cese de todas, o casi todas, las reacciones metabólicas celulares. Los métodos que emplean la desecación parcial (Nitzsche, 1983) y los sistemas de almacenaje con baja presión (Bridgen y Staby, 1983) y con bajo nivel de oxígeno (Bridgen y Staby, 1981), se consideran como alternativas de la crioconservación.

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. Desde que Quatrano (1968) informó acerca de la crioconservación de células de lino, numerosos trabajos han contribuido al progreso de esta técnica que últimamente ha sido objeto de varias revisiones (Finkle y Ulrich, 1983; Finkle et al., 1983, Kartha, 1981a; 1981b; 1982a; 1982b; Withers, 1980a; 1980b; 1980c; 1982; 1983).

Técnicas

Diferentes explantes (ápices caulinares, meristemas, anteras, embriones, protoplastos) así como callos y suspensiones celulares han sido crioconservados a -196 °C (Cuadro 32.1). La heterogeneidad del material vegetal obliga al empleo de diversas técnicas de crioconservación; no obstante, en un intento de generalización, es posible reconocer aspectos comunes entre ellas que, de acuerdo con Withers (1983), son: a) pretratamiento, b) crioprotección, c) congelamiento, d) almacenaje, e) descongelamiento, f) pruebas de viabilidad, y g) 'recultivo'.

Pretratamiento

El grado de tolerancia de las plantas a temperaturas ultrabajas depende de su genotipo, de sus condiciones fisiológicas, y del ambiente en que crecen (Levitt, 1980). La viabilidad del material vegetal de un genotipo determinado puede incrementarse si se lo crioconserva en fases adecuadas de su crecimiento como las siguientes: el estado globular en los embriones somáticos, la fase exponencial de las suspensiones celulares, y los meristemas luego de 2 días de su extracción (Withers, 1983).

Asimismo, el precultivo del material vegetal puede ser de utilidad. El precultivo en medios nutritivos de los ápices caulinares de *Solanum gonio-calyx* mejoró el porcentaje de sobrevivencia de éstos (Grout y Henshaw,

Cuadro 32.1. Crioconservación a -196°C de diferentes explantes de algunas especies de interés agronómico.^a

Especie y (explante)	Crioprotector	Procedimiento de congelación	Viabilidad	Referencias
<i>Arachis hypogaea</i> (meristemas)	Glicerol 5% + DMSO 5% + sacarosa 5%	Rápido	21%-31% vástagos y/o raíces	Bajaj, 1979
<i>Capsicum annuum</i> (suspensión celular)	Glicerol 10% + DMSO 5%	1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, hasta -100°C	25% (FDA)	Withers y Street, 1977
<i>Cicer arietinum</i> (meristemas)	DMSO 4%	0.6 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, hasta -40°C	40% plantas	Kartha y Gamborg, 1978
<i>Daucus carota</i> (embriones somáticos y plántulas)	DMSO, 2.5% a 20%	1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, hasta -40°C	100% de meristemas crecen	Withers, 1979
<i>Daucus carota</i> (suspensión celular)	DMSO 5%	1.8 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, hasta -196°C	65% (FDA) y embriones	Nag y Street, 1973
<i>Daucus carota</i> (protoplastos)	DMSO 5%	2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, hasta -100°C	90% (FDA) y embriones	Withers y Street, 1977; Withers, 1980c
<i>Dianthus caryophyllus</i> (meristemas)	DMSO 5%	50 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, aproximadamente	100% plantas	Seibert y Wetherbee, 1977
<i>Fragaria x ananassa</i> (meristemas)	DMSO 5%	0.84 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, hasta -40°C	95% plantas	Kartha et al., 1980

(Continúa)

Cuadro 32.1. Continuación.

Especie y (explante)	Crioprotector	Procedimiento de congelación	Viabilidad	Referencias
<i>Glycine max</i> (suspensión celular)	DMSO 7%	2 °C/min, hasta -100 °C	52% (FDA)	Bajaj, 1976
<i>Lycopersicon esculentum</i> (plántulas)	DMSO 10%	Rápido	30% callos	Groat et al., 1978
<i>Manihot esculenta</i> (meristemas)	DMSO 15% + sacarosa 3%	0.5 °C/min, hasta -40 °C	callos, callos y hojas, plantas	Kartha et al., 1982a (ver Figura 32.2).
<i>Medicago sativa</i> (callos)	10% DMSO + 10% PEG + glucosa 8%	1 °C/min, hasta -30 °C	crecimiento, plantas	Finkle et al., 1980
<i>Nicotiana tabacum</i> (suspensión celular)	DMSO 5% + sacarosa 3%	2 °C/min, hasta -196 °C	5%-10% plantas	Bajaj y Reinert, 1977
<i>Nicotiana tabacum</i> (anteras)	DMSO 7%	2 °C/min	1.5% plantas	Bajaj, 1978
<i>Nicotiana tabacum</i> (embriones de polen)	DMSO 5% a 7%	1 a 3 °C/min	31% (FDA)	Bajaj, 1978
<i>Oryza sativa</i> (suspensión celular)	DMSO 5%	0.1 °C/min, hasta -40 °C	60%-65% (TTC)	Sala et al., 1979
<i>Pisum sativum</i> (meristemas)	DMSO 5%	0.6 °C/min, hasta -40 °C	60% plantas	Kartha et al., 1979

(Continúa)

Cuadro 32.1. Continuación.

Especie y (explante)	Crioprotector	Procedimiento de congelación	Viabilidad	Referencias
<i>Saccharum</i> sp. (callos)	DMSO 10% + PEG 10% + glucosa 8%	2 °C/min, hasta -40 °C; 5 °C/min, hasta -80 °C	callos y raíces	Ulrich et al., 1979
<i>Solanum tuberosum</i> (ápices caulinares)	DMSO 10%	Rápido en N líquido	60% sobreviven, plantas	Henshaw et al., 1980
<i>Sorghum bicolor</i> (suspensión celular)	0.5 M DMSO + 0.5 M glicerol + 1 M prolina	1 °C/min, hasta -35 °C	25% (FDA)	Withers y King, 1980
<i>Zea mays</i> (suspensión celular)	0.5 M DMSO + 0.5 M glicerol + 1 M prolina	1 °C/min, hasta -35 °C	75% (FDA)	Withers y King, 1980

a. FDA, PEG, DMSO, TTC: ver Apéndice A, Abreviaturas y acrónimos.

1978a). Las suspensiones celulares de *Zea mays* crioconservadas manifestaron mayor viabilidad cuando fueron precultivadas en un medio que contenía prolina (Withers y King, 1979). Un resultado semejante fue observado cuando se usó manitol en suspensiones celulares de *Acer pseudoplatanus* (Withers y Street, 1977). Precultivos en medios con 5% de DMSO incrementaron la viabilidad de las suspensiones celulares de *Atropa belladonna* (Nag y Street, 1975) y de *Catharanthus roseus* (Kartha et al., 1982b), así como la de meristemas de *Pisum sativum* (Kartha et al., 1979) y de *Fragaria x ananassa* (Kartha et al., 1980). Por otra parte, la crioconservación de meristemas de *Dianthus caryophyllus* fue favorecida por el pretratamiento de los meristemas a 4 °C durante 3 días (Seibert y Wetherbee, 1977).

Crioprotección

Para proteger al material vegetal de los daños del congelamiento y del descongelamiento, se utilizan sustancias crioprotectoras (Cuadro 32.1). Las más utilizadas son DMSO (5%-15%) y glicerol (5%-20%). También se emplean otras sustancias como azúcares, azúcares-alcoholes, aminoácidos, y polímeros de alto peso molecular. Una lista de esas sustancias puede consultarse en un trabajo de Withers (1980c).

En muchos casos se emplean mezclas de sustancias crioprotectoras. Una mezcla de PEG (10%), glucosa (8%) y DMSO (10%) fue empleada en tejidos de caña de azúcar y de arroz (Finkle et al., 1983). Una mezcla de DMSO (10%), glicerol (5%) y prolina (10%) fue efectiva en la crioconservación de suspensiones celulares de maíz y zanahorias, y de otras especies (Withers, 1980b).

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

Congelamiento

El éxito de la crioconservación de material vegetal depende, en gran medida, de la acertada elección del procedimiento de congelación que se utilice. Básicamente, se pueden distinguir tres procedimientos (Figura 32.1):

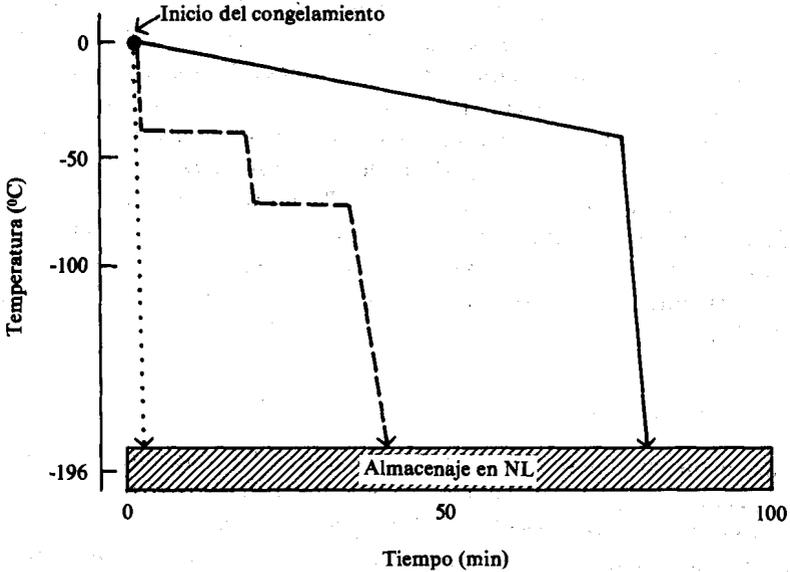


Figura 32.1. Procedimientos para lograr la congelación rápida (· · · ·), escalonada (— · —) y lenta (—) del material vegetal. NL = nitrógeno líquido.

Congelamiento rápido. El material vegetal se coloca directamente en nitrógeno líquido (NL). La velocidad de disminución de la temperatura puede ser hasta de $1000\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. 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 empleando sustancias crioprotectoras adecuadas y procurando que el congelamiento se produzca tan rápidamente como sea posible (a mayor velocidad de congelamiento, 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 (Cuadro 32.1).

Congelamiento lento. El material vegetal se congela de modo gradual. La disminución de la temperatura oscila entre 0.1 y $3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Este procedimiento permite una deshidratación celular protectora, de manera que los cristales de hielo se forman extracelularmente. Sin embargo, es conveniente insistir en 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 su transferencia al NL. El congelamiento lento ha sido empleado en la crioconservación de materiales vegetales de numerosas especies (Cuadro 32.1).

Congelamiento escalonado. 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 (Figura 32.1).

Almacenaje

Es preferible que el almacenaje se haga a la temperatura del NL (-196°C). En los ejemplos citados en el Cuadro 32.1, el material vegetal fue almacenado a -196°C , lo que posibilita el cese de prácticamente toda la actividad metabólica. El uso de congeladores que brinden temperaturas de almacenaje entre -70 y -100°C puede ser otra alternativa, pero no es recomendable para la crioconservación a largo plazo (Withers, 1980c).

Descongelamiento

En general, cualquiera sea el procedimiento empleado para la congelación del material vegetal, su descongelamiento puede llevarse a cabo en forma rápida por medio de baños de 1 a 2 min de duración en agua a 40°C , teniendo la precaución de agregar gradualmente medio de cultivo para diluir las sustancias crioprotectoras y evitar la deplasmólisis celular.

También puede aplicarse el descongelamiento lento por simple exposición del material vegetal crioconservado (contenido en ampollas) a la temperatura del laboratorio (Withers, 1979), o colocándolo en una corriente de aire caliente (Seibert y Wetherbee, 1977).

Pruebas de viabilidad

La estimación de la viabilidad del material vegetal crioconservado puede hacerse de diferentes maneras. Tratándose de meristemas, lo más adecuado es recultivarlos y determinar su capacidad de regenerar plantas; otras evidencias, a menudo empleadas, como su habilidad para formar

callos o adquirir una coloración verde, son inadecuadas porque no garantizan que los meristemas crioconservados regeneren plantas más tarde.

Para estimar la viabilidad de células y protoplastos se puede recurrir a la coloración con diacetato de fluoresceína (FDA). Esta técnica se basa en el hecho de que únicamente las células vivas adquieren coloración con FDA y emiten fluorescencia cuando son iluminadas con luz ultravioleta (Widholm, 1972); para aplicarla se sugiere el siguiente procedimiento (Kantha, 1982b):

- 1) Preparar, con acetona, una solución madre de FDA al 0.5%. Conservarla a -20°C .
- 2) Agregar 0.5 ml de la solución madre a 25 ml de medio de cultivo, para lograr una concentración final de FDA de 0.01%.
- 3) Mezclar, sobre un portaobjeto, una gota de esta solución con una gota de la suspensión celular o de los protoplastos descongelados. Colocar encima un cubreobjeto. En un microscopio con lámpara de tungsteno, contar el número de células o protoplastos. Realizar la misma operación utilizando iluminación ultravioleta (deben trascurrir de 5 a 20 min desde la iniciación de la coloración).
- 4) Expresar la viabilidad como el porcentaje de células o protoplastos que emitan fluorescencia con iluminación ultravioleta.

Para estimar la viabilidad de suspensiones celulares, también puede utilizarse el método del cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio (TTC). Este método, adaptado por Steponkus y Lanphear (1967) se basa en la reducción del TTC, por la actividad mitocondrial de las células vivas, a trifenilformazán (un compuesto rojo e insoluble en agua). Este compuesto se puede solubilizar con etanol y medir espectrofotométricamente a 530 nm. El procedimiento para aplicar este método comprende los siguientes pasos (Bajaj y Reinert, 1977):

- 1) Preparar una solución de TTC al 0.6% en una solución bófer (8.9 g/litro de Na_2HPO_4 + 6.8 g/litro de KH_2PO_4).
- 2) Incubar, a 30°C durante 15 h, 100 mg de células descongeladas en 3 ml de TTC.
- 3) Desechar la solución de TTC y lavar las células con agua bidestilada.
- 4) Centrifugar las células y extraer el trifenilformazán con 7 ml de etanol al 95% durante 5 min, en un baño con agua a 80°C .

- 5) Una vez enfriado el extracto, completar a 10 ml con etanol al 95%. Medir la absorbancia de la solución rosada con un espectrofotómetro a 530 nm. Comparar los valores obtenidos con los del testigo (células no congeladas).

Recultivo

Una vez descongelado, el material vegetal debe ser recultivado; para ello se utilizan, en general, los mismos medios y condiciones en que crecía antes de su congelamiento.

Crioconservación de Meristemas de Fresa o Frutilla (*Fragaria x ananassa*)

En los últimos años se han desarrollado numerosos sistemas para lograr que los ápices caulinares y los meristemas de varias especies vegetales sean crioconservados a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Cuadro 32.1). El sistema desarrollado para frutilla —una especie de propagación vegetativa (Kartha et al., 1980)— además de brindar una alta viabilidad luego del recultivo (95%), posibilita la propagación masiva de esta especie (de 150 a 200 plantas/meristema cultivado). El procedimiento sugerido para la aplicación de este sistema (Kartha et al., 1982b) comprende los siguientes pasos ilustrados en la Figura 32.2:

- 1) La porción apical (± 5 cm de longitud) de los estolones provenientes de plantas de frutilla cultivadas en invernadero se desinfectan con NaOCl al 1.2% durante 20 min, y se lavan con agua destilada estéril. Posteriormente, se disectan los meristemas (de 0.4 a 0.5 mm) y se los cultiva en MS + 1 μM AIB + 1 μM BAP + 0.1 μM AG, a $26\text{ }^{\circ}\text{C}$, con un fotoperíodo de 16 h (4000 lux). Al cabo de 3 semanas se obtienen vástagos.
- 2) Los vástagos se transfieren a un medio de propagación (MS + 10 μM BAP) donde se obtienen, al cabo de 4 ó 5 semanas, entre 150 y 200 nuevos vástagos.
- 3) Los meristemas apicales de los nuevos vástagos se someten a un pretratamiento consistente en cultivarlos durante 48 h en el mismo medio de propagación suplementado con DMSO al 5%.
- 4) Luego del pretratamiento, los frascos con los meristemas se colocan en una conservadora con hielo durante 2 h. Luego, los meristemas se

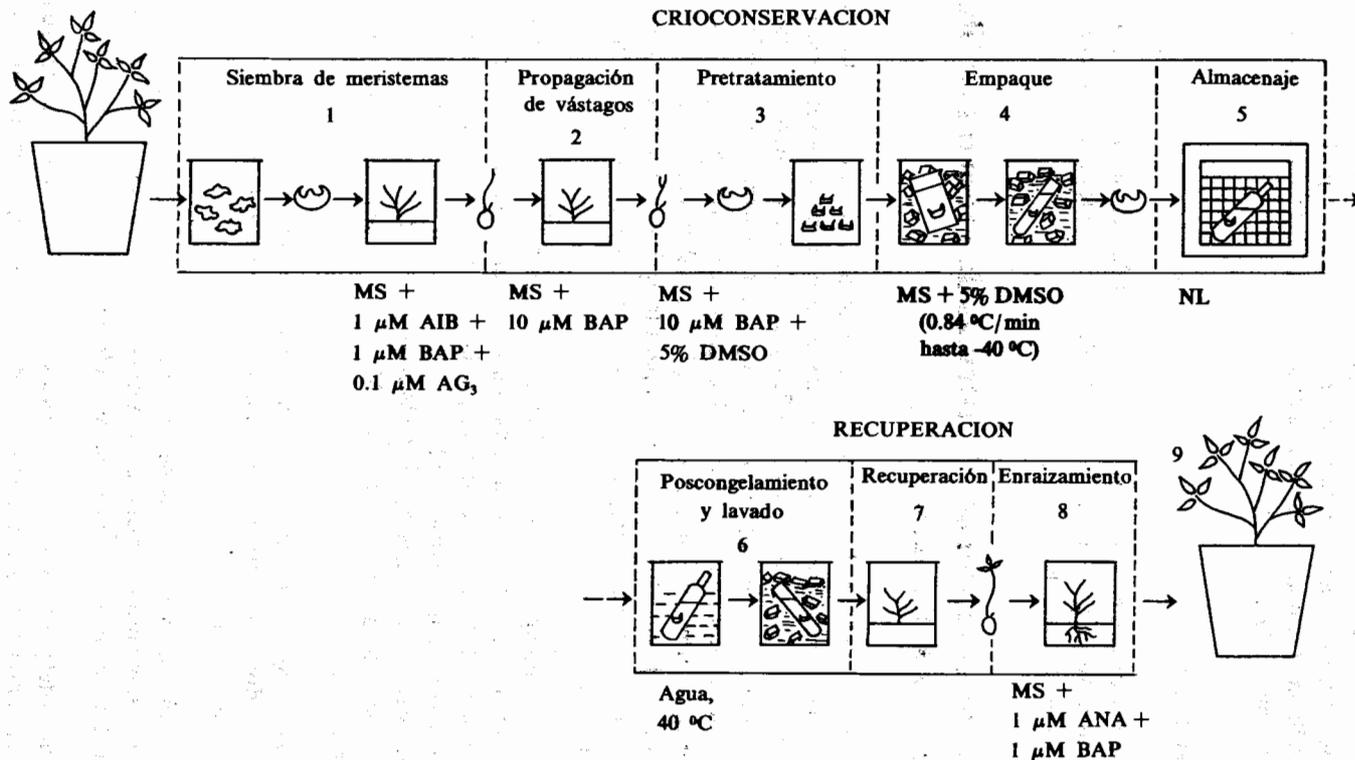


Figura 32.2. Procedimiento para la criopreservación de meristemas de frutilla (*Fragaria x ananassa*); véase el texto. NL = nitrógeno líquido.

trasfieren a tubos de centrifuga (mantenidos en una conservadora con hielo) que contengan 10 ml de MS enfriado. Durante 30 min se agregan, gradualmente, 10 ml de MS + DMSO al 10%, de manera que la concentración final de este último sea del 5%. En seguida, los lotes de 20 meristemas se transfieren a ampollas de vidrio de 1.2 ml que contengan 1 ml de MS + DMSO al 5%; las ampollas son obturadas, excepto una en la que se coloca el termopar. Las ampollas se congelan lentamente (0.84 °C/min) hasta -40 °C.

- 5) El almacenaje de los meristemas contenidos en las ampollas se lleva a cabo mediante su inmersión en NL (-196 °C).
- 6) El descongelamiento se realiza por inmersión de las ampollas en agua a 40 °C durante 90 segundos; éstas se colocan luego en una conservadora con hielo. El contenido de las ampollas se transfiere a un tubo de centrifuga ubicado en una conservadora con hielo. Los meristemas se lavan cuatro veces con MS líquido.
- 7) Los meristemas se cultivan en el medio de propagación con el fin de recuperar plantas.
- 8) Los vástagos se transfieren a un medio de enraizamiento (MS + 1 µM ANA + 1 µM BAP).
- 9) Las plantas obtenidas se trasladan a macetas.

Referencias

- Bajaj, Y. P. S. 1976. Regeneration of plants from cell suspensions frozen at -20, -70, and -196 °C. *Physiol. Plant.* 37:263-268.
- . 1978. Effect of super-low temperature on excised anthers and pollen embryos of *Atropa*, *Nicotiana* and *Petunia*. *Phytomorphology* 28:171-176.
- . 1979. Freeze-preservation of *Arachis hypogaea* and *Cicer arietinum*. *Indian J. Exptl. Biol.* 17:1405-1407.
- y Reinert, J. 1977. Cryobiology of plant cell cultures and establishment of gene banks. En: Reinert, J. y Bajaj, Y. P. S. (eds.). *Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture*. Springer-Verlag, Nueva York, E.U. p. 757-777.
- Bridgen, M. P. y Staby, G. 1981. Low pressure and low oxygen storage of *Nicotiana tabacum* and *Chrysanthemum morifolium* tissue cultures. *Plant Sci. Letters* 22:177-186.

- y ———. 1983. Protocols of low-pressure storage. En: Evans, D. A.; Sharp, W. R.; Ammirato, P. V. y Yamada, Y. (eds.). *Handbook of plant cell culture*. McMillan Publishing, Nueva York, E.U. v. 1, p. 816-827.
- Finkle, B. J.; Ulrich, J. M.; Tisserat, B. y Rains, D. W. 1980. Regeneration of date palm and alfalfa plants after freezing callus tissues to -196°C in a combination of cryoprotective agents. *Cryobiology* 17:625-626. (Resumen.)
- y Ulrich, J. 1983. Protocols of cryopreservation. En: Evans, D. A.; Sharp, W. R.; Ammirato, P. V. y Yamada, Y. (eds.). *Handbook of plant cell culture*. McMillan Publishing, Nueva York, E.U. v. 1, p. 806-815.
- ; ——— ; Scheffer, G. W. y Sharpe, F. (Jr.). 1983. Cryopreservation of rice cells. En: *Cell and tissue culture techniques for cereal crop improvement*. Memorias de un taller. Sciences Press, Beijing, China, e International Rice Research Institute (IRRI), Manila, Filipinas. p. 343-369.
- Grout, B. W. W. y Henshaw, G. G. 1978. Freeze-preservation of potato shoot-tip cultures. *Ann. Bot.* 42:1227-1229.
- ; Westcott, R. J. y Henshaw, G. G. 1978. Survival of shoot meristems of tomato seedlings frozen in liquid nitrogen. *Cryobiology* 15:478-483.
- Hawkes, J. G. 1981. Germoplasma collection, preservation, and use. En: Frey, K. J. (ed.). *Plant Breeding; II*. Iowa State University Press, Ames, Iowa, E.U. p. 57-83.
- Henshaw, G. G.; Stamps, J. A. y Westcott, R. J. 1980. Tissue culture and germplasm storage. En: Sala, F.; Parisi, B.; Cella, R. y Ciferri, O. (eds.). *Plant cell cultures: Results and perspectives*. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Holanda. p. 277-282.
- Kartha, K. K. 1981a. Meristem culture and cryopreservation: Methods and applications. En: Thorpe, T. A. (ed.). *Plant tissue culture: Methods and applications in agriculture*. Academic Press, Nueva York, E.U. p. 181-211.
- . 1981b. Genepool conservation through tissue culture. En: Rao, A. N. (ed.). *COSTED symposium on tissue culture of economically important plants*. Memorias. Singapur. p. 213-218.
- . 1982a. Cryopreservation of germplasm using meristem and tissue culture. En: Tomes et al. (eds.). *Application of plant cell and tissue culture to agriculture and industry*. University of Guelph, Guelph, Canadá. p. 139-161.
- . 1982b. Cryopreservation of plant meristems and cells. En: Wetter, L. R. y Constabel, F. (eds.). *Plant tissue culture methods*. National Research Council Canada, Saskatoon, Canadá. p. 25-33.
- y Gamborg, O. L. 1978. Meristem culture techniques in the production of disease free plants and freeze-preservation of germplasm of tropical tuber crops and grain legumes. En: Maraitte, H. y Meyer, J. A. (eds.). *Diseases of tropical food crops*. Université Catholique Louvain, Bélgica. p. 267-283.

- ; Leung, N. L. y Gamborg, O. L. 1979. Freeze-preservation of pea meristems in liquid nitrogen and subsequent plant regeneration. *Plant Sci. Letters* 15:7-15.
- ; ——— y Pahl, K. 1980. Cryopreservation of strawberry meristems and mass propagation of plantlets. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 105:481-484.
- ; ——— y Mroginski, L. A. 1982a. *In vitro* growth responses and plant regeneration from cryopreserved meristems of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Z. Pflanzenphysiol.* 107:133-140.
- ; ———; Gaudet-La Prairie, P. y Constabel, F. 1982b. Cryopreservation of periwinkle, *Catharanthus roseus* cells, cultured in vitro. *Plant Cell Reports* 1:135-138.
- Levitt, J. 1980. Freezing-resistance types, measurement, and changes. 2a. ed. En: Levitt, J. (ed.). *Responses of plant to environmental stresses*. Academic Press, Nueva York, E.U. v. 1, p. 116-162.
- Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Nag, K. K. y Street, H. E. 1973. Carrot embryogenesis from frozen cultured cells. *Nature* 245:270-272.
- y ———. 1975. Freeze-preservation of cultured plant cells; I: The pretreatment phase. *Physiol. Plant.* 34:254-260.
- Nitzsche, W. 1983. Germplasm preservation. En: Evans, D. A.; Sharp, W. R.; Ammirato, P. V. y Yamada, Y. (eds.). *Handbook of plant cell culture*. McMillan Publishing, Nueva York, E.U. v. 1, p. 782-805.
- Quatrano, R. S. 1968. Freeze-preservation of cultured flax cells utilizing dimethyl-sulfoxide. *Plant Physiol.* 43:2057-2061.
- Sala, F.; Cella, R. y Rollo, F. 1979. Freeze-preservation of rice cells. *Physiol. Plant.* 45:170-176.
- Seibert, M. y Wetherbee, P. J. 1977. Increased survival and differentiation of frozen herbaceous plant organ cultures through cold treatment. *Plant Physiol.* 59:1043-1046.
- Steponkus, P. L. y Lanphear, F. O. 1967. Refinement of the triphenyl tetrazolium chloride method of determining cold injury. *Plant Physiol.* 42:1423-1426.
- Ulrich, J. M.; Finkle, B.; Moore, P. H. y Ginoza, H. 1979. Effect of a mixture of cryoprotectants in liquid nitrogen survival of callus of a tropical plant. *Cryobiology* 16:550-556.
- Widholm, J. M. 1972. The use of fluorescein diacetate and phenosafranin for determining viability of cultured plant cell. *Stain Technol.* 47:189-194.

- Withers, L. A. 1979. Freeze-preservation of somatic embryos and clonal plantlets of carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Physiol.* 63:460-467.
- . 1980a. Storage of plant tissue cultures. En: Withers L. A. y Williams, J. T. (eds.). *Crop genetic resources: The conservation of difficult material. Memorias de reunión internacional.* University of Reading, Inglaterra. p. 49-82.
- . 1980b. Preservation of germplasm. *Intl. Rev. Pytology. Suppl.* 11B. p. 101-136.
- . 1980c. Tissue culture storage for genetic conservation. IBPGR technical report. International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR), Roma. 91 p.
- . 1982. Crioconservación de tejidos vegetales cultivados in vitro. En: Villalobos, V. M. (comp.). *Contribuciones del cultivo de tejidos al mejoramiento y conservación de las plantas.* Centro de Genética, México. p. 29-50.
- . 1983. Germplasm preservation through tissue culture: An overview. En: *Cell and tissue culture techniques for cereal crop improvement. Memorias de un taller.* Sciences Press, Beijing, China, e International Rice Research Institute (IRRI), Manila, Filipinas. p. 315-341.
- y Street, H. E. 1977. The freeze-preservation of plant cell cultures. En: Barz, W. et al. (eds.). *Plant tissue culture and its bio-technical applications.* Springer-Verlag, Nueva York, E.U. p. 226-244.
- y King, P. J. 1979. Proline; a novel cryoprotectant for the freeze-preservation of *Zea mays*. *Plant Physiol.* 64:675-678.
- y ———. 1980. A simple freezing-unit and routine cryopreservation method for plant cell cultures. *Cryo-letters* 1:213-220.