

**Universidad Autónoma de Nuevo León**  
**Facultad de Ciencias Biológicas**  
**Subdirección de estudios de Postgrado**



**Criopreservación de Brotes Apicales de *Citrus sinensis***  
**Mediante la Técnica de Encapsulación-Vitrificación-**  
**Deshidratación.**

**TESIS**  
**QUE COMO REQUISITO PARCIAL**  
**PARA OBTENER EL GRADO DE**  
**DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**PRESENTA**

**Juan Vega Pérez**

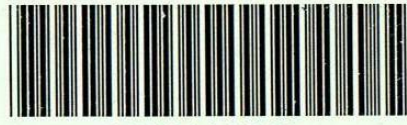
TD

Z5320

FCB

2004

.y4



1020149933

~~1/1~~

\_\_\_\_\_

**Universidad Autónoma de Nuevo León**  
**Facultad de Ciencias Biológicas**  
**Subdirección de estudios de Postgrado**



**Criopreservación de Brotes Apicales de *Citrus sinensis***  
**Mediante la Técnica de Encapsulación-Vitrificación-**  
**Deshidratación.**

**TESIS**  
**QUE COMO REQUISITO PARCIAL**  
**PARA OBTENER EL GRADO DE**  
**DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**PRESENTA**

**Juan Vega Pérez**

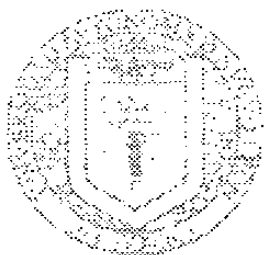
978669

TD  
Z5320  
FEB  
2004  
.V4



FONDO  
TESIS

**Universidad Autónoma de Nuevo León**  
**Facultad de Ciencias Biológicas**  
**Subdirección de Estudios de Postgrado**



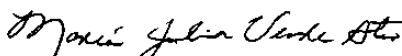
**Criopreservación de Brotes Apicales de *Citrus sinensis***  
**Mediante la Técnica de Encapsulación-Vitrificación-**  
**Deshidratación.**

TESIS  
QUE COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA


**Juan Vega Pérez**

Comisión de Tesis

  
DRA. MARÍA JULIA VERDE STAR  
PRESIDENTE

  
DRA. LIDIA N. GONZÁLEZ SOLÍS  
SECRETARIA

  
DRA. AZUCENA ORANDAY CARDENAS  
PRIMER VOCAL

  
DRA. MARÍA DE LA PAZ TIJERNA GARZA  
SEGUNDO VOCAL

  
DRA. MARÍA LUISA CARDENAS AVILA  
TERCER VOCAL

## Contenido

Dedicatoria.....	i
Agradecimientos.....	ii
Índice de cuadros.....	iii
Contenido.....	iv
Resumen.....	v
Summary.....	vi
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	4
2.1. Conservación de recursos fitogenéticos.....	4
2.2. Estrategias de conservación.....	6
2.2.1. Conservación <i>in situ</i> .....	7
2.2.2. Conservación <i>ex situ</i> .....	8
2.3. Estrategias de almacenamiento.....	9
2.4. Colecciones de plantas.....	10
2.5. Bancos de germoplasma.....	11
2.5.1. Bancos de semillas.....	11
2.5.2. Bancos de cultivo <i>in vitro</i> .....	13
2.5.3. Otros bancos de germoplasma.....	15
2.6. Criopreservación.....	15
2.6.1. Criopreservadores.....	16
2.6.2. Técnicas de criopreservación.....	18
2.7. Descripción del género <i>Citrus</i> .....	20
2.8. Origen de los cítricos.....	21
2.9. Distribución de los cítricos.....	22
2.10. La citricultura mundial.....	23
2.11. La citricultura mexicana.....	23
2.12. Conservación de germoplasma de cítricos.....	24
2.13. Criopreservación de meristemos, brotes y yemas.....	25
2.14. Criopreservación de cítricos.....	50
2.15. Justificación.....	57
3. Hipótesis.....	58
4. Objetivo general.....	58
4.1. Objetivos particulares.....	56
5. Material y métodos.....	59
5.1. Localización del experimento.....	59
5.2. Material vegetativo.....	59
5.3. Preparación del inóculo.....	59
5.3.1. Aislamiento y cultivo de brotes apicales.....	59
5.4. Medios de cultivo.....	60
5.4.1. Medio de cultivo de preacondicionamiento.....	60
5.4.2. Medio de cultivo de regeneración.....	60
5.5. Ensayos de preacondicionamiento a la sacarosa.....	60
5.6. Encapsulación-vitrificación.....	61



5.7. Deshidratación.....	61
5.8. Protocolo estandarizado.....	62
5.9. Cultivo de regeneración.....	62
6. Resultados.....	64
6.1. Efecto del preacondicionamiento en sacarosa.....	64
6.2. Efecto del proceso de deshidratación.....	65
6.3. Efecto de la vitrificación.....	65
6.4. Regeneración de brotes.....	67
7. Discusión.....	69
8. Conclusiones y recomendaciones.....	71
9. Referencias.....	73

## Resumen

Brotos apicales disectados desde baretas de *Citrus sinensis*, fueron exitosamente criopreservadas por la técnica de encapsulación-vitrificación-deshidratación. La óptima tasa de supervivencia de los brotes apicales fue lograda cuando los brotes encapsulados fueron deshidratados hasta un 16.9 % de humedad. La concentración de sacarosa en el medio de pre-acondicionamiento influyó significativamente en el crecimiento y porcentaje de materia seca del grupo de brotes, así como, en la subsiguiente supervivencia de los brotes criopreservados. El máximo crecimiento de los brotes se obtuvo en los tratamientos de pre-acondicionamiento a concentraciones de sacarosa desde 0.15 hasta 0.29 M; el porcentaje de materia seca aumentó con la concentración de sacarosa. La tasa de supervivencia de los brotes criopreservados se incrementó desde un 41.1 hasta un 81.1 % cuando la concentración de sacarosa de los tratamientos aumentó desde 0.09 hasta 0.22 M o 0.29 M. La concentración de benciladenina (BA) afectó significativamente la supervivencia y re-crecimiento de los brotes criopreservados en el medio de post-cultivo. La supervivencia de los brotes fue más baja en el medio libre de benciladenina. Sin embargo, altas concentraciones de BA (3-4 $\mu$ M), indujeron la formación de tejido de callo. La recuperación óptima fue obtenida cuando se adicionó BA 2 $\mu$ M al medio de regeneración.

## Summary

Shoot tips excised from preconditioned stock buds of *Citrus sinensis* were successfully cryopreserved by encapsulation-dehydration. Optimal survival of cryopreserved shoot tips was achieved when encapsulated shoot tips were dehydrated to 16.9 % water content. The sucrose concentration in the preconditioning medium significantly influenced the growth and dry matter percentage of the stock shoots as well as subsequent survival of the cryopreserved shoot tips. Maximal growth of stock shoots was obtained in sucrose concentrations in the range of 0.15 M to 0.29 M, while the dry matter percentage increased as sucrose concentration increased up to 0.44 M. The survival of cryopreserved shoot tips increased from 41.1 % to approximately 81.1 % as the sucrose concentration for stock shoots increased from 0.09 M to 0.22 M or 0.29 M. The benzyladenine concentration in the post-culture medium significantly affected the survival and regrowth of the cryopreserved shoot tips. Survival of the shoot tips was lowest when they were post-cultured on benzyladenine-free medium. However, high benzyladenine concentrations (3-4  $\mu$ M) induced callus formation. Optimal recovery was obtained in post-culture medium containing 2  $\mu$ M benzyladenine.

## 1. Introducción

Los recursos genéticos de plantas para la alimentación y la agricultura forman parte de la disponibilidad biológica indispensable para la seguridad en el abastecimiento mundial de alimentos.

Dentro del reino vegetal han sido clasificadas alrededor de 350,000 especies, de las cuales 70,000 son consideradas plantas comestibles. La humanidad ha utilizado solamente cerca de 7,000 para la alimentación, siendo notable, que solo poco más de 30 especies cubren el 95 % de las necesidades calóricas y proteicas en la alimentación mundial (Morico, 1998).

La importancia de la conservación de los recursos genéticos en bancos de germoplasma, tiene como objetivo mantener la diversidad dentro de las especies para asegurar que su potencial genético esté completamente disponible en el futuro. Por lo que la necesidad para su conservación es justificable para todos los cultivos y plantas utilizables para la alimentación y la agricultura (Menini 1998).

Existen dos técnicas básicas para la conservación de recursos genéticos de plantas; la preservación *in situ* y la *ex situ*. En la primera, la planta se desarrolla en su medio ambiente natural, permitiendo los procesos evolutivos, que son la base de la adaptabilidad y diversidad genética. Por tal razón, la conservación *in situ* es considerada como el sistema dinámico más conveniente para preservar la adaptabilidad ya que permite la evolución de poblaciones que continúa originando mutaciones y flujo de genes. La conservación *ex situ* implica el mantenimiento estático de germoplasma fuera de las condiciones naturales en las que la especie ha evolucionado, incluye el almacenamiento de semillas en atmósferas controladas, de tejidos, células y órganos *in vitro*; así como, almacenamiento de ADN, polen, colecciones de campo y jardines botánicos (Maxted, 1997, citado por Engelmann, (2000). Es bien conocido actualmente que para cualquier banco de genes dado, un número de diferentes metodologías son necesarias para una segura, eficiente y no costosa conservación. La apropiada estrategia y balance

depende de factores tales como las características biológicas de las plantas, el manejo y uso presente, disponibilidad de infraestructura, número de accesiones, el propósito de la conservación, el acervo de germoplasma y la disponibilidad política y administrativa. La utilización de un particular método de conservación puede diferir de un banco de germoplasma a otro (Withers y Engels, 1993, citado por Engelmann (1998).

Las colecciones de germoplasma de cultivos propagados vegetativamente, son usualmente conservadas como colecciones de campo, principalmente, para la confirmación y evaluación de su identidad fenotípica y genotípica, la resistencia a plagas y enfermedades y el comportamiento a las particulares condiciones edafoclimáticas. Desafortunadamente, estas colecciones de germoplasma son vulnerables a contingencias ambientales adversas, y distintos tipos de estrés biótico (Reed *et al.*, 1998).

Estos bancos de genes ocupan grandes superficies y su mantenimiento requiere de cuidados multidisciplinarios intensos y costosos. Se estima que su costo puede llegar a ser de USD \$75 por cada accesión por año. Esto se agrava cuando existe la necesidad de mantener una colección base (duplicado) para la preservación a largo plazo, por lo que son necesarias tecnologías alternativas para la disminución significativa de los costos y a la vez que mantenga o incremente la seguridad en la conservación (Forsline, 1998).

Los cítricos han sido cultivados en la zona geográfica comprendida entre los 40° de latitud norte y 40° de latitud sur. Su centro de origen y diversidad se encuentra en el sudeste asiático. En el hemisferio norte los principales países productores son Estados Unidos, Japón, Cuba, México y China, en la región del mediterráneo Grecia, Italia, España, Israel, Argelia, Marruecos, Chipre, Túnez, Egipto, Líbano y Turquía. En el hemisferio Sur sobresalen Brasil, Argentina, Uruguay, Venezuela, Australia, África del Sur y Chile (Lima y Pérez, 1996). Los cítricos mantienen una importante actividad económica en el mundo. La

producción ha crecido gradualmente y excede los 82 millones de toneladas anuales (FAO 1999, citado por Peña (2000).

La biotecnología mediante las técnicas de micropropagación ofrece además de los medios de la propagación masiva o clonal, un importante papel en la conservación *in vitro*. La conservación clonal *in vitro* de recursos fitogenéticos ha sido desarrollada para un gran número de especies de plantas debido a que esta alternativa reduce en gran medida los problemas de las colecciones de campo, además se tiene la ventaja de poder manipular el material vegetativo en procesos de micropropagación y producción de plantas libres de enfermedades. Las dos principales estrategias de conservación *in vitro* son la reducción del crecimiento a bajas temperaturas y la criopreservación. Los métodos empleados varían de acuerdo a la duración del almacenamiento requerido, sin embargo, la conservación *in vitro* requiere de continuos subcultivos manteniendo las posibilidades de pérdidas de material por contaminación y variaciones somaclonales (Boxus, 1998).

La criopreservación es el almacenamiento de material biológico a ultrabajas temperaturas, usualmente en nitrógeno líquido (-196°C). Es el único método seguro actualmente disponible y rentable para la conservación a largo plazo de recursos genéticos de especies que tienen semillas recalcitrantes o que son propagadas vegetativamente. Grandes progresos se han efectuado en los últimos 10 años con el desarrollo de técnicas de criopreservación para más de 100 especies de plantas. Los protocolos de criopreservación han llegado a estar cada vez más disponibles para aplicaciones de rutina en bancos de germoplasma. Sin embargo, muchos de los trabajos a la fecha han sido efectuados con especies de zonas templadas, dejando a un lado la investigación en especies tropicales y subtropicales, identificándose un área de prioridad para la investigación, desarrollo y transferencias de tecnologías en este campo (Reed, 2000).

## 2. Antecedentes

### 2.1. Conservación de recursos fitogenéticos

La conservación de la biodiversidad no sólo se trata de la obligación ética de preservar este legado para las generaciones venideras o del puro interés científico que pueda aportar. La sociedad es cada vez más consciente de la importancia de la flora silvestre como fuente de alimentos, aceites y lubricantes, gomas, resinas, ceras, colorantes, fibra, energía, sustancias aromáticas, principios medicinales, por su valor ornamental y por su valor ecológico como indicador y elemento restaurador de situaciones ambientales degradadas (McNeely *et al.*, 1990; Prance, 1997).

La conservación toma especial relevancia en nuestros días dado el acelerado proceso de degradación ambiental en el que vivimos. Sin embargo, la preocupación por la conservación de los recursos vegetales es tan antigua como la propia civilización. Con el comienzo de la agricultura y el asentamiento de las poblaciones, el crecimiento y la presión de la población llevó al reconocimiento de la necesidad de conservar los recursos biológicos con objeto de asegurar un abastecimiento sostenible de alimento para la comunidad (Chang, 1985; Maxted *et al.*, 1997).

En cualquier caso, la percepción de la erosión genética como un problema a escala planetaria, no tuvo lugar hasta bien entrado el siglo XX. Las señales de alarma comenzaron a tomarse en serio a mediados de los años sesenta, al descubrirse que el alto ritmo de desplazamiento de variedades primitivas cultivadas por la introducción de nuevos cultivares estaba llevando a un rápido estrechamiento de la base genética de las especies cultivadas (Dodds, 1991; Maxted *et al.*, 1997). La toma de conciencia de esta situación determinó la puesta en marcha de medidas para la conservación de los recursos fitogenéticos. Hoy en día, la conservación de recursos genéticos es aceptada de forma generalizada

como una responsabilidad social, dentro de un contexto mucho más amplio de preservación de la biodiversidad.

En este escenario, a la pérdida de recursos genéticos ocurrida por la sustitución de variedades tradicionales por cultivares modernos, hay que añadir la ocasionada a especies vegetales silvestres a consecuencia del deterioro de los ecosistemas naturales por la creciente actividad humana. La preocupación por la pérdida de la biodiversidad vegetal y la necesidad de tomar medidas para frenarla quedó especialmente patente en la firma del Convenio sobre Diversidad Biológica con ocasión de la Conferencia de las Naciones Unidas sobre el Medio Ambiente y Desarrollo celebrada en Río de Janeiro (UNCED, 1992, citado por Engelmann, 2000).

El conocimiento del alto grado de erosión genética en cultivos de importancia económica y alimenticia, condujo al establecimiento de bancos de germoplasma. Existen dos formas de conservación; la *in situ* y la *ex situ*. La primera, admite que la planta se desarrolle en su medio ambiente natural, permitiendo así los procesos evolutivos, que son la base de la adaptabilidad y diversidad genética. Por tal razón, la conservación *in situ* puede ser considerada como el sistema dinámico más conveniente para preservar la adaptabilidad ya que permite la evolución de poblaciones que continúan originando mutaciones y flujo de genes. La conservación *ex situ* o conservación estática, mantiene sin variación el material genético de la planta ya que no está sujeto a los procesos evolutivos que ocurren en su hábitat natural. Los tipos más comunes de conservación *ex situ* son los bancos de germoplasma de semilla, colecciones vivas en campo, conservación *in vitro* y criopreservación. En el presente, cerca de 6 millones de clones se encuentran almacenadas en colecciones *ex situ* alrededor del mundo. Tomando en consideración la duplicación de colecciones, el estimado de clones únicos se reduce a cerca de 1-2 millones. De acuerdo a los datos disponibles de FAO World Information and Early Warning System (WIEWS) los principales grupos de cultivares presentes en los bancos de germoplasma del mundo comprende los cereales y frutales con un 40 %, leguminosas 15 %, vegetales, raíces y tubérculos,



forrajes 10 % cada uno y aromáticas, medicinales, especias y ornamentales el resto (Morico *et al.* 1998).

## 2.2. Estrategias de conservación

El desarrollo de estrategias y tecnologías para la conservación y mantenimiento de recursos fitogenéticos es sin lugar a duda el único recurso para la seguridad en la disposición y uso de la diversidad genética de especies vegetales de importancia en la alimentación y la agricultura (Engelmann, 1995).

La conservación de la biodiversidad puede, en teoría, aplicarse a tres niveles de organización: génica, organísmica y ecológica. Las estrategias de conservación varían de acuerdo al tipo de reproducción de la especie en particular. Existen cultivares que producen semilla las cuales son llamadas ortodoxas y pueden ser deshidratadas antes de almacenarse a baja temperatura sin problema por largos periodos de tiempo. Sin embargo, hay tres principales categorías de especies para las cuales la conservación en forma de semilla es problemática. Primera, algunos cultivos tales como los plataneros no producen semilla por lo que son propagados vegetativamente. Segundo, algunas especies tales como las patatas o caña de azúcar, ambos incluyen genotipos estériles y genotipos los cuales producen semillas ortodoxas. Sin embargo, esas semillas son generalmente heterocigóticas y son de limitado interés para la conservación de genotipos particulares, por lo que estas especies son mantenidas principalmente como clones. Tercero, numerosas especies de árboles frutales y forestales, especialmente de origen tropical, producen semillas recalcitrantes, o sea que no pueden ser secadas a suficiente bajo nivel de humedad para su almacenamiento a bajas temperaturas. Existe también un gran número de especies catalogadas como intermedias para las cuales la conservación en forma de semilla es demasiado problemática. El método tradicional de conservación *ex situ* en la forma de colecciones de campo, se considera el mejor sistema para la evaluación de adaptabilidad de estos genotipos y ha sido la alternativa de conservación para

estas categorías de especies de plantas (Roberts, 1973; Ellis *et al.*, 1990; Withers y Engels, 1990, citados por Engelmann (1998); Morico *et al.*, 1998).

### 2.2.1. Conservación *in situ*

La conservación *in situ* implica una adecuada protección y gestión de sus ecosistemas. Existe un gran número de figuras de protección de espacios naturales en donde la actividad humana queda condicionada o restringida en mayor o menor medida. No obstante, frecuentemente la simple restricción de la actividad humana en el entorno no resulta suficiente para asegurar la supervivencia de las especies a conservar. La gestión activa de un ecosistema para conservar una determinada especie puede requerir medidas de intervención, como la preservación del medio físico en el que se desarrolla la especie amenazada, la potenciación de interacciones con otros organismos que lleven implícito un beneficio para la especie amenazada, y el establecimiento de programas de reforzamiento de poblaciones existentes, reintroducción en localidades donde la población ya se haya extinguido o, incluso, la introducción de nuevas poblaciones (Falk, 1989). Para poder acometer de forma apropiada este tipo de acciones resulta necesario recabar previamente una gran cantidad de información sobre la especie a proteger y su ecosistema. Por ello, el proceso de conservación *in situ* se inicia con el estudio y seguimiento en el tiempo de las poblaciones, recabando datos demográficos, genéticos y auto-ecológicos (Schemske *et al.*, 1994; Gillman, 1997). La utilización de técnicas de análisis de viabilidad de poblaciones constituye otra herramienta de gran valor por su capacidad diagnóstica y su poder de evaluación al considerar diferentes alternativas de gestión (Menges, 1986; Iriondo, 1996).

A menudo, las actividades de conservación *in situ* se encuentran con problemas de aplicación derivados de la necesidad de establecer marcos legales de protección de las áreas y hábitats pertinentes, de conflictos de interés con otras actividades humanas, y de falta de una asignación continua y a largo plazo de

recursos económicos a las instituciones encargadas de las tareas de conservación. A esto cabe añadir, en numerosas ocasiones, la falta de una información básica sobre la biología de las especies a conservar. Este tipo de limitaciones conlleva la necesidad de desarrollar métodos de conservación *ex situ*, o conservación fuera del hábitat natural, que sirvan para complementar las acciones tomadas en los hábitats naturales (Reid y Miller, 1989).

La mayor desventaja de la conservación *in situ*, está dada por la vulnerabilidad a los diversos factores, tanto antropogénicas como ambientales que pueden constituirse en amenazas a la subsistencia de las especies y de las poblaciones. Como por ejemplo, las catástrofes naturales, como los incendios, tormentas, volcanismos; además, los fenómenos derivados del cambio climático global, como sequías prolongadas y recurrentes, así como de lluvias sobre suelos erosionados, que dificultan el establecimiento de especies arbóreas o arbustivas. Existen áreas silvestres protegidas, que presentan problemas en cuanto a la representatividad genética de las especies y a la concentración de biodiversidad que conservan. Además, existen problemas derivados de la fragmentación de los hábitats, sugiriéndose aumentar el número y la superficie de las áreas protegidas y además, proteger las zonas que constituyen las vías de flujo o migraciones de las especies. Por las razones antes mencionadas, una estrategia complementaria de conservación *ex situ* permitirá resguardar la diversidad genética de las poblaciones que corren alto riesgo de extinción (Pessoa, 1998).

### 2.2.2. Conservación *ex situ*

Mientras está universalmente aceptado que el mecanismo más efectivo y eficiente para la conservación es la protección de los hábitats, también está reconocido que las técnicas de conservación *ex situ* constituyen componentes críticos en un programa de conservación global (Conway, 1988; Ashton, 1987).

Los programas de conservación *ex situ* complementan la conservación *in situ* almacenando a largo plazo germoplasma representativo de las poblaciones, orientados principalmente a resguardar el material genético de las especies de importancia para el mejoramiento genético, la industria alimenticia, farmacéutica, maderera, etc., permitiendo la conservación de especies vulnerables a procesos de erosión genética. Esto permite un mejor conocimiento de las características anatómicas, fisiológicas y bioquímicas del material almacenado, proporcionando propágulos para su utilización en programas educativos, programas de mejora genética de especies cultivadas y en planes de reforzamiento, introducción o reintroducción (McNeely *et al.*, 1990).

Los métodos de conservación *ex situ* implican la recolección de muestras representativas de la variabilidad genética de una especie y su mantenimiento fuera de las condiciones naturales en las que la especie ha evolucionado. Las ventajas que proporcionan estos métodos son control directo sobre el material, fácil accesibilidad y disponibilidad (Reid y Miller, 1989). Una vez realizada la recolección del material a conservar, la conservación *ex situ* de especies consta de dos elementos esenciales: el almacenamiento o preservación del germoplasma y el desarrollo de métodos que posibiliten su propagación. No obstante, también deben tenerse presentes otros elementos relevantes tales como la documentación y la caracterización del germoplasma almacenado (Hummer, 1999).

### 2.3. Estrategias de almacenamiento

El almacenamiento de germoplasma tiene lugar en forma de colecciones de plantas y en bancos de germoplasma (Laliberté, 1997). La apropiada estrategia de conservación depende de factores tales como, características biológicas de las plantas, su manejo presente, el uso de recursos humanos, la disponibilidad de infraestructura para su conservación, número de accesiones, situación geográfica, propósito de conservación, la disponibilidad del germoplasma y las disposiciones políticas y administrativas para el proceso (Withers, 1993).

## 2.4. Colecciones de plantas

Las colecciones de plantas constituyen el método tradicional de conservación *ex situ* de recursos fitogenéticos. Bajo esta denominación se pueden considerar tanto los jardines botánicos como las colecciones de plantas en campo. Los jardines botánicos pueden considerarse las primeras instituciones implicadas en la conservación *ex situ* de recursos vegetales. El establecimiento de colecciones de diferentes tipos de plantas se remonta a la antigüedad, estando en muchos casos vinculado a prácticas religiosas y medicinales. Sin embargo, el gran desarrollo de los jardines botánicos tal como los conocemos en la actualidad llegó de la mano de las grandes potencias coloniales, que establecieron numerosos jardines en sus posesiones de ultramar y en sus propios países como método de introducción de plantas y cultivos exóticos (Smith, 1986). Los jardines botánicos conservan alrededor de 80.000 especies, de las cuales un 10 % se encuentran en peligro de extinción (Miller *et al.*, 1995). Ello pone de manifiesto la importante contribución de la red de jardines botánicos a la conservación de especies amenazadas. La conservación en jardines botánicos presenta una serie de problemas derivados de su irregular distribución por el mundo y del escaso soporte financiero que reciben para su mantenimiento. En los países tropicales, donde reside el mayor número de especies, es donde menos jardines botánicos hay. Por ello, en el conjunto de los jardines botánicos, la flora de los países tropicales y subtropicales se encuentra peor representada que la de los países de climas templados (Maxted *et al.*, 1997). A ello hay que unir el hecho de que la variabilidad intra-específica mantenida suele ser baja, frecuentemente cada accesión está sólo representada por uno o unos pocos ejemplares. Por ello, se reconoce la necesidad de maximizar, en la medida de lo posible, la diversidad genética de las accesiones de los jardines botánicos (Heywood, 1990; Maxted *et al.*, 1997).

## 2.5. Bancos de germoplasma

Los bancos de germoplasma son centros orientados al almacenamiento mediante propágulos de una parte representativa de la variabilidad genética correspondiente a una determinada especie. Dentro de esta categoría podemos distinguir los bancos de semillas, los bancos de cultivo *in vitro*, los bancos de polen y los bancos de genes o bancos de ADN (Maxted *et al.*, 1997).

### 2.5.1. Bancos de semillas

El almacenamiento de semillas ha interesado a la humanidad desde el inicio de la agricultura. Sin embargo, no es hasta mediados del siglo pasado cuando se inicia de forma sistemática el almacenamiento de semillas con fines científicos o de conservación. El almacenamiento del material a conservar en forma de semillas constituye uno de los procedimientos de conservación *ex situ* más válidos y extendidos en la actualidad. Se ha podido evidenciar que el almacenamiento de semillas a largo plazo constituye una operación relativamente simple y económica en términos de tecnología, infraestructuras, personal y gastos de mantenimiento (Maxted *et al.*, 1997).

Mediante este método, resulta posible conservar un gran número de semillas de diferentes especies vegetales durante largos períodos de tiempo con un mínimo riesgo de daños genéticos. Por un lado, las semillas son capaces en la mayoría de los casos de permanecer viables, de forma natural, durante largos períodos de tiempo (Chin, 1994). En segundo lugar, el tamaño pequeño de las semillas, unido a la posibilidad de que cada una de ellas posea una constitución genética diferente, asegura la conservación de una gran diversidad genética en un espacio reducido (Iriondo y Pérez, 1999).

La conservación de semillas ofrece como mínimo un servicio de seguridad y apoyo a otras técnicas de conservación, mientras que, en el otro extremo, puede

constituir la única opción disponible cuando los últimos ejemplares de una especie están a punto de desaparecer (Reid y Miller, 1989). Por ello, entre todos los métodos de conservación, los bancos de semillas son los más utilizados al ser simultáneamente prácticos y económicos (Astley, 1991).

Las semillas se clasifican para su conservación como ortodoxas o tolerantes a la desecación, cuando son capaces de mantener su viabilidad tras ser desecadas al menos al 5-10 % de contenido en humedad. Por el contrario, las semillas recalcitrantes o sensibles a la desecación pierden viabilidad cuando se desecan por debajo de un límite crítico, habitualmente entre 12-30 % de contenido en humedad (Chin y Roberts, 1980). Existe una tercera categoría en la que las semillas tienen características de almacenamiento intermedias entre las ortodoxas y las recalcitrantes. Las semillas intermedias pueden ser desecadas a contenidos de humedad similares a los de las semillas ortodoxas. Sin embargo, una vez desecadas, se dañan al someterlas a bajas temperaturas y su viabilidad desciende rápidamente durante el almacenamiento (Ellis *et al.*, 1990a). Por ello, la determinación del comportamiento de las semillas de una especie constituye un tema trascendental de cara a su conservación a largo plazo. Las semillas de especies ortodoxas pueden ser conservadas en bancos de semillas convencionales bajo condiciones de baja temperatura y humedad. Por el contrario, las especies con semillas intermedias o recalcitrantes no pueden mantenerse de esta manera (Marzalina y Krishnapillay, 1999).

Afortunadamente, la mayoría de las especies silvestres de las zonas templadas del planeta son semillas ortodoxas. Las semillas recalcitrantes se encuentran en especies procedentes de zonas tropicales, especies acuáticas, especies con semillas de gran tamaño, y algunas especies arbóreas de clima templado (Chin y Roberts, 1980).

Los métodos de conservación convencionales normalmente incluyen el almacenamiento a temperaturas comprendidas entre 5 °C y -20 °C. En la conservación a largo plazo las semillas se almacenan normalmente a -18 °C,

mientras que en la conservación a medio plazo se utiliza una temperatura de 0 a 10 °C (Ellis *et al.*, 1985). Independientemente de las condiciones de almacenamiento utilizadas, la viabilidad de las muestras debe ser controlada periódicamente. Si el porcentaje de germinación es inferior al 85 % del valor inicial en muestras almacenadas en colecciones a largo plazo y al 65 % del valor inicial en colecciones activas, se recomienda su regeneración ya sea mediante nuevas recolecciones o por multiplicación a partir de las semillas viables (FAO e IPGRI, 1994).

### 2.5.2. Bancos de cultivo *in vitro*

El cultivo de tejidos es una excelente técnica para el almacenamiento de germoplasma. Las plántulas de muchos genotipos pueden ser fácilmente cultivadas *in vitro* y almacenadas bajo condiciones de refrigeración por varios años. Estas pueden ser extraídas del almacenamiento, recultivadas y posteriormente climatizadas a condiciones de invernadero. La seguridad en la conservación de recursos genéticos requiere de la aplicación de varias estrategias (Reed, *et al.* 1988; Reed y Hummer, 1995). Los métodos de conservación *in vitro* empleados varían de acuerdo a la duración de almacenamiento requerido (Engelmann, 1991 citado por Engelmann 1998). Para la conservación a mediano plazo, se requiere reducir el crecimiento incrementando los intervalos de subcultivo. Generalmente las condiciones ambientales y de medio de cultivo también son modificadas, en la mayoría de los casos se realiza una reducción en la temperatura en asociación con una disminución de la intensidad de luz o su completa supresión durante el cultivo. El almacenamiento de germoplasma a temperaturas que varían de 0 a 15 °C es utilizado para el mantenimiento de muchos recursos genéticos y colecciones de plantas libres de virus. Temperaturas en el rango de 0-5 °C son empleadas principalmente en especies tolerantes al frío, requiriéndose de temperaturas un poco más elevadas para especies tropicales. La modificación en la composición del medio de cultivo generalmente se enfoca en la reducción de la concentración de sacarosa y/o de los elementos minerales. En



ambos casos es notablemente importante limitar la evaporación en el medio de cultivo (Engelmann, 1998).

Las técnicas de conservación a mediano plazo han sido desarrolladas para un amplio rango de especies de plantas, (Withers y Willams, 1985, citado por Hvoself-Eide (1992), listaron más de 30 especies que han sido exitosamente almacenadas *in vitro*, principalmente restringiendo el crecimiento a baja temperatura, disminuyendo el potencial osmótico del medio de cultivo, y bajando el nivel de oxígeno o por la utilización de retardadores del crecimiento.

La principal desventaja de este tipo de conservación está asociada con significantes costos de mantenimiento en laboratorio y los riesgos permanentes de contaminación en el proceso de subcultivo continuo (Mix-Wagner *et al.*, 2000), sin embargo, es una herramienta significativa para el reemplazo de recursos genéticos en colecciones de campo, así como, para investigación e intercambio de germoplasma principalmente (Reed, 1998).

Los protocolos de conservación *in vitro* mantienen las siguientes etapas: a) obtención del inóculo; b) establecimiento del cultivo; c) almacenamiento; d) recuperación de un cultivo viable; e) regeneración de plantas (Dodds, 1991). En estos protocolos el almacenamiento es normalmente la etapa que implica más costos, tanto en equipamiento como en personal. En el caso de que el cultivo se mantenga en condiciones normales (crecimiento continuo), los repicados deberán hacerse en intervalos que oscilarán de varios días a varios meses, dependiendo del tipo de cultivo y de las especies. Además, en estas circunstancias, los subcultivos están expuestos a un continuo riesgo de pérdidas por accidente o contaminación, a lo que hay añadir la posibilidad de riesgo de alteraciones genéticas (variación somaclonal) (Phillips *et al.*, 1994; Lynch, 1999; Pence, 1999).

### 2.5.3. Otros bancos de germoplasma

Los bancos de polen y los bancos de yemas vegetativas son otras dos opciones de conservación que en principio podrían ser aplicables a la conservación de especies raras o amenazadas. En ambos casos, el almacenamiento se realiza a bajas temperaturas, siendo aplicables las técnicas de criopreservación. Los bancos de polen tienen la ventaja de que requieren un mínimo espacio y resultan aplicables tanto a especies con semillas ortodoxas como a especies con semillas recalcitrantes. Sin embargo, sólo conservan la mitad del genoma. Los bancos de yemas vegetativas se utilizan en la actualidad en la conservación de clones de especies frutales y requieren la puesta a punto de la técnica de micro injerto. Esta técnica podría ser también aplicable a determinadas especies arbustivas o arbóreas en peligro de extinción (Wang *et al.*, 1993).

### 2.6. Criopreservación

En la naturaleza existen mecanismos biológicos que impiden el daño por las bajas temperaturas. Existen proteínas que impiden el crecimiento de hielo de una manera no coligativa, sin afectar significativamente el punto de fusión (PF) de las soluciones en los tejidos. El factor por el que estos anticongelantes no afectan el PF implica que los cristales de hielo pueden permanecer en contacto con agua súper enfriada sin crecer. El efecto anticongelante está limitado a que si existe un suficiente enfriamiento se presentará un repentino y rápido crecimiento del cristal de hielo. Un número importante de plantas de zonas templadas son tolerantes al congelamiento en el invierno. Como en muchos insectos tolerantes al congelamiento, las plantas parecen segregar potentes proteínas anti-congelantes encontradas en sus fluidos extracelulares. Las proteínas de plantas pueden protegerlas del congelamiento desde temperaturas de -5 °C hasta -12 °C. La manera precisa en que las proteínas actúan es desconocida, pero probablemente organizan las moléculas de agua de una manera semejante a como se organizan en el hielo formando agregados de moléculas de agua. Las moléculas de agua

organizadas por las proteínas frecuentemente poseen largas secuencias de grupos cargados positiva y negativamente lo cual puede influenciar en la orientación espacial de las moléculas de agua por atracción o repulsión (Zachariassen y Kritiansen, 2000).

Artificialmente, la criopreservación es la técnica de almacenamiento de germoplasma a ultra bajas temperaturas (-196 °C) en nitrógeno líquido (NL) o en su fase de vapor (-150 °C). A esa temperatura son detenidos todos los procesos cinéticos moleculares, sin afectar la estabilidad genética del material. Actualmente es la técnica más segura y rentable, ya que el tiempo de almacenamiento es indefinido y su costo y mantenimiento son relativamente bajos.

Es ampliamente aceptada como una metodología rentable para el almacenamiento a largo plazo de una variedad de células vivas, tanto en la industria, como en la medicina, agronomía y tecnología de alimentos. La criopreservación exitosa involucra una serie de procedimientos para evitar daños a las células que tienen que ser estudiados para cada caso en específico, tanto en el congelamiento, descongelamiento y recuperación del material biológico a conservar. Esto es debido a que cada organismo o célula tiende a tener diferentes respuestas al daño causado por el congelamiento como resultado de los fenómenos de nucleación y deshidratación, así como, a los daños bioquímicos asociados al estrés oxidativo en el proceso de descongelación (Odani *et al.*, 2003).

### 2.6.1. Criopreservadores

Los daños asociados a la criopreservación convencionalmente son debidos a la tasa a la cual las células son enfriadas. En el enfriamiento a tasas de velocidad lenta, el daño puede ocurrir de dos formas; una debido al aumento en la concentración de los solutos (intra- y extracelulares) como resultado de la formación externa de hielo pudiendo ser tóxico, o bien, por la liberación de agua de las células debido a una excesiva contracción celular. Los daños causados por el enfriamiento lento pueden corregirse adicionando crioprotectores de bajo peso molecular al medio de congelación. Cuando se utilizan tasas rápidas de enfriamiento, la formación de

hielo extracelular y la concentración de solutos ocurren más rápidamente que la exosmosis de agua por la célula. Esto trae consigo un súper-enfriamiento en el citoplasma, incrementando la probabilidad de nucleación intracelular letal. La criobiología se encarga de resolver la posibilidad de estos daños enfriando las células a la más alta tasa posible sin formar hielo intracelular. La combinación de óptimas tasas de enfriamiento y la adición de crioprotectores es la base de la metodología usada para la criopreservación de células y tejidos (Acker y McGann, 2003).

Una multitud de factores influyen en la efectividad de la criopreservación de células, tejidos u órganos vegetales; por ejemplo, especie, tipo y tamaño de inóculo, edad y etapa de crecimiento, composición, pH y osmolaridad del medio de cultivo, contenido de agua del inóculo, composición y contenido de lípidos de la célula, densidad celular al congelamiento, tasa de enfriamiento, temperatura y duración del almacenamiento, adición de crioprotectores, tasa de descongelación y composición del medio de recuperación. La adición de agentes crioprotectores generalmente incrementa la tasa de supervivencia, sin embargo, existen casos de supervivencia sin aditivos protectores (Hubálek, 2003).

Los aditivos protectores (AC) pueden ser clasificados tradicionalmente de acuerdo a la tasa de penetración: aquellos que penetran rápidamente, usualmente dentro de 30 min., incluyen el etilenglicol (EG), propilen glicol (PG), dimetilformamina, metil-acetamida y dimetilsulfóxido; glicerol el cual penetra más suavemente; los mono-, oligo-, y polisacáridos, manitol, sorbitol, dextrano, hidroxietil-almidón (HES), metil-celulosa, albúmina, gelatina, otras proteínas, polivinil-pirrolidina (PVP), polietilen-glicol (PEG), o polivinil-alcohol, los cuales todos son compuestos no penetrantes, que causan crioprotección extracelular cuando se presentan a concentraciones de 10-40 %. La permeabilidad de algunos de esos compuestos por ejemplo el glicerol, dependen marcadamente de la temperatura y tipo de célula. De lo anterior se distinguen tres categorías; (1) aquellos que penetran tanto la pared celular como el citoplasma (glicerol y

dimetilsulfóxido), (2) los que penetran solo la pared celular (mono- y di-sacáridos, amino ácidos, polímeros con bajo peso molecular (PEG-1000); y (3) aquellos que no penetran ni la pared celular (polímeros con alto P.M., proteínas, polisacáridos, PEG-6000, dextrano, HES, y PVP (Hubálek, 2003).

### 2.6.2. Técnicas de criopreservación

Las primeras técnicas de criopreservación (clásicas) comprenden una serie de combinaciones de tratamientos crioprotectores seguidos por el congelamiento y almacenamiento usando congeladores programables. La técnica está basada en la acción química crioprotectora y de inducción de la deshidratación en los inóculos. Las sustancias más comúnmente usadas son el dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol, manitol, sorbitol, sacarosa, trealosa y polietilenglicol (PEG). Estos compuestos tienen principalmente una actividad osmótica pero algunos de ellos pueden entrar a las células y proteger la integridad celular durante el congelamiento. Para muchos materiales, las óptimas condiciones de congelamiento consisten en la utilización de una tasa lenta de enfriamiento ( $0.5$  a  $2$   $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ) hasta alcanzar una temperatura terminal de  $-40$   $^{\circ}\text{C}$ , y enseguida por una rápida inmersión en nitrógeno líquido (NL). Estos procedimientos son principalmente usados para el congelamiento de cultivos indiferenciados tales como suspensiones celulares y tejidos de callo. Utilizando la deshidratación física u osmótica de los inóculos seguida por una rápida congelación en NL, el éxito se deriva de una vitrificación de los solutos intracelulares, formándose una estructura cristalina amorfa sin que ocurra formación de cristales de hielo, los cuales son perjudiciales en la integridad de la estructura celular. La principal ventaja en comparación de los procedimientos clásicos es su simplicidad y que no se requiere de un congelador programable (Withers, 1985; Kartha y Engelmann, 1994 citados por Engelmann (1998).

De acuerdo a Engelmann (2000), para el congelamiento de tejidos y órganos diferenciados tales como ápices, embriones somáticos y cigóticos han sido

desarrolladas nuevas técnicas recientemente. Estas están basadas en la remoción de la mayor parte del agua del tejido sin causar daños. Se pueden identificar los siguientes procedimientos de criopreservación: (I) encapsulación-deshidratación, (II) vitrificación; (III) encapsulación-vitrificación; (IV) deshidratación; (V) precultivo; (VI) precultivo-deshidratación, y (VII) congelamiento en micro-gotas.

(I) El procedimiento de encapsulación-deshidratación está basado en la tecnología desarrollada para la producción de semillas artificiales. Los inóculos son encapsulados en esferas de alginato, precultivadas en medio líquido enriquecido con sacarosa por 1 a 7 días, parcialmente desecadas en la corriente de aire de la campana de flujo laminar o con sílica gel para disminuir su contenido de humedad a menos de 20 % (base peso fresco), y entonces congelado rápidamente. Las tasas de supervivencia son altas y la recuperación del crecimiento de las muestras criopreservadas es generalmente rápido y directa, sin la formación de callos. Esta técnica ha sido aplicada a ápices de numerosas especies de origen tropical y templado. Su aplicabilidad a suspensiones celulares y embriones somáticos también ha sido demostrada.

(II) La vitrificación puede ser definida como la transición del agua directamente de la fase líquida a una fase amorfa de hielo evitando la formación de hielo cristalino. La vitrificación incluye el tratamiento de muestras con sustancias crioprotectivas, la deshidratación con soluciones vitrificantes altamente concentradas se usan para deshidratar osmóticamente el citosol suficientemente sin causarle daño. Existen diferentes sustancias vitrificantes y sus mezclas. La más importante es designada como PVS2 (una mezcla de Glicerol-EG-DMSO) (Sakai, 2000), la cual es de baja toxicidad y no penetra al citosol (vitrificación parcial). En la vitrificación completa tanto el citosol como la solución crioprotectora son vitrificados. Posteriormente se sigue una rápida congelación y descongelación, remoción de crioprotectores y recuperación del crecimiento. Este procedimiento ha sido desarrollado para ápices, suspensiones celulares y embriones somáticos de diferentes especies.

(III) La encapsulación-vitrificación es una combinación de los procedimientos de encapsulación-deshidratación y vitrificación, donde las

muestras son encapsuladas en esferas de alginato, vitrificadas y posteriormente inmersas en NL. Esta técnica ha sido desarrollada principalmente para ápices.

(IV) La desecación es el proceso simple de deshidratación de los inóculos y la rápida inmersión en NL. Esta técnica es utilizada principalmente con embriones cigóticos o embriones axilares extraídos de semillas. Ha sido aplicada a embriones de un gran número de semillas intermedias y recalitrantes. La desecación se realiza en el flujo de aire esterilizado de la campana de flujo laminar. Las óptimas tasas de supervivencia han sido logradas cuando las muestras son congeladas con un contenido de humedad entre el 10-20 % en base a peso fresco.

(V) La técnica de precultivo consiste en cultivar las muestras en presencia de crioprotectores, enfriadas y rápidamente inmersas en el nitrógeno líquido. Esta técnica ha sido desarrollada principalmente para ápices de *Musa* spp.

(VI) El procedimiento de precultivo-deshidratación consiste en precultivar los inóculos en la presencia de crioprotectores, deshidratar en campana de flujo laminar y congelar rápidamente. Este método ha sido exitoso en segmentos de tallo de espárragos, embriones somáticos de palma de aceite y embriones cigóticos de cocotero.

(VII) La técnica de congelamiento en micro-gotas ha sido desarrollada principalmente para ápices de tomate y espárrago. Las muestras son pretratadas en medio líquido crioprotector, entonces colocados en hojas de aluminio en pequeñas gotas de crioprotector y congelados directamente por inmersión en nitrógeno líquido (NL).

## 2.7. Descripción del género *Citrus*

*Citrus* es uno de los 33 géneros en la sub-familia Aurantioideae de la familia de las Rutáceas (Swingle y Reece, 1967).

La taxonomía del género no está precisamente establecida, pero, citrón (*C. medica*), mandarina (*C. reticulata*), y pomelo (*C. máxima*) son considerados los más similares a los ancestros de los tipos de cultivares modernos de cítricos. Estas tres especies se reproducen sexualmente. Los demás importantes tipos,

naranja, toronja, limón y lima, se cree se han originado de una o más generaciones de hibridación entre esos géneros ancestrales. Muchos de los cultivares de naranja, toronja y limón se cree también tienen su origen de plantas nucelares. Consecuentemente, la cantidad de diversidad genética dentro de esos grupos es relativamente baja. Contrariamente, las mandarinas, pomelos y citrones tienen altos niveles de diversidad genética debido a que muchos de los cultivares tienen hibridación sexual. Los cítricos silvestres son relativamente raros. Los cítricos hibridan rápidamente en algunas instancias, debido a la embrionía nucelar. Estos factores hacen que la propagación se realice vegetativamente por injerto, una vez efectuada la selección de líneas élite (Scora, 1975; Barrett y Rodees, 1976; Linnaeus, 1753; y Hooker, 1875, citados por Swingle y Reece, (1967).

## 2.8. Origen de los cítricos

Al tener su centro de origen/diversidad en el sureste de Asia, es ahí donde existe la mayor cantidad de diversidad de germoplasma de *Citrus*, particularmente *in situ*. Sin embargo en los países como la India y China, el desarrollo y la destrucción de hábitats ocurren muy rápidamente, dando como resultado en la pérdida de material genético. Reconociendo esta amenaza, se han realizado esfuerzos para la conservación *ex situ*, así como la preservación de los hábitats. Fuera de los centros de origen/diversidad, las colecciones consisten mayormente en líneas avanzadas y variedades comerciales. El sur de China es uno de los centros de origen/diversidad de *Citrus* y especies relacionadas, y un amplio rango de diversidad genética aparentemente todavía está presente *in situ*. La exploración y colección de los recursos genéticos de los cítricos nativos inició en los 50s y 60s, pero fue interrumpida por la Revolución Cultural de 1967-1972. Las investigaciones gubernamentales continuaron durante los 70s y 80s y descubrieron nuevas especies putativas, incluyendo, *C. honghensis*, *C. mangshanensis*, *C. daoxianensis*, y *Poncirus polyandra*. Estas especies son en su mayoría poco conocidas fuera de China. La exacta composición de las



colecciones es desconocida, pero un alto porcentaje es germoplasma nativo, indudablemente representa una substancial cantidad de diversidad. En la India, el centro de origen/diversidad es la región noreste. Desafortunadamente, esta región presenta inestabilidad social, por lo que resulta difícil realizar exploraciones y evaluaciones de la diversidad genética. Aparentemente existen algunas locaciones de cítricos silvestres en esas áreas. Una larga historia de cultivo y selección han producido muchos genotipos por lo que su separación de los cítricos silvestres resulta difícil. Aunque indudablemente, todavía existe un amplio rango de diversidad genética en esas áreas. Otras regiones de origen/diversidad incluyen las Himalayas central y del noreste y la de Maharashtra. Las grandes colecciones *ex situ* de cítricos fuera de su centro de origen/diversidad, se encuentran en Argentina, Australia, Brasil, Corsica, Maruecos, Nueva Zelanda, Sudáfrica, España, Turquía, y los Estados Unidos. Algunas de las colecciones más grandes pueden tener selecciones de la misma variedad, y por esto la diversidad genética es menor de lo que podría esperarse por el número de accesiones (Swingle y Reece, 1967).

## 2.9. Distribución de los cítricos

El cultivo de los cítricos se confunde con la historia de las antiguas civilizaciones, quienes los cultivaron primero por sus perfumes y más tarde por sus frutos. Es con el esplendor de las civilizaciones china e hindú, cuando el cultivo inicia su propagación durante el primer milenio antes de nuestra era, por todos los países del sudeste asiático, sur de Japón y Malasia (Praloran, 1977).

En los años de 1400 d.c., después de los viajes de Marco Polo a China, los portugueses los introdujeron en el Mediterráneo. Es a partir de esta cuenca que los navegantes árabes los propagaron por las costas orientales de África hasta Mozambique. Cristóbal Colón en su segundo viaje al Nuevo Mundo en 1493 los introdujo a Haití, desde donde llegó a México por Veracruz en 1518 y después a la Florida en 1565, a Carolina del Sur y Georgia en 1577, Arizona en 1701, a

California en 1767 y a Texas hacia 1890. Actualmente, los cítricos son cultivados desde el ecuador hasta los 41 grados de latitud norte y sur (Loussert, 1990).

#### 2.10. La citricultura mundial

La citricultura mundial de cítricos al final del milenio reporta una producción de 82 millones de toneladas siendo Brasil el principal productor, seguido por Estados Unidos, China, España, México, Egipto, Argentina e Italia (FAO 1999, citado por Peña, (2000). El comercio internacional de jugo concentrado de naranja (1998/99) fue de 27, 663,600 t y está regulado por los dos principales productores; Brasil con más del 50% y Estados Unidos con más del 30%. Los principales importadores son Estados Unidos, Alemania, Países Bajos, Inglaterra y Francia (Ramos, 1997; Leos, 2001).

#### 2.11. La citricultura mexicana

La citricultura representa una importante actividad económica para nuestro país, de ella dependen alrededor de 90 mil familias. En el ciclo 1998/99 ocupó el 5º lugar con una producción de 4, 291,000 t. La superficie cultivada con cítricos en México es de 485,000 ha las cuales producen en promedio anual 5.6 millones de toneladas de fruta con un valor estimado de 4,659 millones de pesos. De la superficie total cultivada, la naranja ocupa el 69 %, el limón mexicano el 21 %, el limón persa el 3 % y la mandarina, toronja, otros limones y pomelo ocupan el 7 %. El estado de Veracruz con 176,000 ha de plantación ocupa el primer lugar en la producción de frutas cítricas, le sigue San Luís Potosí con 44,000 ha, Tamaulipas con 38,000 ha, Michoacán con 35,000 ha, Nuevo León y Colima con 32,000 ha cada uno; en conjunto, estas entidades concentran el 83% de la superficie cultivada en el país (Leos, 2001; Villarreal, 2001).

La producción de naranja y limón Persa se concentra en la región del Golfo de México, la de limón mexicano (lima) en la costa del Pacífico centro y el limón

verdadero (italiano) se produce actualmente en Tamaulipas. El principal destino de la producción de naranja en México es el mercado nacional en fresco, al cual normalmente se ha destinado más del 80 %, lo cual contrasta con Brasil y Estados Unidos, en donde más del 80 % de la producción concurre a la industria de jugo. Nuestros volúmenes procesados durante las temporadas 86-87 a 93-94 no excedieron las 400, 000 toneladas, siendo durante la temporada 94-95 cuando se alcanzan casi las 700, 000 t. La industria nacional productora de jugo concentrado está formada por 22 plantas localizadas a lo largo de la costa del Golfo de México, las cuales tienen una capacidad total de 657, 500 libras de evaporación por hora. Las exportaciones de jugo concentrado de naranja han crecido substancialmente en 1979/81 se exportó 7,100 t y en 1998 103,100 t (Ramos, 1997; Leos, 2001).

Uno de los problemas fitosanitarios más importantes que restringen la exportación de frutas fresca es la presencia de la mosca de la fruta. La excepción lo constituye el limón persa cuya exportación no está sujeta a la problemática fitosanitaria. México exportó a Estados Unidos aproximadamente 0.75 millones de bushels en 1985 y para 1998 la exportación alcanzó los 7.6 millones de bushels (Leos, 2001).

## 2.12. Conservación de germoplasma de cítricos

Fuera de los centros de origen/diversidad, las colecciones consisten principalmente de líneas avanzadas y variedades comerciales. Según reporte de la FAO existen localizadas colecciones de campo en más de 50 países. La conservación de cultívars y porta injertos de cítricos, ha estado restringida a las limitaciones impuestas por las colecciones de campo. Sin embargo, los costos para la conservación de la diversidad en colecciones *ex situ* de germoplasma son altos, requieren de grandes espacios, gastos en mantenimiento, monitoreo y evaluación periódica de su desarrollo y procesos de adaptación, control de plagas y enfermedades, además presentan la desventaja de estar siempre expuestas a contingencias ambientales y distintos tipos de estrés biótico (Menini, 1998).

En México existen 6 bancos de germoplasma de cítricos como colecciones de campo. Se encuentran localizados en los Campos Agrícolas Experimentales de Culiacán, Sin., General Terán, N.L., Tecomán, Col., Oaxaca, Oax., Uxmal, Yuc., todos ellos pertenecientes al Instituto Nacional de investigaciones Agrícolas (INIA) y el Centro Nacional de Investigación y Experimentación Citrícola Gral. Francisco Villa, el cual cuenta con la principal colección con 257 variedades en Guémez, Tamaulipas (Leos, 2001).

### 2.13. Criopreservación de meristemos, brotes y yemas

Reed y Lagerstedt (1987), describieron una metodología para el congelamiento de meristemos de 5 cultivares de *Rubus*. Los meristemos fueron aislados de plantas cultivadas *in vitro*. Usaron como sustancias crioprotectoras las siguientes soluciones: dimetilsulfóxido (DMSO) al 5 % y 10 %; polietilenglicol al 10 %, glucosa al 10 % y DMSO al 10 % (PGD); y polietilenglicol al 10 %, trealosa al 10 %, y DMSO al 10 % (PTD). Se emplearon meristemos de 0.6 a 1.0 mm. cultivados 48 h en medio de Anderson con 5 % de DMSO y posteriormente pretratados en una solución de DMSO 5 % en medio líquido por 1 h. Posteriormente las muestras fueron congeladas hasta una temperatura terminal de  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  a una tasa de  $0.8\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  y luego almacenadas en NL por 1 h. El proceso de descongelado fue rápido a una temperatura de  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 90 segundos. El tratamiento con 5 % de DMSO fue efectivo para la sobre vivencia (4-12 %) en solo 3 de los clones. El tratamiento con la mezcla 10 % (PEG), 10 % Glucosa y 10 % DMSO (PGD) mostró la mejor tasa de supervivencia en todos los genotipos. La regeneración también se vio afectada por los distintos tratamientos, siendo las mezclas de DMSO y PEG ya sea con glucosa o trealosa (PGD y PTD) los que mejor resultados dieron para todos los cultivares (50-75 % y 40-100 %) respectivamente.

El proceso de aclimatación al frío como una forma de incrementar la supervivencia de meristemas al almacenamiento criogénico fue investigado por Reed (1988). Se utilizaron para este estudio meristemas obtenidos de plantas de *Rubus* cultivadas *in vitro*. Las condiciones de precultivo para aclimatación al frío consistieron de la aplicación de un fotoperiodo de 8/16 h (luz/oscuridad) con  $25\text{ }^{\circ}\text{C}/\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante una semana. Los crioprotectores usados fueron una combinación de polietilenglicol al 10 %, glucosa 10 % y DMSO 10 % en agua (PGD). Los meristemas disectados de las plantas aclimatadas y no aclimatadas se crecieron previamente 48 h en medio de cultivo con DMSO al 5 %, retomando los meristemas aclimatados a las mismas condiciones de cultivo. Posteriormente estos fueron colocados en los viales a los cuales se les fue agregando la mezcla PGD a  $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$  por media hora y posteriormente congelados hasta la temperatura terminal de  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  a una tasa de  $0.8\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  para después almacenarse a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ . La descongelación se realizó a  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 60 segundos y posteriormente a  $23\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Después las muestras fueron re-cultivadas en medio sólido. En la regeneración posterior a la criopreservación se observó que en los meristemas no aclimatados hubo formación de callo y la tasa de supervivencia varió desde 18-41 %; en contraste, los meristemas aclimatados presentaron tasas de supervivencia desde 51-67 %. Esto demostró que el proceso de aclimatación genera mecanismos de tolerancia al congelamiento en cultivares de *Rubus*.

La susceptibilidad a la criopreservación mediante la aclimatación de 4 cultivares y un híbrido de pera (*Pyrus communis* L.) fue también probada por Reed (1990). Los meristemas (0.8 mm.) fueron aislados de plantas cultivadas *in vitro* en el medio de Cheng. El proceso de aclimatación se desarrolló a un fotoperiodo de 8/16 h (luz/oscuridad) a  $22\text{ }^{\circ}\text{C}/\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  por una semana. Posteriormente fueron precultivados en medio suplementado con DMSO al 5 %. El proceso de crioprotección se desarrolló adicionando una solución de PGD a  $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 30 min. El proceso de congelación se efectuó hasta una temperatura terminal de  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  a una tasa de congelación desde 0.1 hasta  $0.8\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  para luego almacenarse en NL. El proceso de descongelamiento fue a  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 1 min. y posteriormente

enfriados a 23 °C. Se cambiaron los crioprotectores por medio de cultivo y se transfirieron los meristemas a medio sólido. El proceso de aclimatación mostró mejores resultado que sin este. Los porcentajes de supervivencia para los materiales no acondicionados fueron detrimentales (desde 0 hasta 26 %), mientras que los aclimatados variaron desde 5 % hasta 95 % dependiendo de la tasa de congelación. La supervivencia se incrementó con la disminución de las tasas de la congelación. La regeneración de meristemas descongelados fue muy semejante con materiales aclimatados que sin ello. En este experimento varios factores se vieron envueltos en la supervivencia a la criopreservación, uno a ser considerado fue el vigor de los cultivos *in vitro*. La pérdida de vigor puede contribuir a baja tolerancia a la deshidratación o al enfriamiento, así como, disminución del crecimiento en el medio de cultivo después de la descongelación. Otros estudios han demostrado que las tasas de supervivencia son también afectadas por la composición del medio como a las condiciones de enfriamiento.

Brotes apicales de 5 géneros y 38 especies y cultivares ornamentales de *Caryophyllaceae*, fueron criopreservados por Fukai *et al.* (1991). Los brotes apicales (0.5-0.7 mm.) fueron disectados de plantas crecidas en invernadero y colocados en una solución de DMSO al 10 % y Glucosa al 3 % incubándose por 1 h a 0 °C. Se congelaron hasta una temperatura terminal de -40 °C con una tasa de congelación de 0.5 °C·min<sup>-1</sup> antes de congelarse en NL. El descongelamiento se realizó a una temperatura de 30 °C. Los brotes apicales fueron cultivados en medio MS, vitaminas, 0.1 mg·l<sup>-1</sup> de BA, 0.5 mg·l<sup>-1</sup> de ANA y 20 g·l<sup>-1</sup> de sacarosa por 40 días antes de evaluar su regeneración. Fueron observadas altas tasas de regeneración en todas las especies y cultivares. Treinta de los 38 cultivares regeneraron al 100 %, únicamente 3 especies mostraron tasas menores del 50 % de supervivencia. Esto puede ser debido a que el medio de regeneración pudo haber sido inadecuado.

Tannoury *et al.* (1991), establecieron un proceso de criopreservación por vitrificación para brotes apicales de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.). Los

resultados indicaron que la resistencia de los brotes apicales al nitrógeno líquido fue alta sin importar la tasa de enfriamiento en el rango de 20 °C·min<sup>-1</sup> (73 %) hasta 0.5 °C·min<sup>-1</sup> (93 %). En el proceso de enfriamiento directo hasta -196 °C, la supervivencia fue de 83 %. Esto indicó que la vitrificación fue el mecanismo que permitió mejorar la tasa de supervivencia. En este experimento se utilizaron brotes apicales disectados de plantas de 8 semanas de cultivo *in vitro*. En esta técnica, el domo meristemático acompañado de 2 primordios de hoja fueron encapsulados en alginato. Después de un precultivo de 12 h en medio líquido suplementado con sacarosa 0.7 M, las cápsulas fueron transferidas a medio líquido el cual fue progresivamente enriquecido hasta una concentración final de 6 gr. de sacarosa por 4 gr. de agua. Enseguida estos fueron almacenados por 5 h a 0 °C en una solución conteniendo 6 gr. de sacarosa, 4 gr. de agua y 6 gr. de etilenglicol. Las esferas conteniendo 1-3 brotes fueron entonces enfriadas por inmersión directa en el nitrógeno líquido, o por un segundo procedimiento, en el cual las esferas fueron primeramente congeladas a -150 °C a diferentes tasas de enfriamiento (0.5-20 °C·min<sup>-1</sup>) y después inmersas en el nitrógeno líquido.

La criopreservación de brotes apicales de papa dulce [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.], mediante el pre-tratamiento de vitrificación con algunos crioprotectores fue reportada por Towill y Jarret (1992). El inóculo fue tomado de brotes de segmentos nodales de plántulas cultivadas *in vitro*. Se usaron domos meristemáticos de 0.5-0.7 mm. conteniendo de 3 a 4 primordios de hoja. El protocolo de inducción de vitrificación se desarrolló con una solución de glicerol 30 % (w/v), etilenglicol 15 % (w/v), y DMSO 15 % en medio MS con 0.4 M de sacarosa (PVS2). Esta solución se diluyó para obtener los tratamientos (20, 40, 60, 80, y 100% v/v) los cuales se fueron adicionando gradualmente a una temperatura de 0 °C para después congelarse en NL. Los ápices se descongelaron a 30 °C y se colocaron en el medio de regeneración. El efecto del tiempo de exposición a diferentes concentraciones de PVS2 mostró que a altas concentraciones tiene efectos fitotóxicos, la supervivencia de aquellos que no fueron expuestos al PVS2 pero si al MS2 sobrevivieron el 100 %. La concentración de PVS2 desde 20 hasta 80 %

no fue tóxica dentro de los tiempos de exposición estudiados, sin embargo, la exposición de los brotes en la solución PVS2 al 100 % disminuyó grandemente la supervivencia.

Niino *et al.*, (1992), criopreservaron exitosamente brotes apicales de manzana (*Malus domestica* Borkh. cv. Fuji) utilizando la técnica de vitrificación. Los brotes apicales (1.5-2.0 mm.) fueron obtenidos de plantas cultivadas *in vitro*. Se probaron además otros 5 cultivares de manzana, 1 híbrido y 3 porta injertos, así como, 8 cultivares de pera (*Pyrus pyrifolia*). Estos fueron aclimatados 1-2 días a 5 °C en medio MS con 0.7 M de sacarosa. Después, estos fueron vitrificados en solución PVS2 en medio MS con 0.4 M de sacarosa por 20 min. y luego remplazada por PVS2 a varios periodos de tiempo antes de almacenarse en nitrógeno líquido. Después de descongelarse en agua a 25 °C se drenó el PVS2 y se colocaron en medio sólido MS (excluido el nitrato de amonio) para su regeneración. Los resultados mostraron que los brotes regenerados de material vitrificado aumentaron su supervivencia con el incremento de tiempo de exposición en el PVS2, alcanzando un máximo a 80 min. Los Brotes tratados con PVS2 por encima de 80 min. pero que no fueron congelados mostraron 90 % de supervivencia, sin embargo, largas exposiciones mostraron disminución de formación de brotes hasta cerca del nivel de los vitrificados, demostrándose claramente que la pre-aclimatación al frío mejoró significativamente la tasa de supervivencia, por lo que parece ser que la incubación en PVS2 es selectiva para ciertas especies.

Reed (1993), evaluó la respuesta a la criopreservación de cultivares y especies de *Rubus* (blackberry y raspberry) optimizando el uso de crioprotectores, tratamientos de aclimatación, y diferentes tasas de congelación. En la aclimatación las plántulas cultivadas *in vitro* fueron almacenadas por una semana a un termoperiodo de 8/16 h día/noche a temperatura de 22/-1 °C. Se disectaron de ellas meristemos de 0.8 mm. los cuales fueron mantenidos por 48 h en medio basal MS con DMSO al 5 %. Se utilizó como crioprotector la mezcla PGD. Las

---



muestras fueron congeladas hasta  $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$  a una tasa de congelación de  $0.8\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  y posteriormente almacenadas en NL por 1 h. La descongelación se realizó a  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$  y el crioprotector fue drenado y remplazado por medio MS. Para la regeneración los meristemas fueron mantenidos en medio sólido MS por 1 mes antes de la evaluación de la supervivencia. Los resultados mostraron que la aclimatación al frío mejoró notablemente la supervivencia de los genotipos de *Rubus* variando desde 23.1 hasta 74.5 % según el genotipo.

La criopreservación por vitrificación de meristemas de wasabi (*Wasabia japonica*) fue evaluada por Matsumoto *et al.*, (1994). Ellos utilizaron meristemas (1 mm.) provenientes de plántulas cultivadas *in vitro*, los cuales fueron precultivados en medio basal MS (50 %) con diferentes concentraciones de sacarosa por 1-3 días. Los meristemas fueron entonces tratados con varios crioprotectores por 5-20 min. a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  antes de la deshidratación con la solución vitrificante PVS2. Los meristemas fueron finalmente almacenados en NL por 1 h. La descongelación se realizó a  $40^{\circ}\text{C}$  por 1 min. Se drenó después la solución PVS2 y se remplazó por una solución de sacarosa 1.2 M por 20 min. Los meristemas fueron transferidos después a papel filtro esterilizado y colocado sobre medio basal MS (50 %) conteniendo  $0.1\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de BA y 3 % de sacarosa para su regeneración. La más alta tasa de formación de brotes de los meristemas pretratados con sacarosa fue observada en los meristemas protegidos con la mezcla de glicerol 2 M y sacarosa 0.4 M, esto ocurrió con los meristemas pretratados con sacarosa 0.3 M con un 87.1 % de formación de brotes, mientras que, los no tratados solo alcanzaron un 12.5 %. Respecto al efecto del tiempo de precultivo con la mezcla de glicerol 2 M con sacarosa 0.4 M se observó un 100 % de formación de brotes con 1 día de precultivo comparado con el 61.2 % con los meristemas no tratados. Con los tratamientos de 3 días de precultivo el porcentaje varió desde 25.0 hasta 40.0 % con los meristemas no protegidos y protegidos respectivamente. El efecto en el porcentaje de formación de brotes respecto al tiempo de exposición en PVS2 fue más alto con 10 min. a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  ó por 30-50 min. a  $0^{\circ}\text{C}$ .

Meristemos apicales de plántulas cultivadas *in vitro* de gooseberry (*Ribes*) y grosellas fueron criopreservadas exitosamente usando una variedad de técnicas. Para todos los procesos de congelación los cultivares fueron primeramente aclimatados a un termoperiodo de 8/16 h a 22/-1 °C antes de disectar los meristemos de 0.8 mm. Para la técnica de congelamiento lento los meristemos fueron cultivados por 2 días en medio basal RIB con DMSO al 5 % y luego transferidos a medio líquido adicionado de la solución crioprotectora PGD por 30 min. a 4 °C, seguido por enfriamiento a una tasa de 0.3 o 0.5 °C·min<sup>-1</sup> hasta -40 °C antes de almacenarse en NL. Posteriormente, las muestras fueron descongeladas por 1 min. en agua a 45 °C y enfriadas a 22 °C por 2 min. Se enjuagaron con medio basal RIB y se colocaron en medio sólido para su regeneración. Los resultados no mostraron diferencias significativas en la supervivencia para ninguno de los genotipos, a las 2 tasas de congelamiento estudiadas, variando desde 25 hasta 65 %. Para la técnica de encapsulación-deshidratación los meristemos disectados fueron encapsulados en esferas de alginato y cultivadas en medio líquido RIB conteniendo sacarosa 0.7 M por 18 h. Después del pre-tratamiento las esferas fueron colocadas en cajas de petri y secadas en el flujo de aire de la campana por 2 o 3 h antes de almacenarse en NL. Para la descongelación, los viales con las cápsulas fueron expuestas a la temperatura ambiente por 15 min. y entonces colocadas en cajas con medio basal RIB para su regeneración. Los resultados mostraron significativamente altas tasas de supervivencia con el tratamiento de 3 h de deshidratación de las esferas desde 58 hasta 82 %. Para la técnica de vitrificación, los meristemos fueron cultivados en medio con DMSO al 5 %. Posteriormente fueron colocados en la solución vitrificante PVS2 y mantenidos en baño de hielo. Después se almacenaron en NL. Para su descongelación se utilizó agua a 45 °C y luego enfriados a 22 °C por 2 min., y enjuagados con medio RIB con sacarosa 1.2 M. La supervivencia varió de acuerdo al genotipo. Los mejores resultados se obtuvieron con la utilización de DMSO (68 %), sin embargo, para el genotipo *R. rubrum* cv. cherry ninguno sobrevivió. Una modificación al método de vitrificación se realizó para mejorar la supervivencia del control y los meristemos enfriados después de exponerse al PVS2. Los meristemos pretratados

por 2 días en medio con DMSO al 5 % fueron tratados con el crioprotector PGD 30 min. antes de exponerse a PVS2 por 20 min. El congelamiento y descongelamiento fue el mismo que para el proceso de vitrificación. En los resultados no se encontró mejora en la supervivencia al utilizar el adicional pre-tratamiento con PGD, los porcentajes de sobre vivencia variaron desde 4-60 % de acuerdo al genotipo (Reed y Yu, 1995).

Meristemas apicales derivados de brotes adventicios de *Lilium japonicum* Thunb. fueron criopreservados por Matsumoto *et al.*, (1995). Los brotes adventicios fueron primeramente aclimatados a 0 °C por 7-30 días antes de aislar los meristemas (1 mm.). Estos fueron incubados en medio basal MS conteniendo sacarosa 0.3 M por 1 día a 25 °C. Para el procedimiento de vitrificación se utilizaron varias soluciones crioprotectoras por 20 min. a 25 °C. Posteriormente fueron deshidratadas por exposición a PVS2 a 0 °C y 25 °C por varios periodos de tiempo antes de almacenarse en NL. La descongelación se realizó a 45 °C. Después fue removido el PVS2 y se adicionó sacarosa 1.2 M por 20 min. antes de colocarse en el medio de regeneración. La más alta tasa de formación de brotes después del descongelamiento ocurrió con los meristemas tratados con la mezcla de glicerol 2 M adicionado de sacarosa 0.4 M o con glicerol con DMSO al 10 % y sacarosa 0.3 M. El acondicionamiento de los meristemas a 0 °C por 7 días incrementó significativamente la tasa de formación de brotes desde 40 hasta 72 %. Con respecto al tratamiento con PVS2 el mejor resultado se logró con la exposición por 100-110 min. a 0 °C, o con 20 min. a 25 °C con una tasa de 80 % de formación de brotes.

Brotos apicales disectados de plántulas de betabel (*Beta vulgaris* L.) cultivadas *in vitro* fueron criopreservadas usando la técnica de encapsulación-deshidratación. Los brotes fueron encapsulados en esferas de alginato y precultivadas por 24 h en medio líquido enriquecido con diferentes concentraciones de sacarosa desde 0.3 hasta 1 M. Las esferas fueron subsecuentemente deshidratadas en sílica gel antes de almacenarse en NL por 1

h. Posteriormente fueron descongeladas a 38 °C por 2 min. antes de colocarse las esferas en el medio de regeneración. No se encontró diferencia cuando las esferas fueron precultivadas por 24 h en presencia de sacarosa 0.3 M, sin embargo, a concentraciones de 1 M disminuyó la formación de brotes. Solo se encontró supervivencia cuando los brotes fueron deshidratados por 7 h, alcanzando una máxima tasa del 29 %, cuando el contenido de humedad estuvo entre 20-21 % (Vandenbussche y DeProft, 1996).

Benson *et al.*, (1996), criopreservaron brotes apicales de cultivares de *Ribes nigrum* provenientes de plantas micropropagadas mediante el uso de varias técnicas. Todas las plantas fueron aclimatadas a un termoperiodo de 8/16 h a 22 °C/-1 °C por 1 semana antes de aislar los brotes. Para el proceso de vitrificación los meristemas fueron pretratados por 2 días en el medio de RIB conteniendo DMSO al 5 %. Después de removerse éste se adicionó la solución PVS2 por 20 min. antes de almacenarse en NL. La descongelación de las muestras se realizó a 45 °C por 1 min. y enfriadas luego a 22 °C por 2 min. Los brotes fueron luego enjuagados con medio líquido RIB con sacarosa 1.2 M y transferidas al medio RIB para su regeneración. Los resultados mostraron diferencias genotípicas en la supervivencia y formación de brotes, desde 20 % para la variedad ben more hasta 60 % para ben tron. En el proceso de encapsulación-deshidratación, los meristemas fueron encapsulados en esferas de alginato y pre-tratadas por 18 h en medio líquido RIB con 0.75 M de sacarosa. Posteriormente las esferas fueron deshidratadas en el flujo de la campana por 3 o 4 h antes de almacenarse en NL. La descongelación se realizó a temperatura ambiente por 15 min. y las esferas fueron colocadas en el medio RIB para su regeneración. En los resultados se encontraron menores diferencias genotípicas, con una producción de brotes de 80 % en ambos genotipos. Para la técnica de congelación programada, los meristemas fueron aclimatados por 2 días en el medio RIB con DMSO 5 % y removido éste, se adicionó el crioprotector PGD por 30 min. a 4 °C seguido por enfriamiento a una tasa de 0.5 °C·min<sup>-1</sup> hasta una temperatura terminal de -40 °C,

antes de almacenarse en NL. Esta técnica mostró recuperaciones menores del 20 % de supervivencia.

Brotos apicales de taro (*Colocasia esculenta* L. Schott.) fueron criopreservados por vitrificación, utilizando diferentes tamaños de inóculo. Después de disectados (2 mm.), fueron precultivados en medio MS conteniendo diferentes concentraciones de sacarosa en la oscuridad. Posteriormente los inóculos fueron tratados con varias soluciones crioprotectoras. Las yemas axilares y los brotes apicales fueron directamente inmersos en las soluciones. Posteriormente los inóculos fueron colocados en la solución PVS2 por 10-60 min. a 25 °C y almacenados en NL por 1 h. Después se descongelaron en agua a 40 °C, la solución PVS2 se reemplazó con una solución de sacarosa 1.2 M manteniéndose por 10 min. a 25 °C. Los brotes descongelados fueron transferidos a medio MS con sacarosa 0.3 M. Después de 2 días los inóculos fueron transferidos a medio MS con 0.1 M de sacarosa para su recuperación. Con respecto al tiempo de exposición al PVS2, la más alta tasa de sobre vivencia (25.8 %) se encontró en los tratamientos mantenidos por 20 min. en la solución, para los meristemas de 0.8 mm. Las yemas axilares y brotes apicales de 2 mm. tuvieron muy baja tasa de sobre vivencia (5 %). A fin de mejorar la tasa de sobre vivencia, se desarrolló una variante en la cual los inóculos fueron pretratados con la mezcla glicerol 1.5 M, sacarosa 0.4 M y DMSO 0.5 % por 20 min. antes de la solución PVS2. Los resultados mejoraron notablemente, alcanzando una tasa de supervivencia de 77 % con un tiempo de exposición de 10 min. También se observó que el incremento en la supervivencia mejoraba con respecto a la edad de las plantas donadoras, sugiriendo que las condiciones fisiológicas son un factor importante en la tolerancia a los procedimientos criogénicos.

Maruyama *et al.*, (1997), evaluaron la criopreservación de germoplasma de *Guazuma crinita*, un árbol de la Amazonia peruana, utilizando como inóculo clusters de yemas cultivadas *in vitro*, utilizando el medio Woody Plant (WPM), las siguientes mezclas de criopreservación: a) glicerol 30 %, etilenglicol 15 % y DMSO

15 %; b) glicerol 25 %, sacarosa 15 %, etilenglicol 15 %, DMSO 13 %, y polietilenglicol 2 %; c) etilenglicol 35 %, DMSO 10% y polietilenglicol 5 %. La tasa de supervivencia de las yemas después del almacenamiento en NL dependió del tamaño del inóculo, de la mezcla de criopreservadores y del tiempo de exposición a los mismos. Altas tasas de supervivencia (73-85 %) fueron logradas en los inóculos pequeños de 1.0-1.5 mm<sup>3</sup>, pretratados con la mezcla a o b por 5-90 min. En contraste, los inóculos grandes (3.0-4.0 mm<sup>3</sup>) y aquellos tratados con la mezcla c, no sobrevivieron. La más alta tasa de supervivencia fue lograda en los inóculos tratados con la mezcla a por 15-45 min. o por la mezcla b por 15-60 min.

Escobar *et al.*, (1997), desarrollaron un protocolo para la conservación en NL de brotes apicales de cassava (*Manihot esculenta* Cranz). Los brotes apicales fueron primero precultivados en el medio basal MS conteniendo sorbitol 1 M, DMSO 0.1 M, y sacarosa al 4 %, a 26-28 °C en la oscuridad antes de la criopreservación. Para la criopreservación los brotes apicales se colocaron previamente en una solución crioprotectora de DMSO 10 % y sorbitol 1 M por 2 h en hielo. Después de remover los crioprotectores los brotes fueron deshidratados antes de su congelación. Después de la congelación hasta -40 °C, los inóculos fueron almacenados en NL. La descongelación se realizó a 37 °C y recuperados secuencialmente en 2 medios de cultivo a 25 °C en la oscuridad. Las tasas de recuperación variaron desde 50-70 %.

Phunchindawan *et al.* (1997), establecieron una metodología para criopreservar brotes apicales de rábano (*Armoracia rusticana*) mediante dos técnicas. Primeramente, los brotes apicales fueron encapsulados en esferas de alginato y precultivados en medio basal MS adicionado de 0.5 M de sacarosa por 1 día y entonces deshidratados en una solución concentrada de PVS2 por 4 h a 0 °C antes de almacenarse en NL. La tasa de supervivencia obtenida fue del 69 %. Utilizando una variante en la que se substituyó la deshidratación de las esferas con PVS2 por glicerol 1.5 M por 1 día y secados en el flujo de aire de la campana antes de almacenarse en NL. La tasa de supervivencia alcanzó el 90 %.

Melón (*Cucumis melo* L. cv. *pince melon*) fue exitosamente criopreservado utilizando como inóculo brotes primordiales, mediante la técnica de congelación programada. Meristemos apicales hasta con 1 hoja primordial fueron precultivados por 3 días en medio basal líquido MS con 3 % de sacarosa y  $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de BA. Esta solución fue intercambiada por las soluciones crioprotectivas de sacarosa, DMSO y glicerol a varias concentraciones por 0.5-3 h., y entonces congeladas hasta  $-8 \text{ }^{\circ}\text{C}$  a una tasa de  $0.5 \text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  y mantenidas por 30 min. para posteriormente enfriarse a una tasa  $0.3\text{-}1 \text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  hasta  $-40 \text{ }^{\circ}\text{C}$  antes de almacenarse en NL. La descongelación se desarrolló a  $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$  y el medio de criopreservación se diluyó adicionando sacarosa 3 o 10 % por 20-30 min. antes de transferirse al medio de regeneración MS con sacarosa 3 %,  $0.2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de BA y  $0.2\text{-}1.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de GA3. La más alta tasa de supervivencia fue del 80 % y la de regeneración de brotes del 30 %. Estos resultados se obtuvieron con una combinación de sacarosa 10 %, DMSO 10 %, y 5 % glicerol incubados por 30 min. La ausencia (0 %) o concentraciones altas (10 %) de glicerol en el medio de crioprotección disminuyeron la viabilidad hasta el 36 % (Ogawa *et al.*, 1997).

Suzuki *et al.*, (1998), investigaron el efecto de la criopreservación en la supervivencia, organogénesis y crecimiento de plantas regeneradas a partir de segmentos nodales de espárragos (*Asparagus officinalis* L.) que fueron aislados de plantas cultivadas *in vitro*. La adición de DMSO a la solución de congelación desde 8-16 % con o sin azúcar (glucosa, sorbitol, o sacarosa) fue exitosa para la criopreservación programada. La frecuencia de la formación de raíz fue de 59.3 % de los segmentos nodales sobre vivientes a la criopreservación significativamente más alta que los segmentos que únicamente se congelaron sin los azúcares. Esto sugiere que el incremento en la frecuencia de formación de raíz parece ser inducida por el procedimiento criogénico empleado. Así mismo, la promoción de brotes se notó incrementada con el porcentaje de formación de raíz.

Para la criopreservación de wasabi (*Wasabia japonica*) se disectaron meristemos de 1 mm. de plántulas cultivadas *in vitro*. Los meristemos se precultivaron en medio basal MS (50 %) conteniendo varios solutos 0.3 M (sacarosa, trealosa, sorbitol y prolina) por 16 h. El procedimiento de vitrificación se realizó con la solución concentrada de PVS2 para después almacenarse en NL. Después de la descongelación rápida, se drenó el PVS2 y se reemplazó con solución de sacarosa 1.2 M manteniéndose por 20 min. Los meristemos fueron transferidos posteriormente a medio MS con 0.1 mg·l<sup>-1</sup> de BA y 3 % de sacarosa para su regeneración. El efecto del precultivo con varios solutos en la formación de brotes varió desde 50.0, 53.5 y 55.0 % para sorbitol, sacarosa y trealosa respectivamente cuando se deshidrataron en PVS2 por 10 min., sin embargo, el tratamiento con prolina fue detrimento (5.0 %). A las mismas condiciones de deshidratación, pero precultivando con sacarosa 0.3 M en combinación con varias concentraciones de glicerol se obtuvo una tasa de formación de brotes de 55.0, 65.0, 76.7, 88.3 y 82.5 % para las concentraciones de glicerol a 0.0, 0.1, 0.3, 0.5, 1.0 M. La más alta tasa de formación de brotes se obtuvo cuando se precultivó con sacarosa 0.3 y se vitrificó con la mezcla de glicerol 2 M y sacarosa 0.4 M alcanzando un 97.5 % (Matsumoto *et al.*, 1998).

Vandenbussche y De Proft (1998), usando la técnica de encapsulación-deshidratación criopreservaron brotes apicales de betabel (*Beta vulgaris* L.) analizando la influencia del ácido abscísico (ABA) y la aclimatación al frío. Los inóculos fueron aislados de plántulas cultivadas *in vitro* y entonces encapsulados y deshidratados antes de almacenarse en el NL. Para examinar el efecto del ácido abscísico por una semana en medio suplementado con 10<sup>-6</sup> M de ABA. El efecto para la aclimatación al frío consistió de dos diferentes formas, primero, creciendo las plántulas *in vitro* a un termoperiodo de 8/16 h a 21/5 °C por una semana, y el segundo creciendo las plántulas *in vitro* a 5 °C bajo un fotoperiodo de 8 h por un mes. La tasa de supervivencia en los tratamientos con ABA varió desde 23 hasta 45 % para los brotes precultivados por una semana y un mes respectivamente. Con respecto a la influencia de la aclimatación al frío la



supervivencia mostró mejores resultados con el primer tratamiento (70 %) que con la aclimatación a un mes (68 %).

Meristemos de brotes apicales de menta (*Mentha spicata* L.) fueron criopreservados exitosamente mediante el método de encapsulación-vitrificación por Hirai y Sakai (1999). Los meristemos fueron aislados desde segmentos nodales de plántulas cultivadas *in vitro*. Los segmentos fueron primeramente aclimatados al frío a 4 °C por 1-3 semanas bajo un foto-periodo de 12 h. Los meristemos con o sin aclimatación al frío fueron encapsulados en esferas de alginato polimerizado en una solución de cloruro de calcio adicionada con glicerol 2 M y 0.4 M de sacarosa para los meristemos aclimatados al frío, y glicerol 2 M y sacarosa 0.8 M para los no-aclimatados. Para el proceso de vitrificación los meristemos encapsulados fueron deshidratados en la solución PVS2 a diferentes periodos de tiempo. Después de esto, las esferas fueron inmersas en el NL. Los resultados mostraron que el efecto a la aclimatación con respecto a tiempo fue mejor por 3 semanas produciendo cerca del 90 % de la formación de brotes. El efecto en la formación de brotes de la osmo-protección con y sin aclimatación varió desde 9.1 hasta 87 % y desde 5.6 hasta 63 %, respectivamente.

Martínez *et al.*, (1999), establecieron un protocolo para la criopreservación de brotes apicales de lúpulo (*Humulus lupulus* L.) utilizando la técnica de encapsulación-deshidratación. Después de disectados los brotes apicales fueron encapsulados en medio MS conteniendo BAP, GA<sub>3</sub>, sacarosa y alginato. Utilizaron tres tipos de precultivo: primero, incrementaron progresivamente la concentración de sacarosa desde 0.3 hasta 1 M, por doce horas en cada concentración; segundo, colocándolas directamente en 0.75 M de sacarosa y; tercero, directamente en 1 M de sacarosa. La duración del precultivo para los últimos dos tratamientos varió de 1-7 días. La deshidratación se realizó por más de 9 h antes de almacenarse en NL. Las óptimas condiciones de criopreservación consistieron por el pre-cultivo por dos días en medio MS con sacarosa 0.7 M o con los

---

tratamientos de incremento de concentración de sacarosa con 4 h de deshidratación, logrando cerca del 80 % de regeneración de brotes.

Chang y Reed (1999), analizaron la influencia de la aclimatación al frío prolongada para mejorar el crecimiento de brotes apicales de *Rubus* criopreservados. Se disectaron brotes apicales de plántulas aclimatadas al frío por dos semanas a un termoperiodo de 8/16 h a 22/-1 °C por 1-10 semanas. Los meristemas disectados se crecieron por 48 h en un medio con 5 % DMSO, para posteriormente transferirse a un medio líquido a 0 °C. Se utilizó como crioprotector una solución PGD (mezcla de PEG, glucosa y DMSO al 10 % cada uno) en el medio de cultivo antes de enfriarse a una temperatura terminal de -35 °C a una tasa de 0.5 °C·min<sup>-1</sup>, para después almacenarse en NL. Se descongelaron rápidamente a 45 °C por un minuto y después por 2 minutos a 23 °C. Los resultados indicaron que cuando la duración de la aclimatación al frío antes de la criopreservación se incrementó de 1 a 3 semanas, la supervivencia de los brotes se incrementó desde 63 hasta 90 %, ocurriendo lo mismo con la formación de brotes desde el 25 hasta el 75 %.

Ápices aislados desde plántulas de caña cultivadas *in vitro* fueron criopreservadas usando la técnica de encapsulación-deshidratación, utilizando un pre-tratamiento de 24 h en medio líquido con sacarosa 0.75 M, y posteriormente deshidratarlos hasta una humedad de 20-25 % y rápidamente inmersos en NL. Ápices de una variedad fueron almacenados por más de un año a -196, -70 y -25 °C, con o sin una previa inmersión transitoria en NL. Mientras que el porcentaje de recuperación de ápices almacenados a -196 °C se mantuvo alto y constante a través del experimento, la recuperación de los ápices conservados a -70 y -25 °C disminuyó dramáticamente en menos de un día, y fue nulo después de 10 y 120 días en almacenamiento a -25 y -75 °C, respectivamente. El porcentaje de recuperación de ápices de cuatro variedades adicionales permaneció estable después de un periodo de un año de almacenamiento a -196 °C (González-Arao *et al.*, 1999).

Niino *et al.* (2000), criopreservaron las yemas laterales de plántulas desarrolladas *in vitro* de inuala (*Solenostemon rotundifolius* mediante la técnica de vitrificación. Los segmentos nodales fueron aislados desde brotes cultivados *in vitro* y entonces cultivados en medio MS conteniendo sacarosa 0.1 M por 3 semanas. Este proceso indujo un gran número de yemas laterales uniformes. Segmentos nodales con dos yemas laterales fueron disectadas de los brotes y pre-cultivadas con sacarosa 0.3 M durante 2 días. Después fueron tratadas con una solución que contenía glicerol 2 M y sacarosa 0.4 M durante 20 minutos y deshidratada con la solución de vitrificación PVS2 por 18 minutos previo a la inmersión en NL. Las yemas laterales supervivientes continuaron con el crecimiento después de 3 días y desarrollaron brotes sin formación intermedia de callo. El promedio de recuperación de crecimiento después de la criopreservación fue de 85 %.

La criopreservación de ciruela (*Prunus domestica* L.) fue obtenida por un procedimiento de vitrificación en un paso de brotes apicales de plántulas cultivadas *in vitro* aclimatadas al frío. Los brotes fueron cultivados en un medio MS adicionado con 0.09, 0.4 o 0.7 M de sacarosa por 24 o 48 h, a 4°C, o con 0.0.9 M de sacarosa con diferentes tiempos de pre-cultivos (2 y 7 días). Después del pre-cultivo los brotes fueron tratados por 30 o 60 minutos con un crioprotector de glicerol 2 M y sacarosa 0.4 M. Posteriormente fue reemplazado el crioprotector con una solución PVS2 a 0 °C, antes de almacenarse en NL. Esto fue comparado con un procedimiento de enfriamiento suave ( $-0.5\text{ °C}\cdot\text{min}^{-1}$ ) hasta una temperatura terminal de  $-45\text{ °C}$  y después directamente inmersos en NL, o bien, enfriando los brotes hasta  $-160\text{ °C}$  por 25 minutos antes de almacenarse en NL. Todos los brotes fueron encapsulados en alginato y el proceso de deshidratación se realizó por dos días en un medio conteniendo 0.5 M de sacarosa para después secarse en una atmósfera de sílica gel por 4 h. La mejor tasa de supervivencia (57 %) fue obtenida cuando los brotes apicales fueron aclimatados a 4 °C por 2 días en medio conteniendo 0.09 M de sacarosa, en el tratamiento de 30 minutos con el

crioprotector glicerol 2 M y 0.4 M de sacarosa e incubados en PVS2 a 0 °C por 90 minutos antes de almacenarse en NL. Los procedimientos de congelación programada presentaron bajos porcentajes de supervivencia, desde 23 hasta 44 % (De Carlo *et al.*, 2000).

La criopreservación de brotes apicales de betabel (*Beta vulgaris* L.) mediante la técnica de vitrificación fue descrita por Vandebussche *et al.* (2000), utilizando como fuente de inóculo brotes provenientes de plántulas aclimatadas al frío. Los ápices disectados fueron pre-cultivados por un día a 5 °C en un medio con 0.3 M de sacarosa. Después fueron expuestos por 20 min. en una mezcla de glicerol 2 M y sacarosa 0.4 M a 20 °C. La deshidratación se realizó tratando los brotes por 20 min. con una solución PVS2 a 0 °C antes de almacenarse en NL. El efecto de la deshidratación con PVS2 en el porcentaje de supervivencia de los brotes criopreservados fue más alto en la exposición por 10 min. (40 %). El efecto de la aclimatación, días de precultivo y exposición a la mezcla crioprotectora en el porcentaje de supervivencia varió desde 43 hasta 92 % con un día de pre-cultivo, 20 min. de exposición al crioprotector y un día de pre-cultivo y 10 min. de exposición a la mezcla crioprotectora. En el experimento se notó efecto del genotipo en el porcentaje de supervivencia.

Channuntapipat *et al.*, (2000), criopreservaron exitosamente brotes apicales de dos cultivares de almendra y un porta injerto utilizando la técnica de vitrificación de un paso. Los brotes apicales fueron aislados de plántulas aclimatadas al frío por 3 semanas a 4 °C. Posteriormente, los brotes fueron incubados en una solución de vitrificación a 25 °C por 45 min. para los cultivares y 160 min. para el porta injerto, antes de almacenarse en NL. Después de un congelamiento rápido a -30 °C, los brotes fueron enjuagados en medio basal y colocados en medio sólido por 2-3 semanas. Los brotes sobrevivientes a la criopreservación mostraron un 87.5, 60 y 72.5 % de porcentaje de formación de brotes para los cultivares 'Ne Plus Ultra', 'Nonpareil 15-1' y el porta injerto respectivamente.

Brotos apicales de papa dulce (*Ipomoea batatas* L.) aislados de segmentos nodales cultivados *in vitro* se criopreservaron mediante la técnica de vitrificación. Los brotes fueron inicialmente tratados por un día en medio basal MS conteniendo 0.3, 0.5 y 0.75 M de sacarosa por 24 h. Posteriormente los brotes fueron inmersos en un medio líquido adicionado de glicerol 2 M y 0.4 M de sacarosa, por 20 o 60 min. a 22 °C, esta solución fue removida y los brotes fueron deshidratados por exposición a la solución de PVS2 por 10-26 min. antes de almacenarse en NL. La supervivencia de los brotes vitrificados se incrementó con el pre-cultivo en sacarosa 0.3 M a 22 °C por 24 h. La mejor tasa de supervivencia (100 %) fue obtenida utilizando la mezcla crioprotectora por 1 h a 22 °C seguido por la deshidratación con PVS2 por 16 min. a 22 °C (Pennycooke y Towill, 2000).

Paul *et al.*, (2000), criopreservaron brotes apicales de manzana (*Malus x domestica* Borkh.) aislados de cultivos *in vitro* usando la técnica de encapsulación-deshidratación. Los brotes fueron aclimatados al frío por 0-33 semanas en continua oscuridad a 4 °C. Los brotes se transfirieron después por 3, 7 o 15 días a 24 °C antes de disectarlos. Después de encapsular en esferas de alginato los brotes, éstas se deshidrataron por exposición al flujo de aire estéril de la campana por 0-7 h antes de colocarse en NL. El descongelamiento se realizó a temperatura ambiente por 15 min. y se transfirieron a medio para su regeneración. Para el proceso de encapsulación-vitrificación los brotes axilares no-aclimatados fueron encapsulados en esferas de alginato y se pre-cultivaron toda la noche en medio basal suplementado con 0.75 M de sacarosa y entonces sucesivamente suspendidos por una hora en sacarosa 1 M, 1.5 M y 1 h en una solución concentrada de 120-180 g. de sacarosa/100 ml de agua dependiendo de la mezcla crioprotectora (MC). Las MC probadas consistieron de soluciones de varias proporciones de sacarosa (120-180 g /100 ml de agua) y etilenglicol (EG) (180-120 g/100 ml de agua). Después de que las esferas fueron mantenidas en las soluciones CM por 5 h a 0 °C fueron suavemente secadas y colocadas en NL se descongelaron a temperatura ambiente por 15 min. y se transfirieron al medio de regeneración. La más alta tasa de formación de brotes (83.7 %) a partir de los

brotos congelados se logró cuando fueron precultivados en el medio conteniendo 0.75 M de sacarosa, seguido por 6 h de deshidratación.

La criopreservación de germoplasma de álamo blanco (*Populus alba* L.) de plántulas aclimatadas al frío a 5 °C por 3 semanas fue logrado por Lambardi *et al.*, (2000). Después de disectados los brotes fueron precultivados en medio MS basal suplementado con 0.09, 0.3 o 0.7 M de sacarosa por 2 días a 5 °C. Después del precultivo los brotes fueron colocados por 20 min. a 25 °C con la mezcla crioprotectora de glicerol 2 M y sacarosa 0.4 M, después de removerse esta solución se reemplazó con la solución de vitrificación PVS2 a 20 y 60 min. antes de almacenarse en NL. La mejor tasa de supervivencia (90 %) fue obtenida cuando los brotes fueron precultivados en sacarosa 0.09 M, sin reguladores de crecimiento, vitrificados por exposición a la solución PVS2 por 60 min. a 0 °C y, seguido a la criopreservación, fueron descongelados a 40 °C y tratados con una solución de sacarosa 1.2 M durante 20 min. La regeneración fue mejorada colocando los brotes en medio MS conteniendo 1.5 µM de benciladenina (BA) adicionado de 0.5 µM de ácido giberélico. El enraizamiento fue logrado en medio MS conteniendo 3 µM de ácido indolbutírico (AIB) con una tasa de 60 %.

Usando el nuevo método "droplet", Mix-Wagner *et al.*, (2000), establecieron un protocolo de criopreservación de espárragos (*Asparagus officinalis* L.) para 8 cultivares élite. Los brotes apicales fueron disectados de yemas laterales cultivadas *in vitro* y pre-cultivadas en el medio de inducción (sales de MS suplementada con 200 mg·l<sup>-1</sup> de L-glutamina, 0.1 mg·l<sup>-1</sup> de kinetina y 3 % de sacarosa) toda la noche. Posteriormente los brotes fueron transferidos a una solución crioprotectora DMSO al 10 % por dos horas a temperatura ambiente. Brotes individuales fueron colocados dentro de 6 gotas separadas (5 µl) de solución crioprotectora en tiras de hojas de aluminio de 5 x 15 mm., y colocadas las tiras dentro de viales congelados previamente a -196 °C antes de almacenarse directamente en el NL. Los brotes apicales de los 8 genotipos probados fueron exitosamente criopreservados lográndose altas tasas de supervivencia sin ningún

tratamiento de aclimatación o precultivo variando desde el 58 hasta el 96 % dependiendo del genotipo.

Blakesley y Kiernan (2001), presentaron los resultados de una metodología desarrollada para la criopreservación de plántulas desarrolladas *in vitro* de dos genotipos híbridos de *Eucaliptus* con el propósito de usarse en programas de modificaciones genéticas. Las yemas axilares fueron encapsuladas en alginato y precultivadas en un medio conteniendo concentraciones elevadas de sacarosa o una combinación de sacarosa y glicerol. Las yemas encapsuladas fueron entonces deshidratadas antes del proceso de congelamiento en dos pasos en NL. 18 % de los brotes sobrevivieron al congelamiento cuando se utilizó solo sacarosa como protector. Altas tasas de sobre vivencia (49 %) fueron obtenidas con la incorporación de glicerol al protocolo. Después de la regeneración, los brotes se desarrollaron normalmente sin la evidencia de meristemas adventicios.

Zhao *et al.*, (2001) criopreservaron yemas axilares de vid (*Vitis vinifera*) disectadas de plántulas cultivadas *in vitro* usando la técnica de encapsulación-deshidratación. Los porcentajes de regeneración variaron desde el 15 % hasta el 40 %. Las yemas fueron encapsuladas en esferas de alginato conteniendo 0.5 M de sacarosa y fueron pre-cultivadas a 5 °C en medio basal conteniendo concentraciones progresivas de sacarosa incrementadas diariamente desde 0.1 hasta 1.0 M y entonces secadas hasta un 21 % de humedad, y congeladas lentamente hasta una temperatura terminal de -40 °C a una tasa de enfriamiento de 0.2 °C·min<sup>-1</sup> antes de almacenarse en NL. El estado fisiológico de las plantas madre y el procedimiento de congelación empleado influyó dramáticamente los resultados. La regeneración después de la criopreservación fue lograda únicamente cuando las yemas fueron disectadas de plantas madre que fueron mantenidas sin sub-cultivo por 3 o 4 meses. Adicionalmente cuando las plantas madres fueron aclimatadas por un mes a 0 °C y congeladas en dos pasos mejoró la regeneración. La tasa de multiplicación de brotes producida desde yemas criopreservadas fue más baja que el control durante el primer sub-cultivo después

de la descongelación. Sin embargo la facilidad de enraizamiento del control y las plántulas criopreservadas fueron similares a partir del cuarto sub-cultivo.

Brotos apicales aislados desde yemas de manzano (*Malus domestica* Borkh cv. golden delicious) antes del proceso de congelación fueron exitosamente criopreservados usando tres diferentes métodos (vitrificación, encapsulación-deshidratación y congelamiento en dos pasos). Este último procedimiento obtuvo las más altas tasas de regeneración (83 %) de brotes criopreservados seguido del procedimiento de vitrificación (60 %) y por el de encapsulación-deshidratación (33 %). En contraste, cuando las yemas se criopreservaron en la técnica en dos pasos, los brotes apicales disectados desde ellas después del descongelamiento y cultivo *in vitro* mostraron únicamente un 16 % de recuperación (Wu *et al.*, 2001).

Matsumoto *et al.*, (2001), lograron un promedio de tasas de formación de brotes del 89 % cuando criopreservaron brotes apicales disectados desde yemas axilares de árboles de persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) de 20 años de edad. Los brotes apicales fueron pre-cultivados en medio basal MS conteniendo sacarosa 0.3 M por un día a 25 °C, siendo algunos crioprottegidos con una mezcla de glicerol 2 M y sacarosa 0.4 M por 20 min. a 25 °C antes del proceso de deshidratación en una solución de vitrificación PVS2 por 0-40 min. antes de almacenarse en NL. Después de la descongelación a 40 °C se removió el PVS2 con una solución de sacarosa 1.2 M por 20 min. durante un día y después fueron transferidos al medio de regeneración. Para el procedimiento de encapsulación-deshidratación los brotes fueron encapsulados en alginato y tratadas con una solución de sacarosa 0.8 M por 16 h, o bien, con glicerol 2 M adicionado de sacarosa 0.8 M por una hora. Las esferas fueron después deshidratadas por 0-8 h antes de almacenarse en NL. Después de descongelarse a 40 °C por 2-3 min. las esferas fueron transferidas al medio de regeneración. El porcentaje de formación de brotes criopreservados derivados del proceso de vitrificación de los 19 cultivares mostraron tasas de formación de brotes desde 37.5 hasta el 100 %,



siendo las más altas tasas para las especies coreanas que para las sub-tropicales, respectivamente.

Pennycooke y Towill (2001) utilizaron las técnicas de vitrificación y encapsulación-deshidratación para la criopreservación de brotes apicales de papa (*Ipomoea batatas* L.). Para este experimento se utilizaron genotipos de papa micro propagados a partir de segmentos nodales. Los brotes apicales se precultivaron en medio líquido MS conteniendo 2 % de sacarosa por 24 h, para posteriormente transferirse a medio MS conteniendo 0.3 M de sacarosa por 24 h. Los brotes fueron tratados con diferentes soluciones crioprotectores por 1 h, incluyendo glicerol 2 M, más sacarosa 0.4 M o PVS2 al 20 %. Después de removerse estas soluciones, los brotes fueron deshidratados por exposición a la solución concentrada de PVS2 por 16 min. Enseguida, los brotes fueron removidos y colocados en una solución de vitrificación en una tira de hoja de aluminio y almacenados en NL. El precultivo en sacarosa fue crítico para la supervivencia de los brotes apicales. El precultivo con glicerol 2 M y sacarosa 0.4 M antes de la deshidratación con PVS2 dio las más altas tasas de recuperación. El efecto de la sacarosa y el precultivo en los tratamientos crioprotectores en la regeneración de brotes varió desde 0 % utilizando glicerol 2 M más sacarosa 0.4 M sin precultivo en sacarosa hasta 93 % utilizando el precultivo en sacarosa. El efecto del precultivo en la solución PVS2 no mejoró la tasa de regeneración (36 %), siendo más efectiva sin el precultivo en PVS2. El efecto en la composición del medio en la regeneración varió desde 32 hasta 93 % con el medio basal libre de nitrato de amonio. El efecto del precultivo en sacarosa seguido por la deshidratación (0-4.5 h) mostró un 100% en la regeneración, mientras que con 7 h sólo el 85 %.

El protocolo de encapsulación-deshidratación para la criopreservación del germoplasma de kiwi (*Actinidia spp.*) fue optimizado para un cultivar híbrido. Los brotes aislados se transfirieron en medio líquido con concentración de sacarosa incrementadas diariamente desde 0.3, 0.5 y 0.75 M y mantenidas por 2 o 4 días. Se deshidrataron hasta un 20 % de humedad antes de almacenarse en NL y

descongelarse a temperatura ambiente. La tasa de regeneración varió desde 85 a 95 %. Los brotes regenerados no mostraron anomalías fenotípicas (Bachiri *et al.*, 2001).

Lambardi (2002), probó la eficiencia de la técnica de vitrificación para preservar brotes apicales de plantas de tres cultivares de álamo (*Populus alba*, *P. nigra* y *P. canescens*). Antes de disectar los brotes, las yemas fueron aclimatadas a 5 °C por 3 semanas. Los brotes disectados se precultivaron después por dos días a 5 °C para posteriormente colocarse por 20 min. a 25 °C en la mezcla crioprotectora de glicerol 2 M más sacarosa 0.4 M. Posteriormente se reemplazó con la solución PVS2 de vitrificación por 20, 40, 60, 80, 100 y 120 min. a 0 °C o a 25 °C y se evaluó su supervivencia. Seleccionándose el tratamiento de 20 min. a 25 °C y el de 60 min. a 0 °C como los mejores. Los brotes fueron suspendidos en solución fresca de PVS2 y almacenados en NL. Después de la descongelación a 40 °C, se removió la solución de PVS2 y se colocaron en medio sólido de regeneración. Los resultados mostraron que el mejor tratamiento en el medio de pre-cultivo con sacarosa resultó el 0.09 M con una exposición a la solución de PVS2 con 60 min. a 0 °C (90 % de supervivencia). El porcentaje de formación de brotes varió desde el 50, 55, y 62 % para el precultivo en sacarosa 0.7, 0.3 y 0.09, respectivamente, con el mismo tiempo de exposición a PVS2.

Lambardi *et al.*, (2002), en una revisión sobre la conservación de germoplasma de olivo encontró que el mejor tipo de inóculo para la criopreservación fueron los brotes apicales disectados de plántulas cultivadas *in vitro*, principalmente para asegurar la fidelidad genética de las plantas donantes. Martínez *et al.*, (1999), establecieron un protocolo en el cual los inóculos se deshidrataban previamente antes de almacenarse en NL. La máxima tasa de supervivencia de 35 % después del descongelamiento se reportó para los brotes apicales que fueron previamente deshidratados hasta un 28 y 33 % de humedad. Los brotes han sido criopreservados usando la solución de vitrificación PVS2 o bien, mediante la osmo-protección/deshidratación. Aunque se ha reportado hasta

un 30 % de supervivencia después de la descongelación, la regeneración de los brotes ha sido problemática. Mientras tanto, la criopreservación de tejido embriogénico y embriones somáticos ha sido exitosa usando una variedad de tratamientos de vitrificación, aunque es un método menos adecuado para la conservación de germoplasma. A la fecha, el almacenamiento criogénico de semillas de olivo y embriones cigóticos han recibido poca atención, esto es debido, a la limitada insignificancia de su aprovechamiento para la preservación de germoplasma de especies tales como el olivo, los cuales son propagados vegetativamente. Sin embargo, mediante un procedimiento simple de deshidratación de embriones y su directa inmersión en NL, González-Río *et al.*, (1994) criopreservaron embriones cigóticos de olivo disectados de frutas maduras, los cuales fueron previamente almacenados a 4 °C por cerca de 4 meses, mostrando un 70 % de germinación después del descongelamiento. Con respecto a la criopreservación de semillas, se ha demostrado que se puede obtener un 95 % de germinación después de congelar directamente las semillas en NL (Revilla *et al.*, 2002).

Panis *et al.*, (2002), describieron un método sencillo de criopreservación para germoplasma de plátano (*Musa spp.*). Utilizaron meristemas precultivos por dos semanas en medio enriquecido con sacarosa 0.4 M seguido de un congelamiento rápido en NL. Diferentes medios de precultivos fueron evaluados para encontrar la protección eficiente de los meristemas. La sacarosa fue remplazada por fructosa y glucosa sin afectar significativamente las tasas de supervivencia. Una alta concentración de BA (100 µM) en el medio de precultivo resultó en una disminución en material disponible para la criopreservación, pero sin afectar la crioprotección. El cultivo en medio líquido mejoró significativamente la regeneración después del descongelamiento. El protocolo de criopreservación optimizado se aplicó para 33 cultivares de plátano y las frecuencias de regeneración variaron desde 0 hasta 66 % mostrando ser altamente dependiente de la constitución genómica del cultivar.

González-Benito *et al.*, (2002), examinaron los diferentes factores incluidos en los protocolos para la criopreservación de axilas embriogénicas de *Quercus ilex* y *Q. Suber*. La temperatura de incubación *in vitro* tiene un papel importante en el desarrollo apropiado de las axilas de *Q. ilex*, resultando mejor a 15 °C. Las axilas de *Q. suber* resultaron más sensibles a la deshidratación y congelamiento. Se observó poca supervivencia (35 %) cuando las axilas se incluyeron en crioviales y luego en NL, y ninguna cuando fueron inmersos en NL. Las axilas de *Q. ilex* mostraron desarrollo *in vitro* pobremente organizado (50 % de las axilas no-congelados presentaron desarrollo de brotes)

Usando la técnica de encapsulación-vitrificación optimizando las condiciones de osmo-protección se criopreservaron brotes apicales de papa dulce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). Los brotes fueron encapsulados y pre-incubados en medio líquido con 30 g/l sacarosa por 24 h, y entonces transferidos a un medio enriquecido de sacarosa 0.3 M por 16 h. Los brotes fueron osmo-protegidos con una solución glicerol 2 M y sacarosa 1.6 M por 3 h antes de comenzar la deshidratación con la solución de PVS2 por 1 h a 25 °C., antes de almacenarse directamente en NL. Los brotes fueron rápidamente descongelados, mostrando una tasa de formación de brotes de cerca del 80 % (Hirai y Sakai, 2003).

La criopreservación de segmentos nodales y brotes apicales de germoplasma de cassava fue reportada encapsulando los inóculos en alginato de calcio adicionado de 0.25, 0.5, 0.75 o 1 M de sacarosa. Los resultados indicaron que ambos inóculos mostraron regeneración de brotes después del descongelamiento, sin embargo, fueron afectados significativamente por la duración del periodo de almacenamiento (28 días) disminuyendo la recuperación del 100 al 73 % para los segmentos nodales descongelados y del 94 al 60 % para los brotes apicales (Danso y Ford-Lloyd, 2003).

## 2.14. Criopreservación de cítricos

Kobayashi *et al.*, (1990), comentan brevemente que la trayectoria de la aplicación de las técnicas de criopreservación en cítricos se remonta al término de la década de los 70's. Inicialmente Kobayashi *et al.*, (1978) reportaron el desarrollo de una técnica para el almacenamiento en NL de polen de cítricos. Mumford y Grout (1979) publican la tolerancia a la deshidratación y a la temperatura de  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  de las semillas de *Citrus limon*; Bajaj (1984) investigó la inducción del desarrollo de óvulos de cítrico. No fue hasta que Marin y Duran-Vila (1988), reportaron que un pequeño número de embriones congelados (3-5 %) supervivieron y desarrollaron después de micro propagación en plantas completas. Este fue el primer reporte que describió la recuperación de plantas completas a partir de tejido somático de cítricos criopreservado, sin embargo, la recuperación de los embriones somáticos no se refiere a la supervivencia de embriones completos, sino a la recuperación de estructuras provenientes en embriogénesis secundaria. Para la criopreservación de células nucleares de *Citrus sinensis* (L.) Osb., utilizaron tejido nuclear el cual fue aislado de óvulos de flores. Estos fueron crecidas en medio Murashige y Tucker (MT) (1969) conteniendo 0.15 M de sacarosa y suplementado con  $10\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de BA. Los callos nucleares se desarrollaron después de 2-3 meses. Células crecidas por 6 días se pre-cultivaron únicamente en solución de sacarosa 1.2 M y colocadas en un baño de hielo. Después, fue gradualmente adicionado medio MT adicionado de 1.2 M de sacarosa, sorbitol, glucosa y glicerol cada uno en combinación de 30 % w/v de DMSO y mantenido a esa temperatura por 1-h. Alícuotas de la suspensión celular se dispusieron en viales y se procedió a congelar analizando una temperatura terminal desde  $-25$  hasta  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ , con tasas desde 0.3 hasta  $5\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , para luego almacenarse en NL. Después del descongelamiento y sin lavar, se determinó la viabilidad mediante tinción con fluorescein-diacetato (FDA) y safranina. Para el re-crecimiento las células se dispusieron en papel filtro sobre el medio MT con 5 % de galactosa, y 5 % de agua de coco  $5\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . Después de 2 meses de cultivo fueron producidos embrioides cotiledonares los cuales desarrollaron en plantas

completas en el medio MT con 2 % de sacarosa,  $500 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de extracto de malta y  $0.05 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de ANA, las cuales fueron morfológicamente uniformes. La máxima tasa de viabilidad fue de 70 %. La óptima tasa de congelación fue de  $0.5 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$

Para determinar la técnica de criopreservación de yemas axilares embriogénicas Radhamani y Chandel (1992), aislaron asépticamente axilas embriogénicas desde semillas de naranja trifoliada *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. El proceso de secado se desarrolló en una atmósfera seca de sílica gel por periodos de 1 hasta 5 h y las otras mediante 5 h en el flujo de aire esterilizado de la campana. Las axilas se colocaron en viales y se almacenaron en NL. Después de 1 h se descongelaron rápidamente en baño de agua a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  y se probó su germinación. Previos resultados indicaron que la viabilidad de las semillas no se vio afectada cuando se bajo el contenido de humedad de 36 a 28 %, y no pudieron sobrevivir a contenidos de humedad por debajo del 20 %. Los resultados de la deshidratación de los embriones axilares indicaron que en la primera hora se pierde el mayor contenido de humedad, la mejor tasa de supervivencia ocurrió con un tiempo de secado de 4 h. La viabilidad en los embriones congelados fue más eficiente con humedad de 16 % o menos, siendo el 14 % la mejor tasa (68 %).

Marin *et al.*, (1993), regeneraron plantas completas de naranja dulce (*Citrus sinensis* L. Osb.) a partir de embriones somáticos sometidos a criopreservación en NL. Los embriones fueron generados a partir del cultivo de óvulos provenientes de frutas colectadas 2 a 8 semanas después de la anthesis. Se seleccionaron arbitrariamente para este experimento solo estructuras con una talla de 0.5-1.0 mm. Estos fueron tratados con una solución crioprotectora de DMSO por 1 h y después congelados. La temperatura terminal fue de  $-42 \text{ }^\circ\text{C}$  a una tasa de  $0.5 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  antes de almacenarse en nitrógeno líquido. Se determinaron dos procesos de descongelación; en el lento los viales se descongelaron a temperatura ambiente por 15 min. y en el rápido se colocaron en baño de agua a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  por 5 min. Los embriones descongelados se colocaron en medio de regeneración y se evaluó la tasa de supervivencia en 3 meses. Se

observó en los resultados que ninguno de los embriones congelados directamente en NL sobrevivió. El efecto del proceso de descongelamiento se reflejó en el tiempo de re-crecimiento, usando el doble de tiempo aquellos descongelados lentamente. En ambos casos se regeneraron nuevos embriones secundarios. La mejor tasa de supervivencia (30.5 %) se alcanzó cuando los embriones fueron descongelados rápidamente a 37 °C. Los embriones supervivientes regeneraron en plantas completas y el análisis de proteínas totales solubles no mostró diferencias respecto al material no congelado.

Perez *et al.*, (1997) criopreservaron cultivos celulares embriogénicos de varias especies de cítrico y variedades. Líneas celulares de las especies de naranja dulce (*Citrus sinensis* L. Osb.) Salustiana, Washington Navel, Pineapple y Succari; toronjas (*Citrus paradisi* Macf) Star Ruby, Marsh blanca y roja; limón [*C. limon* (L.) Burm f.] Lac; mandarina *Cleopatra* (*C. reshni* Hort. Ex Tan.); naranja agria (*C. aurantium* L.) y lima mexicana [*C. aurantifolia* (Christm.) Swing.] Todas las líneas celulares se pre-trataron en viales con medio basal MS con 10 % vol. de DMSO y mantenidas a 4 °C por 30 min. Se ensayaron tres condiciones de almacenamiento. Para el congelamiento rápido se congelaron directamente en NL, para el congelamiento a velocidad media los viales se colocaron primero a -20 °C por 2 h, transfiriéndose después a -70 °C por 18 h y finalmente a NL. Para el congelamiento lento se utilizó una tasa de congelación de 0.5 °C·min<sup>-1</sup> hasta una temperatura terminal de -40 °C y posteriormente almacenadas a -196 °C. Se probaron dos procesos de descongelación; primero, rápidamente colocando el vial en agua a 37 °C y suavemente dejando los viales a temperatura ambiente. Para recrecer las células se usó el medio MS. La viabilidad se detectó mediante la tinción con fluorescein-diacetato (FDA). Los mejores resultados se obtuvieron con las tasas bajas de congelación y descongelamiento rápido. Todos los tratamientos en todos los cultivares resultaron 100 % efectivos. La diferencia se observó en el porcentaje de embriogénesis de cada tratamiento y cultivar y en el porcentaje de obtención de plantas completas.

El primer reporte exitoso de la aplicación de la criopreservación en ápices fue hecho por Gonzalez-Arno (1998). Para este propósito se utilizaron ápices de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. Los cuales fueron obtenidos a partir de plántulas germinadas *in vitro*. Para los experimentos fueron disectados ápices de un tamaño de 0.5-1 mm. y precultivados toda la noche en medio basal Murashige-Skoog. Después fueron encapsulados en esferas de alginato al 3 % y precultivadas en medio líquido con varias concentraciones de sacarosa (0.3-1 M) por diferentes periodos de tiempo desde 1 a 10 d. En otro experimento la concentración de sacarosa en el precultivo fue incrementándose progresivamente por la transferencia diaria de los ápices al siguiente medio con más alta concentración de sacarosa. Los ápices encapsulados fueron después deshidratados a temperatura ambiente hasta alcanzar 20-25 % de humedad en el flujo de aire esterilizado de la campana. La congelación se realizó rápidamente por inmersión directa en nitrógeno líquido y otra parte suavemente hasta una temperatura terminal de -40 °C con una tasa de congelación de 0.5 °C·min<sup>-1</sup> antes de almacenarse en NL. Después de 1 h se procedió a descongelar colocando los viales en el flujo de la campana por 2-3 min. Posteriormente se colocaron las cápsulas en papel filtro sobre el medio de cultivo semisólido y fueron mantenidas en la oscuridad por 1 semana. Se emplearon 15-20 ápices por repetición. La tasa de supervivencia de los ápices encapsulados después del descongelamiento varió dependiendo del contenido de sacarosa en el medio de precultivo. Los pre-cultivos en concentraciones de 0.75 y 1 M de sacarosa fueron perjudiciales para la supervivencia. En contraste a concentraciones de 0.5 y 0.3 M a precultivos más extendidos fue mejorando la supervivencia. Los precultivos con duración de 2 h o más tuvieron tasas de supervivencia alrededor del 80 %. La supervivencia de los ápices congelados lentamente fue alcanzada por todos los periodos de precultivo mientras que en la congelación rápida se logró estos resultados en los tratamientos con 3 y 4 días de precultivo. La más alta tasa de supervivencia con lento y rápido congelamiento fue logrado después de 3 y 4 días de precultivo respectivamente. Los ápices precultivados en incrementos progresivos de concentración de sacarosa incrementaron la tolerancia a altos niveles de sacarosa



en comparación con los tratamientos en precultivo directo a la misma concentración final. La supervivencia de los ápices procedentes de precultivos con concentración final de sacarosa de 1 M fueron perjudiciales. La supervivencia de ápices criopreservados fue más alta después del congelamiento lento que los congelados rápidamente, mientras que la de los ápices con respecto al proceso de secado disminuyó linealmente con la disminución del contenido de humedad. Después de la criopreservación, las más altas tasas de supervivencia se lograron con el congelamiento lento con las cápsulas deshidratadas hasta una humedad entre el 23 y el 28 %, con un 50 % de supervivencia mientras que en la congelación rápida fue del 40 %. En el proceso de recrecimiento no fue necesario extraer los ápices de la esfera, los ápices pudieron salir sin dificultad y desarrollarse sin formación transitoria de callo. Los ápices que no sobrevivieron se tornaron blancos o negros. Los mejores resultados a congelación lenta sugieren que no toda el agua congelable de los ápices y cápsulas durante el proceso de deshidratación ha sido extraída.

La tolerancia a la desecación y congelamiento de semillas con y sin testa, y yemas embriogénicas axilares de *Citrus aurantifolia* fue reportado por Cho *et al.*, (2002). Las semillas fueron primeramente desecadas por tres métodos. En atmósfera seca con sílica gel; en el flujo de la campana y a temperatura ambiente, con y sin testa. Para la congelación las semillas se colocaron en papel aluminio y se almacenaron directamente en el NL por 24 h. La descongelación se realizó a 40 °C por 3 min. y se colocaron en medio de cultivo con 0.3 M de sacarosa por 1 día para reducir el estrés osmótico durante la rehidratación. En los experimentos con las yemas axilares embriogénicas se disectaron estas de las semillas y se precultivaron por 24 h en medio basal MS con varias concentraciones de sacarosa (0.1 hasta 0.7 M), y 0.3 mg·l<sup>-1</sup> de bencilaminopurina (BAP). Después fueron deshidratadas por 1-3 h en el flujo de aire de la campana. Se cubrieron con aluminio y se almacenaron rápidamente en NL por 24 h. La descongelación se realizó rápidamente en agua a 40 °C y colocadas en medio MS con 0.3 M de sacarosa por 1 día y luego transferidos a medio con 0.1 M de sacarosa, 0.1 mg·l<sup>-1</sup>

de BAP para el recrecimiento hasta plantas completas. Los resultados mostraron que la supervivencia antes y después de la criopreservación fue más alta para las semillas sin testa. La supervivencia de las semillas completas descongeladas fue de 41.3 % y fue obtenida después de secarse hasta un contenido de 7.3 % de humedad, mientras que el de las semillas sin testa fue de más del 85 % al mismo contenido de humedad. Para las semillas secadas en sílica gel la supervivencia fue del 60% para semillas con un contenido de 3.3 % de humedad. Para los embriones, la supervivencia después de la criopreservación fue nula cuando estos no fueron precultivados o deshidratados. Estos últimos empezaron a sobrevivir linealmente con el incremento de la concentración de sacarosa en el precultivo desde 7.5 % con 0.1 M hasta 77.5 % con 0.7 M de sacarosa. Los embriones precultivados y deshidratados tuvieron una supervivencia entre 55.8 y 92.5 %.

Cho *et al.*, (2002), demostraron que las yemas axilares embriogénicas pueden aumentar su supervivencia después de la criopreservación al utilizar una modificación en la técnica de encapsulación-deshidratación. Después de disectar las yemas axilares fueron precultivados 3 días en medio sólido MS suplementado con 0.1 mg.l<sup>-1</sup> de bencilaminopurina (BAP), ac. naftalenacético (ANA), y ac. giberélico (GA<sub>3</sub>) respectivamente y sacarosa 0.1 M, seguido por el cultivo de 1 día en medio con 0.3 M de sacarosa y 0.5 M de glicerol. Después de los precultivos, las yemas fueron encapsuladas y pre-tratadas con distintos crioprotectores en agitación continua y después secados a varios periodos de tiempo. Las esferas posteriormente se almacenaron en NL. Se descongelaron en baño de agua a 40 °C y se transfirieron en medio MS con 0.3 M de sacarosa por 1 día y luego en otro con 0.1 M para recuperar el crecimiento. En el medio de encapsulado se probaron distintas concentraciones de sacarosa y glicerol para optimizar el congelamiento. Se probó el glicerol 1 o 2 M en mezcla con varias concentraciones de sacarosa, así como, el tiempo de exposición. Mediante el protocolo estándar de encapsulación-deshidratación se obtuvo 57.5 % de supervivencia, mientras que con la modificación la cual incluye el pre tratamiento con glicerol 2 M y sacarosa

0.6 M por 1 h, y secadas las esferas hasta alrededor de 30 % de humedad, esta técnica elevó la tasa hasta 65%.

Óvulos de naranja dulce (*Citrus sinensis* L. Osb.) de los cultivares pineapple, navel foyos y parent navel; toronja (*C. paradisi* Macf.) duncan; limon [*C. limon* (L.) Burm. f]; mandarina (*C. deliciosa* Ten.) y naranja agria (*C. aurantium* L.) fueron disectados de frutas inmaduras colectadas 2-8 semanas después de la anthesis y cultivados en el medio CM toda la noche. Los embriones somáticos fueron generados a partir de óvulos. Los experimentos de criopreservación utilizaron embriones en los diferentes estadios, globular, torpedo y corazón. La criopreservación de óvulos y embriones fue desarrollada siguiendo el protocolo básico de encapsulación-deshidratación. Después de la encapsulación los óvulos de todas las especies fueron pre-crecidos en medio líquido conteniendo distintas concentraciones de sacarosa (0.75 M, 1.0 M o 1.25 M) para varios periodos de crecimiento (desde 1 hasta 7 días). Se desarrollaron también algunos tratamientos progresivos transfiriendo las muestras después de 1, 3, o 4 días en medio de cultivo conteniendo concentraciones progresivas de sacarosa (0.3 M hasta 1.25 M). Los embriones encapsulados fueron pre-crecidos en medio líquido con diferentes concentraciones de sacarosa (0.3 M hasta 1.5 M). Algunos tratamientos progresivos fueron ensayados por transferencia diaria a medios conteniendo concentraciones mayores de sacarosa. Después de la etapa de precultivo los óvulos y embriones fueron deshidratados en el flujo de aire de la campana bajando desde 20-25 % el contenido de humedad en las cápsulas (1 a 12 h). Después, las muestras fueron congeladas rápidamente en NL. Los óvulos fueron también sujetos a un proceso de congelamiento lento a una temperatura terminal de  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  a una tasa de  $0.5\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  y enseguida el almacenamiento a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Después de 1 h de almacenamiento, se descongelaron las esferas a temperatura ambiente y se transfirieron a medio basal de regeneración. La mejor tasa de supervivencia (75-100 %) fue consistentemente obtenido después de 1 día de pre-crecimiento en 0.75 M de sacarosa (González-Arno, *et al.*, 2003).

## 2.15. Justificación

Los cítricos son uno de los más importantes cultivos de frutales ampliamente distribuidos en las regiones subtropicales del mundo. La diversidad del germoplasma en colecciones de campo, es prerrequisito para programas de mejoramiento convencional y biotecnológico. La criopreservación permite el almacenamiento a largo plazo de estos recursos con una máxima estabilidad de sus características feno y genotípicas en un mínimo espacio, y requerimientos de almacenamiento y mantenimiento. A la fecha, la criopreservación de germoplasma de cítricos ha sido exitosamente aplicada a semillas (Mumford y Grout 1979), óvulos (Bajaj, 1984), embriones (Marin y Duran-Vila, 1988); Marin *et al.*, 1993), embriones axilares (Radhamani y Chandel, 1992) y embriones somáticos (Pérez *et al.*, 1997, 1999). Sin embargo, la información disponible para la aplicación de la criopreservación de brotes apicales es aún muy limitada. La importancia de la conservación de brotes apicales radica principalmente, en que los cultivares de cítrico son propagados vegetativamente, por consiguiente, este inóculo resulta ser el más importante para el aseguramiento de la conservación de las características genotípicas del cultivar.

La criopreservación es el almacenamiento de material biológico a ultrabajas temperaturas, usualmente en nitrógeno líquido (-196°C). Es el único método seguro actualmente disponible y rentable para la conservación a largo plazo de recursos genéticos de especies que tienen semillas recalcitrantes o que son propagadas vegetativamente. Grandes progresos se han efectuado en los últimos 10 años con el desarrollo de técnicas de criopreservación para más de 100 especies de plantas. Los protocolos de criopreservación han llegado a estar cada vez más disponibles para aplicaciones de rutina en bancos de germoplasma. Sin embargo, muchos de los trabajos a la fecha han sido efectuados con especies de zonas templadas, dejando a un lado la investigación en especies tropicales y subtropicales, identificándose un área de prioridad para la investigación, desarrollo y transferencias de tecnologías en este campo (Reed, 2000).

### 3. Hipótesis

Si la cantidad de agua contenida en los espacios intra y extracelulares de brotes apicales de *C. sinensis* (L.) Osbek var. valencia puede ser substituida parcialmente por la sacarosa, o, disminuida por deshidratación, se evitará el daño por la formación de astillas de hielo al congelar los brotes a -196 °C.

### 4. Objetivo general

Desarrollar un protocolo para la criopreservación de brotes apicales de la especie de mayor importancia económica en la citricultura, el naranjo [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck.] var. valencia, utilizando la técnica de encapsulación-vitrificación-deshidratación.

#### 4.1. Objetivos particulares

- 1.- Evaluar el efecto de preacondicionamiento en distintos niveles de sacarosa en la regeneración de brotes apicales de *C. sinensis* (L.) Osbek var. valencia criopreservados.
- 2.- Establecer los niveles óptimos de vitrificación-deshidratación de los brotes encapsulados para la supervivencia de brotes criopreservados.
- 4.- Evaluar el efecto de la citocinina benciladenina (BA) en el recrecimiento de los brotes criopreservados.

## 5. Material y métodos

### 5.1. Localización del experimento

El experimento se desarrolló en el laboratorio de Biotecnología de la Unidad Académica Multidisciplinaria de Agronomía y Ciencias de la Universidad Autónoma de Tamaulipas, México.

### 5.2. Material vegetativo

Se utilizaron como fuente de brotes, baretas provenientes de árboles donadores de yemas de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck var. valencia conteniendo un promedio de 10 yemas cada una, proporcionadas por el banco de germoplasma Francisco Villa de Guémez, Tamaulipas.

### 5.3. Preparación del inóculo

Después de lavarse con jabón líquido, las baretas se esterilizaron por superficie con una solución de etanol al 70 % por 30 segundos y posteriormente en una solución de cloro activo al 0.06 % por 20 minutos. Se enjuagaron con agua destilada esterilizada y se incubaron en probetas conteniendo agua esterilizada para la obtención de brotes de las yemas vegetativas. El proceso se desarrolló en cámara bioclimática a 27 °C con un fotoperiodo de 16/8 h luz/oscuridad con una intensidad de  $45 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  proporcionado por lámparas de luz fluorescente blanca.

#### 5.3.1. Aislamiento y cultivo de brotes apicales

Después de 5 semanas de cultivo de las baretas, se seleccionaron arbitrariamente brotes con una longitud promedio de 1 cm. Se separaron de la baretas y se esterilizaron por superficie con una solución de etanol al 70 % por 10 segundos y posteriormente con una solución de cloro activo al 0.06 % por 15 minutos. Se

enjuagaron en campana de flujo laminar con agua destilada esterilizada por 4 veces y se colocaron dentro de cajas de petri esterilizadas hasta su uso. Con ayuda de un estereomicroscopio se disectaron los primordios de hoja hasta alcanzar a visualizar solo la presencia de 2-3 primordios cubriendo el domo meristemático, antes de aislar el brote apical (aprox. 1 mm.) con una navaja.

#### 5.4. Medios de cultivo

A todos los medios de cultivo se ajustó el pH a 5.7, se solidificaron con 8 gr.l<sup>-1</sup> de agar, y se esterilizaron a 120 °C por 15 min. a 15 lb. de presión.

##### 5.4.1. Medio de cultivo de preacondicionamiento

Para el proceso de pre-acondicionamiento de brotes apicales se utilizó el medio de cultivo Murashige-Skoog (MS) al 50 %, adicionado de sacarosa 0.22 M, 100 mg.l<sup>-1</sup> de mio-inositol, 0.2 mg.l<sup>-1</sup> de tiamina, 1 mg.l<sup>-1</sup> de piridoxina-HCl, 1 mg.l<sup>-1</sup> de ac. nicotínico.

##### 5.4.2. Medio de cultivo de regeneración

Para la regeneración de brotes encapsulados se utilizó el medio de cultivo MS (1962), adicionado de las vitaminas del medio de Gamborg (1963), 0-4 µM de BA, y 30 gr.l<sup>-1</sup> de sacarosa.

#### 5.5. Ensayos de preacondicionamiento a la sacarosa

Para evaluar los efectos de la sacarosa en el crecimiento y desarrollo después de la criopreservación, un grupo de brotes disectados se colocaron sobre la superficie del medio de cultivo de preacondicionamiento probándose concentraciones de sacarosa desde 0.09, 0.15, 0.22, 0.29 y 0.44 M. El grupo de brotes se mantuvo a temperatura constante de 27 °C y a un fotoperiodo de 16/8 h

(luz/oscuridad) con una intensidad de  $45 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  proporcionado por lámparas de luz fluorescente blanca. Los parámetros a evaluar fueron altura de brotes, número de hojas expandidas completamente y porcentaje de materia seca de los brotes, 8 semanas después de iniciado el preacondicionamiento.

#### 5.6. Encapsulación-vitrificación

Para el proceso de encapsulación, los ápices fueron inmovilizados por inmersión directa en medio de cultivo MS adicionado con 3 % (p/v) de alginato de sodio, 2 M de glicerol, y 0.4 M de sacarosa de acuerdo a la metodología descrita por Wang *et al.* (2000). Los ápices fueron removidos de esta solución con ayuda de una pipeta de 10 ml. esterilizada y fueron adicionados por goteo (1 ápice por gota) a una solución 0.1 M de  $\text{CaCl}_2$ , conteniendo glicerol 2 M y sacarosa 0.4 M a temperatura ambiente. Las esferas formadas (4 mm. de diámetro) conteniendo dentro el ápice se mantuvieron en la solución por 30 min. en agitación suave para consolidar la polimerización. Para la vitrificación, las esferas se removieron de la mezcla y se enjuagaron tres veces con medio MS de regeneración y se precultivaron paso a paso, en medio sólido enriquecido con incrementos de concentración de sacarosa de 0.3, 0.5, 0.7 y 1 M, por 4 días, un día en cada paso, en agitación continua de 100 rpm.

Las condiciones de cultivo fueron a temperatura constante de  $27^\circ\text{C}$  y a un fotoperiodo de 16/8 h (luz/oscuridad) con una intensidad de  $45 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  proporcionado por lámparas de luz fluorescente blanca. Se evaluó el porcentaje de supervivencia.

#### 5.7. Deshidratación

Las esferas precultivadas se colocaron sobre papel filtro esterilizado dentro de cajas de petri y se deshidrataron en la corriente de aire de la campana de flujo laminar a temperatura y humedad ambiente por 8 h. Después de la deshidratación, diez esferas precultivadas fueron transferidas dentro de un vial de 2 ml y se



almacenaron directamente en nitrógeno líquido (NL) por 1 h. Para determinar el tiempo óptimo de deshidratación, se deshidrataron esferas precultivadas conteniendo el brote, tomadas del grupo de brotes preacondicionadas con 0.09 M de sacarosa por periodos de 0-10 h. El contenido de humedad de las esferas fue medido secándolas en estufa a 80 °C por 48 h. Después de la deshidratación, se colocaron 10 esferas por tubo de 2 ml y se almacenaron directamente en el NL. El descongelamiento se desarrolló por inmersión de los viales sacados directamente del NL en agua a 40 °C por 3 min. Se evaluó el porcentaje de supervivencia.

#### 5.8. Protocolo estandarizado.

De acuerdo a los resultados preliminares de los efectos en la supervivencia de los brotes debidos al precultivo en sacarosa, encapsulación, vitrificación y deshidratación se estableció el siguiente protocolo:

Los grupos de brotes preacondicionados con 0.09, 0.15, 0.22 y 0.29 M de sacarosa en el medio respectivamente y encapsulados, fueron precultivados independientemente en medio sólido enriquecido con incrementos diarios de concentraciones de sacarosa desde 0.3, 0.5, 0.7, y 1.0 M por 4 días y entonces deshidratados hasta un 17 % de humedad antes de almacenarse en NL por 1 h. Los brotes criopreservados se descongelaron rápidamente en agua a 40 °C por 3 min. Se evaluó el porcentaje de supervivencia.

#### 5.9. Cultivo de regeneración

Las esferas descongeladas fueron postcultivadas en cajas de petri conteniendo el medio de regeneración en la oscuridad por 48 horas para posteriormente ser transferidos a las condiciones de cultivo del preacondicionamiento y evaluar la supervivencia. La supervivencia fue determinada por el porcentaje del número total de brotes que mostraron color verde después de 2 semanas de postcultivo. En la regeneración fue observada la formación de callo, elongación del brote y el número de hojas abiertas completamente después de 8

semanas de cultivo. Los efectos de las concentraciones de BA desde 0-4  $\mu\text{M}$  en la supervivencia y regeneración fue evaluada.

## 6. Resultados

### 6.1. Efecto del preacondicionamiento en sacarosa

La concentración de sacarosa en el medio de pre acondicionamiento manifestó un fuerte efecto en el crecimiento y porcentaje de materia seca de los brotes (tabla 1). Un máximo crecimiento fue obtenido cuando la concentración de sacarosa varió desde 0.15 hasta 0.29 M, las concentraciones de sacarosa más bajas de 0.15 o más altas que 0.29 M, disminuyeron el crecimiento. El porcentaje de materia seca se incrementó con la concentración de sacarosa. Los segmentos internodales y las hojas de los brotes preacondicionados con 0.44 M de sacarosa fueron extremadamente cortos y pequeñas respectivamente, considerándose un crecimiento anormal, y se descartó este tratamiento para su uso en los experimentos de congelación. En este ensayo se estableció como mejor tratamiento de preacondicionamiento para el protocolo general de criopreservación la concentración de 0.22 M de sacarosa ya que proporcionó la mejor tasa de crecimiento sin ser detrimental en cuanto al número de hojas expandidas y porcentaje de materia seca.

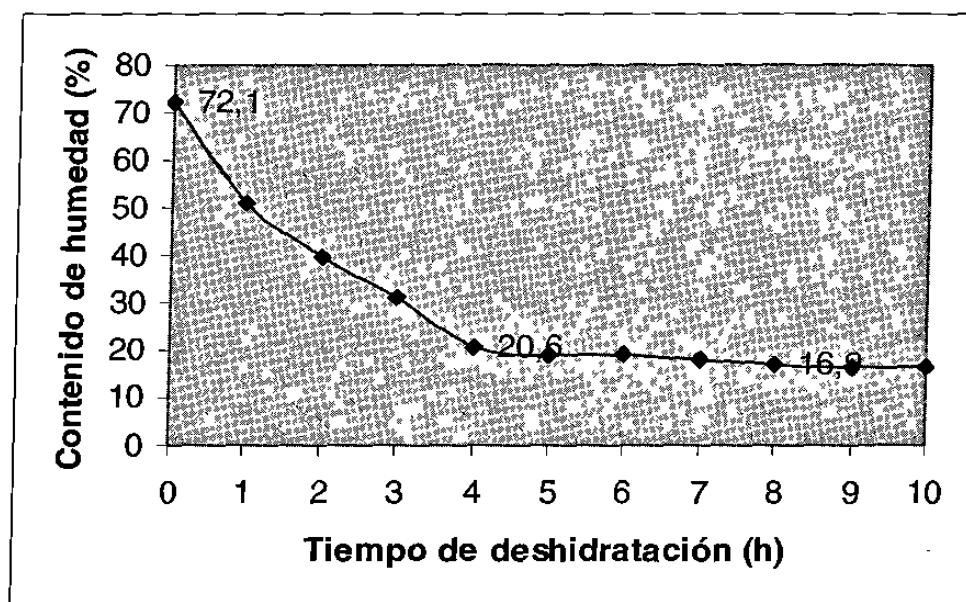
**Tabla 1.-** Efecto de la concentración de sacarosa en el crecimiento del grupo de brotes de *Citrus sinensis* (L.) Osb. en el medio de preacondicionamiento.

Concentración de sacarosa (M)	Altura de brotes (cm.)	Número de hojas completamente expandidas	Porcentaje de materia seca de brotes (%)
0.09	3.4±0.4	5.3±0.5	20.3±1.1
0.15	4.5±0.5	8.0±0.8	22.5±1.6
0.22	4.6±0.3	7.6±1.0	23.2±1.7
0.29	4.4±0.4	7.2±1.2	24.4±2.2
0.44	2.9±0.4	1.7±0.5	29.7±1.4

Los datos corresponden a las medias  $\pm$  el error estándar de las observaciones realizadas 8 semanas después de iniciado el preacondicionamiento.

## 6.2. Efecto del proceso de deshidratación

Los cambios en el contenido de humedad de las esferas sometidas a la deshidratación después del proceso de vitrificación con concentraciones progresivas con sacarosa por 4 días, se presentan en la fig. 1. El contenido inicial de humedad fue de 72.1 % en base al peso fresco y disminuyó rápidamente hasta 20.6 % dentro de las primeras 4 h y después fue gradualmente disminuyendo hasta 16.1 % después de 10 h de secado.

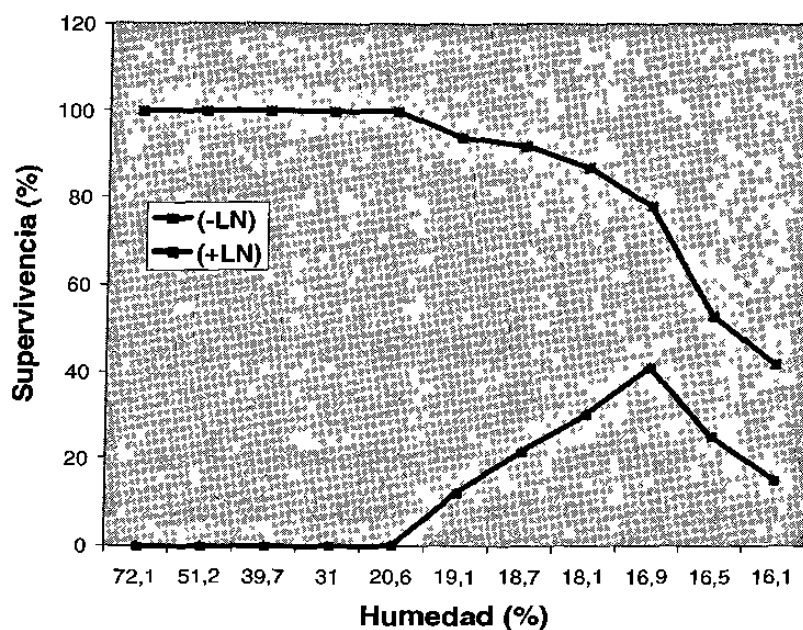


**Figura 1.-** Efecto del proceso de deshidratación de los brotes apicales encapsulados de *C. sinensis* L. Osb. en el contenido de humedad

## 6.3. Efecto de la vitrificación

La supervivencia de los brotes apicales criopreservados (+NL) y no criopreservados (-NL) se vio fuertemente influenciada por el contenido de agua en

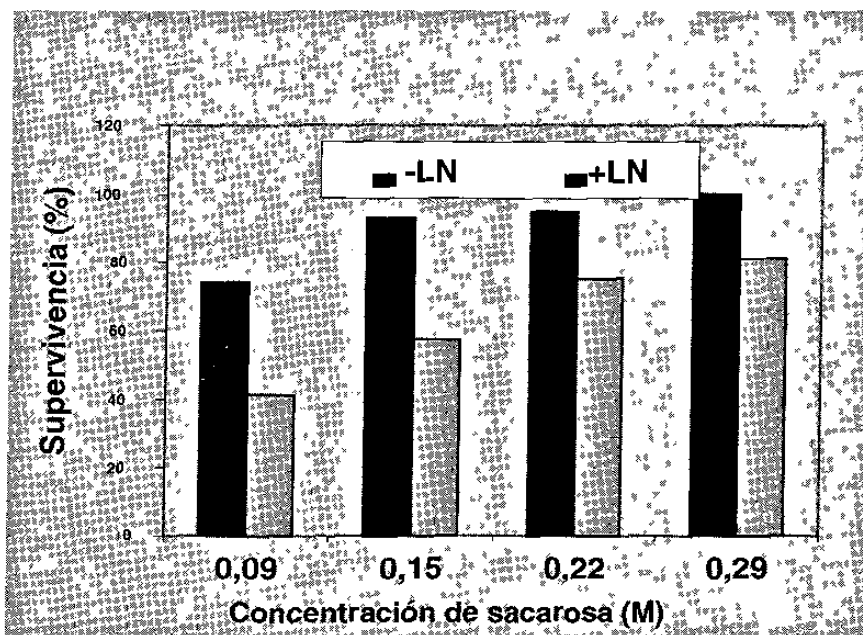
las esferas preacondicionadas. Mientras que la supervivencia de los brotes no criopreservados se mantuvo en un 100% cuando el contenido de humedad varió desde 72.1 hasta 20.6 % y después empezó a disminuir (fig. 2.). Aproximadamente un 42 % de los brotes deshidratados hasta un 16.1 % sobrevivieron. La supervivencia de los brotes criopreservados solo se presentó cuando el contenido de humedad fue mas bajo del 19.1 %, con una máxima tasa de supervivencia del 41.1 % a un 16.9 % de humedad.



**Figura 2.-** Efecto en el porcentaje de supervivencia de los brotes criopreservados (+NL) y no criopreservados (-NL) con respecto al contenido de humedad

La tolerancia de los brotes apicales a la deshidratación y al subsiguiente congelamiento fue fuertemente mejorado por el preacondicionamiento de vitrificación. Los brotes apicales no criopreservados (-NL) que fueron preacondicionados en sacarosa 0.09 M mostraron una tasa de supervivencia del 74 %, mientras que los que se preacondicionaron en-sacarosa 0.29 M sobrevivieron en un 100 %.

La supervivencia de los brotes apicales criopreservados (+NL) se incrementó desde un 41.1 % hasta aproximadamente 81.1 % cuando la concentración de sacarosa se incrementó desde 0.09 M hasta 0.29 M (fig. 3.).



**Figura 3.-** Efecto de la concentración de sacarosa en el medio de cultivo en la supervivencia del control (-NL) y brotes criopreservados cuando se deshidrataron hasta un 17 % de humedad antes de almacenarse en NL.

#### 6.4. Regeneración de brotes

La concentración de benciladenina (BA) en el medio de regeneración afectó fuertemente la supervivencia y recrecimiento de los brotes criopreservados. La supervivencia aumento con la concentración de BA en el medio. En los tratamientos con BA desde 0-2  $\mu\text{M}$  no se observó formación de tejido de callo, sin embargo, se presentó en las concentraciones de 3-4  $\mu\text{M}$  encontrándose que 2  $\mu\text{M}$  de BA es la concentración óptima para la recuperación de brotes apicales, como se puede apreciar en la tabla 2.

**Tabla 2.-** Efecto de la benciladenina (BA) en el medio de postcultivo en la supervivencia y regeneración de los brotes criopreservados.

Concentración de Benciladenina (BA) $\mu M$	Supervivencia %	Formación De callo	Altura de Brotes (cm)	N° de hojas expandidas
0	31.4 $\pm$ 0.4	-	1.3 $\pm$ 0.3	0.8 $\pm$ 0.3
1	62.5 $\pm$ 0.5	-	2.1 $\pm$ 0.3	1.2 $\pm$ 0.3
2	77.6 $\pm$ 0.3	-	5.2 $\pm$ 0.4	5.1 $\pm$ 0.4
3	74.3 $\pm$ 0.4	+	6.1 $\pm$ 0.4	5.8 $\pm$ 0.3
4	81.5 $\pm$ 0.4	++	5.0 $\pm$ 0.5	4.8 $\pm$ 0.6

## 7. Discusión

La criopreservación es considerada a la fecha la más promisorio alternativa para la conservación de germoplasma de especies con semillas recalcitrantes y de plantas propagadas vegetativamente. En cítricos, la supervivencia de semillas, embriones, óvulos, embriones axilares y células embriogénicas congelados y descongelados ha sido demostrada con distintos niveles de éxito (Mumford y Grout, 1979; Bajaj, 1984; Marin y Duran-Vila, 1988; Marin *et al.*, 1993; Radhamani y Chandel 1992; Kobayashi *et al.*, 1990; Sakai *et al.*, 1990, 1991). Sin embargo, considerando que los cultivares de cítrico son propagados vegetativamente y que por lo tanto las yemas axilares y brotes apicales son el mejor tipo de inóculo para criopreservar, la presente investigación se concreto a la utilización de brotes apicales como única fuente de inóculo. Al respecto, las investigaciones realizadas con este tipo de inóculo en cítricos y utilizando la técnica de encapsulación vitrificación, han sido reportadas solo sobre las especies portainjerto *Poncirus trifoliata* L. Raf. y citrange troyer [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. x *Citrus sinensis* (L.) Osbeck.] (González-Amao, *et al.*, 1998 y Wang *et al.*, 2002). En la presente investigación los resultados de supervivencia (81.1 %) con el precultivo de brotes apicales en medio conteniendo sacarosa cuya concentración es incrementada progresivamente, mejora la supervivencia de brotes criopreservados, coincidiendo con González-Amao, *et al.*, 1998 y Wang *et al.*, 2002 los cuales reportan una supervivencia de 90 y 80 % respectivamente. Resultados semejantes con altas concentraciones de sacarosa (0.7 M) en la etapa de precultivo hicieron posible superar la sensibilidad de los brotes apicales de caña de azúcar a la exposición directa al NL (González-Amao *et al.*, 1999). Por otra parte, Hitmi *et al.*, (1999) demostraron también que la sacarosa reduce el contenido de agua de los brotes apicales, fortaleciendo la tolerancia a la congelación. Observaron que una alta concentración de sacarosa dentro de las células disminuía el riesgo del daño ocasionado por la deshidratación y congelación debido al benéfico establecimiento de un estado de vitrificación, reportando también que la sacarosa mantenía la integridad de la membrana plasmática por el reemplazo de agua de la superficie de la membrana estabilizando las proteínas a las



condiciones de deshidratación y congelación. Los resultados del presente estudio mostraron que la tolerancia a la deshidratación y el subsiguiente congelamiento fue grandemente mejorado con el preacondicionamiento del grupo de brotes a concentraciones de sacarosa dentro de los rangos desde 0.22 M hasta 0.29 M, al mismo tiempo, con el preacondicionamiento los brotes mostraron un mejor crecimiento que con las concentraciones normales de sacarosa en el medio de cultivo, concordado con los resultados obtenidos por los autores mencionados.

El mecanismo preciso que explique las observaciones de esta investigación es aún desconocido, pero se puede inferir que un contenido reducido de agua en el tejido de los brotes es benéfico para la inducción de la tolerancia a la deshidratación y la subsiguiente congelación, como se demostró en el trabajo de Takagi *et al.*, (1997) con la supervivencia de brotes criopreservados de taro (*Colocasia esculenta*), donde la supervivencia se incrementó gradualmente con la edad de las plantas donadoras desde 46-86 % con inóculos provenientes de plantas de una y 29 semanas de edad respectivamente, observando que los brotes provenientes de plantas más jóvenes contenían mayor contenido de agua que las menos jóvenes. Estos resultados también coinciden con los de Vandebussche *et al.*, (1999), donde se demostró que altos niveles de acumulación de sacarosa en los inóculos fue determinante para la prevención de daños causados por la deshidratación y congelación, incrementando la supervivencia de brotes apicales de betabel.

Paul *et al.*, (2000), afirman que el estado fisiológico de los inóculos puede significativamente influenciar su potencial de supervivencia. Los resultados de esta investigación pueden inferir que el preacondicionamiento de brotes apicales a altas concentraciones de sacarosa, indujo un nuevo estado fisiológico a los mismos, lo cual puede habilitarlos para tolerar mejor la deshidratación y la subsiguiente congelación.

La composición del medio de regeneración es muy importante para la recuperación de los brotes apicales criopreservados. Es requerido un apropiado medio de regeneración, que permita el logro de altas tasas de supervivencia y rápido

recrecimiento de los brotes criopreservados. La regeneración se debe desarrollar sin la formación intermedia de tejido de callo. La formación de callo es usualmente indeseable debido a que puede causar variaciones somaclonales sobre todo si los brotes obtenidos son de origen adventicio. Para probar los efectos de varias combinaciones y concentraciones de reguladores de crecimiento en la recuperación de brotes apicales criopreservados de álamo blanco (*Populus alba* L.), Lambardi *et al.* (2000), encontraron que aunque no se observó formación de tejido de callo, la supervivencia y formación de brote fue marcadamente disminuida cuando los brotes criopreservados fueron regenerados en un medio libre de reguladores de crecimiento. La adición de citocininas y GA<sub>3</sub> al medio de regeneración fortalecieron grandemente la supervivencia y velocidad del desarrollo de brotes, sin embargo, la presencia de BA a una concentración mayor de 3 μM indujeron la formación de callo. En esta investigación, los resultados fueron similares a los alcanzados por los autores mencionados, confirmando que la presencia de la citocinina benciladenina (BA) a una concentración de 2 μM en el medio de regeneración, es esencial después de la criopreservación, para la aceleración de la recuperación de brotes, sin embargo, la concentración de BA debe ser cuidadosamente ajustada para evitar la formación de tejido de callo indeseable.

## 8. Conclusiones y recomendaciones

De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede concluir que la utilización del precultivo de los brotes apicales de *C. sinensis* (L.) Osb. en sacarosa en el rango de concentración de 0.15-0.29 M, fue determinante en la optimización de las tasas de supervivencia posterior a la criopreservación.

El proceso de vitrificación-deshidratación duplicó la tasa de supervivencia, comprobándose así, que el proceso de intercambio de agua por sacarosa dentro de las células de los tejidos de *C. sinensis* (L.) Osb. participa en la inhibición de formación de astillas de hielo, conjuntamente con el proceso de deshidratación, evitando así, el daño celular por la congelación, reflejándose en el aumento en la supervivencia desde 41.1 hasta 81.1 % de los brotes criopreservados. De acuerdo a resultados obtenidos, la inducción de la tolerancia a la deshidratación y a la subsiguiente congelación después del preacondicionamiento de los brotes, parece estar regulada por el proceso de vitrificación. Sin embargo, el mecanismo preciso que pueda explicar las observaciones del presente trabajo es desconocido.

Para lograr un mejor conocimiento de los anteriores mecanismos de vitrificación-deshidratación, se recomienda realizar más estudios a niveles fisiológicos y bioquímicos, así como, la utilización de otros sistemas de preacondicionamiento, como lo es la aclimatación al frío previo al proceso de congelación que se realiza con especies templadas buscando la inducción de resistencia a la deshidratación y congelación.

La utilización de benciladenina (BA) a una concentración de 2  $\mu$ M en el medio de regeneración de brotes criopreservados influyó grandemente en la estimulación de los brotes a reanudar rápidamente su crecimiento después de la congelación. El protocolo estandarizado de criopreservación para *C. sinensis* (L.) Osb. obtenido en esta investigación resulta ser una herramienta prometedora para la conservación de germoplasma de cultivares de cítricos de líneas comerciales y avanzadas establecidas en las colecciones de campo.

Es recomendable también validar esta metodología en otras especies de cítricos para la conservación de germoplasma en colecciones de campo, y evitar las problemáticas de pérdidas de material genético por los distintos factores adversos mencionados en los antecedentes.

## 9. Referencias

- Abdelnour-Esquivel, A. y Engelmann, F. (2002). Cryopreservation of chayote (*Sechium edule* Jacq. Sw.) zygotic embryos and shoot-tips from *in vitro* plantlets. *Cryo-Letters*, 23, 299-308.
- Acker, J.P. y McGann, L.E. (2003). Protective effect of intracellular ice during freezing. *Cryobiology*, 46, 197-202.
- Ashton, P.S. (1987). Biological considerations in *in-situ* versus *ex-situ* plant conservation. En *Botanic Gardens and the World Conservation Strategy* (pp. 117-130). London: Academic Press.
- Astley, D. (1991). Exploration: Methods and problems of exploration and field collecting. En *Genetic conservation of world crop plants* (pp. 11-22). London: Academic Press.
- Bachiri, Y., Song, G. Q., Plessis, P., Shoar-Ghaffari, A., Rekab, T., y Morisset, C. (2001). Routine cryopreservation of kiwifruit (*Actinidia spp*) germplasm by encapsulation-dehydration: Importance of plant growth regulators. *Cryo-Letters*, 22, 61-74.
- Benson, E. E., Reed, B. M., Brennan, R. M., Clacher, K. A., y Ross, D. A. (1996). Use of thermal analysis in the evaluation of cryopreservation protocols for *Ribes nigrum* L. germplasm. *Cryo-Letters*, 17, 347-362.
- Blakesley, D., y Kiernan, R. J. (2001). Cryopreservation of axillary buds of a *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus camaldulensis* hybrid. *Cryo-Letters*, 22, 13-18.
- Boxus, P. (1998) Plant biotechnology applied to horticultural crops. En *Memorias de World conference on horticultural research* (pp. 1-14). Roma: ISHS.
- Chang, T.T. (1985). Crop history and genetic conservation: rice – a case study. *Iowa State Journal of Research*, 59, 425-455.
- Chang, Y. y Reed, B. M. (1999). Extended cold acclimation and recovery medium alteration improve regrowth of *Rubus* shoot tips following cryopreservation. *Cryo-Letters*, 20, 371-376.
- Channuntapipat, C., Collins, C., Bertozi, T., Sedgley, M. (2000). Cryopreservation of *in vitro* almond shoot tips by vitrification. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 72, 228-232.
- Chin, F. (1994). Seedbanks: conserving the past for the future. *Seed Science and Technology*, 22, 385-400.
- Chin, F., Roberts, E.H. (1980). *Recalcitrant crop seeds*. Kuala Lumpur: Tropical Press.
- Cho, E.G., Hor, Y.L., Kim, H.H., Rao, V.R. y Engelmann, F. (2002). Cryopreservation of *Citrus madurensis* embryonic axes by encapsulation-dehydration. *CryoLetters*, 23, 325-332.

Cho, E.G., Noor, N.M., Kim, H.H., Ro, V.R. y Engelmann, F. (2002). Cryopreservation of *Citrus aurantifolia* seeds and embryonic axes using a desiccation protocol. *CryoLetters*, 23, 309-316.

Conway, W. (1988). Can technology aid species prevention?. En *Biodiversity* (pp. 263-268). Washington: Nacional Academy Press.

Danso, K. E., y Ford-Lloyd, B. V. (2003). Encapsulation of nodal cuttings and shoot tips for storage and exchange of cassava germplasm. *Plant Cell Reports*, 21, 718-725.

De Carlo, A., Benelli, C. y Lambardi, M. (2000). Development of a shoot-tip vitrification protocol and comparison with encapsulation-based procedures for plum (*Prunus domestica* L.) cryopreservation. *Cryo-Letters*, 21, 215-222.

Dodds, J.H. (1991). *In vitro* methods for conservation of plant genetic resources. London: Chapman & Hall.

Dziubiak, M. (2001). Cryopreservation of dormant vegetative buds in liquid nitrogen as an alternative method of conservation of fruit crop germplasm: Review. En *IX Conferencia Internacional de Horticultura (Comp.)* (pp. 55-59). Lednice, Czech:ISBN 80-7157-524-0.

Ellis, R.H., Hong, T.D., Roberts, E.H. (1985). Handbook of seed technology for genebanks. Roma: IBPGR

Ellis, R.H., Hong, T.D., Roberts, E.H., (1990). An intermediate category of seed behaviour? 1. Coffe. *Journal of Experimental Botany*, 41, 1167-1174.

Engelmann, F. (2000). Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources. En *Keynote presentations of Cryopreservation of tropical plant germplasm.* (pp. 8-20). Japon: Engelmann y Takagi.

Engelmann, F. (1997). *In vitro* conservation methods. En *Biotechnology and plant genetic resources.* (pp. 119-161). Roma: CAB International.

Engelmann, F. (1998). *In vitro* conservation of horticultural genetic resources review of the state of the art. En *Conferencia mundial en investigación hortícola* (pp. 1-6). Roma: ISHS.

Escobar, R. H., Mafla, G. y Roca, W. M. (1997). A methodology for recovering cassava plants from shoot tips maintained in liquid nitrogen. *Plant Cell Reports*, 16, 474-478.

Falk, D. (1989). The theory of integrated conservation strategies for biological diversity. En *Asociación de áreas naturales* (pp. 5-10). Syracuse, NY: Nat. Areas Assoc.

FAO/IPGRI (1994). Genebank Standards. Roma: FAO-IPGRI

Fukai, S., Goi, M. y Tanaka, M. (1991). Cryopreservation of shoot tips of Caryophyllaceae ornamentals. *Euphytica*, 56, 149-153.

Gillman, M. (1997). Plant population ecology. En *Plant genetic conservation* (pp. 114-131). London: Chapman & Hall.

- González-Arno, M.T., Juárez, J., Ortega, L., Navarro, L. y Duran-Vila, N. (2003). Cryopreservation of ovules and somatic embryos of *Citrus* using the encapsulation-dehydration technique. *CryoLetters*, 24, 85-94.
- González-Arno, M.T., Engelmann, F., Urra, C., Morenza, M. y Rios, A. (1998). Cryopreservation of *Citrus* apices using the encapsulation-dehydration technique. *CryoLetters*, 19, 177-182.
- González-Arno, M. T., Urra, C., Engelmann, F., Ortiz R., y de la Fe, C. (1999). Cryopreservation of encapsulated sugarcane apices: Effect of storage temperature and storage duration. *Cryo-Letters*, 20, 347-352.
- González-Benito, M. E., Moreno-Prieto, R., Herradón, E. y Martín, C. (2002). Cryopreservation of *Quercus suber* and *Quercus ilex* embryonic axes: *In vitro* culture, desiccation and cooling factors. *CryoLetters*, 23, 283-290.
- Grospietsch, M., Stodulkova, E., Zamecnic, J. (1999). Effect of osmotic stress on the dehydration tolerance and cryopreservation of *Solanum tuberosum* shoot tips. *CryoLetters*, 20, 339-346.
- Heywood, V.H. (1990). Objectives and strategies for a network of Mediterranean botanic gardens. En *Conservation techniques in botanic gardens* (pp. 57-62). España: Koeltz Scientific.
- Hitmi, A., Barthomeuf, C., Sallanon, H. (1999). Cryopreservation of *Chrysanthemum cinerariaefolium* shoot tips. Effects of pre-treatment conditions and retention of biosynthetic capacity. *CryoLetters*, 20, 109-120.
- Hirai, D. y Sakai, A. (1999). Cryopreservation of *in vitro*-grown axillary shoot-tip meristems of mint (*Mentha spicata* L.) by encapsulation vitrification. *Plant Cell Reports*, 19, 150-155.
- Hirai, D., y Sakai, A. (2003). Simplified cryopreservation of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] by optimizing conditions for osmoprotection. *Plant Cell Reports*, 21, 961-966.
- Hubálek, Z. (2003). Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*, 46, 205-229.
- Hummer, K.E. (1999). Biotechnology in plant germplasm acquisition. En *Plant Conservation Biotechnology* (pp. 25-39). London: Taylor & Francis.
- Iriondo, J. M. (2001). Conservación de germoplasma de especies raras y amenazadas. *Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg.*, 16, 5-24.
- Iriondo, J.M., Pérez, C. (1996). Micropropagation and *in vitro* storage of *Cenaturium rigualii* Esteve (Gentianaceae). *Israel Journal of Plant Science*, 44, 115-123.
- Iriondo, J.M. Pérez, C. (1999). Propagation from seeds and seed preservation. En *A colour atlas of plant propagation and conservation* (pp. 46-57). London: Manson Publishing.

- Kobayashi, S., Sakai, A. y Oiyama, I. (1990). Cryopreservation in liquid nitrogen of cultured navel orange (*Citrus sinensis* Osb.) nucelar cells and subsequent plant regeneration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 23, 15-20.
- Lalibertè, B. (1997). Botanic garden seed banks/genebanks worldwide, their facilities, collections and network. *Botanic Gardens Conservation News*, 2, 18-23.
- Lambardi, M. (2002). Cryopreservation of germplasm of *Populus* (poplar) species. En *Cryopreservation of Plant Germplasm II* (pp. 269-286). Berlin: Springer-Verlag.
- Lambardi, M. y De Carlo, A. (). Application of tissue culture to germplasm conservation of temperate broad-leaf trees. En *Micropropagation of woody trees and fruits* (pp. 815-840). Roma: Kluwer Academic Publishers.
- Lambardi, M., Fabbri, A. y Caccavale, A. (2000). Cryopreservation of white poplar (*Populus alba* L.) by vitrification of *in vitro*-grown shoot tips. *Plant Cell Reports*, 19, 213-218.
- Lambardi, M., Lynch, P. T., Benelli, C., Mehra, A. y Siddika, A. (2002). Towards the cryopreservation of olive germplasm. *Adv. Hort. Sci.*, 16, 165-174.
- Leos, R. (2001) La citricultura: Un esbozo de su problemática. En *Simposio internacional "La citricultura en el siglo XXI"* (pp. 1-19). México: U.A.T.-UARCT.
- Lima, H. y Pérez, M.C. (1996) Introducción al estudio de los cítricos. En *Curso Internacional de Citricultura* (pp. 1-14). México: U.A.T.-UARCT.
- Luo, J. y Reed, B. M. (1997). Abscisic acid-responsive protein, bovine serum albumin, and proline pretreatments improve recovery of *in vitro* currant shoot-tip meristems and callus cryopreserved by vitrification. *Cryobiology*, 34, 240-250.
- Lynch, P.T. (1999). Tissue culture techniques in *in vitro* plant conservation. En *Plant conservation biotechnology* (pp. 41-62). London: Taylor & Francis.
- Marzalin, M., Krishnapillay, B. (1999). Recalcitrant seed conservation. En *Plant conservation Biotechnology* (pp. 265-276). London: Taylor & Francis.
- Marin, M.L., Gogorcena, Y., Ortiz, J. y Duran-Vila, N. (1993). Recovery of whole plants of sweet orange from somatic embryos subjected to freezing thawing treatments. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 34, 27-33.
- Martínez, D., Tamés, R. S., y Revilla, M. A. (1999). Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot-tips of hop (*Humulus lupulus* L.) using encapsulation/dehydration. *Plant Cell Reports*, 19, 59-63.
- Maruyama, E., Kinoshita, I., Ishii, K., Ohba, K. y Sakai, A. (1997). Germplasm conservation of *Guazuma crinita*, a useful tree in the Peru-Amazon, by the cryopreservation of *in vitro*-cultured multiple bud clusters. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 48, 161-165.



- Matsumoto, T., Mochida, K., Itamura, H. y Sakai, A. (2001). Cryopreservation of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) by vitrification of dormant shoot tips. *Plant Cell Reports*, 20, 398-402.
- Matsumoto, T., Sakai, A. y Nako, Y. (1998). A novel preculturing for enhancing the survival of *in vitro*-grown meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) cooled to -196 °C by vitrification. *CryoLetters*, 19, 27-36.
- Matsumoto, T., Sakai, A. y Yamada, K. (1994). Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) by vitrification and subsequent high plant regeneration. *Plant Cell Reports*, 13, 442-446.
- Matsumoto, T., Sakai, A. y Yamada, K. (1995). Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of lily by vitrification. *Plant Cell. Tissue and Organ Culture*, 41, 237-241.
- Maxted, N., Ford-Lloyd, B.V. y Hawkes, J.G. (1997). Complementary conservation strategies. En *Plant genetic Resources Conservation, The in situ approach* (pp. 15-39). London: Chapman y Hall.
- McNelly, J.A., Miller, K.R., Reid, W.V., Mittermeier, R.A., Werner, T.B. (1990). *Conserving the world biological diversity*. Gland, Suiza: IUCN-WRI-CI-WWF-US.
- Menge, E. (1986). Predicting the future of rare plant populations: demographic monitoring and modeling. *Natural Areas Journal*, 6, 13-25.
- Menini (1998). Policy issues for the conservation and utilization of horticultural genetic resources for food and agriculture. En *World Conference on Horticultural Research* (pp. 1-23). Roma: AGRSI-UNIBO.
- Miller, K., Allegretti, M.H., Johnson, N., Jonsson, B. (1995). Measures for conservation of biodiversity and sustainable use of its components. En *Global Biodiversity Assessment* (pp. 919-1061). Cambridge, USA.: UNEP-Cambridge University Press.
- Mix-Wagner, G., Conner, A. J. y Cross, R. J. (2000). Survival and recovery of asparagus shoot tips after cryopreservation using the "droplet" method. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 28, 283-287.
- Morico, G. (1998). Horticultural genetic diversity: Conservation and sustainable utilization and related international agreements. En *World Conference on Horticultural Research* (pp. 1-10). Roma: AGRSCI-UNIBO.
- Niino, T., Hettiarachchi, A., Takahashi, J. y Samarajeewa, P. K. (2000). Cryopreservation of lateral buds of *in vitro*-grown innala plants (*Solemostemon rotundifolius*) by vitrification. *Cryo-Letters*, 21, 349-356.
- Niino, T., y Sakai, A. (1992). Cryopreservation of alginate-coated *in vitro*-grown shoot tips of apple, pear and mulberry. *Plant Sci.*, 87, 199-206.
- Niino, T., Sakai, A., Yakawa, H. y Nojiri, K. (1992). Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of apple and pear by vitrification. *Plant Cell. Tissue and Organ Culture*, 28, 261-266.

- Niino, T., Tashiro, K., Ohuchi, S., Magoshi, J., Akihama, T. (1997). Cryopreservation of *in vitro* grown shoot tips of cherry and sweet cherry by one-step vitrification. *Sci. Horticulture*, 70, 155-163.
- Ogawa, R., Ishikawa, M., Niwata, E. y Oosawa, K. (1997). Cryopreservation of shoot primordia cultures of melon using a slow prefreezing procedure. *Plant Cell. Tissue and Organ Culture*, 49, 171-177.
- Panis, B., Strosse, H., Van Den Hende, S. y Swennen, R. (2002). Sucrose preculture to simplify cryopreservation of banana meristem cultures. *Cryo-Letters*, 23, 375-384.
- Panis, B. y Thinh, N. T. (2001). *Crioconservación de germoplasma de Musa*. Montpellier, France: Red Internacional para el mejoramiento del Banano y el Plátano.
- Paul, H., Daigny, G. y Sangwan-Norreel, B. S. (2000). Cryopreservation of apple (*Malus x domestica* Borkh.) shoot tips following encapsulation-dehydration or encapsulation-vitrification. *Plant Cell Reports*, 19, 768-774.
- Pence, V. (1999). The application of biotechnology for the conservation of endangered plants. En *Plant Conservation Biotechnology* (pp. 227-250). London: Taylor & Francis.
- Peña, M. S. (2000). Importancia económica de la citricultura en México. En *Curso de aprobación y actualización fitosanitaria en la campaña contra el VTC* (pp. 105-109). México: SAGAR.
- Pennycooke, J. C. y Towill, L. E. (2000). Cryopreservation of shoot tips from *in vitro* plants of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] by vitrification. *Plant Cell Reports*, 19, 733-737.
- Pennycooke, J. C., y Towill, L. E. (2001). Medium alterations improve regrowth of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] shoot tips cryopreserved by vitrification and encapsulation-dehydration. *Cryo-Letters*, 22, 381-389.
- Pérez, R.M., Navarro, L. y Duran-Vila. (1997). Cryopreservation and storage of embryogenic callus cultures of several *Citrus* species and cultivars. *Plant Cell Reports*, 17, 44-49.
- Pessoa, A. (1998). Estado de conservación de las especies silvestres de *Lycopersicum* de en Chile. *Serie La Platina*, 68, 42-54.
- Phunchindawan, M., Hirata, K., Sakai, A. y Miyamoto, K. (1997). Cryopreservation of encapsulated shoot primordia induced in horseradish (*Armoracia rusticana*) hairy root cultures. *Plant Cell Reports*, 16, 469-473.
- Prance, G.T. (1997). The conservation of Botanical Diversity. En *Plant Genetic Conservation* (pp. 3-14). London: Capman & Hall.
- Radhamani, J. y Chandel, K.P.S. (1992). Cryopreservation of embryonic axes of trifoliolate orange [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] *Plant Cell Reports*, 11, 372-374.

- Ramos, N. J. (1997). Situación actual de la citricultura mundial. En *II Curso internacional de citricultura* (pp. 1-18). México: U.A.T.-U.A.R.C.T.
- Reed, B. M. (1988). Cold acclimation as method to improve survival of cryopreserved *Rubus* meristems. *Cryo-Letters*, *9*, 166-171.
- Reed, B. M. (1990). Survival of *in vitro*-grown of apical meristems of *Pyrus* following cryopreservation. *HortScience*, *25*, 111-113.
- Reed, B. M. (1993). Responses to ABA and cold acclimation are genotype dependent for cryopreserved blackberry and raspberry meristems. *Cryobiology*, *30*, 179-184.
- Reed, B.M., Paynter, C.L., DeNoma, J. y Chang, Y. (1998). Thechniques for medium- and long-term storage of pear (*Pyrus spp.* L.) genetic resources. *Plant Genetic Resources Newsletter*, *115*, 1-5
- Reed, B.M., DeNorma, J. y Chang, Y. (2000). Application of cryopreservation protocols at a clonal genebank. En *Cryopreservation of tropical plant germplasm* (pp. 246-249). Japon: JIRCAS/IPGRI.
- Reed y Hummer (1995). Conservation of germplasm of strawbrry. En. *Biotechnology in Agriculture and Forestry* (pp. 354-370) USA.: Y.P.S. Bajaj.
- Reed, B. M. y Lagerstedt, H. B. (1987). Freeze preservation of apical meristems of *Rubus* in liquid nitrogen. *HortScience*, *22*, 302-303.
- Reed, B. M. y Yu, X. (1995). Cryopreservation of *in vitro*-grown gooseberry and currant meristems. *Cryo-Letters*, *16*, 131-136.
- Reid, W.V., Miller, K.R. (1989). *Keeping options alive. The Scientific Basis for Conserving Biodiversity*. Washington: World Resources Institute ed.
- Sakai, A. (2000). Development of Cryopreservation techniques. En: *Cryopreservation of tropical plant germplasm* (pp. 1-7). Japon: JIRCAS/IPGRI.
- Schemske, D.W., Husband, B.C., Ruckelshaus, M.H., Goodwillie, C., Parker, I.M., Bishop, J.G. (1994). Evaluating approaches to the conservation of rare and endangered plants. *Ecology*, *75*, 584-606.
- Smith, N.J.H. (1986). *Botanic Gardens and Germplasm Conservation*. Honolulu: University of Hawaii Press.
- Susuki, T., Kaneko, M., y Harada, T. (1997). Increase in freezing resistance of excised shoot tips of *Asparagus officinalis* L. by preculture on sugar-rich media. *Cryobiology*, *34*, 264-275.
- Susuki, T., Kaneko, M., Harada, T. y Yakuwa, T. (1998). Enhanced formation of roots and subsequent promotion of growth of shoots on cryopreserved nodal segments of *Asparagus officinalis* L. *Cryobiology*, *36*, 194-205.

Takagi, H., Tien Thinh, N., Islam, O. M., Senboku, T., y Sakai, A. (1997). Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of taro [*Colocasia esculenta* (L.) Schott] by vitrification. 1. Investigation of basic conditions of the vitrification procedure. *Plant Cell Reports*, 16, 594-599.

Tannoury, M., Ralambosoa, J., Kaminski, M. y Dereuddre, J. (1991). Cryoconservation by vitrification of alginate-coated carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) shoot-tips of *in vitro* plantlets. *C. R. Seances-Acad. Sci. Ser. 3*, 633-38.

Towill, L. y Jarret, R. L. (1992). Cryopreservation of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.)] shoot tips by vitrification. *Plant Cell Reports*, 11, 175-178.

Vandenbussche, B. y De Proft, M. P. (1996). Cryopreservation of *in vitro* sugar beet shoot-tips using the encapsulation-dehydration technique: development of a basic protocol. *Cryo-Letters*, 17, 137-140.

Vandenbussche, B. y De Proft, M. P. (1998). Cryopreservation of *in vitro* sugar beet shoot tips using the encapsulation-dehydration technique: influence of abscisic acid and cold acclimation. *Plant Cell Reports*, 17, 791-793.

Vandenbussche, B., Leuridan, S., Verdoodt, V., Gysemberg, M., DeProft, M. (1999). Changes in sugar content and fatty acid composition of *in vitro* sugar beet shoots after cold acclimation: influence on survival after cryopreservation. *Plant Growth Regulators*, 28, 157-163.

Vandenbussche, B., Weyens, G. y De Proft, M. P. (2000). Cryopreservation of *in vitro* sugar beet (*Beta vulgaris* L.) shoot tips by a vitrification technique. *Plant Cell Reports*, 19, 1064-1068.

Villarreal, G. L. (2001). Antecedentes y situación del VTC en México. En *Simposium Internacional de "Virus tristeza de los cítricos"* (pp. 1-6). México: U.A.T.-U.A.R.C.T.

Wu, Y., Engelmann, F., Zhao, Y., Zhou, M., Chen, S. (1999). Cryopreservation of apple shoot tips: importance of cryopreservation technique and of conditioning of donor plants. *Cryoletters*, 20, 121-130.

Wu, Y., Zhao, Y., Engelmann, F., Zhou, M., Zhang, D., y Chen, S. (2001). Cryopreservation of apple dormant buds and shoot tips. *Cryo-Letters*, 22, 375-380.

Wang, Q.C., Batuman, O., Li, P. y Bar-Joseph, M. (2002). Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of "Troyer" citrange [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. X *Citrus sinensis* (L.) Osbeck] by encapsulation-dehydration. *Plant Cell Reports*, 20, 901-906.

Wang, B.S.P., Charest, P.J., Downie, B. (1993). *Ex situ* storage of seeds, pollen and *in vitro* cultures of perennial woody plant species. En *FAO Forestry Paper 113* (pp. 83). Roma: FAO.

Wang, Q.C., Tanne, E., Arav, A., Gafny, R. (2000). Cryopreservation *in vitro*-grown shoot tips of grapevine (*Vitis* L.) by encapsulation-dehydration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 63, 41-46.

Withers, L.A. (1993). Conservation methodologies with particular reference to *in vitro* conservation. En *Proceedings of the Asian Sweet Potato Germplasm Network Meeting* (pp. 102-109). Manila.

Zachariassen, K.E. y Kristiansen, E. (2000). Ice nucleation and antinucleation in nature. *Cryobiology*, 41, 257-279.

Zhao, Y., Wu, Y., Engelmann, F. y Zhou, M. (2001). Cryopreservation of axillary buds of grape (*Vitis vinifera*) *in vitro* plantlets. *Cryo-Letters*, 22, 321-328.

