

# LA CRIOPRESERVACIÓN VEGETAL: SU APLICACIÓN A LA CONSERVACIÓN DEL GERMOPLASMA DE AJO (*ALLIUM SATIVUM* L.)

## Plant cryopreservation: its application to garlic (*Allium sativum* L.) germplasm conservation

**María de los Ángeles Torres Mederos\***

Departamento de Recursos Fitogenéticos y Semillas, Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt" (INIFAT). Calle 188 no.38754 e/ 397 y Linderos, Santiago de las Vegas, La Habana, Cuba.

**RESUMEN:** El interés en las investigaciones sobre la criopreservación vegetal se ha incrementado debido a la necesidad de una alternativa efectiva para la conservación del germoplasma de las especies que no pueden ser almacenadas en los bancos de semillas convencionales. Las primeras técnicas de criopreservación utilizaban protocolos con velocidades de enfriamiento lentas y eran conocidas como técnicas de enfriamiento lento. Éstas probaron ser sistemas muy eficientes para los callos y las suspensiones celulares, pero fueron menos exitosas para los tejidos vegetales organizados. Posteriormente, se desarrollaron protocolos con alta velocidad de enfriamiento, los cuales son más apropiados para los explantes constituidos por poblaciones celulares, como los ápices, las yemas y los ejes embrionarios. La vitrificación, la gota-vitrificación y las V y D crio-placas están entre los protocolos más estudiados y son utilizados para la implementación de colecciones criopreservadas. La criopreservación de germoplasma de ajo se ha estudiado mediante diferentes protocolos debido a su importancia como planta de interés culinario y medicinal. En el presente, se mantienen colecciones criopreservadas de ajo mediante los métodos de la vitrificación, la gota-vitrificación o la V crio-placa en Europa, Corea del Sur, Japón y Los Estados Unidos de América.

**Palabras clave:** crioprotectores, protocolos para la criopreservación, vitrificación.

**ABSTRACT:** The interest on plant cryopreservation researches have increased due to the necessity of an effective alternative of germplasm conservation for species which conventional seed banks is not a suitable strategy. First cryopreservation techniques were based on low freezing velocity protocols, known as slow freezing techniques. These proved to be very efficient systems for callus and cell suspensions, but are less successful for organized plant tissues. Lately, protocols with high freezing velocity were developed, which were more suitable for explants constituted for cellular populations as apices, buds and embryo axis. Vitrification, droplet vitrification and V y D cryo-plates were among the most studied protocols and were used for the implementation of cryopreserved collections. Garlic germplasm cryopreservation has been studied by different protocols due to its importance as culinary and medicinal plant. At present, garlic cryopreserved collections were maintained by vitrification, droplet-vitrification or V cryo-plate methods, in Europe, Japan, South Korea and the United States of America.

**Key words:** cryopreservation protocols, cryoprotectants, vitrification.

## INTRODUCCIÓN

La pérdida creciente de especies vegetales, debido a la deforestación, el cambio climático, la salinización de los suelos y la sustitución de las variedades tradicionales por cultivares mejorados en grandes extensiones agrícolas, ha generado, entre otras

causas, el interés de los investigadores por conservar el germoplasma vegetal. El 90 % de las plantas angiospermas pueden conservarse en bancos de semillas, pero a partir de modelos predictivos y análisis de datos, se estima que la mitad de las especies vegetales no pueden ser almacenadas

\* Correspondencia a: [genética14@inifat.co.cu](mailto:genética14@inifat.co.cu); [mariadelosangelest636@gmail.com](mailto:mariadelosangelest636@gmail.com)

Recibido: 12/03/2024

Aceptado: 04/06/2024

**Conflicto de intereses:** El autor no presenta conflicto de intereses



Este artículo se encuentra bajo los términos de la licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial (CC BY-NC 4.0). <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>



en estos bancos. Entre ellas se encuentran las especies de reproducción vegetativa y las que poseen semillas excepcionales o intermedias; además, de otras que no producen semillas como los helechos y los musgos. Se ha calculado que entre las especies que no pueden ser preservadas en los bancos convencionales existentes, alrededor de 60 000 son de interés para la conservación (Walters y Pence, 2020).

Para las especies que no pueden ser conservadas mediante las semillas, la criopreservación es la única técnica disponible en la actualidad para garantizar la conservación de su germoplasma de forma segura y económicamente eficiente (Engelmann, 2012). Producto de más de 60 años de investigaciones, se han desarrollado protocolos que permiten obtener altos porcentajes de recuperación de plantas post-criopreservación, y se considera que alrededor de 10 000 accesiones se conservan, actualmente, de forma segura mediante esta criobiología (Panis, 2019).

En este trabajo se explican los principios básicos de la criopreservación y se resumen las características fundamentales de los protocolos más estudiados hasta el presente, con especial atención a su aplicación para la conservación del germoplasma de ajo, una especie de reproducción vegetativa y de importancia agrícola y medicinal, lo cual le confiere especial interés a su preservación.

## DESARROLLO

### Principios de la criopreservación

La criopreservación es el proceso mediante el cual las células o los tejidos biológicos se preservan por enfriamiento a temperaturas ultra-bajas, como la del nitrógeno líquido (-196 °C). A estas temperaturas, cualquier actividad biológica (incluyendo las reacciones bioquímicas que conducen al envejecimiento y la muerte celular) es ralentizada, de manera que el material biológico mantenido en esas condiciones puede ser almacenado por períodos muy prolongados.

La criopreservación se basa en la extracción del agua congelable de los tejidos por deshidratación física u osmótica, seguido por el enfriamiento ultra-rápido por inmersión en el nitrógeno líquido; y actualmente, se considera que es la perspectiva biotecnológica más novedosa y asequible que permite la conservación segura, por largo tiempo,

de la biodiversidad vegetal, sin riesgos de modificaciones genéticas (Benelli, 2021). Este método de conservación es crucial para las plantas que no producen semillas o que producen semillas que no germinan y se propagan vegetativamente (Jiroutová y Sedlák, 2020)

Como se mencionó anteriormente, la criopreservación tiene como primer paso la eliminación del agua congelable de los tejidos, mediante la deshidratación. A un contenido de agua menor de 0,25 gH<sub>2</sub>O.gms<sup>-1</sup> (ms, materia seca) se le denomina frecuentemente "agua no congelable" y las células vegetales que contienen de 0,25-0,4 gH<sub>2</sub>O.gms<sup>-1</sup>, usualmente, sobreviven a la exposición al nitrógeno líquido (Volk y Walters, 2006; Jiroutová y Sedlák, 2020).

La única forma de evitar la formación de cristales de hielo a temperaturas ultra-bajas sin una reducción extrema del contenido de agua es a través de la fase física denominada "vitrificación", que es la solidificación de un líquido formando una estructura amorfa o vítrea (Panis, 2019; Panis *et al.*, 2020), lo que significa que cuando se alcanza el estado sólido las moléculas se asocian sin adquirir la estructura ordenada que corresponde a la cristalización.

Todos los procedimientos desarrollados para la criopreservación de los materiales biológicos están basados en la optimización de la vitrificación, la que necesita dos condiciones para que se produzca: 1) velocidades de enfriamiento ultra-rápidas, para evitar que transcurra el tiempo necesario para que un cristal de hielo pueda formarse antes que todas las moléculas queden inmovilizadas por la temperatura ultra-baja, y 2) concentrar la solución celular, para que relativamente más moléculas (de soluto) interfieran la organización de las moléculas de agua para formar los cristales de hielo (Panis *et al.* 2020). Por ello, la vitrificación requiere de una solución altamente concentrada, que deshidrate suficientemente los tejidos sin causar daños, y haga posible que estos formen un estado vítreo estable (con la solución altamente concentrada circundante) cuando sea sumergido en el nitrógeno líquido (Matsumoto, 2017). La combinación de la deshidratación con el enfriamiento rápido de las células causa que el agua residual solidifique sin cristalización, la cual podría dañar a las células vivas (Taylor *et al.*, 2004).

## Los agentes crioprotectores

Los crioprotectores son sustancias que protegen las membranas y pueden formar un estado vítreo en las células. Se dividen en penetrantes y no penetrantes. Los que penetran al interior de las células tienen la función de reducir la deshidratación celular y el crecimiento de los cristales de hielo. Ellos son los principales constituyentes de las soluciones de vitrificación. Entre los más utilizados están el glicerol, el etilenglicol y el dimetilsulfóxido (DMSO), componentes de la solución de vitrificación PVS2.

Se considera que la actividad crioprotectora del glicerol se debe a que forma enlaces de hidrógeno con el agua, lo cual dificulta la formación de los cristales de hielo. Es el menos tóxico en altas concentraciones comparado con otros crioprotectores. El etilenglicol también actúa alterando los puentes de hidrógeno y se ha encontrado que cuando se une con el agua, la mezcla de 40 % de agua y 60 % de etilenglicol disminuye el punto de congelación y va a ser incapaz de formar sustancias cristalinas, pero se ha observado alguna toxicidad vinculada a este crioprotector (Bhattacharya, 2018).

En cuanto al DMSO, Faltus *et al.* (2021) en su estudio, sobre la habilidad de diferentes agentes crioprotectores para producir la vitrificación, concluyeron que el DMSO es el agente crioprotector más efectivo. Al respecto, Samuels *et al.* (2021) señalaron que se conoce que el DMSO rompe la red de enlaces de hidrógeno del agua y favorece la vitrificación sobre la cristalización. Esta característica puede ser el factor significativo que sustenta la inclusión del DMSO en la combinación de agentes crioprotectores y la frecuencia del uso de las soluciones basadas en el DMSO (Faltus *et al.*, 2021).

Mediante la espectroscopia CARS (espectroscopía coherente anti Stokes Raman) y el uso de d6-DMSO (DMSO marcado con deuterio, un isótopo no radiactivo del hidrógeno), se pudo comprobar que el DMSO no se distribuye uniformemente en el interior de las células, sino que se acumula dentro de los organelos (Samuels *et al.*, 2021). Sobre la base de sus experimentos, los autores estiman que los organelos que captan el DMSO son los amiloplastos y los cuerpos de almidón.

Un incremento en la concentración del DMSO en esos organelos pudiera favorecer su protección y al mismo tiempo, son los que están en mayor riesgo de daño debido a la toxicidad del DMSO, el cual en altas concentraciones puede producir la ruptura de las membranas.

En cuanto a la función de los crioprotectores no penetrantes, se consideran que pueden incrementar la tonicidad de las soluciones de vitrificación, lo cual contribuye a evitar el daño por congelación. La sacarosa, que es un carbohidrato natural en las células, a baja temperatura (-45 °C) proporciona la nutrición requerida para la preservación de las células y combinada con el DMSO mantiene buenas propiedades de crioprotección (Bhattacharya, 2018).

Generalmente, se recomienda una combinación de agentes crioprotectores para evitar el riesgo del daño de las muestras por la citotoxicidad. La combinación de los agentes crioprotectores puede disminuir la porción de los componentes individuales por debajo de su umbral de toxicidad (Faltus *et al.*, 2021).

Sobre la base del efecto preservador de los crioprotectores y, al mismo tiempo, su posible toxicidad en altas concentraciones, se han diseñado diferentes soluciones combinando los crioprotectores penetrantes y no penetrantes. De ellas, las más utilizadas son la solución PVS2 (plant vitrification solution) y la PVS3. La PVS2 está constituida por 30 % glicerol + 15 % etilenglicol + 15 % DMSO + 0,4 M sacarosa (Sakai *et al.*, 1990); y la PVS3, por 40 % glicerol y 40 % de sacarosa (Nishizawa *et al.* 1993); aunque también aparece en la literatura con la proporción 50 % de glicerol y 50 % de sacarosa (Keller y Senula, 2013; Panis, 2019).

## Aplicación de la criopreservación a diferentes tipos de material vegetal

Se han aplicado distintas técnicas criogénicas a un amplio rango de explantes, incluyendo el polen, las semillas, los embriones cigóticos y somáticos, las suspensiones celulares o los cultivos de callos, las yemas apicales, los ápices y las yemas dormantes. La selección del explante también está relacionada con el mejor método de recuperación *in vitro* (post-criopreservación) del material biológico, para un genotipo en específico (Benelli, 2021.)



## Protocolos para la criopreservación vegetal

### Técnicas clásicas.

#### Enfriamiento lento (slow freezing)

Quatrano (1968) describió el primer reporte sobre la aplicación del protocolo de enfriamiento lento a los tejidos vegetales. Con la reducción de la temperatura mediante el enfriamiento lento, se inicia la formación de cristales de hielo (seeding) en el medio exterior a la célula, la membrana actúa como una barrera física y previene la formación de hielo dentro de la célula; por lo éstas se mantienen sin la formación de hielo (sobreenfriadas). A medida que la temperatura disminuye, una cantidad creciente de la solución extracelular se convierte en hielo, lo que resulta en la concentración de los solutos intracelulares. En dependencia de la velocidad del enfriamiento y de la temperatura de pre-congelación, van a salir diferentes cantidades de agua de las células antes de que solidifiquen.

El protocolo del enfriamiento lento incluye los siguientes pasos: 1) precultivo de las muestras, 2) la crioprotección, 3) el enfriamiento lento (0,5-2,0 °C.min<sup>-1</sup> hasta una temperatura determinada; usualmente -40 °C), 4) la inmersión rápida de las muestras en nitrógeno líquido, 5) el almacenamiento, 6) transferencia rápida de las muestras a la temperatura ambiente (recalentamiento) y 7) la recuperación. Aunque su desventaja consiste en que requiere del uso de equipos específicos para producir el enfriamiento lento, ha sido aplicado exitosamente para la criopreservación de cultivos indiferenciados, como las suspensiones celulares (Engelmann, 2012)

Por su parte, Matsumoto (2017) señaló como técnicas clásicas para la criopreservación el enfriamiento lento y el enfriamiento simple. Describe el método enfriamiento lento (slow freezing), en concordancia con lo referido por Engelmann (2012), con los pasos siguientes: 1) las muestras (ápices, embriones y células) se empacan en criotubos; 2) se tratan con agentes crioprotectores (DMSO, glicerol, etilenglicol y sacarosa); 3) se induce la iniciación del hielo (extracelular, seeding) a -7 °C; 4) se enfrían a 0,3-0,5 °C min<sup>-1</sup> hasta -40 °C usando un congelador programable (para la deshidratación) y 5) se sumergen en el nitrógeno líquido. Respecto al método enfriamiento simple (simple freezing) indica que las muestras se empacan en los

criotubos, se tratan con un crioprotector a 25 °C, se enfrían a -30 °C para la deshidratación y se sumergen en el nitrógeno líquido.

### Protocolos de enfriamiento rápido

#### Gota ("Droplet freezing")

Este protocolo fue desarrollado por Schäfer-Menuhr *et al.* (1996) para criopreservar una colección de variedades de papa (*Solanum tuberosum* L.). Los ápices de las vitroplantas de 2-3 mm de largo y 0,5-1 mm de ancho se mantuvieron en medio de cultivo durante la noche. Al día siguiente, se colocaron durante dos horas en una solución crioprotectora (10 % DMSO en medio de cultivo) a la temperatura ambiente. A continuación, se pipetearon gotas de 2.5 µL de la solución crioprotectora sobre láminas de aluminio estéril de 0,7 por 2 mm y 0,03 mm de grueso, a razón de seis gotas por lámina. Se transfirió un ápice a cada gota y el enfriamiento se realizó por inmersión directa en el nitrógeno líquido. Para la conservación, se colocaron dos láminas por cada criovial de 2 mL, los que se habían enfriado previamente en el nitrógeno líquido. La utilización del soporte de aluminio y la introducción de la muestra en el nitrógeno líquido sin otra superficie intermedia que la gota, permite obtener un enfriamiento ultra-rápido, en favor de evitar la cristalización del agua celular durante los procesos de enfriamiento y el retorno a la temperatura ambiente.

Según Faltus *et al.* (2021), este método no está basado en la vitrificación de la muestra, ya que la baja concentración del DMSO utilizada no es suficiente para impedir la congelación del agua, de ahí su nombre droplet-freezing. Sus resultados positivos se asocian a que el DMSO induce algunos cambios ultraestructurales en las células tratadas que ayudan a superar la congelación del agua sin daños que conduzcan a la muerte celular.

### Protocolo encapsulación-deshidratación

Fue desarrollado por Fabre y Dereuddre, en 1990, para la criopreservación de ápices del género *Solanum*. El protocolo consta de los pasos siguientes: 1) los ápices, se suspenden en un medio libre de calcio suplementado con alginato de sodio al 3 %; 2) se dejan gotear sobre un medio con 100 mM de cloruro de calcio, para formar capsulas de alginato de calcio;

3) las cápsulas, de aproximadamente 3 mm de diámetro, conteniendo de uno a dos ápices, se ponen a cultivar en medios líquidos enriquecidos en sacarosa; 4) las capsulas, con alta concentración de sacarosa, se deshidratan en la corriente de aire de un flujo laminar, a un contenido de humedad del 20-30 % y 5) las capsulas deshidratadas se trasladan a crioviales y se sumergen en el nitrógeno líquido. La deshidratación también se puede lograr poniendo las cápsulas en placas de Petri colocadas en recipientes con sílica gel activada.

El tratamiento con sacarosa combinado con la deshidratación resulta en la vitrificación de la matriz de alginato y el explante embebido. La principal limitación de este método es que algunas especies resultan muy susceptibles a las altas concentraciones de sacarosa seguidas de la deshidratación y a que requiere de varios días para la ejecución del protocolo (Panis, 2019).

### Protocolos basados en la vitrificación

Estos protocolos se basan en producir la deshidratación celular antes del enfriamiento, exponiendo las muestras a medios crioprotectores concentrados y/o a la desecación por aire, seguido del enfriamiento, con lo cual se evitan los factores que favorecen la formación de hielo intracelular (Engelmann, 2012).

Los protocolos basados en la vitrificación tienen como ventaja, respecto a los protocolos clásicos, que en ellos el paso crítico para la supervivencia es la deshidratación y no el enfriamiento; de modo que si las muestras pueden ser deshidratadas a un contenido de humedad suficientemente bajo, sin que la supervivencia disminuya o disminuya poco respecto al control no deshidratado; generalmente, no se observa la caída de la supervivencia después de la criopreservación, o ésta es limitada (Engelmann, 2012). El autor también señaló que estos protocolos son más apropiados para los órganos complejos como los ápices de crecimiento y los embriones.

### Protocolo vitrificación

Estas técnicas se basan en exponer las muestras a las soluciones crioprotectoras altamente concentradas (para producir la deshidratación de la muestra), seguido de un enfriamiento rápido. El protocolo de la vitrificación típicamente

incluye los pasos siguientes: 1) exponer la muestra a una solución concentrada compuesta por glicerol y sacarosa (solución de carga) que tiene como finalidad el aumento gradual de la concentración de solutos; 2) la deshidratación con la solución de vitrificación (más comúnmente la PVS2 y la PVS3); 3) el enfriamiento rápido, mediante la inmersión directa de los crioviales en el nitrógeno líquido; 4) el retorno de las muestras a la temperatura ambiente (después de la criopreservación) sumergiendo los crioviales en un baño de agua, a la temperatura de 40 °C, por 80 s. y 5) la disminución gradual de la concentración de solutos, una vez que la muestra ha sido retirada del nitrógeno líquido, mediante una solución 1,2 M de sacarosa (solución de recuperación; Panis *et al.*, 2020).

El método de la vitrificación tiene como ventajas sobre la encapsulación deshidratación mayor tasa de regeneración después de la recuperación y un período de tiempo más corto para la ejecución del protocolo (Matsumoto, 2017). Este protocolo fue propuesto por Keller y Senula (2013) para la criopreservación de ajo, utilizando la solución de vitrificación PVS3. En Cuba, se han obtenido buenos resultados aplicando el protocolo vitrificación con la solución PVS3 para la criopreservación de ápices de la piña (Villalobos *et al.*, 2016) y el ajo (Torres, 2022).

### Encapsulación-vitrificación

Fue desarrollado por Matsumoto *et al.*, en 1995. Es una combinación del protocolo encapsulación-deshidratación y la vitrificación. El mayor mérito de esta técnica combinada es la mejor protección de las muestras encapsuladas durante la vitrificación y la reducción del tiempo necesario para la deshidratación, comparado con el método clásico de encapsulación deshidratación (Jiroutová y Sedlák, 2020).

### Protocolo gota (droplet)-vitrificación

Este método combina las soluciones altamente concentradas (PVS2 y PVS3) de la vitrificación con el enfriamiento ultra-rápido del protocolo "droplet freezing". Se utilizó por primera vez por Pennycooke y Towill, en el 2000, para la criopreservación de ápices de plantas *in vitro* de boniato (*Ipomea batatas* L. Lam). Los ápices de 0,5 a 1 mm, se precultivaron en sacarosa por



24 horas, y se trataron según el protocolo de la vitrificación (respecto a la exposición a la solución de carga y la deshidratación con la solución de vitrificación PVS2). A continuación, se colocaron en 10  $\mu\text{L}$  de esa solución de vitrificación sobre láminas de aluminio estéril (40 x 2 mm), las que se sumergieron en nitrógeno líquido parcialmente solidificado (velocidad de enfriamiento de 400  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

El protocolo gota vitrificación, utilizando la solución PVS2, se ha empleado con éxito para la creación de colecciones criopreservadas de diferentes cultivos. Se optimizó en el Centro Internacional de la Papa (CIP), radicado en Perú (Vollmer *et al.*, 2017), y se ha aplicado para un amplio rango de especies y genotipos de papa ( $\sim 3250$ ), con una alta tasa media de recuperación de plantas completas ( $\sim 60\%$ ) (Vollmer *et al.*, 2021). También se empleó para la implementación de colecciones criopreservadas de ápices de *Musa* spp. en el Centro Internacional de Tránsito de Germoplasma de *Musa*, en Bélgica (Panis *et al.*, 2011) y de ápices de yemas de cítricos en el Laboratorio Nacional para Preservación de Recursos Genéticos (NLGRP, por sus siglas en inglés) de Fort Collins, E.U. (Volk *et al.*, 2019).

Wilms *et al.* (2020) también publicaron la optimización del protocolo gota vitrificación, con la solución PVS2, para la criopreservación de diez cultivares de boniato, originarios de cuatro continentes, procedentes del Banco de Germoplasma del CIP. Los autores determinaron que el 70 % de los cultivares evaluados mostraron valores de regeneración superiores al 45 %.

El protocolo gota vitrificación, utilizando la solución PVS3, también se ha aplicado en gran escala, como es el caso de la implementación de una colección criopreservada de *Allium* en el Banco de Germoplasma de la Administración de Desarrollo Rural de la República de Korea (Kim *et al.*, 2012).

La principal ventaja del protocolo gota-vitrificación es la posibilidad de obtener muy altas velocidades de enfriamiento y calentamiento (warming) debido al pequeño volumen del medio crioprotector en el que se colocan los explantes (Matsumoto, 2017) y el uso de la lámina de aluminio, buen conductor de la temperatura.

Estos resultados son congruentes con la afirmación de Roque-Borda *et al.* (2021) quienes señalaron que el método gota (droplet)-vitrificación es el más aplicado a la criopreservación de las plantas de interés agronómico. Se estima que, en el presente, se aplica a 111 especies de plantas, entre las que se encuentran especies agrícolas de gran importancia (Panis *et al.*, 2020).

### Protocolos V y D crio-placas

Estos métodos siguen el mismo principio que el método de la gota-vitrificación: los pequeños volúmenes (gotitas) se enfrían más rápidamente a la temperatura del nitrógeno líquido comparado con los volúmenes grandes. La principal diferencia es que en los métodos de las crio-placas los meristemos se retienen en pequeñas gotas de alginato de calcio, colocadas en una placa de aluminio, antes de ser deshidratados y subsiguientemente, inmersos en el nitrógeno líquido (Panis *et al.*, 2020)

En cuanto a la encapsulación de los explantes en alginato de calcio, las crio-placas son similares al protocolo encapsulación-deshidratación. En el caso de las crioplacas, se colocan gotas de alginato de sodio al 2-3 % en las concavidades de las crioplacas, y en ellas se colocan los explantes, que generalmente reciben un precultivo antes de la encapsulación. A continuación, se hace gotear, sobre los explantes, una solución de cloruro de calcio 0.1 M en medio Murashige y Skoog (MS, 1962) basal. Una vez que los explantes quedan adheridos a las crioplacas, éstas se colocan en la solución de carga para su osmoprotección.

Niino *et al.* (2019) señalaron que la placa de aluminio (que actúa como soporte de los explantes) es resistente y reutilizable, con una alta conductividad térmica; la cual permite alcanzar velocidades de enfriamiento en el entorno de los 4000 a 5000  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  y velocidades de recalentamiento (el retorno a la temperatura ambiente) de 3000 a 4500  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , aspecto fundamental para evitar la cristalización del agua que pueda quedar en las células. Las crioplacas de aluminio tienen dimensiones de 37 mm de largo, 7 de ancho y 0.5 de grosor; contienen 10 pequeñas concavidades cuyo tamaño (que debe ser seleccionado de acuerdo a las dimensiones del explante) varía de 1 a 3 mm de diámetro y 0,75 mm de profundidad.

A partir de este paso, las técnicas se diferenciarán en V crio-placa (vitrificación crio-placa) o D crio-placa (deshidratación crio-placa), según el procedimiento a seguir. En el caso de la V crio-placa, las muestras se exponen a una solución de vitrificación para la deshidratación de los explantes, y a continuación se siguen los mismos pasos del protocolo vitrificación. En el método D crio-placa los explantes se deshidratan, ya sea colocándolos dentro de un recipiente con sílica gel, o expuestos a la corriente de aire de una cabina de flujo laminar, y a continuación se sigue el procedimiento de la técnica encapsulación-deshidratación (Niino *et al.*, 2019).

Según Matsumoto (2017) la clave de la criopreservación exitosa con el protocolo D crio-placa radica en inducir la osmoprotección de los ápices mediante el precultivo en sacarosa, el tratamiento con la solución de carga (LS), y en determinar el tiempo óptimo para la deshidratación. Niino *et al.* (2013), por su parte, reportaron que las ventajas de esa técnica radica en que puede ser aplicada a especímenes grandes y que es menos laboriosa que otros métodos de criopreservación. Este protocolo supera la dificultad asociada a la sensibilidad a la PVS2, una deshidratación insuficiente o excesiva, así como el daño o la pérdida de material durante la escisión y la manipulación (Matsumoto, 2017).

En cuanto a la duración del tratamiento, Niino *et al.* (2013) señalaron que con la V crio-placa la duración óptima de la exposición a la solución PVS es de 30-40 min, mientras que la duración de la deshidratación con el método D crio-placa es de 2-4 h. El mayor tiempo requerido por este método también ha sido señalado por otros autores (Yamamoto *et al.*, 2015; Wang *et al.*; 2020)

Yamamoto *et al.* (2015) utilizaron los protocolos V crio-placa y D crio-placa para la criopreservación de ápices de papa y obtuvieron valores de regeneración de 96,7 % y 93,3 %, respectivamente. Estas técnicas tienen dos ventajas principales: son de fácil manipulación debido a que las muestras están sostenidas en las placas de aluminio y tienen una alta tasa de regeneración a causa de las altas velocidades de enfriamiento y calentamiento (a la temperatura ambiente) conferidas por la transmisión de la temperatura que aporta la placa de aluminio (Niino *et al.*, 2013).

Otra alternativa similar a las crio-placas es el protocolo denominado "crio-mesh" propuesto por Funnekotter *et al.* (2017) para la criopreservación de *Anigozanthos viridis*, una especie endémica de Australia. El procedimiento general es similar al del protocolo V crio-placa. La mayor diferencia entre ambos protocolos es que el crio-mesh usa como soporte una malla de acero inoxidable (Wang, *et al.*, 2020). Este nuevo protocolo se comparó con la gota/vitrificación para la criopreservación de ápices de *A. viridis*, sin que se encontraran diferencias significativas en la supervivencia o la regeneración. No obstante, como los propios autores señalan, el protocolo crio-mesh debe ser evaluado en otras especies vegetales.

### Comparación entre el método gota-vitrificación y las V y D crio-placas

Debido a que el método gota-vitrificación y los protocolos V y D crio-placas tienen principios comunes, ha sido de interés de los investigadores comparar la eficiencia de estos métodos en cuanto a la tasa de regeneración de plantas post-criopreservación. Diversos autores han señalado que el método gota-vitrificación y los métodos V y D crio-placas poseen similares velocidades de enfriamiento y de retorno a la temperatura ambiente (recalentamiento; warming) (Yamamoto *et al.*, 2011; Niino *et al.*, 2013, 2019; Funnekotter *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2020). Tanto la gota-vitrificación como las V y D crio-placas son aplicables a un amplio rango de genotipos de una especie, así como de las especies de un género y producen niveles de regeneración de ápices comparables (Masumoto, 2017; Niino *et al.*, 2019; Normah *et al.*, 2019; Panis, 2019; Wang *et al.*, 2020), de manera que según Panis *et al.* (2020) la selección de un método u otro queda al criterio de los investigadores.

### Aplicación de la criopreservación a gran escala

En la actualidad, cerca de 19 bancos de germoplasma criopreservan plantas de cultivo (Acker *et al.*, 2017; Panis *et al.*, 2020), y en diez instituciones ubicadas en Bélgica, República Checa, Colombia, Nigeria, Perú, Alemania, Corea del Sur, la India y los Estados Unidos se conservan cantidades sustanciales de accesiones criopreservadas de cultivos de



importancia económica. Se estima que cerca de 10 000 accesiones de cultivos propagados vegetativamente, iniciados como cultivos *in vitro*, se conservan de forma segura mediante la criopreservación (Panis, 2019). Al respecto, Agrawal *et al.* (2019) señalaron que en la India, el Banco de Germoplasma del Centro Nacional de Recursos Genéticos Vegetales (NBPGR, por sus siglas en inglés) mantenía 150 accesiones criopreservadas (62 de *Allium*) en la fase líquida del nitrógeno y 13,363 en la fase de vapor, incluyendo diversos cultivos en forma de semillas, embriones, ejes embrionarios, polen, yemas de esquejes y ADN. Dentro de esta colección 7,517 accesiones corresponden a especies hortícolas de importancia.

### Estabilidad genética

Existen pocos eventos y reportes en la literatura que refieran modificaciones genéticas relacionadas con la criopreservación, y si éstas ocurren el mecanismo exacto y la naturaleza de la inestabilidad genética no ha sido esclarecida, considerando los múltiples estados involucrados en el proceso (cultivo *in vitro*-criopreservación-regeneración) (Benelli, 2021).

A partir de los resultados de 20 publicaciones en las que se utilizaron los marcadores moleculares para la evaluación de la estabilidad genética de material conservado *in vitro* y criopreservado, Agrawal *et al.* (2019) concluyeron que esos estudios no mostraron mayores variaciones del material conservado en relación con el original, reforzando las afirmaciones realizadas por Engelmann, en 2011 y Matsumoto, en 2017. Coherentemente, Panis *et al.* (2020) señalaron que en los tejidos mantenidos en el almacenamiento a la temperatura ultra-baja del nitrógeno líquido (-196 °C) la ocurrencia de variaciones somáticas es muy escasa. A este respecto, la criopreservación es la mejor opción para la conservación segura, por largo tiempo, de los cultivos regenerativos.

### Otras aplicaciones de la criopreservación

**Crioterapia.** Además de la aplicación de las temperaturas ultra-bajas para la conservación de germoplasma, éstas tienen un efecto en la erradicación de patógenos, por lo que también se ha utilizado para esos fines, lo que se denomina crioterapia.

La crioterapia se basa en que el tratamiento con el nitrógeno líquido destruye las células diferenciadas, mientras que las células meristemáticas sobreviven y tienen la capacidad de renovarse, dividirse, diferenciarse y regenerar en una nueva planta libre de virus. Jiroutová y Sedlák (2020) señalaron la combinación de la termoterapia y la crioterapia como un procedimiento efectivo para la limpieza de virus, argumentando que la termoterapia inhibe el movimiento de los virus hacia las células meristemáticas de los ápices y al mismo tiempo causa alteraciones subcelulares (como el agrandamiento de las vacuolas), lo cual resulta en que una menor cantidad de células diferenciadas (e infectadas) sobrevivan después de la inmersión en el nitrógeno líquido. Este procedimiento se ha aplicado exitosamente a especies vegetales como la papa, el boniato, el plátano (*Musa spp.*), la mora (*Rubus idaeus L.*), la uva (*Vitis vinifera L.*) y la manzana (*Malus spp.*).

### La criopreservación del germoplasma de ajo

En el presente, más de 10,000 accesiones de plantas propagadas *in vitro* están criopreservadas en forma segura y más del 80 % de éstas pertenecen a cinco cultivos principales: la papa, la yuca, el plátano, la mora y el ajo (*Allium sativum L.*) (Jiroutová y Sedlák, 2020).

### Protocolo vitrificación

El primer artículo sobre criopreservación de ajo fue publicado por Niwata (1995). Los explantes de los discos basales de dientes post-dormantes se trataron mediante el protocolo vitrificación con la solución PVS2. Posteriormente, Makowska *et al.* (1999) ensayaron la criopreservación de ápices de bulbillos y dientes de ajo con las soluciones de vitrificación PVS2 y PVS3, y señalaron que el tratamiento con la solución PVS3 permitió la regeneración de los ápices, mientras que no se obtuvieron resultados positivos con la solución PVS2. Estos resultados fueron confirmados y ampliados por Keller, en el 2002.

En contraste, Ellis *et al.* (2006) criopreservaron 12 genotipos de ajo con el protocolo vitrificación y encontraron que de los 10 genotipos que regeneraron, cinco mostraron mejor respuesta al tratamiento con la solución PVS2 y cuatro respondieron mejor a la PVS3.

En abril del 2007, comenzó el proyecto EURALLIVEG (EURopean ALLium germplasm VEGetatively maintained), con la participación de Alemania, República Checa y Polonia, para la creación de un criobanco tripartita de ajo. En ese estudio, para las accesiones que producen vara floral se tomaron como explantes ápices de bulbillos y para las que no las producen, se tomaron ápices de vitroplantas. El protocolo de criopreservación utilizado fue la vitrificación con la solución PVS3 (Zanke *et al.*, 2011).

Por otra parte, según lo señalado por Keller *et al.* (2012), el alcance de ese proyecto se extendió al desarrollo de una colección núcleo europea formada a partir de las colecciones nacionales de Alemania, República Checa, Polonia, Italia y Francia. La colección crioconservada contó de 200 accesiones; y en esos ensayos se encontró que los explantes del cultivo *in vitro* tuvieron porcentajes de regeneración más bajos que los esperados y que la distribución de los porcentajes de regeneración entre las muestras tuvieron valores medios del 50 % para los genotipos que producen vara floral y del 32 % para los que no las producen.

Al respecto, Olas-Sochacka y Kotlińska (2015) publicaron que para esa fecha el criobanco europeo de *Allium* mantenía 220 accesiones y que el proyecto EURALLIVEG constituyó un modelo para posteriores actividades de criopreservación en los bancos de germoplasma europeos.

Para los genotipos que producen vara floral, se desarrolló, en el 2010, el proyecto de colaboración AEGIS entre Alemania, Polonia y Portugal (Keller *et al.*, 2011), en el que se estudió la criopreservación, tomando como fuente de explantes los primordios de bulbillos de las inflorescencias. Las inflorescencias desinfectadas y separadas de la espata se cortaron en fragmentos de 1 mm de diámetro y 2 mm de largo, incluyendo la base (conteniendo los primordios de bulbillos) y se llevaron a medio de cultivo. De los nuevos brotes se obtuvieron explantes secundarios, en los que se probaron los métodos vitrificación y gota-vitrificación con las soluciones PVS2, PVS3 y PVS4 (35 % glicerol + 20 % etilenglicol + 0.6 M sacarosa) (Sakai, 2000). En la mayoría de los casos los explantes de las inflorescencias inmaduras mostraron mayor regeneración que la que se había obtenido con los bulbillos o los ápices de vitroplantas. El método gota-vitrificación fue

más efectivo que la vitrificación, y a pesar de que los resultados no fueron coincidentes entre las instituciones, la regeneración con la solución PVS3 fue algo mayor que con la PVS2, mientras que la PVS4 resultó inefectiva.

En China, Liu *et al.* (2017) estudiaron la criopreservación del cultivar 'Gailiangsuan' y los resultados se verificaron con otros siete cultivares chinos representantes de tres patrones diferentes de maduración. Como tipo de explante se seleccionaron ápices de yemas adventicias formadas *in vitro* a partir primordios de bulbillos de inflorescencias inmaduras. Como protocolo de criopreservación se probó la vitrificación con las soluciones PVS2 y PVS3, y se obtuvo mejores porcentajes de regeneración con la solución PVS3. En esas condiciones, cuatro cultivares de maduración temprana mostraron baja tasa de regeneración debido a la formación de bulbillos; mientras que para los cultivares de ciclo de cosecha medio y largo la regeneración post-criopreservación fue del 51,5-82,6 % y del 44,8-75,9 %, respectivamente.

### Protocolo gota vitrificación

Los estudios realizados en el Centro Nacional de Agrobiodiversidad de la República de Corea, cristalizaron en el establecimiento de una colección criopreservada de germoplasma de *Allium* en el Banco de Germoplasma de esa Institución (Kim *et al.*, 2012). Según los autores, para las variedades que producen vara floral, la fuente de explantes más apropiada fueron los primordios de los bulbillos formados en las inflorescencias inmaduras, debido a que presentaron altos porcentajes de regeneración post-criopreservación y niveles más bajos de contaminación, seguido de los ápices de los brotes apicales de los bulbos sencillos y de los dientes. Para el procesamiento de las muestras, desarrollaron un protocolo estándar optimizado, consistente en un precultivo en medio con sacarosa 0.3 M, por 2-3 días a 10 °C; seguido por la deshidratación con la solución PVS3, por 150 min. y el enfriamiento rápido en gotas de la solución PVS3 sobre láminas de aluminio. La transferencia de las muestras a la temperatura ambiente se realizó de 1-2 días después de la criopreservación. Ese protocolo se aplicó a 1651 muestras de *Allium* de orígenes diferentes, las que se almacenaron en el criobanco del Centro Nacional de Agrobiodiversidad de Corea.



La colección está integrada por muestras de bulbillos de inflorescencias inmaduras, bulbillos maduros, bulbos simples o dientes, de acuerdo a las características morfológicas de las accesiones. La regeneración post-criopreservación estuvo en el rango del 33,6 al 100 %, con un valor medio del 65,9 %.

### Protocolo V crio-placa

Las investigaciones realizadas por el Centro de Recursos Genéticos de Japón, en colaboración con las Universidades de Tsukuba y Shimane, dieron como resultado que el protocolo V crio-placa, con la solución PVS2 resultó apropiado para la implementación de un criobanco para las especies de *Allium*, con tasas de regeneración cercanas al 100 % (Tanaka *et al.*, 2020). Los autores afirmaron que la efectividad de ese protocolo para la creación de un criobanco de *Allium* radica en que la inmersión directa en el nitrógeno líquido de los ápices adheridos a las crioplasmas permitió alcanzar velocidades de enfriamiento y de recuperación de la temperatura ambiente más rápidas que los protocolos vitrificación y gota vitrificación, lo que resultó en mayores tasas de regeneración.

Los resultados expuestos mediante diferentes protocolos tanto para la criopreservación de germoplasma de ajo, como en general, muestran que es posible obtener la regeneración a la criopreservación utilizando diferentes protocolos; por tanto, la selección del protocolo, según Tanaka *et al.* (2018), puede depender de la situación del laboratorio, los costos, la sensibilidad de los explantes a las soluciones de vitrificación (PVS) y/o la destreza del personal.

### Colecciones criopreservadas de ajo

En la actualidad, se cuenta con tres criobancos mundiales para la conservación de germoplasma de ajo: el Criobanco Europeo Tripartita que mantiene 220 accesiones, de ellas 202 pertenecientes a la Colección Núcleo Europea (Olas-Sochacka y Kotlińska, 2015); el criobanco del Centro Nacional de Agrobiodiversidad de la República de Corea, con 1158 accesiones de ajo y otras especies de *Allium*, utilizando el protocolo gota-vitrificación (Kim *et al.* 2012) y una colección de 100 accesiones criopreservadas mediante la vitrificación que se mantiene en Sistema Nacional de Germoplasma Vegetal (NPGS, por sus siglas en inglés) en Colorado, EU. (Jenderek y Reed, 2017).

### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Acker, J.P.; Adkins, S.; Alves, A.; Horna, D. y Toll, J. (2017). Feasibility study for a safety backup cryopreservation facility; Independent expert report. Bioersity International: Italy Roma (Italia): 100 p. ISBN: 978-92-9255-073-8
- Agrawal, A.; Singh, S.; Vaidya Malhotra, E.; Meena D.P.S. y Tyagi, R.K. (2019). In Vitro Conservation and Cryopreservation of Clonally Propagated Horticultural Species. En: Springer Nature Singapore Pte Ltd. 2019 P. E. Rajasekharan, V. R. Rao (eds.), Conservation and Utilization of Horticultural Genetic Resources, [https://doi.org/10.1007/978-981-13-3669-0\\_18](https://doi.org/10.1007/978-981-13-3669-0_18)
- Bhattacharya, S. (2018). Cryoprotectants and their usage in cryopreservation process. IntechOpen. <https://dx.doi.org/10.5772/intechopen.80477>
- Benelli, C. (2021). Plant cryopreservation: a look at the present and the future. *Plants* 2021, 10, 2744. <https://doi.org/10.3390/plants10122744>
- Ellis, D.; Stogerboe, D.; Hellier, B. y Volk G. (2006). Implementation of garlic cryopreservation techniques in the national plant germplasm system. *Cryo-Letters* 27(2): 99-109. PMID 16794741.
- Engelmann, F. (2011). Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 47, 5–16. <https://doi.10.1007/s11627-010-9327-2>.
- Engelmann, F. (2012). Germplasm collection, storage, and conservation. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-341466-1.00017-1>
- Fabre, K. y Dereuddre, J. (1990). Encapsulation dehydration – a new approach to cryopreservation of *solanum* shoot tips. *Cryo Lett.* 11: 417-416.
- Faltus, M.; Bilavcik, A. y Zamecnik, J. (2021). Vitrification ability of combined and single cryoprotective agents. *Plants* 2021, 10, 2392. <https://doi.org/10.3390/plants10112392>
- Funnekotter, B.; Bunn, E. y Mancera, R.L. (2017). Cryo-mesh: a simple alternative cryopreservation protocol. *CryoLetters* 38, 2: 155-159. <https://www.researchgate.net>. 3169
- Jenderek, M. M. y Reed, B. M. (2017). Cryopreserved storage of clonal germplasm in the USDA National Plant Germplasm System. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* <https://doi.org/10.1007/s11627-017-9828-3>

- Jiroutová, P. y Sedlák, J. (2020). Cryobiotechnology of Plants: A Hot Topic Not Only for Gene Banks. *Appl. Sci.* 2020, 10, 4677; <https://doi.org/10.3390/app10134677>
- Keller, E.R.J. (2002). Cryopreservation of *Allium sativum* L. (Garlic). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. En: L.E. Towill y Y.P.S. Bajaj (Eds.) *Cryopreservation of Plant Germplasm II*. Vol. 50. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-04674-6\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-662-04674-6_3)
- Keller, E.R.J.; Kotlińska, T. y Reis, A. (2011). Cryopreservation of young inflorescence bases in bolting garlic for germplasm storage (AEGIS Project). <https://www.ecpgr.cgiar.org>.
- Keller, E.R.J. y Senula, A. (2013). Micropropagation and cryopreservation of garlic (*Allium sativum* L.). En: M. Lambardi *et al.* (eds.), *Protocols for Micropropagation of Selected Economically-Important Horticultural Plants*, *Methods in Molecular Biology*, vol. 994. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-074-8\\_28](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-074-8_28).
- Keller, E.R.J.; Grübe, M.; Hajirezaei, M.R.; Melzer, M.; Mock, H.P.; Rolletschek, H. y Senula, A. (2016). Experience in large-scale cryopreservation and links to applied research for safe storage of plant germplasm. *Proc. III International Symposium of Plant Cryopreservation. Acta Hort.* 1234. ISHS. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2019.1113.36>
- Keller, E.R.J.; Stavělková, H.; Zámečník, J.; Kotlińska, T.; Kik, C.; Esnault, F.; Solberg S. y Miccolis, V. (2012). EURALLIVEG: Establishment of a European core collection by cryopreservation and virus elimination in garlic. En: T. Wako (ed), *Proc. 6th IS on Edible Alliaceae. Acta Hort.* 969, ISHS 20: 319-327. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2012.969.41>
- Kim, H.H., Popova, E., Shin, D.J.; Yi, J.Y.; Kim, C.H., Lee, J.S., Yoon, M.K. y Engelmann, F. (2012). Cryobanking of Korean *Allium* germplasm collections: Results from a 10 year experience. *CryoLetters* 33 (1): 45-57. PMID 22434122
- Liu, X.X.; Wen, Y.B.; Cheng, Z.H. y Mou, S.W. (2017). Establishment of a garlic cryopreservation protocol for shoot apices from adventitious buds in vitro. *Scientia Horticulturae*. 226: 10-18. <https://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2017.08.016>
- Makowska, Z.; Keller, J. y Engelmann, F. (1999) Cryopreservation of apices isolated from garlic (*Allium sativum* L.) bulbils and cloves. *Cryo-Letters*, 20(3): 175-182. ISSN 0143-2044.
- Matsumoto, T. (2017). Cryopreservation of plant genetic resources: Conventional and new methods. *Reviews in Agricultural Science*, 5: 13–20. <https://doi.org/10.7831/ras5.13>
- Matsumoto, T; Sakai, A; Takahashi, C y Yamada, K. (1995). Cryopreservation of in vitro-grown meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) by encapsulation-vitrification method. *CryoLetters*. 16: 189-196
- Murashige T. y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054-1962.tb08052.x>
- Niino, T.; Yamamoto, S.; Fukui, K.; Martínez, C.R.C.; Arizaga, M.V.; Matsumoto, T. y Engelmann F. (2013). Dehydration improves cryopreservation of mat rush (*Juncus decipiens* Nakai) basal stem buds on cryo-plate, *CryoLetters*. 34: 549-560.
- Niino, T.; Yamamoto, S.; Matsumoto, T.; Engelmann, F.; Valle Arizaga, M. y Tanaka, D. (2019). Development of V and D cryo-plate methods as effective protocols for cryobanking. *Proc. III International Symposium of Plant Cryopreservation. Acta Hort.* 1234. ISHS. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2019.1234.33>
- Nishizawa, S.; Sakai, A.; Amano, Y. y Matsuzawa, T. (1993). Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis*) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification. *Plant Sci.* 91.1: 67-73. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(93\)90189-7](https://doi.org/10.1016/0168-9452(93)90189-7)
- Niwata, E. (1995). Cryopreservation of apical meristemes of garlic (*Allium sativum* L.) and high subsequent plant regeneration. *Cryo Lett.* 16: 102-107.
- Normah M. N; Sulong, N. y Reed B. M. (2019). Cryopreservation of shoot tips of recalcitrant and tropical species: advances and strategies. *Cryobiology* 87:1–14. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.01.008>
- Olas-Sochacka, M. y Kotlińska, T. (2005) International Cryobank of the genus *Allium*. En: Rybczyński, J. y Puchalski, J.T. *Monographs of Botanical Gardens*.(2): 35-39.

- Panis, B. (2019). Sixty years of plant cryopreservation: from freezing hardy mulberry twigs to establishing reference crop collections for future generations. Proc. III International Symposium of Plant Cryopreservation. Acta Hort. 1234. ISHS. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2019.1234.1>
- Panis, B.; Nagel, M. y Van den houwe, I. (2020). Challenges and prospects for the conservation of crop genetic resources in field genebanks, in in vitro collections and/or in liquid nitrogen. *Plants* 2020, 9, 1634; <https://doi.org/10.3390/plants9121634>
- Panis, B.; Piette, B.; André, E.; Van den houwe, I. y Swennen, R. (2011). Droplet vitrification: the first generic cryopreservation protocol for organized plant tissues? En: Proc. First IS on Cryopreservation in Hort. Species. Eds.: B. Panis and P. Lynch Acta Hort. 908, ISHS.
- Pence, V. C. y Bruns, E.B. (2022). The tip of the Iceberg: cryopreservation needs for meeting the challenge of exceptional plant conservation. *Plants* 2022, 11, 1528. <https://doi.org/10.3390/plants11121528>
- 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 Rep.* 19, 7: 733-737. <https://doi.org/10.1007/s002999900171>
- Quatrano, R.S. (1960). Freeze preservation of cultured flax cell utilizing dimethylsulfoxide. *Plant Physiol.* 43 (12): 2057-2061. <https://doi.org/10.1104/pp.43.122057>
- Roque-Borda, C.A.; Kulus, D.; Vacaro de Souza, A.; Kaviani, B. y Vicente, E.F. (2021). Cryopreservation of agronomic plant germplasm using vitrification-based methods: an overview of selected case studies. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 6157. <https://doi.org/10.3390/ijms22116157>
- Sakai, A. (2000). Development of cryopreservation techniques. In: Engelmann F. y Takagi, H. (eds) Cryopreservation of tropical plant germplasm – current research progress and applications. Proc JIRCAS/IPCRI Joint Int. Workshop, 20-23 Oct 1998, Tsukuba, Japan, 1-7. <https://cgspace.cgiar.org>
- Sakai, A.; Kobayashi, S. y Oiyama, I. (1990). Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Rep.* 9: 30-33. <https://doi.org/10.1007/BF00232130>
- Samuels, F.M.D.; Stich, D.G.; Bonnart, R.; Volk, G.M. y Levinger, N.E. (2021). Non-uniform distribution of cryoprotecting agents in rice culture cells measured by CARS microscopy. *Plants* 10, 589. <https://doi.org/10.3390/plants10030589>
- Schäfer-Menuhr, A., Müller, E. y Mix-Wagner, G. 1996. Cryopreservation: an alternative for the long-term storage of old potato cultivars. *Potato Res.* 39 (4), 507–513 <https://doi.org/10.1007/BF02358469>.
- Tanaka, D.; Niino, T. y Uemura, M. (2018). Cryopreservation of plant genetic resources. En: M. Iwaya-Inoue et al. (eds.). *Survival strategies in extreme cold and desiccation. Advances in Experimental Medicine and Biology* 1081, [https://doi.org/10.1007/978-981-13-1244-1\\_19](https://doi.org/10.1007/978-981-13-1244-1_19)
- Tanaka, D.; Sakuma, Y.; Yamamoto, S.; Niino, T. y Matsumoto, T. Application of cryobanking for *Allium* spp., especially garlic shoot tips by V cryo-plate method. *Hort. Res. (Japan)* 2020. 19 (2): 189–195. <https://doi.org/10.2503/hrj.19.189>
- Taylor, M.J.; Song, Y.C.; Brockbank, K.G.M. (2004). Vitrification in tissue preservation: new developments. in *life in the frozen state*; Fuller, B.J., Lane, N., Benson, E.E., Eds.; CRC Press: London, UK, pp. 603–644. ISBN 978-0-203-64707-3.
- Torres, M.A. (2022). Viabilidad y recuperación de plantas de ápices crioconservados de ajo (*Allium sativum* L.). *Agrotecnia de Cuba*. Vol 46 (1):1-11. ISSN 2414-4673.
- Villalobos Olivera. A.; Méndez Pelegrín, R.; Nápoles Borrero, L.; González Olmedo, J.; Iglesias Alfonso, A.; Martínez Rodríguez, J.; Rodríguez Escriba, R.C.; Lorente González, G.Y.; Quintana Bernabé, N.; Rodríguez Sánchez, R.; Vidigal Duarte Souza, F. y Martínez Montero, M.E. (2016). Estrategia criogénica para el establecimiento de un banco de germoplasma de piña (*Ananas comosus* var. *Comosus*). *Cultivos Tropicales*, vol. 37, no. especial, pp. 81-90. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.2962.9045>
- Volk, G.M.; Jenderek, M.M.; Walters C.; Bonnart, R.; Shepherd, A.; Skogerboe, D.; Hall, B.D.; Moreland, B.; Krueger, R. y Polek, M.R. (2019). Implementation of Citrus shoot tip cryopreservation in the USDA-ARS National Plant Germplasm System. *Acta Hort.*

1234. ISHS 2019. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1234.43>. Proc. III International Symposium on Plant Cryopreservation Eds.: K. Thammasiri *et al.*
- Volk, G.M. y Walters, C. (2006). Plant vitrification solution 2 lowers water content and alters freezing behavior in shoot tips during cryoprotection. *Cryobiology* 2006, 52, 48–61.
- Vollmer, R.; Espirilla, J.; Villagaray, R.; Cárdenas, J.; Castro, M.; Sánchez, J.M.; Manrique-Carpintero, N.; Ellis, D. y Anglin, N.L. (2021). Cryopreservation of potato shoot tips for long-term storage. En: *Solanum tuberosum. Methods and protocols*. D. Dobnik, K. Gruden, Ž. Ramšak y A. Coll (eds.) Humana Press. 21-54. <https://doi.org/10.1007/978-1-10716-1609-3>.
- Vollmer, R.; Villagaray, R.; Cárdenas J.; Castro M.; Chávez O. Anglin N.L y Ellis, D. (2017). A large-scale viability assessment of the potato cryobank at the International Potato Center (CIP). *In Vitro Cell.Dev.Biol.—Plant* (2017) 53:309–317. <https://doi.org/10.1007/s11627-017-9846-1>
- Walters C. y Pence, V.C. (2020). The unique role of seed banking and cryobiotechnologies in plant conservation. *Plants People Planet*. 2020: 00:1-9. <https://doi.org/10.1002/ppp3.10121>
- Wang, M-R; Lambardi, M. Engelmann, F.; Pathirana, R.; Panis, B.; Volk, G.M. y Wang, Q-C. (2020). Advances in cryopreservation of in vitro-derived propagules: technologies and explant sources. *Plant Cell Tissue Org*. 2020. <https://doi.org/10.1007/s112.40-020-01770-0>
- Wilms, H.; Sleziaak, N.F.; Van der Auweraer, M.; Brands, M.; Verleije, M.; Hardeman, D. Andre, E. y Panis, B. (2020). Development of a fast and user-friendly cryopreservation protocol for sweet potato genetic resources. *Scientific Reports*. 10: 14674. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70869-3>
- Yamamoto, S.; Rafique, T.; Priyantha, W.S.; Fukui, K.; Matsumoto, T. y Niino, T. (2011). Development of a cryopreservation procedure using aluminium cryo-plates. *CryoLetters* 32 (3): 256-265.
- Yamamoto, S.; Wunna; Rafique, T.; Valle Arizaga, M.; Fukui K.; Cruz Gutierrez, E.J., Castillo Martinez, C.R.; Watanabe, K. y Niino T. (2015). The aluminum cryo-plate increases efficiency of cryopreservation protocols for potato shoot tips. *Am. J. Potato Res*. <https://doi.org/10.1007/s12230-014-9425-5>
- Zanke, C; Keller E.R.J.; Zámečník, J.; Kotlińska, T. y Ola, M. (2011). Cryopreservation of garlic for the establishment of a European Core collection *Acta Horticulturae* <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2011.908.55>