

Capítulo 10

La aplicación del cultivo de tejidos en la multiplicación y conservación de los Recursos Fitogenéticos

Jean Pierre Baudoin

10.1. INTRODUCCIÓN

La región andina se caracteriza por su elevada diversidad biológica que contribuye a la seguridad alimentaria, por la presencia de muchos centros de origen y domesticación ricos en endemismos y propicios para el desarrollo de una amplia variabilidad genética en poblaciones autótonas de especies vegetales. La región andina también se caracteriza por la gran diversidad de condiciones ecológicas en espacios muy reducidos, así como por las condiciones sumamente limitantes. El poblador andino logró manejar esta diversidad ecológica, así como sus posibilidades, habiendo domesticado más de 40 especies alimentarias, muchas de las cuales están adaptadas a las condiciones extremas de sequía, frío y humedad de ciertas zonas.

En la región altiplánica, *Solanum tuberosum*, *Ullucus tuberosus*, *Oxalis tuberosa*, *Tropaeolum tuberosum*, *Chenopodium quinoa*, *Chenopodium pallidicaule*, *Lupinus mutabilis* son los ejemplos de especies domesticadas más representativas de la diversidad de especies domesticadas. En los valles se domesticaron *Zea mays*, *Capsicum* spp., *Ipomoea batatas*, *Amaranthus caudatus* y diversas frutas. Las tierras bajas también fueron centros de domesticación de numerosas especies vegetales, como *Arachis hypogaea*, *Manihot* spp., *Zea mays*,

Capsicum, *Gossypium*, *Nicotiana tabacum*, *Bixa orellana* y varios tipos de calabazas y frutas. Estas son sólo algunas de las especies domesticadas en estas zonas. Un gran número de especies alimentarias autótonas hacen parte de la dieta de poblaciones locales de la región andina.

Aunque parte del germoplasma de estos cultivos ha sido recolectado y conservado en bancos de germoplasma (semillas y colecciones de campo), aún falta completar y manejar colecciones para muchas especies. Además, los cultivos andinos poseen un inmenso potencial para el mejoramiento y promoción de nuevas especies a través de la ampliación de la base genética de las colecciones, la introducción genética a partir de acervos foráneos y el desarrollo y producción de nuevos materiales a partir de estas especies poco difundidas y potencialmente promisorias.

El manejo de recursos fitogenéticos incluye varias actividades como la prospección, la colecta, la caracterización, la evaluación, la conservación y el intercambio de germoplasma a nivel nacional e internacional. El seguimiento científico de todos estos componentes garantiza una valoración promisoriosa de los recursos genéticos y su utilización en programas de mejoramiento varietal. Mediante técnicas biotecnológicas es posible lograr un desarrollo más eficiente de las

actividades mencionadas, proporcionando así nuevas alternativas para utilizar los recursos genéticos. La biotecnología, por medio de la genética molecular y el cultivo de tejidos o de células *in vitro* ofrece nuevas herramientas para alcanzar esas metas y racionalizar los usos de los recursos fitogenéticos. En particular, el cultivo *in vitro* contribuye de diferentes maneras al uso sostenible de los recursos genéticos.

En la actualidad se utilizan abundantemente las técnicas de cultivo de tejidos para la micropropagación de clones selectos y para conseguir material de plantación libre de patógenos; se utiliza cultivo de anteras y de microporas para la obtención de haploides y a fin de facilitar y acelerar el mejoramiento genético. Una porción grande de la variabilidad genética para caracteres económicamente importantes, ocurre en el germoplasma silvestre o en especies relacionadas. Tradicionalmente, la identificación de genes que controlan esos caracteres en el germoplasma silvestre, y su utilización en el pre-mejoramiento ha encontrado dificultades. La hibridación interespecífica ayudada por el cultivo *in vitro* de embriones se está convirtiendo en una alternativa para la transferencia de caracteres útiles entre especies relacionadas, pero sexualmente incompatibles, o que presentan absorción temprana de embriones. Sin embargo, el objetivo del presente capítulo es destacar el papel del cultivo *in vitro* en la preservación y el manejo de los recursos filogenéticos.

10.2. CONTRIBUCIÓN DEL CULTIVO *IN VITRO* EN LA CONSERVACIÓN DE LOS RECURSOS FITOGENÉTICOS

Las estrategias de conservación de germoplasma dependen principalmente de las características biológicas de éstos, de los recursos humanos e infraestructura disponibles y del número de accesiones. Existen dos estrategias generales de conservación de ger-

plasma: *in situ* (ecosistemas y hábitats naturales) y *ex situ* (bancos de germoplasma de semilla, colecciones de campo, jardines botánicos y colecciones *in vitro*), estos métodos no son mutuamente excluyentes sino más bien complementarios.

Si las semillas ortodoxas pueden ser conservadas sin mayores dificultades con baja temperatura y baja humedad relativa en bancos de germoplasma, existen sin embargo otras especies denominadas recalcitrantes cuyas semillas pierden su viabilidad en un corto período de tiempo al ser conservadas por métodos convencionales debido a sus elevados contenidos de humedad. En paralelo, existen especies que producen semillas después de un largo tiempo (plantas perennes) o producen semillas de alto grado de heterocigosidad debido a su naturaleza alogama o no producen semilla botánica verdadera, teniendo como alternativa de reproducción órganos vegetativos (tubérculos, rizomas, bulbos o semillas agamicas). Los recursos genéticos de estas especies son generalmente conservados como colecciones de campo o a través de medios más sofisticados como la conservación *in vitro*.

Precisamente, las dificultades derivadas de las colecciones de campo (elevados requerimientos de espacio y mano de obra, riesgo de infestación con plagas y enfermedades, daño provocado por catástrofes naturales y pérdida de la integridad genética de las accesiones) y la preservación de especies recalcitrantes han permitido desarrollar metodologías como la conservación *in vitro* de germoplasma, entendiéndose por cultivo *in vitro* al conjunto de técnicas mediante las cuales un explante, es decir, una parte de la planta (órgano, tejido, célula o protoplasto) se cultiva asépticamente en un medio nutritivo bajo condiciones de luz y temperatura controlada.

El cultivo *in vitro* de especies vegetales nace con los estudios pioneros de Haberlandt al principio del siglo XX. El cultivo de los diferentes órganos de las plantas se ha ido desarrollando a fin de lograr tres fines: la micropro-

pagación vegetativa, la conservación de germoplasma y generar una herramienta para recortar los diferentes pasos de un programa de mejoramiento genético, ya sea por medio de la regeneración de nuevas plantas o de estructuras indiferenciadas (masas celulares o callos).

En el caso de la conservación de germoplasma, las principales finalidades del cultivo *in vitro* son la preservación de la integridad genética de cada entrada de la colección (se evita la segregación de las semillas sexuales) y el mantenimiento altamente seguro de los recursos al quedar eliminados los riesgos de pérdidas por causa del medio ambiente; como es una técnica axénica, no hay detrimentos o daños por plagas o enfermedades y no existe peligro de infecciones por patógenos ni plagas. Sin embargo, como siempre, existe la probabilidad de contaminación debido a hongos o bacterias ambientales, necesitando de un monitoreo específico del material en conservación a fin de mantener bajo cierto nivel de control los explantes.

En el manejo de los recursos fitogenéticos, la utilización del cultivo *in vitro* empieza directamente a partir de la recolección del germoplasma en el terreno para reducir las dificultades prácticas de colectas de germoplasma, especialmente en especies cuyo traslado hacia los bancos de germoplasma causa deterioros por daño mecánico y/o ataques de plagas y enfermedades. Lo anterior, esencialmente consiste en esterilizar explantes del material colectado para posteriormente depositarlos en medios de cultivo estériles a través de un procedimiento simple que sólo requiere equipo rudimentario. La técnica ha sido utilizada exitosamente en algodón (*Gossypium spp.*), cacao (*Theobroma cacao*), vides (*Vitis spp.*) y algunas forrajeras. El traslado de material *in vitro* desde el sitio de colecta es especialmente conveniente para especies alógamas, especies con semillas de reducido poder germinativo, especies con semillas recalcitrantes y aquellas de reproducción vegetativa.

Pero es principalmente para la conservación de los materiales colectados que las técnicas del cultivo *in vitro* han sido objeto de esfuerzos de investigación. Las técnicas de conservación por cultivo *in vitro* se empezaron a aplicar en los años 80 y actualmente se utilizan de forma sistemática en la conservación e intercambio de germoplasma de varias especies como raíces y tubérculos, árboles frutales y otras.

Entre las ventajas que presenta la mantención *in vitro* de germoplasma destacan: conservación de un gran número de plantas en espacios pequeños; mayor control sobre el estado fitosanitario de las plantas; reducción en los tiempos de multiplicación; facilidad de intercambio de material genético debido a su sanidad e incremento de la tasa de multiplicación de germoplasma valioso.

10.3. CONSERVACIÓN A CORTO, MEDIANO Y LARGO PLAZO

El cultivo *in vitro* comprende una sucesión de pasos: (i) desinfección, disección y extracción del tejido de la planta (ii) determinación de una técnica adecuada y establecimiento de la colección *in vitro* (iii) recuperación del tejido viable de la fase de conservación a través del trasplante a macetas (iv) regeneración de plantas.

Diversos órganos o tejidos pueden conservarse *in vitro*, pero usualmente se dividen los materiales vegetales iniciales en dos categorías: diferenciados y no diferenciados. En los tejidos diferenciados, el cultivo se deriva de meristemas provenientes de yemas y brotes o de meristemas adventicios derivados del cultivo *in vitro*. Esta técnica incluye la micropropagación en la forma de cultivo de tallos, de hojas, de raíces, de microtubérculos y de embriones. En los tejidos no diferenciados se cultivan callos o células en suspensión en medios sólidos o líquidos. Dentro del marco de la conservación del germoplasma se debe mantener la composición genética de cada entrada,

razón por la cual se utiliza preferentemente los meristemas. El cultivo de meristemas es apropiado para la conservación porque que no solamente el meristema tiene una estabilidad genética muy alta, sino porque además tiene un potencial de propagación alto y de facilidad de saneamiento. Al contrario, el cultivo de células somáticas, no meristemáticas y las de origen germinal presentan con frecuencia inestabilidad citogenética (euploidia, aneuploidia, alteraciones cromosómicas), sobre todo cuando se prolonga el estado *in vitro*.

En las técnicas convencionales de los meristemas, el objetivo es obtener un crecimiento continuo de los explantes a tasas normales, a través de sub-cultivos sucesivos de meristemas en medios frescos. Cada sub-cultivo aumenta la posibilidad de pérdidas debido a accidentes o contaminación microbiana.

La conservación del germoplasma *in vitro* puede realizarse a corto-mediano plazo y a largo plazo mediante métodos criogénicos. La alternativa a utilizar dependerá del progreso de la capacidad tecnológica, infraestructura disponible, objetivos de conservación y la naturaleza de las especies a conservar.

10.4. CULTIVO *IN VITRO* DE CRECIMIENTO LENTO

La conservación *in vitro* a corto y mediano plazo necesariamente requiere de subcultivos periódicos, actividad que generalmente dificulta su conservación. Para prolongar el período de conservación *in vitro*, aumentando de esta forma los tiempos requeridos entre los sucesivos subcultivos, se han desarrollado métodos que permiten retardar el crecimiento de los explantes y así prolongar el tiempo requerido entre los sucesivos subcultivos. Esos métodos llamados «cultivo *in vitro* de crecimiento lento o a tasas mínimas» se basan en la reducción del crecimiento mediante diferentes métodos: modificación de nutrientes del medio de cultivo, uso de reguladores o inhibidores de crecimiento, reducción de la tempe-

ratura de incubación, desecación y cambio de la concentración de gases atmosféricos, reducción de tensión de oxígeno, defoliación de brotes y manipulación de la presión osmótica de los medios de cultivo, tamaño de los envases o tubos, intensidad de luz y fotoperíodo. La temperatura interacciona con casi todos esos factores.

En resumen, el crecimiento y desarrollo puede ser reducido agregando o modificando los medios de cultivo en dos formas básicas: generando estrés (principalmente osmótico) o utilizando reguladores de crecimiento para reducir la elongación y multiplicación celular.

Diferentes investigaciones fueron conducidas en varios cultivos ecológicamente diferentes, poniendo en evidencia principios o tendencias. La reducción de la temperatura disminuye el crecimiento de los cultivos, pero ésta depende del cultivo. También se reduce el crecimiento privando al medio de ciertos nutrientes inorgánicos y orgánicos. El crecimiento varía según el contenido total del nitrógeno, el balance Carbono/Nitrógeno y el contenido de sacarosa. Los reguladores de crecimiento actúan en forma antagónica al ácido giberélico, reduciendo la elongación y multiplicación celular. El ácido abscísico es retardante del crecimiento. La concentración osmótica del medio es otro factor importante. Los azúcares-alcoholes (sorbitol, manitol) no asimilables por las plantas, son sustancias que generan estrés osmótico y reducción del crecimiento de los explantes. El uso de carbón activado combinado con baja concentración osmótica del medio permite aumentar el tiempo de conservación. En condiciones de baja temperatura se necesita reducir la intensidad de la luz. Cada especie tiene un óptimo de conservación *in vitro* y se debe diseñar el protocolo más adecuado para cada especie. Desafortunadamente en algunos casos esos factores combinados varían con la variedad y el tiempo de conservación.

Cabe recalcar que esos métodos pueden ocasionar alteraciones no deseables para la con-

servación del germoplasma. Por ejemplo, las células de plántulas bajo estrés son de menor tamaño, con vacuolas muy pequeñas y en menor número. Por otro lado, los reguladores de crecimiento pueden producir condiciones de senescencia que limitan el rango de concentración de esas sustancias químicas. El otro problema es la reacción diferente de genotipos del banco de germoplasma debido a una condición hormonal no igual entre los explantes. Otra alternativa es reducir la temperatura ambiental de la cámara de crecimiento *in vitro* hasta los límites en que se logre la mayor longevidad de las plántulas. El principio es la reducción del sistema metabólico de la planta debido a la alta sensibilidad de enzimas, hormonas y reguladores, al efecto de las temperaturas.

Protocolos que permiten la efectiva conservación de germoplasma *in vitro* han sido desarrollados para aproximadamente 37.600 accesiones en el mundo. Si bien el cultivo *in vitro* elimina los problemas asociados con la conservación en campo, su éxito es función de la eficiencia de la micropropagación y de la mantención de la integridad genética de las colecciones.

Ciertas propiedades del cultivo *in vitro* reducen la fidelidad de los sistemas de mantención *in vitro* de germoplasma. La *variabilidad asociada al cultivo in vitro* se denomina variación somacional, es decir, alteraciones genéticas de los materiales conservados *in vitro* respecto a la planta madre, situación no deseada desde el punto de vista de la conservación de germoplasma. Algunas de estas variaciones son heredables mientras que otras son epigenéticas, de tipo reversible y no hereditaria. La variación somacional puede ser atribuida a diversos factores como la especie, los medios de cultivo, los reguladores de crecimiento, el tipo de explante y el número de repicajes requeridos entre subcultivos. Por lo tanto, es importante manejar los factores que inducen variación somacional y evaluar posibles

alteraciones, utilizando análisis citológicos y/o moleculares en los materiales conservados *in vitro*. La variabilidad asociada al cultivo *in vitro* puede ser parcialmente minimizada utilizando ápices meristemáticos, los cuales poseen células con un menor grado de diferenciación y genéticamente más estables. El riesgo de cambio genético en este tipo de material es mucho menor que cuando se emplean "callos" o estructuras desorganizadas. La elección del explante y el monitoreo de las colecciones son importantes a fin de detectar posibles variantes en relación al material original, el cual puede ser efectuado mediante marcadores moleculares.

10.5. CRIOPRESERVACIÓN O SUSPENSIÓN TOTAL DEL CRECIMIENTO Y METABOLISMO

Actualmente, debido a los inconvenientes de los métodos antes descritos, se han derivado crecientes recursos a la búsqueda de otros métodos de conservación a largo plazo, como la criopreservación. El desarrollo de métodos de conservación de germoplasma a temperaturas criogénicas ha surgido como una nueva alternativa de conservación a largo plazo (colección base) para un gran número de especies. La criopreservación se basa en la reducción y subsecuente detención de las funciones metabólicas y la división celular de los tejidos vegetales debido a la disminución de su temperatura al nivel del nitrógeno líquido (-196° C), manteniendo así la viabilidad de los materiales conservados por periodos indefinidos de tiempo.

El proceso de criopreservación comprende diferentes pasos:

- aislamiento y deshidratación del tejido
- enfriamiento
- congelación
- almacenamiento
- descongelamiento
- recuperación y crecimiento de plantas

Una etapa muy crítica es la formación de cristales de hielo intra y extracelular. Durante el proceso de congelación se inicia la formación de cristales de hielo en la solución extracelular del tejido, produciendo un desequilibrio termodinámico, perdiéndose agua desde el interior de las células hacia los cristales de hielo ubicados al exterior. El equilibrio se produce formándose hielo intracelular, lo que mata las células. El éxito del proceso depende de la velocidad y evolución del enfriamiento y congelación. Si el enfriamiento es lento, toda el agua congelable sale de la célula produciéndose daño por deshidratación, aumento de la concentración osmótica interna y desintegración de la membrana celular. Si el enfriamiento es rápido, el agua congelable no sale de la célula por falta de tiempo y se forman cristales intracelulares. El enfriamiento moderado controla la salida del agua de la célula así como la deshidratación y congelamiento intracelular, debido al contenido suficiente de la célula. El control de la rapidez del enfriamiento se ejerce hasta cierta temperatura límite, después de la cual ya no existe peligro. Las temperaturas límite y las tasas de enfriamiento deben ser investigadas para cada especie. A fin de superar el problema de la formación de hielo, se puede usar agentes crioprotectores, como glicerol, sorbitol y manitol; el objetivo es de reemplazar el agua de la célula por crioprotectores. Según las especies, varias técnicas han sido usadas para evitar el daño causado por el congelamiento: reducción rápida de la temperatura mediante inmersión directa del explante en nitrógeno líquido, enfriamiento lento y continuo hasta una cierta temperatura (- 40° C) y posterior inmersión en nitrógeno líquido.

El descongelamiento de los tejidos es otra etapa crítica. El método más eficiente es poner en baño maría a 40° C por algunos minutos hasta que el hielo se transforme en agua. Durante el descongelamiento, se produce la hidratación del ambiente intra y extracelular. Si el descongelamiento es lento, en presencia de microcristales, estos se cristalizan formando

cristales de hielo más grandes, produciendo la destrucción de organelos y membranas celulares. Si la deshidratación es extrema, el descongelamiento tiene que ser más lento para prevenir una plasmólisis masiva. Después del descongelamiento, se debe cambiar el contenido del medio debido a la presencia de sustancias tóxicas provenientes de las necrosis de las células.

Una exitosa criopreservación depende de numerosos factores como el tipo y condición fisiológica del explante, los crioprotectores empleados, la rapidez del proceso de congelamiento y descongelamiento, la temperatura de manutención y la estrategia de recuperación de los tejidos, entre otros. Varias técnicas existen para reducir o eliminar estos problemas: pretratamientos con crioprotectores, enfriamiento y descongelamiento rápido o lento, reducción o absorción de las sustancias tóxicas que se generan de las células muertas del tejido criopreservado, etc.

Esta metodología ha sido utilizada en aproximadamente cien especies a nivel mundial, lo que permite suponer que en un futuro cercano se convertirá en la metodología de conservación más eficaz, segura y de bajo costo. Los tejidos más apropiados para criopreservar son varios como granos de polen, protoplastos, semillas, yemas invernales, meristemas, embriones cigóticos y somáticos, cultivos en suspensión y callos. Las primeras investigaciones en criopreservación identificaron los meristemas de tallos como lo más conveniente. Actualmente se demostró que los cultivos de embriones tienen ventajas y un bajo riesgo de variación somaclonal, particularmente los embriones cigóticos y somáticos de tamaño pequeño. Otra innovación de la técnica es la aplicación de la vitrificación. Los tratamientos se basan en un enfriamiento muy rápido, causando la vitrificación interna de los solutos dentro de las células, evitándose la formación de hielo intracelular.

10.6. INTEGRIDAD Y ESTABILIDAD EN CULTIVO *IN VITRO*

El objetivo básico de los bancos de germoplasma de propagación clonal es el de mantener la identidad genética de cada accesión. Desde el punto de vista del cultivo de tejidos, está ampliamente demostrado que mientras más directa sea la regeneración de una nueva plántula, la probabilidad de variación es mucho menor. Sin embargo, variaciones epigenéticas, puntuales y quimeras pueden ocurrir en cualquier momento, particularmente en los bancos de germoplasma clonales *in vitro* a mediano plazo usando bajas temperaturas y/o reguladores de crecimiento. Esto significa una presión de selección sobre el material y una posibilidad de variación genética. Resulta que es necesario desarrollar programas de evaluación de la integridad genética de los materiales conservados *in vitro*. La comprobación de la integridad genética requiere observaciones morfológicas, comprobando los materiales mantenidos *in vitro* con los materiales semejantes multiplicados en los terrenos. Existen también pruebas bioquímicas, moleculares y cromosómicas para comprobar la integridad genética y reducir el riesgo de variación somaclonal.

10.7. BIBLIOGRAFÍA

- Acquaah G., 2007. *Principles of plant genetics and breeding*. Blackwell Publishing, Oxford, UK, pp. 568.
- Castillo R., 1995. *Plant genetic resources in the Andes: impact, conservation, and management*. Crop Science 35: 355-360.
- Dillon S.L., 2006. *Strategies employed to collect plant genetic resources for ex situ conservation*. In: Engels J.M.M., Ramanatha Rao V., Brown A.H.D., Jackson M.T. (eds). *Plant conservation genetics*. Food Products Press, Binghamton, N.Y., pp. 37-56.
- Engelmann F., Engels J.M.M. 2002. *Technologies and strategies for ex situ conservation*. In: Engels J.M.M., Ramanatha Rao V., Brown A.H.D., Jackson M.T. (eds). *Managing plant genetic diversity*. CAB International and IPGRI, Wallingford, pp. 89-103.
- Hawkes J.G., Moxted N., Ford-Lloyd B.V., 2000. *The ex situ conservation of plant genetic resources*. Kluwer, Dordrecht, pp. 250.
- Henry R.J. 2006. *Plant conservation genetics*. Food Products Press, Binghamton, N.Y., pp. 180.
- Karp A. 2002. *The new genetic era: will it help us in managing genetic diversity?* In: Engels J.M.M., Ramanatha Rao V., Brown A.H.D., Jackson M.T. (eds). *Managing plant genetic diversity*. CAB International and IPGRI, Wallingford, pp. 43-56.
- Lobo M., 2006. *Recursos genéticos y mejoramiento de frutales andinos: una visión conceptual*. Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria 7(2), 40-54.
- Luan H.Y. 2001. *In vitro conservation and cryopreservation of plant genetic resources*. In: Saad M.S., Ramanatha Rao V. (eds). *Establishment and management of field gene bank, a training manual*. IPGRI - APO, Serdang, pp. 54-58.
- Paris B., Heliott B., Strosse H., Remy S., Lepoivre R., Swennen R. 2005. *Germplasm conservation, virus eradication and safe storage of transformation competent cultures in banana: the importance of cryopreservation*. Acta Horticulturae (ISHS) 692: 51-60.
- Pence V.C., Sandoval J.A., Villalobos V.M., Engelmann F. 2002. *In vitro collecting techniques for germplasm conservation*. IPGRI Technical Bulletin No. 7. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
- Popovce H., 1989. *Lost crops of the Incas. Little-known plants of the Andes with promise for worldwide cultivation*. National Research Council, National Academy Press Washington, D.C., pp. 415.
- Rao N.K., 2004. *Plant genetic resources: advancing conservation and use through biotechnology*. African Journal of Biotechnology 3(2): 136-145.
- Reed B.M., Chang Y. 1997. *Medium- and long-term storage of in vitro cultures of temperate fruit and nut crops*. Razdan M.K., Cocking E.C. (eds). *Conservation of plant genetic resources in vitro*, Volume 1: general aspects. Science Publishers Inc., Enfield, NH, pp. 67-105.
- Reed B.M., De Noma J., Chang Y. 2000. *Application of cryopreservation protocols at a clonal genebank*. In: Engelmann F., Takagi H. (eds). *Cryopreservation of tropical plant germplasm*. Current research progress and application. Japan International Research Centre for Agricultural Sciences, Tsukuba, Japan and International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, pp. 246-249.
- Sevilla R., Holle M. 2004. *Recursos genéticos vegetales*. Luis Leon Asociados, Lima, Perú, pp. 445.
- Takagi H. 2000. *Recent developments in cryopreservation of shoot apices of tropical*

species, pp. 178-193. In: Engelmann F., Takagi H. (eds). Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application. Japan International Research Centre for Agricultural Sciences, Tsukuba, Japan and International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.

Thormann I., Dulloo M., Engels J. 2006. *Techniques for ex situ plant conservation*. In: Henry R.J. (eds). Plant conservation genetics. Food Products Press, Binghamton, N.Y., pp. 7-36.