

Artículo científico**VIABILIDAD Y RECUPERACIÓN DE PLANTAS VIABLES DE UNA MUESTRA CRIOCONSERVADA DE AJO.**

María de los Ángeles Torres Mederos

RESUMEN

En el Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical (INIFAT) se han desarrollado investigaciones para la crioconservación de ajo, con el objetivo de preservar los clones adaptados al clima tropical. La implementación de una colección crioconservada requiere pronosticar la cantidad de explantes viables de cada accesión conservada en el tanque de nitrógeno líquido. Esa cantidad se puede estimar sobre la base del número de explantes procesados y la viabilidad de una muestra crioconservada control, para un nivel de confiabilidad seleccionado. La muestra crioconservada control de ajo evaluada en este ensayo estuvo compuesta por 40 ápices y fue procesada mediante el protocolo vitrificación, con la solución PVS3. La muestra tuvo una viabilidad de 0,76 y regeneró 23 plantas viables. Ese número de plantas fue comparable con la cantidad estimada para ese valor de viabilidad y tamaño de la muestra, considerando un 95 % de confiabilidad (25 plantas). Los resultados ratifican la adecuación del protocolo vitrificación, con la solución PVS3, para la crioconservación de ajo en el Banco de Germoplasma del INIFAT y constituyen una contribución a las investigaciones destinadas a la implementación de una colección crioconservada de ajo en Cuba.

Palabras clave: ajo, crioconservación, viabilidad

Viability and recovery of viable plants of a garlic cryopreserved sample.**ABSTRACT**

Investigations on garlic cryopreservation developed at the Institute for Fundamental Research on Tropical Agriculture (INIFAT) targets to preserve garlic clones adapted to tropical climate. The implementation of a cryopreserved collection requires determining the predicted number of viable explants in a genebank accession. That quantity can be estimated based on the number of explants processed, viability level of the control, and a desired confidence level. The garlic control cryopreserved sample evaluated in this assay included 40 apices and was cryopreserved by vitrification protocol, with the PVS3 solution. The sample had a viability of 0.76 and regenerated 23 viable plants. That number of plants was comparable to the quantity estimated for that viability level and number of processed explants, considering a confidence level of 95 % (25 plants). These results confirm the fitness of vitrification protocol, with the PVS3 solution, for garlic cryopreservation at INIFAT's genebank, and constitute a contribution to the research for the implementation of a garlic cryopreserved collection in Cuba.

Key words: cryopreservation, garlic, viability

Dra.C. María de los Ángeles Torres Mederos, Investigador Titular del Departamento de Recursos Fitogenéticos y Semillas del Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical (INIFAT). Calle 188 no. 38754 e/ 397 y Linderos, Santiago de las Vegas, Boyeros. La Habana, Cuba. E-mail: genetica14@inifat.co.cu.

INTRODUCCIÓN

Debido a la pérdida creciente de la biodiversidad y las amenazas sobre los efectos del cambio climático, la conservación de las especies vegetales tiene una importancia cardinal a nivel mundial. Así, la FAO (2020) reportó que para la fecha de febrero del 2019 se habían publicado datos de más de cinco millones de accesiones conservadas desde 98 países y 17 centros internacionales y regionales. Por su parte, Walters y Pence (2020) señalaron que actualmente en el mundo existen cerca 1750 bancos de semillas que conservan cerca de seis millones de accesiones. Entre las acciones para la conservación de semillas se destaca, además, la creación del Banco Mundial de Semillas de Svalbard, ubicado en Noruega.

De igual forma, se han intensificado las investigaciones sobre la crioconservación vegetal. Se han estandarizado los protocolos de aplicación para un mayor número de especies (Reed, 2017) y actualmente se trabaja para el fomento de un proyecto, similar al Banco Mundial de Svalbard, para la conservación de las especies de reproducción vegetativa, mediante la crioconservación (Acker *et al.*, 2017). El desarrollo del conocimiento científico en relación a la crioconservación vegetal ha llegado al punto que en la actualidad ésta se considera como parte de una disciplina más amplia denominada criobiología vegetal (Pritchard, 2018). Estos hechos refuerzan la evidencia de la necesidad de avanzar en las investigaciones sobre crioconservación vegetal para preservar el germoplasma nacional que lo requiere.

Desde hace más de dos décadas, en el INIFAT se ha trabajado para la conservación a largo plazo de las especies de reproducción vegetativa mediante la crioconservación, con énfasis en la protección del germoplasma

nacional de ajo y de los cultivares obtenidos por mejoramiento genético (Torres, 2012).

Entre los protocolos evaluados para la crioconservación de ajo, la vitrificación con las soluciones PVS2 y PVS3 ha mostrado resultados favorables en diferentes países (Ellis *et al.*, 2006; Keller *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2017).

Con el establecimiento de las colecciones crioconservadas se ha incrementado el interés por la estimación de la viabilidad del material mantenido en el criotank, por lo que se han desarrollado procedimientos para estimar la cantidad de explantes que se mantendrían viables (con la capacidad de regenerar plantas) en el tanque de crioconservación, lo cual se estima en función de la viabilidad, calculada a partir de una muestra control que se procesa en similares condiciones al material que se va a conservar en el criotank, pero que después de ser expuesta al nitrógeno líquido, se extrae, se retorna a la temperatura ambiente y se coloca en condiciones que inducen la regeneración de plantas (Dussert *et al.*, 2003; Volk *et al.*, 2016).

Volk *et al.* (2016) desarrollaron una serie de herramientas y tablas con el objetivo de asistir a los curadores de los Bancos de germoplasma para calcular el número de explantes que deben ser procesados a fin de tener una muestra crioconservada segura. Este cálculo se realiza en función de la viabilidad estimada de una muestra crioconservada de prueba (control), el número de explantes procesados y el nivel de confiabilidad seleccionado para el cálculo (0,5; 0,75; 0,90; 0,95 y 0,99).

En este sentido, la Unidad para la Preservación de los Recursos Genéticos de Animales y Plantas, perteneciente al Servicio de Investigación Agrícola del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA-ARS, por sus siglas en inglés), ha adoptado un estándar para el almacenamiento del material clonal, que establece un nivel de viabilidad

posterior a la criopreservación (expresada en porcentaje) ≥ 40 % y una cantidad de propágulos viables por accesión ≥ 60 . Estos dos requerimientos se han unido en un estándar denominado 40/60 (Jenderek y Reed, 2017). Esto quiere decir que para tener la certeza de que una accesión criopreservada ofrezca seguridad en cuanto a la recuperación de plantas viables, es necesario que la muestra criopreservada control alcance un valor de viabilidad post-criopreservación $\geq 0,40$ (relación plantas viables obtenidas/cantidad de explantes que integran la muestra) y que según ese valor de la viabilidad, la cantidad estimada de explantes viables que se conserven en el criotank sea ≥ 60 para un nivel de confiabilidad definido, calculado por las tablas del procedimiento probabilístico descrito por Volk *et al.* (2016).

El presente trabajo está dirigido a evaluar la viabilidad de una muestra de ápices de ajo criopreservado mediante el protocolo vitrificación con la solución PVS3 y determinar la relación entre la cantidad de plantas viables obtenidas experimentalmente y la cantidad estimada para dicha muestra.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal

Se trabajó con un clon tipo "Criollo", colectado en la localidad de Güira de Melena, en la provincia de Artemisa. Como explantes se utilizaron los ápices de crecimiento de dientes de bulbos de campo, fuente de explantes utilizada en otros trabajos de criopreservación de ajo (Bettoni *et al.*, 2020). La desinfección de los bulbos (dientes) se realizó con hipoclorito de sodio al 5 %. Los ajos desinfectados se sembraron en el medio basal Murashige y Skoog (MS) (1962). Esto permitió descartar los bulbos que no se desinfectaron y estimular la brotación del ápice de crecimiento.

Criopreservación

Protocolo: Vitrificación con la solución PVS3.

Una vez germinados los bulbos, se extrajeron los ápices (manteniendo parte de la base). El ápice incluyó el meristemo de crecimiento y el primer primordio foliar envolvente, con dimensiones de 1 a 2 mm de diámetro y de 3 a 4 mm de longitud. La criopreservación se realizó mediante el protocolo vitrificación con la solución PVS3 (50 % de glicerol + 50 % de sacarosa en medio MS) según el procedimiento descrito por Keller y Senula (2013).

También se trató una muestra testigo, que recibió igual tratamiento que la muestra criopreservada control, exceptuando la inmersión en el nitrógeno líquido, para discriminar el efecto de la criopreservación de cualquier otro efecto relacionado con el cultivo *in vitro*.

Recuperación.

Después del tratamiento de criopreservación, los ápices se colocaron en el medio Linsmaier y Skoog (LS) (1965) con 0,3 M de sacarosa y al día siguiente se pasaron a placas de Petri conteniendo medio LS con una relación nitrato/amonio de 56,5/3,5 (Nagakubo *et al.*, 1993). A la semana de la criopreservación, los ápices se transfirieron de las placas a erlenmeyers de 100 ml y después de 15 días (a las tres semanas del tratamiento) se pasaron a tubos de cultivo individuales, manteniendo el mismo medio de cultivo y la identificación del criovial de origen. El contenido de sacarosa en el medio fue el 3 %. Las muestras se mantuvieron en un cuarto de cultivo; la primera semana en la oscuridad y posteriormente, en fotoperíodo de 12 horas luz, a la temperatura de 24 ± 2 °C. El estado de las plantas se revisó semanalmente. Después que las plantas (mantenidas en condiciones *in vitro*) iniciaron la bulbificación, se transfirieron a medio BDS con 15 % de sacarosa.

Para la muestra crioconservada se utilizaron 41 ápices en ocho crioviales (a razón de cinco ápices por criovial, como medida de precaución ante una posible contaminación) y se destinaron 20 ápices para la muestra testigo no crioconservada (cuatro crioviales, con de cinco ápices cada uno).

La viabilidad y el desarrollo de las plantas se registraron teniendo en cuenta los siguientes indicadores:

- Viabilidad. Para su cálculo consideró el total de plantas viables (plantas que están regenerando hojas, emergiendo nuevos brotes o desarrollando bulbillos de aspecto vigoroso). Se cuantificó por la relación entre la cantidad de plantas regeneradas viables y el total de explantes que conformaron la muestra, y se expresó por su valor fraccionario de acuerdo a Volk *et al.* (2016).
- Emergencia de ápices. Se consideró como tal a los ápices de las nuevas hojas que sobresalen de las hojas externas preexistentes (primordios foliares que cubren al meristemo)
- Plantas. Condición en la que los explantes mostraban nuevas hojas desarrolladas.
- Cantidad de hojas/planta. Valor promedio de la cantidad de hojas abiertas por cada vitroplanta.
- Bulbificación. Se cuantificó en dos fases: el inicio de la bulbificación (IB), manifestado por el engrosamiento de la base de las hojas, y la bulbificación completa (BC) cuando el bulbillito se había desarrollado y conformado completamente.

La emergencia de ápices, las plantas (vitroplantas) y la bulbificación se cuantificaron, en todos los casos, como porcentajes respecto al total de ápices que integró cada muestra (crioconservada control y testigo no crioconservado).

La estimación de la cantidad de plantas viables que se podía obtener de la muestra crioconservada control se realizó a partir del

procedimiento probabilístico de Volk *et al.* (2016). Los autores realizaron un procedimiento para estimar la cantidad de plantas viables conservadas tomando como referencia la literatura publicada sobre los estándares establecidos para la viabilidad y el número de explantes preservados/procesados de los criobancos de material clonal. De esa información, tuvieron en cuenta el cultivo, el tipo y el número de explantes utilizados para determinar la viabilidad; los niveles mínimo y máximo de la viabilidad y el número menor y mayor de explantes almacenados para cada accesión. Con esos datos se realizaron tablas que permiten estimar la cantidad de explantes viables conservados considerando diferentes niveles de confiabilidad (DOI:10.1007/s10722-016-0460-6).

En el presente trabajo se comparó el número de plantas viables regeneradas, obtenido experimentalmente de la muestra crioconservada control, con el número de explantes viables estimado por ese procedimiento probabilístico, teniendo en cuenta el valor de la viabilidad experimental obtenido, el número de explantes que procesados y el nivel de confiabilidad del 95 %.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Figura 1 muestra la supervivencia de la muestra a los 10 días de la crioconservación, que se manifiesta por la elongación de los primordios foliares que cubrían el meristemo y el desarrollo del color verde.

Los valores de la viabilidad de la muestra crioconservada control y el testigo no crioconservado, desde las cuatro a las 15 semanas posteriores al tratamiento, se recogen en la Tabla 1 (A y B). La Tabla 1 A, que se refiere a la muestra crioconservada control, muestra que el valor de la viabilidad a las seis semanas del tratamiento (tiempo más

conveniente para evaluar la regeneración del ajo según Keller (2005) fue 0,76 y que a las 15 semanas del tratamiento el 56 % de las plantas

(23 plantas) completaron el ciclo de vida característico del cultivo hasta el desarrollo de los bulbillos.



Figura 1. Ápices crioconservados a 10 días del tratamiento, mostrando el crecimiento de la hoja externa y color verde.

Tabla 1. Viabilidad de los ápices de ajo crioconservados (A) y de la muestra testigo (B), y porcentajes de plantas regeneradas, desde las cuatro hasta las 15 semanas posteriores a la crioconservación. Protocolo: vitrificación con la solución PVS3. Clon: Tipo “Criollo”.

(A) Muestra crioconservada control

Semanas	Viabilidad	A Ápices (%)	B Plantas ¹ (%)	C Cantidad de hojas/planta	D E Bulbificación (%)	
					IB	BC
4	(A+B) 0,66	51,2	14,6	-	-	-
6	(A+B) 0,76	19,5	56,1	2,2	-	-
8	(A+B) 0,73	7,3	65,9	2,6	21,9	-
12	(B+D+E) 0,71	-	17,1	2,4	7,3	46,3
15	(D+E) 0,56	-	-	-	4,9	51,2

A las 15 semanas: Total de plantas vivas = 28. Total de plantas que bulbificaron = 23 (56,1 %)

(B) Muestra testigo no crioconservada

Semanas	Viabilidad	A Ápices (%)	B Plantas ¹ (%)	C Cantidad de hojas/planta	D E Bulbificación (%)	
					IB ²	BC
4	(A+B) 1,0	44,4	55,5	-	-	-
6	(A+B) 1,0	22,2	77,8	1,6	-	-
8	(B) 0,89	-	88,9	2,3	-	-
12	(B+D+E) 0,78	-	11,1	2,4	22,2	44,4
15	(E) 0,56	-	-	-	-	55,6

¹Plantas: Vitroplantas que desarrollaron nuevas hojas, ²IB: Inicio de la bulbificación, que se manifiesta por el engrosamiento de la base de las hojas y BC: Bulbificación completa, dada por una buena conformación del bulbillito.

Estos valores ratifican los resultados de trabajos anteriores, en los cuales el protocolo vitrificación, con la solución PVS3, se probó para 11 clones: cinco correspondientes al tipo comercial “Criollo”, uno al tipo Vietnamita y cinco clones obtenidos por mejoramiento genético. De ellos, solo uno mostró un valor de viabilidad inferior al 0,40 (clon ‘Tropical-18’, viabilidad 0,38).

La Figura 2A muestra que los ápices crioconservados desarrollaron vitroplantas a las ocho semanas de la crioconservación y completaron la formación de bulbillos (Figura 2B) a las 15 semanas (105 días), lo que indica que el ciclo biológico de este clon, en condiciones *in vitro*, se aproximó al ciclo de 120 días que presentan los clones “Criollos” en el campo.

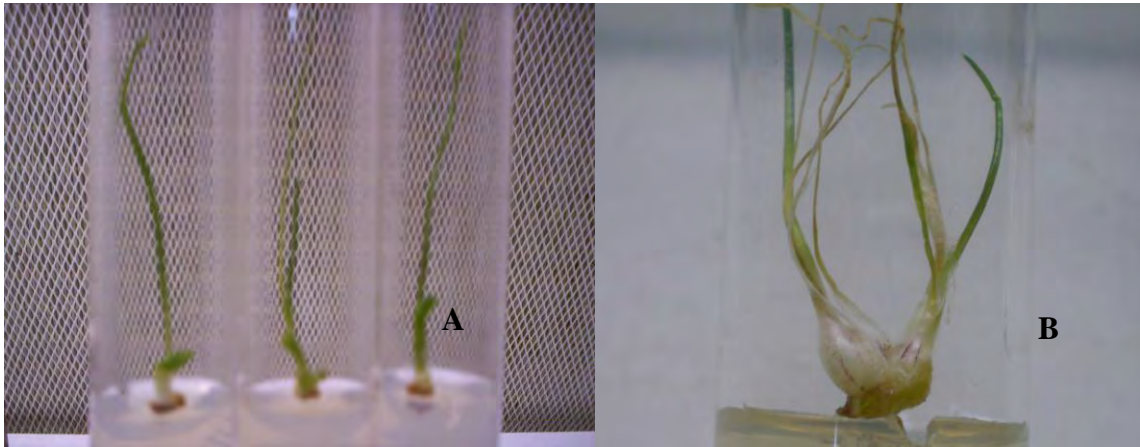


Figura 2. Regeneración de plántulas de ajo después de la crioconservación. A) Vitroplantas desarrolladas a las cuatro semanas. B) Bulbillos formados a las 15 semanas. Clon: Tipo “Criollo”.

Por otra parte, en la Tabla 1B que se refiere a la muestra testigo no crioconservada, se observa que esa muestra mantuvo todos los explantes viables durante las primeras seis semanas (viabilidad =1), si bien a las 15 semanas la viabilidad llegó a ser comparable a la de la muestra crioconservada, al presentar un 55,6 % de las plantas que completaron su ciclo de vida hasta la bulbificación.

Al comparar la muestra crioconservada control con el testigo no crioconservado (Tabla1 A y B), se observa que en ambas muestras la mayor parte de las plantas ya habían bulbificado a las 12 semanas del tratamiento, aunque en la muestra crioconservada las primeras manifestaciones de la bulbificación se iniciaron a las ocho semanas. Este dato resulta útil en cuanto a la iniciar el procedimiento para la

aclimatización de las vitroplantas a las condiciones ambientales, o procesarlas para otros objetivos (como la micropropagación) antes de que se inicien los procesos fisiológicos propios de la dormancia y formación del bulbillo. El protocolo vitrificación con la solución PVS3 se implementó en los Estados Unidos para la conservación de parte de los clones de ajo (también se utiliza la solución PVS2) (Ellis *et al.*, 2006), con un 74,1 % de las accesiones dentro del estándar 40/60 (Jenderek y Reed, 2017). También se utiliza para la conservación de 131 accesiones de ajo y otras especies de *Allium*, en Alemania (Keller *et al.*, 2016). Según Panis (2019), el protocolo vitrificación ha sido aplicado a diferentes tejidos vegetales de más de 100 especies y actualmente es el protocolo más

ampliamente aplicado para la crioconservación de plantas.

Los resultados obtenidos hasta el presente indican que el protocolo vitrificación con la solución PVS3 también resultó adaptable a las condiciones de trabajo existentes en el Banco de Germoplasma del INIFAT. No obstante, no es posible obviar que las investigaciones sobre la crioconservación continúan en desarrollo y que se han propuesto nuevos protocolos, como la gota-vitrificación y las crioplasmas, a la vez que también se trabaja con explantes tomados de plantas crecidas *in vitro*, entre los que se señalan los segmentos de hojas y los discos de tallos, para obtener de ellos, después de la crioconservación, la regeneración de brotes (Wang *et al.*, 2020).

Los resultados obtenidos en este trabajo aportaron criterios para determinar la cantidad de explantes que deben almacenarse para la conservación segura de una accesión, ya que son coherentes con el procedimiento descrito por Volk *et al.* (2016), para definir el número predecible de explantes viables conservados. Según la tabla diseñada por estos investigadores para el nivel de confiabilidad del 95 %, si se tiene un valor de la viabilidad de 0,75 y un tamaño de muestra de 40 explantes, la cantidad estimada de explantes viables en el tanque de nitrógeno líquido es de 25 explantes. La muestra crioconservada control estudiada, a las seis semanas del tratamiento, tuvo una viabilidad de 0,76 y de los 41 explantes que la integraron regeneraron 23 plantas viables, valor que se aproximó a la cantidad estimada por el procedimiento probabilístico (25 explantes).

La muestra evaluada cumplió con el requerimiento de la viabilidad post-crioconservación $\geq 0,40$ (Jenderek y Reed, 2017), y si se quisiera comparar con el estándar de seguridad 40/60 del Sistema Nacional de Germoplasma Vegetal del ARS-USDA, es decir

para tener la seguridad de que se mantengan en el nitrógeno líquido al menos 60 explantes viables, sería necesario procesar, al menos, 100 explantes (valor obtenido de la tabla correspondiente al 95 % de confiabilidad).

Aunque la cantidad de plantas regeneradas mostró variabilidad entre los crioviales, de todos se obtuvieron plantas viables (considerando como tales a las plantas que llegaron a bulbificar) (Figura 3). Esto indica que la pérdida de la viabilidad, que se debió principalmente a la muerte del meristemo apical, pudo estar más asociada a las características de los ápices y su manipulación que al procedimiento de crioconservación. La variabilidad de la regeneración entre crioviales es un aspecto a tener en cuenta para establecer el tamaño de la muestra crioconservada control y utilizar una cantidad de viales (réplicas) suficiente para evitar errores en la estimación de la viabilidad. Por ello, en los trabajos a desarrollar en el INIFAT sería conveniente, al menos al inicio de su implementación, realizar el cálculo de la viabilidad, a partir de muestras crioconservadas control no menores de 50 explantes.

El valor mínimo de la viabilidad encontrado para los genotipos de ajo crioconservados en el INIFAT hasta el momento es de 0,38 (Torres, 2012), cercano al 0,40 referido por Keller y Senula (2016) y Reed (2017). No obstante, no es objetivo de este trabajo hacer comparaciones con los valores obtenidos por otros autores, ya que en ese valor influyen diversos factores como los genotipos y la fuente de explantes (ya sean dientes, bulbillos aéreos, inflorescencias inmaduras o vitroplantas) (Keller y Senula, 2013). También influyen el tiempo en que se evalúa la viabilidad y los detalles específicos en la ejecución del protocolo, los cuales pudieran diferenciarse entre laboratorios. Además, el valor de la viabilidad tiene que ser estimado siempre en el momento en que se procesa la muestra

para su crioconservación. En el caso de que la viabilidad no garantice conservar una cantidad de explantes viables aceptable para los

requerimientos del banco de germoplasma sería necesario reprocesar la muestra o seleccionar otro protocolo (Volk *et al.*, 2016).

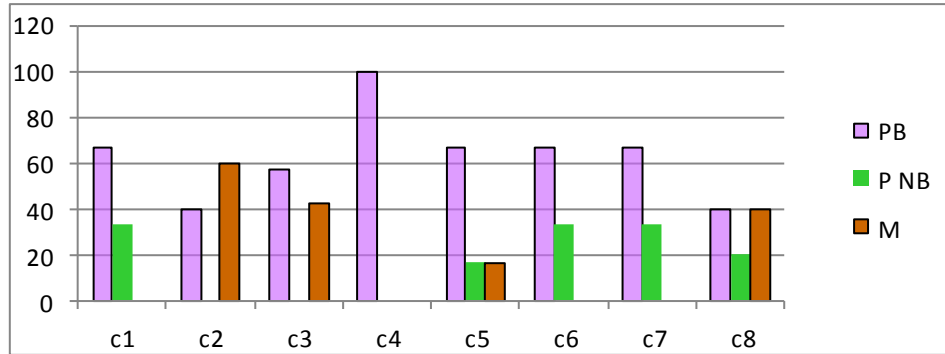


Figura. 3. Porcentajes de plantas viables (PB: plantas que bulbificaron), y plantas no viables (P NB: plantas que no bulbificaron y M: ápices muertos) a las 15 semanas de la crioconservación, de acuerdo al criovial de origen (c).

Kim *et al.* (2012) implementaron una colección crioconservada de especies de *Allium* de 1158 accesiones. Estos autores establecieron como estándar mínimo de conservación a largo plazo, para la colección de *Allium* del Centro Nacional de Agrobiodiversidad (National Agrobiodiversity Center) de Korea, la conservación de cuatro viales con 40 % de regeneración (es decir, de viabilidad). Por su parte, Keller *et al.* (2012), para la creación de una colección núcleo de clones procedentes de diferentes países de Europa, definieron el tamaño de la accesión en dependencia del valor su regeneración. Así, cuando la regeneración fue superior al 30 %, muestra crioconservada estuvo formada por dos réplicas de 50 explantes y una muestra adicional de 25 explantes como control. En los casos en que la regeneración estuvo entre el 30 y el 10 % conservaron una muestra adicional de igual número de explantes, y descartaron las muestras con valor de regeneración menor al 10 %.

Si bien la crioconservación se aplica, en gran escala, en 11 instituciones ubicadas en nueve

países (Panis, 2019), hay expertos que señalan que no existe una fácil transición entre los programas de investigación y la actividad de rutina del criobanco (Ellis, 2019), lo cual limita su aplicación en muchos bancos de germoplasma. Este autor señala la variación entre los genotipos como la principal variable que afecta el tránsito de la escala experimental a la operacional para la conservación en criobancos de los cultivos clonales, y señala que el monitoreo de la viabilidad puede ser una ayuda para el manejo de los cryobancos de plantas.

Por otra parte, Keller y Kik (2018) señalaron a la necesidad de personal técnico entrenado y a la sofisticación de algunos factores como las causas de que haya existido alguna reserva en el uso de la crioconservación para la preservación de los recursos fitogenéticos mantenidos vegetativamente, a pesar de que es la única forma segura de conservar ese material por largo tiempo. También ha sido tema de investigación el balance entre los costos relativamente altos de la introducción del material al criobanco y los costos muy bajos de

su mantenimiento. Al respecto, después de 6-10 años de investigaciones, los autores concluyeron que, para el ajo la criopreservación ha resultado más efectiva que la conservación mediante cultivo de campo.

A su vez, Liu *et al.* (2019) compararon el comportamiento en campo de plantas de ajo regeneradas de la criopreservación con plantas provenientes de campo, y determinaron que las plantas desarrolladas del material criopreservado mostraron ventajas en cuanto a la tasa fotosintética, el diámetro y el peso de los bulbos, el número de dientes y la eliminación de virus. Las temperaturas ultrabajas que se utilizan para la criopreservación, también se emplean para la erradicación de virus de los tejidos vegetales (Wang *et al.*, 2018), lo cual es otro efecto beneficioso de la criopreservación.

Estos elementos sustentan el criterio de que la criopreservación puede ser una opción para proteger, al menos, aquellos cultivares y genotipos que por sus características tienen un alto riesgo de perderse utilizando otras formas de conservación.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos ratifican la adaptabilidad del protocolo vitrificación con la solución PVS3 para la criopreservación de ápices de ajo en las condiciones del Banco de Germoplasma del INIFAT, lo que aporta elementos sobre la flexibilidad de este protocolo para su aplicación en países e instituciones diversas. La muestra criopreservada control de ajo, evaluada para determinar la viabilidad y la regeneración de plantas, resultó coherente con el método probabilístico para determinar el tamaño de la muestra a conservar en el nitrógeno líquido, lo cual constituye un punto de partida, para la implementación de una colección criopreservada de ajo en el Banco de Germoplasma del INIFAT.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acker, J.P.; Adkins, S.; Alves, A.; Horna, D. y Toll, J. (2017). Feasibility study for a safety back-up cropreservation facility. Independent expert report: July 2017. Rome (Italy): Biodiversity International. 100 p. ISBN: 978-92-9255-073-8.
- Bettoni, J.C.; Bonnart, R. y Volk, G.M. (2020). Challenges in implementing plant shoot tip cryopreservation technologies. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (PCTOC) <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01846-x> (consultado: septiembre 2020).
- Dussert, S.; Engelmann, F. y Noirot, M. (2003). Development of probabilistic tools to assist in the establishment and management of cryopreserved plant germplasm collections. *CryoLetters*, 24: 149-160. PMID 12908025.
- Ellis, D.; Skogerboe, D.; Andre, C.; Hellier, B. y Volk, G. (2006). Implementation of garlic cryopreservation techniques in the National Plant Germplasm System. *CryoLetters* 27 (2): 99-106. PMID16799441
- Ellis, D. (2019). Plant cryobanks-How will genebank managers 100 year from now judge what we are doing today? *Cryobiology*, 91:158. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2019.10.055 (Fecha de consulta: agosto del 2020).
- FAO (2020). Institutional Information. SDG Indicator 2.5.1: Number of plant and animal genetic resources for food and agriculture secured in either medium or long-term conservation facilities. Disponible en: www.fao.SDG megadata. March 2020. (Fecha de consulta: 21 de agosto de 2020).
- 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., DOI: 10.1007/s11627-017-9828-3.
- Keller, E.R.J.; Stavěliková, H.; Zámečník, J.; Kotlínska, 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. DOI:10.17660/Acta Hort.2012.969.41 (Fecha de consulta: enero 2019).
- Keller, E.R.J. y Senula, A. (2013). Micropropagation and cryopreservation of garlic (*Allium sativum* L.). En: Maurizio Lambardi *et al.* (eds.), Protocols for Micropropagation of Selected Economically-Important Horticultural Plants, Methods in Molecular Biology, 994. DOI:10.1007/978-1-62703-074-8_28. (Fecha de consulta: septiembre 2019).
- Keller, E.R.J. y Senula, A. (2016). Recent aspects of *Allium* cryopreservation in the federal German genebank. En: Gokce A.F. (ed.). Proc. VII Int. Sym. on Edible Alliaceae. Acta Hort., ISHS 1143: 35-44. DOI 10.17660/ActaHortic.2016.1143.6.
- Keller, E.R.J. (2005). Improvement of cryopreservation results in garlic using low temperature preculture and high-quality *in vitro* plantlets. CryoLetters, Nov- Dec; 26 (6): 357-366. PMID 16547550.
- Keller, E.R.J.; Grübe, M.; Hajirezaei, M.R.; Melzer, M.; Mock, H.P.; Rolletschek, H.; Senula, A. y Subbarayan, K. (2016). Experience in large-scale cryopreservation and links to applied research for safe storage of plant germplasm. Acta Hort., 1113, 239-250. DOI:10.17660/ActaHortic.2016.1113.36.
- Keller, E.R.J. y Kik, C. (2018). *Allium* Genetic Resources. 23-52 En: M. Shigyo *et al.* (eds.). The Allium Genomes, Compendium of Plant Genomes. 217 pp. DOI:10.1007/978-3-319-95825-5_3.
- 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 years' experience. CryoLetters, 33 (1): 45-57. PMID 22434122.
- Linsmaier, E.M. y Skoog, F. (1965). Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 18: 100-127. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1965.tb06874.x>.
- 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. DOI: 10.1016/j.scientia.2017.08.016
- Liu, X.X.; Mou, S.W. y Cheng, Z.H. (2019). Effects of cryopreservation on plant growth, bulb characteristics and virus reduction of garlic (*Allium sativum* L.). Cryoletters, 2019 Nov-Dec; 40 (&): 322-332. PMID 33966058.
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15: 473-497. DOI:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.
- Nagakubo, T.; Nagasawa A. y Ohkawa H. (1993). Micropropagation of garlic through *in vitro* bulblet formation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 32: 175-183. <https://doi.org/10.1007/BF00029840>.
- Panis, B. (2019). Sixty years of plant cryopreservation: from freezing hardy mulberry twigs to establishing reference crop collections for future generations. Acta Hort., 1234. ISHS 2019. Proc. III International Symposium on Plant

- Cryopreservation. K. Thammasiri *et al.* (eds). DOI: 10.17660/ActaHortic.2019.1234.1 (Fecha de consulta: mayo 2021).
- Pritchard, H.W. (2018). The rise of plant cryobiotechnology and demise of plant cryopreservation? *Abstracts Cryobiology*, 85, 160–161. Disponible en <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.10.159> (Fecha de consulta: 8 de septiembre de 2020).
- Reed, B.M. (2017). Plant cryopreservation: a continuing requirement for food and ecosystem security. In *Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.*, 53(4): 285-288. e-ISBN 978-0-387-72276-4. DOI: 10.1007/s11627-017-9851-4. (Fecha de consulta: enero 2019).
- Torres, M.A. (2012). Desarrollo de la conservación *in vitro* del germoplasma de ajo (*Allium sativum* L.). Informe final del proyecto. Programa Nacional Mejoramiento Vegetal y Recursos Fitogenéticos (01500148). Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical (INIFAT), La Habana.
- Volk, G.M.; Henk, A.D.; Jenderek, M.M. y Richards, C.M. (2016). Probabilistic viability calculations for cryopreserving vegetatively propagated collections in genebanks. *Genet. Resour. Crop Evol.*, 64:1613-1622. DOI:10.1007/s10722-016-0460-6. (Fecha de consulta: noviembre de 2017).
- Walters, C. y Pence, V.C. (2020). The unique role of seed banking and cryobiotechnologies in plant conservation. *Plants, People, Planet.*, 3(1): 83-91. <https://doi.org/10.1002/ppp3.10121> (Fecha de consulta: mayo de 2021).
- Wang, M.R.; Chen, L.; Zhang, Z.; Blystad, D.R. y Wang, Q.C. (2018). Cryotherapy: a novel method for virus eradication in economically important plant species. In: Loyola-Vargas, V.; Ochoa-Alejo, N. (eds.) *Plant Cell Culture Protocols. Methods in Molecular Biology*, 1825:257-268. Humana Press, New York, N.Y. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4_17 (Fecha de consulta: enero de 2020).
- Wang, M.R.; Lambardi, M.; Engelmann, F.; Pathirana, R.; Panis, B.; Volk, G.M. y Wang, Q.Ch. (2020). Advances in cryopreservation of in vitro-derived propagules: technologies and explant sources. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 144, 7-20. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01770-0>. (Fecha de consulta: agosto de 2020).

Fecha de recepción: 21 noviembre 2021

Fecha de aceptación: 20 marzo 2022

Agrotecnia de Cuba

ISSN impresa: 0568-3114

ISSN digital: 2414- 4673

<http://www.grupoagricoladecuba.gag.cu>

