

To freeze or not to freeze for long-term plant preservation

Congelar o no congelar para la conservación de plantas a largo plazo

MANUEL MARTÍNEZ ESTEVÉZ^{1,2}

¹Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Calle 43 No. 130 x 32 y 34. Col. Chuburná de Hidalgo, 97205, Mérida, Yucatán, México.

²Banco de Germoplasma, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Parque Científico y Tecnológico de Yucatán, Km. 5.5 Carretera Sierra Papacal-Chuburná Puerto, Tablaje 31257, 97302, Sierra Papacal, Mérida, Yucatán, México.
luismanh@cicy.mx

La conservación a temperaturas criogénicas de material vivo, específicamente material vegetal es un método utilizado desde hace más de dos siglos. Está considerado como un método *ex situ* de conservación y se destina para plantas que por una razón u otra no se pueden conservar de manera tradicional en forma de semillas. Es importante señalar que existen diferentes técnicas de criopreservación dependiendo de la naturaleza del explante; por otra parte, es vital poder identificar si el material no sufrió cambios genéticos y tener un método eficiente de propagación de este material conservado.

Palabras clave:
Congelación, propagación,
semillas recalcitrantes,
vitrificación.

Imaginemos que vivimos en uno de los lugares más fríos del planeta, con un promedio de temperatura en enero en -50°C . Por ello, no es raro que Oymyakon sea considerado el asentamiento más frío con habitantes permanentes en todo el mundo. Este sitio ubicado en Rusia es conocido como el “Polo del frío” y registró en 1926 la temperatura más fría jamás registrada en el hemisferio norte que fue de -71.2°C . En esta zona del planeta, la vegetación es de tundra, la cual es un bioma que se caracteriza por su subsuelo helado, falta de vegetación arbórea y en sus suelos pantanosos solo viven musgos y líquenes. En estas condiciones, las plantas que habitan estos lugares desarrollan características que les permiten estar a temperaturas criogénicas. Esto ha sugerido, siguiendo la biomimetización, desarrollar técnicas de conservación de material vegetal.

La palabra criobiología es derivada de la palabra griega “cryo” = frío, “bios” = vida, y “logos” = ciencia. En la práctica, la criobiología es el estudio de materiales o sistemas biológicos a temperaturas inferiores a lo normal. Algunos de los primeros conceptos de crio protección fueron establecidos por biólogos en el siglo XIX y principios del XX que estudiaron la congelación, la resistencia al frío y la resistencia a las heladas en el medio ambiente, con mayor frecuencia en las plantas. Por ejemplo, Molisch en la

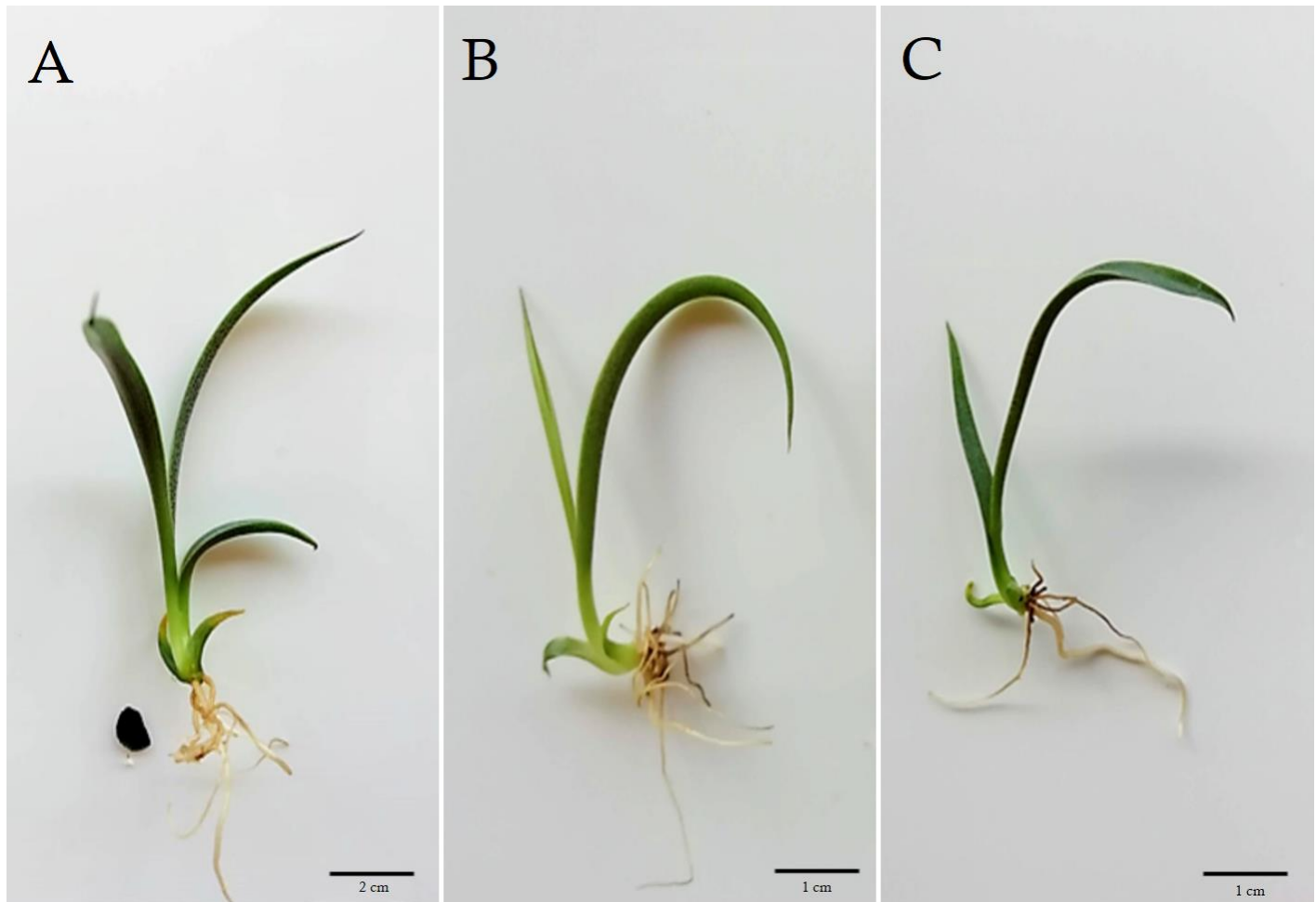


Figura 1. Conversión a plantas de *Agave tequilana* F.A.C. Weber, Cultivar “Chato”. **A.** Planta derivada de embrión cigótico después de 60 días de cultivo en medio MS. **B.** Planta derivada de embrión somático no criopreservado después de 60 días de cultivo en medio MS. **C.** Planta derivada de embrión somático recuperado después de la criopreservación y cultivado durante 105 días en medio MS. (Tomado de: Delgado-Aceves *et al.* 2021. <https://doi.org/10.3390/plants10020249>).

década de 1890 examinó la congelación en plantas mediante microscopía directa (Molisch 1896). Hoy es evidente que Molisch sabía que la composición y la concentración de sustancias dentro de las células vegetales esencialmente controlaban la supervivencia o la muerte de estas después de la congelación y que estas características se desarrollaban de manera natural dependiendo de los ambientes en los cuáles se desarrollaban.

Se cree que hace 2500 a.C. los antiguos egipcios utilizaban las bajas temperaturas en la medicina. Hipócrates recomendó el uso de frío para detener el sangrado y la hinchazón.

El hombre relacionó estas características con la conservación y desde 1890 se ha estado trabajando en la conservación de plantas por estos métodos; por lo tanto, la criopreservación o criopreservación

ha sido una herramienta fundamental de la criobiotecnología actual. Este método utiliza nitrógeno líquido, que mantiene temperaturas muy bajas (-196°C en líquido y $<-150^{\circ}\text{C}$ en vapor sobre líquido), es relativamente económico, químicamente inerte y fácilmente accesible.

La criopreservación es considerado un método de conservación *ex situ*, o sea fuera de su hábitat. Requiere evitar la formación de cristales de hielo letales dentro de las células vegetales (adónde rompen las membranas) y consta de tres estrategias básicas:

- 1) Secado parcial, lo que reduce la cantidad de agua dentro de los tejidos.
- 2) El uso de soluciones que protejan las estructuras celulares de la congelación, como combinaciones de dimetilsulfóxido, azúcares, glicerol, etilenglicol y otros productos

químicos, solos o mezclados, que eliminan el agua de las células y cambian las propiedades de congelación del remanente del agua.

- 3) Por último, el enfriamiento de los tejidos a tasas de cientos a miles de grados por segundo, logrado con la inmersión directa de tejidos en contenedores en nitrógeno líquido, para que no dar tiempo a la formación de cristales de hielo (Wesley-Smith *et al.* 2013).

Estos tres pasos estabilizan los cristales formados dentro de las células en forma acuosa, un proceso llamado *vitrificación*. Hoy se desarrollan diferentes técnicas de crioconservación dependiendo de la naturaleza de los explantes. Por ejemplo, el método clásico de congelación rápida y controlada y las técnicas basadas en la vitrificación (pre-cultivo y deshidratación, encapsulación/ deshidratación, encapsulación/ vitrificación, crioplacas, entre otros).

La conservación de material genético vegetal es hoy de vital importancia para mantener la biodiversidad de un sinnúmero de especies de diferentes familias y mantener los acervos genéticos a salvo para recuperar, si fuera necesario, especies en peligro de extinción. El poder hacer esto es de urgencia debido al deterioro de los ecosistemas por el cambio global, que incluye el cambio climático y la destrucción de los ecosistemas por el avance de las fronteras agrícola y urbana.

Sin embargo, no todas las plantas se pueden conservar de manera convencional, en campo, o en bóvedas frías, porque a veces sus semillas no resisten la bajas temperaturas y humedades relativas. ¿Qué y cómo podemos crio conservar las plantas por estos métodos?

El hombre, por puro sentido común, ha intentado como primera opción el conservar las semillas como el órgano principal para originar de manera directa una planta completa; sin embargo, como se mencionó anteriormente, no todas las semillas se pueden conservar en cámaras frías. Por tal motivo, se han utilizado otros tejidos para cumplir este objetivo. Por ejemplo, se han conservado ejes embrionarios de las semillas recalcitrantes que se definen como aquéllas que pasan por un muy corto o nulo secado de maduración, y permanecen sensibles a la deshidratación, tanto en su desarrollo como después de su desprendimiento. También, se han conservado esporas, polen, brotes, meristemos y embri-

nes somáticos (Figura 1), gametofitos en plantas con alternancia de generaciones, etc. Todos estos tejidos, teóricamente, pueden estar en estado de congelación por tiempo indefinido y para ello se han hecho las pruebas de viabilidad a diferentes tiempos de almacenamiento.

Hoy y siempre, una de las preocupaciones importantes de los conservacionistas es si ese material estará en condiciones de producir una nueva planta. Para ello se han utilizado diferentes métodos para determinar estabilidad genética de estos materiales; entre ellos tenemos, la citometría de flujo, el análisis de cromosomas, los niveles de ploidía, las amplificaciones al azar de segmentos polimórficos, el análisis de polimorfismos en la longitud de fragmentos de ADN amplificados y los microsátelites (Pence *et al.* 2020). Algo muy importante, siempre hay que contar con un método de propagación eficiente de estos materiales para poder recuperar las plantas.

La crioconservación es factible en todos los países del mundo, independiente del clima existente, y es de vital importancia para conservar material vegetal de especies amenazadas y de importancia cultural cuyas semillas son recalcitrantes. Sin duda es un método válido y alternativo para la conservación *ex situ*. Hoy en día, aún no hemos podido establecer este método en nuestro Banco de Germoplasma del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. En cambio, en México hay instituciones que lo utilizan hace años. Por nuestra parte, estamos trabajando en las estrategias para establecerlo y creemos importante que se le dé difusión a esta técnica.

Referencias

- Delgado-Aceves L., González-Armao M.T., Santacruz-Ruvalcaba F., Folgado R. y Portillo L. 2021.** Indirect Somatic Embryogenesis and Cryopreservation of *Agave tequilana* Weber Cultivar “Chato”. *Plants (Basel)* 10(2): 249.
<https://doi.org/10.3390/plants10020249>
- Molish H. 1896.** Das Erfrienen von Pflanzen bie Temperaturen uber dem Eispunkt. *Denkschriften der Kaiserlichen Akademie der Wissenschaften. Mathematisch-naturwissenschaftliche Klasse* 105: 1–14.
- Pence V.C., Ballesteros D., Walters C., Reed B.M., Philpott M., Dixone K.W., Pritchard H.W., Culley T.M. y Vanhove A.C. 2020.** Cryobiotechnologies: Tools for expanding long-

term ex situ conservation to all plant species.
Biological Conservation 250: 108736

**Wesley-Smith J., Berjak P., Pammenter N.W. y
Walters C. 2013.** Intracellular ice and cell survi-

val in cryo-exposed embryonic axes of recalcitrant seeds of *Acer saccharinum*: An ultrastructural study of factors affecting cell and ice structures. *Annals of Botany* 113: 695–709.

Desde el Herbario CICY, 13: 143–146 (15-julio-2021), es una publicación semanal editada por el Herbario CICY del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., con oficinas en Calle 43 x 32 y 34 No. 130, Col. Chuburná de Hidalgo, C.P. 97205, Mérida, Yucatán, México. Tel. 52 (999) 942-8330 Ext. 110, www.cicy.mx/Sitios/Desde_Herbario/, webmas@cicy.mx. Editores responsables: Germán Carnevali Fernández-Concha y José Luis Tapia Muñoz. Reserva de Derechos al Título Exclusivo No. 04-2016-041413195700-203, otorgado por el Instituto Nacional del Derecho de Autor, ISSN: 2395-8790. Responsable de la publicación: José Fernely Aguilar Cruz, Calle 43 x 32 y 34 No. 130, Col. Chuburná de Hidalgo, C.P. 97205, Mérida, Yucatán, México. Fecha de última modificación: 15 de julio de 2021. Las opiniones expuestas por los autores no necesariamente expresan la postura del editor de la publicación. De la misma manera, la responsabilidad sobre la veracidad y la precisión de los contenidos, le corresponde totalmente a los autores de los ensayos.