



Criopreservação de germoplasma vegetal

A alternativa para a conservação a longo prazo

Izulmé R. I. Santos

EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, CP 02372, CEP 70849-970, Brasília-DF, Brasil
izulme@cenargen.embrapa.br

Fotos cedidas pela autora



Os recursos genéticos vegetais são um reservatório natural de genes com potencial de uso para a produção sustentável de gêneros essenciais à humanidade, tais como alimentos, fibras e medicamentos. Entretanto, essa biodiversidade está sendo destruída numa velocidade alarmante, devido ao crescimento desorganizado e à exploração sem controle dos ecossistemas e de seus recursos naturais. A conservação *in situ* e *ex situ* do germoplasma de raças locais, cultivares domésticas e parentes silvestres de espécies agromônimas foi proposta como medida de prevenção desse processo de erosão genética. Seu principal objetivo é desenvolver técnicas para conservação a longo prazo do germoplasma de espécies vegetais com a máxima integridade genética e biológica possível (Bajaj, 1995).

A conservação de sementes é a forma mais comum de conservação *ex situ*, já que a semente é a unidade de propagação natural para a maioria das espécies de plantas superiores. A metodologia convencional de conservação de sementes utilizada em bancos de germoplasma compreende a desidratação, para teores de umidade extremamente baixos (5%),

e armazenamento em câmaras a temperaturas abaixo de zero (-18 a -20°C). As sementes de numerosas espécies de plantas mantêm alta viabilidade após o armazenamento nessas condições e são classificadas como ortodoxas (Roberts, 1973). Entretanto, existem sementes muito sensíveis (recalcitrantes) ou moderadamente sensíveis (intermediárias) à desidra-

Tabela 1. Lista de algumas espécies de plantas de importância econômica criopreservadas com sucesso

Grupo/Espécie	Referência
a) Raízes, bulbos e tubérculos	
Alho (<i>Allium sativum</i>)	Niwata, 1995
Batata (<i>Solanum</i> spp)	Fabre e Dereuddre, 1990
Batata-doce (<i>Ipomea batatas</i>)	Schneibel-Preikstas <i>et al.</i> , 1992
Mandioca (<i>Manihot esculenta</i>)	Marin <i>et al.</i> , 1990
b) Cereais e gramíneas	
Trigo (<i>Triticum</i> spp)	Bajaj, 1983
Milho (<i>Zea mays</i> L.)	Delvallée <i>et al.</i> , 1989
Cana-de-açúcar (<i>Saccharum officinale</i>)	Paulet <i>et al.</i> , 1993
c) Plantas ornamentais	
Cravo (<i>Dianthus</i> spp)	Dereuddre <i>et al.</i> , 1988
Crisântemo (<i>Chrysanthemum</i> spp)	Fukai, 1990
d) Frutíferas tropicais e temperadas	
Banana (<i>Musa</i> spp)	Panis <i>et al.</i> , 1990
Citrus (<i>Citrus</i> spp)	Marin e Duran-Vila, 1988
Maçã (<i>Malus</i> spp)	Stushnoff e Seufferheld, 1995
Morango (<i>Fragaria</i> spp)	Yonjie <i>et al.</i> , 1997
Pêra (<i>Pirus</i> spp)	Dereuddre <i>et al.</i> , 1990
Videira (<i>Vitis</i> spp)	Plessis <i>et al.</i> , 1993
e) Leguminosas e oleaginosas	
Amendoim (<i>Arachis</i> spp)	Runthala <i>et al.</i> , 1993
Côco (<i>Cocus nucifera</i> L.)	Assy-Bah e Engelmann, 1992
Grão-de-bico (<i>Cicer</i> spp)	Bajaj, 1995
Oliveira (<i>Oliva</i> spp)	Gonzales-Rio <i>et al.</i> , 1994
f) Estimulantes, medicinais e aromáticas	
Café (<i>Coffea arabica</i>)	Abdelnour <i>et al.</i> , 1992
Chá (<i>Cammelia sinensis</i>)	Chaudhury <i>et al.</i> , 1991

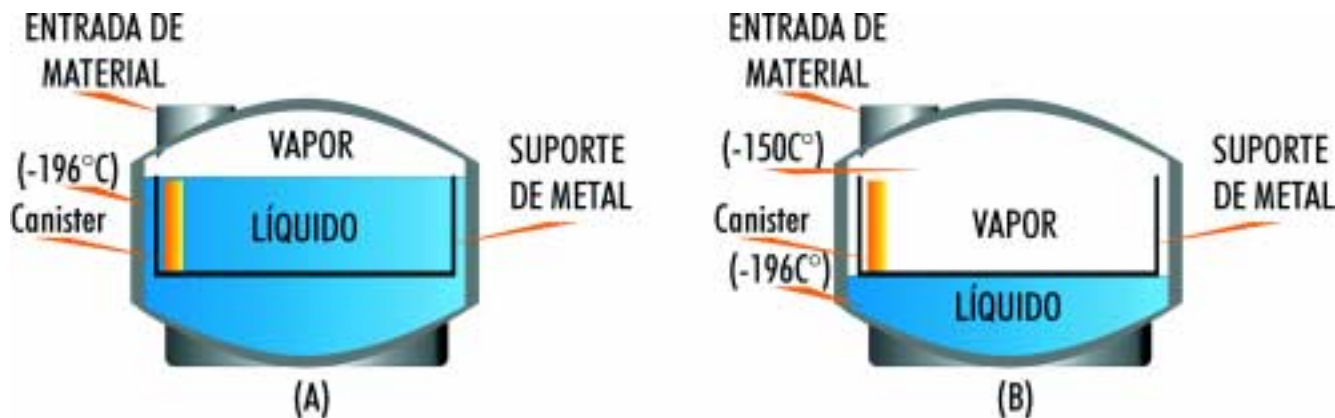


Figura 1. Desenho esquemático de um tanque criogênico mostrando o armazenamento de amostras mergulhadas em nitrogênio líquido a -196°C (A) ou na sua fase de vapor a -150°C (B)

tação e ao congelamento, que não sobrevivem ao armazenamento nessas condições (Ellis *et al.*, 1990 e 1991; Roberts, 1973). Este é o caso de sementes de inúmeras espécies de plantas arbóreas e arbustivas de importância econômica, nativas de regiões tropicais e sub-tropicais, tais como: dendê (*Elaeis oleifera* [Kunth.] Cortes), côco (*Cocos nucifera* L.), borracha (*Hevea brasiliensis* M. Arg.), cacau (*Theobroma cacao* L.), café (*Coffea* spp) e citros (*Citrus* spp). Existem ainda espécies que se propagam exclusivamente por propagação vegetativa (batata-doce, batata-inglesa, mandioca) ou que não produzem sementes viáveis (banana) para as quais não existe uma metodologia de conservação a longo prazo.

Essas espécies são geralmente conservadas como coleções no campo ou em casas de vegetação, uma metodologia eficiente, mas que assegura a manutenção de coleções por curto ou médio prazo apenas. A possibilidade de obter plantas inteiras a partir de células isoladas, de tecidos e de órgãos de plantas pelo uso de técnicas de cultura de tecidos levou ao estabelecimento dos bancos de germoplasma *in vitro*. A conservação *in vitro* envolve manutenção de culturas em crescimento ativo através de subculturas periódicas de brotos e segmentos nodais. Numerosas espécies de importância econômica, tais como: café (*Coffea arabica* L.), morango (*Fragaria* spp.), banana (*Musa* spp.), mandioca (*Manihot esculenta* Crantz.), batata (*Solanum* spp.), bata-

ta-doce (*Ipomea batatas*), vinha (*Vitis* spp.) têm sido conservadas com sucesso pelo uso dessa metodologia (Bajaj, 1995). Entretanto, essa técnica também permite conservar o germoplasma vegetal somente por curtos períodos de tempo (nove a doze meses) dependendo do procedimento ou da espécie de planta. Em suma, nenhuma das diferentes metodologi-

as existentes e em prática, no momento, para conservação do germoplasma vegetal permite conservar a longo prazo espécies que são vegetativamente propagadas ou que produzem sementes recalcitrantes ou intermediárias com alta estabilidade genética e biológica. A criopreservação é a única técnica disponível na atualidade com potencial para garantir a conservação a longo prazo do germoplasma de espécies problemáticas.

O que é Criopreservação?

A criopreservação é definida como a conservação de material biológico em nitrogênio líquido a -196°C , ou, em sua fase de vapor, a -150°C (Figura 1). Essa técnica pode assegurar a conservação de material biológico por longos períodos de tempo, uma vez que a essas temperaturas ultra-baixas o metabolismo celular fica tão reduzido que a deterioração biológica é virtualmente paralisada.

A criobiologia alcançou grande progresso nos últimos dez anos e foram desenvolvidos com sucesso protocolos de criopreservação para numerosas espécies de plantas de propagação vegetativa, cereais e gramíneas, plantas ornamentais, frutíferas tropicais e temperadas, leguminosas e oleaginosas, estimulantes, medicinais e aromáticas, entre outras, (Tabela 1; Figura 2). Técnicas diferentes têm sido utilizadas em cada caso, incluindo a criopreservação de protoplastos, suspensões celulares,

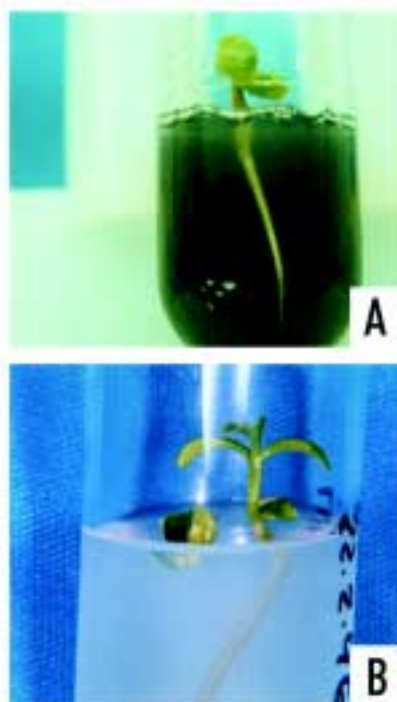


Figura 2. Plântulas obtidas a partir de eixos embrionários de café (A) e de laranja (B) criopreservados em nitrogênio líquido usando a técnica de congelamento rápido



Figura 3. Representação esquemática de cristais de gelo

calos, gemas apicais e laterais, meristemas, sementes, embriões somáticos e zigóticos e produtos biotecnológicos (culturas produtoras de metabólitos secundários de interesse econômico e linhagens celulares geneticamente modificadas) (Sakai, 1995; Stushnoff e Seufferheld, 1995).

O grande desafio para o criobiologista é realizar um congelamento sem a formação de cristais de gelo no interior das células. A formação de gelo no meio intracelular causa ruptura do sistema de membranas celulares, resultando em perda da semi-permeabilidade e da compartimentação celular; em consequência disso, as células entram em colapso e morrem. A injúria mecânica sofrida pelas células advém de dois fenômenos: o comportamento peculiar da água, que se expande ao congelar-se, e a conformação dos cristais de gelo (Figura 3). Entretanto, evitar a formação desses cristais não é uma tarefa fácil, porque os tecidos vegetais usados para a criopreservação (calos, embriões zigóticos ou somáticos, gemas apicais e laterais, sementes e suspensões celulares) apresentam altos teores de água em suas células. Extensiva formação de cristais de gelo intracelular irá ocorrer caso estes tecidos sejam congelados no estado hidratado. Portanto, a água precisa ser removida antes do congelamento, para evitar a injúria causada pelos cristais de gelo. Entretanto, a desidratação que, a princípio, parece uma solução simples, não é um processo trivial, porque a água tem muitas funções biológicas fundamentais nas células de organismos vivos. Por exemplo, ela é um importante solvente, meio de transporte, resfriador (através da evaporação), e um constituinte essencial e estabilizador da estrutura das macromoléculas e organelas, cuja

conformação funcional se mantém, principalmente, devido às interações hidrofílicas e hidrofóbicas entre elas (Kramer e Boyer, 1995; Vertucci e Farrant, 1995). Portanto, o sucesso de um protocolo de criopreservação depende da desidratação para um teor de humidade que seja baixo o suficiente para evitar a formação de gelo intracelular, mas não tão reduzido que cause injúria por desidratação.

Metodologia clássica

Os primeiros protocolos de criopreservação de tecidos vegetais utilizavam congelamento em duas fases: congelamento lento, até uma temperatura de pré-congelamento (-30 a -40°C), a uma velocidade de congelamento definida (1 a 10°C/hora) usando-se um congelador programável, seguido de imersão direta em nitrogênio líquido (Figura 4). Esse método foi baseado nos eventos físico-químicos que ocorrem durante o processo de congelamento em condições naturais, os quais foram descritos por Mazur (1963; 1969). À medida que a temperatura decresce, aproximando-se de 0°C, a célula e seu meio externo atingem um estado de super-resfriamento ("supercooling") e, posteriormente, ocorre a formação de gelo no meio extracelular. O conteúdo da célula super-resfriada permanece descongelado possivelmente porque a parede celular e a membrana plasmática impedem que os cristais de gelo presentes nos espaços intercelulares penetrem a célula e desencadeiem o congelamento do citoplasma. Se o congelamento ocorre lentamente a água se difunde do interior da célula supercongelada para o meio externo devido à diferença de pressão do vapor da água (maior dentro

da célula que nos espaços intercelulares congelados) e é convertida em gelo na superfície das células ou entre o protoplasto e a parede celular. Esse fenômeno é chamado de desidratação induzida por congelamento ("freeze-induced desiccation"). Com isso, a célula desidrata-se, reduzindo a um mínimo ou removendo completamente a água livre presente e evitando, assim, a formação de gelo em seu interior. Como resultado, a concentração da solução celular aumenta e a célula perde turgor. Quando o potencial hídrico das células parcialmente desidratadas iguala-se àquele do gelo extracelular, é estabelecido um equilíbrio e a desidratação pára, contanto que a temperatura permaneça constante. Entretanto, se o congelamento da célula for muito rápido, a desidratação por congelamento não ocorre, as células se tornam cada vez mais super-resfriadas e, eventualmente, a solução intracelular, que contém alto teor de água livre, congela-se, formando cristais de gelo e causando injúria mecânica às células (Steponkus e Webb, 1992). Em condições experimentais, quando as células atingem a temperatura de pré-congelamento, a maior parte da água congelável já escapou formando gelo no meio externo e a exposição à temperatura do nitrogênio líquido tem muito pouco efeito adverso (Kantha, 1985; Sakai, 1995). Em resumo, o método de congelamento lento é um procedimento complexo, no qual a velocidade de congelamento e a temperatura de pré-congelamento têm um papel crítico na preservação da viabilidade do material.

Metodologias contemporâneas

As técnicas de criopreservação desenvolvidas mais recentemente são mais simples e estão baseadas na vitrificação (Figura 5). Vitrificação, ou formação do estado vítreo, é o processo através do qual a água sofre uma transição da fase líquida para um estado sólido amorfo e meta-estável (Fahy *et al.*, 1984; Franks, 1982). O sólido assim formado é, na verdade, uma solução super-saturada e de alta viscosidade, o que lhe confere as

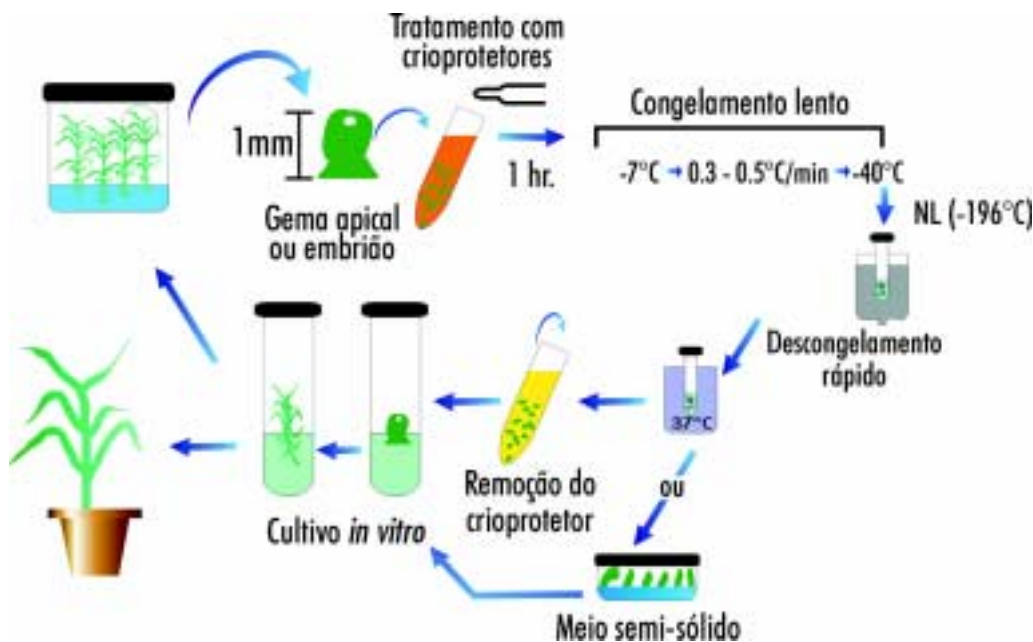


Figura 4. Diagrama mostrando as diferentes etapas do congelamento lento (metodologia clássica)

propriedades mecânicas de um sólido embora não haja formação de uma estrutura cristalina. A transição para o estado vítreo não envolve mudanças químicas, mas apenas mudanças físicas na viscosidade do líquido.

A vitrificação do citoplasma pode ser obtida experimentalmente por meio da desidratação dos tecidos para um teor de umidade em que não exista água livre para a cristalização antes de mergulhá-lo em nitrogênio líquido. Com isso, a solução celular torna-se muito concentrada e pode passar pela transição de vitrificação quando uma velocidade de congelamento apropriada é utilizada. Desse modo, a formação de gelo durante a exposição a -196°C é evitada. A desidratação pode ser obtida por evaporação da água ou por tratamento com soluções concentradas de crioprotetores químicos (solução de vitrificação). Dimetilsulfóxido (DMSO), etileno glicol, metanol, glicerol e propileno glicol são os crioprotetores mais comumente utilizados. Entretanto, esses crioprotetores podem ser tóxicos ou podem causar estresse osmótico, levando à morte as células ou modificando sua resposta morfo genética em cultura (Sakai, 1995). Mais recentemente, têm sido utilizados açúcares (sacarose, trealose e gluco-

se) como substâncias crioprotetoras porque eles não apresentam citotoxicidade mesmo quando se acumulam em grande quantidade no citoplasma (Figura 5). Em comparação com os crioprotetores tradicionais, esses açúcares mostram alta eficiência na estabilização das membranas celulares durante o congelamento. Pode ser observada evidência do efeito protetor desses compostos em plantas de clima temperado. Essas plantas acumulam carboidratos solúveis em seus tecidos durante a aclimação ao frio, na natureza ou sob condições experimentais. O período em que tais plantas são mais tolerantes ao congelamento corresponde ao ponto de máximo acúmulo desses compostos (Imanishi *et al.*, 1998; Sakai e Yoshida, 1968). De modo semelhante, grande quantidade de açúcares como sacarose, trealose e oligosacarídeos (rafinose e estaquiose) acumulam-se em estruturas que são tolerantes a intensa desidratação. Este é o caso de esporos de fungos, leveduras, musgos, samambaias, sementes e pólen da maioria das angiospermas (Crowe *et al.*, 1988; Hoekstra *et al.*, 1994; Oliver, 1996).

O modo de ação dos açúcares na aquisição da tolerância à desidratação e ao congelamento ainda não é totalmente conhecido e uma correla-

ção direta de causa e efeito ainda não foi demonstrada, mas ele possivelmente envolve múltiplos componentes. A princípio, se propôs que os açúcares agiam como agentes osmóticos externos, removendo o excesso de água intracelular através de um gradiente osmótico (Dumet *et al.*, 1993). Outras evidências levaram à formulação de duas hipóteses diferentes sobre o modo de ação destes compostos. Primeiro, sugere-se que eles sejam excelentes agentes vitrificadores e, por conseguinte, seu efeito protetor é atribuído à vitrificação das membranas celulares e das biomoléculas (Hirsh,

1987). Outra hipótese, denominada hipótese da substituição da água ("water replacement hypothesis") propõe que estes açúcares podem substituir a água removida das biomoléculas, desta forma mantendo as estruturas hidrofílicas na sua orientação hidratada e evitando perda de funcionalidade, mesmo depois da água ter sido removida (Crowe *et al.*, 1988).

O processo de vitrificação tornou-se um dos principais métodos de crioproteção, tendo sido aplicado a uma ampla variedade de tecidos vegetais. Do ponto de vista prático, uma grande vantagem desse método é poder congelar rapidamente os tecidos vitrificados pelo mergulho direto em nitrogênio líquido, eliminando a necessidade de se usarem congeladores programáveis. Durante o rápido decréscimo da temperatura, em contraste com o congelamento lento, não há tempo suficiente para o crescimento de cristais de gelo no espaço intracelular, e, com isso, as células passam rapidamente pela zona de temperatura na qual o crescimento letal de cristais de gelo ocorreria (Luyet, 1937). Além disso, os procedimentos baseados na vitrificação simplificam o procedimento de crioproteção e permite que explantes complexos contendo diversos tipos de células sobrevivam à exposição ao

nitrogênio líquido (Paulet *et al.*, 1993). O ponto crítico para obter sobrevivência usando protocolos de vitrificação é a desidratação e não o congelamento. Portanto, se a amostra for desidratada para o teor de umidade apropriado, obtém-se alta sobrevivência na maioria dos casos (Engelmann *et al.*, 1997).

O estado vítreo tem muitos outros efeitos benéficos para a célula desidratada: limitação da perda de água, limitação da cristalização de sais e proteínas no citoplasma, proteção contra mudanças no pH à medida que a água é removida, e prevenção de colapso celular durante extensiva perda de água (Koster, 1991). A vitrificação restringe a difusão de substratos e de produtos dentro da célula, levando a um estado de quiescência metabólica, e resultando na prevenção de reações químicas dependentes do processo de difusão (Koster, 1991). Devido a essas características do estado vítreo, a deterioração de sistemas biológicos é suprimida, assegurando a estabilidade durante o período de quiescência.

Um outro procedimento de vitrificação que tem apresentado excelentes resultados é o encapsulamento-desidratação (Dereuddre *et al.*, 1990). Nessa técnica, os explantes são encapsulados em gel de alginato de sódio e as cápsulas contendo o material são pré-cultivadas em um meio contendo concentrações elevadas de

sacarose (0.3 a 0.7 M) e parcialmente desidratados para aproximadamente 20% de umidade (base em peso fresco), imersos diretamente em nitrogênio líquido e descongelados lentamente. Esse procedimento tem sido usado com sucesso para a criopreservação de uma grande variedade de espécies de plantas. Estruturas maiores (gemas apicais e laterais) que haviam previamente se mostrado intolerantes ao congelamento foram congeladas com sucesso por meio dessa metodologia.

Estudos realizados nos últimos dez anos resultaram em grande avanço na criopreservação de células e tecidos vegetais. O desenvolvimento de técnicas baseadas na vitrificação simplificou grandemente o processo de criopreservação. Essa técnica pode ser efetivamente utilizada para conservação do germoplasma de muitas espécies de plantas. Entretanto, a pesquisa ainda não atingiu o mesmo nível para todos os materiais vegetais, e algumas plantas ainda são sensíveis ao congelamento, como é o caso das sementes recalcitrantes. Isto se deve ao fato de que o congelamento de rotina de material vegetal implica a delimitação de condições muito bem definidas, as quais requerem trabalho de pesquisa extensivo. A diversidade de resposta entre as diferentes espécies de plantas, ou mesmo entre diferentes tecidos de uma mesma espécie, dificulta muito a

generalização e o desenvolvimento de um protocolo de caráter universal. No entanto, existem ainda várias abordagens técnicas que podem ser utilizadas para melhorar a eficiência e aumentar a aplicabilidade das técnicas de criopreservação de espécies vegetais.

Literatura Citada

Abdelnour A, Villalobos V, Engelmann F (1992) Cryopreservation of zygotic embryos of *Coffea* spp. *Cryo-Letters* **13**: 297-302

Assy-Bah B, Engelmann F (1992) Cryopreservation of immature embryos of coconut (*Cocos nucifera* L.). *Cryo-Letters* **13**: 67-74

Bajaj YPS (1983) Cryopreservation of germplasm of cereals. Progress and prospects. In Proceedings of the 6th International Wheat Genetics Symposium, Kyoto, Japan, pp 565-574

Bajaj YPS (1995) Cryopreservation of plant cell, tissue, and organ culture for the conservation of germplasm and biodiversity. In Bajaj YPS, ed, *Biotechnology in agriculture and forestry*, vol. 32, Cryopreservation of plant germplasm I. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 3-28

Chaudhury R, Radhamani J, Chandel KPS (1991) Preliminary observations on the cryopreservation of desiccated embryonic axes of tea (*Camellia sinensis* [L.] O. Kuntze) seeds for genetic conservation. *Cryo-Letters* **12**: 31-36

Crowe JH, Crowe LM, Carpenter JF, Rudolph AS, Aurell Wistrom C, Spargo BJ, Anchordoguy TJ (1988) Interactions of sugars with membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* **947**: 367-384

Delvallée I, Guillaud J, Beckert M, Dumas C (1989) Cryopreservation of immature maize embryos after freeze-hardening in the ear and *in vitro*. *Plant Sci* **60**: 129-136

Dereuddre J, Scottez C, Arnaud Y, Duron M (1990) Resistance d'apex caulinares de vitro-plants de Poirier (*Pyrus communis* L. cv. Beurre Hardy), enrobés dans l'alginate, a une deshydratation puis a une con-

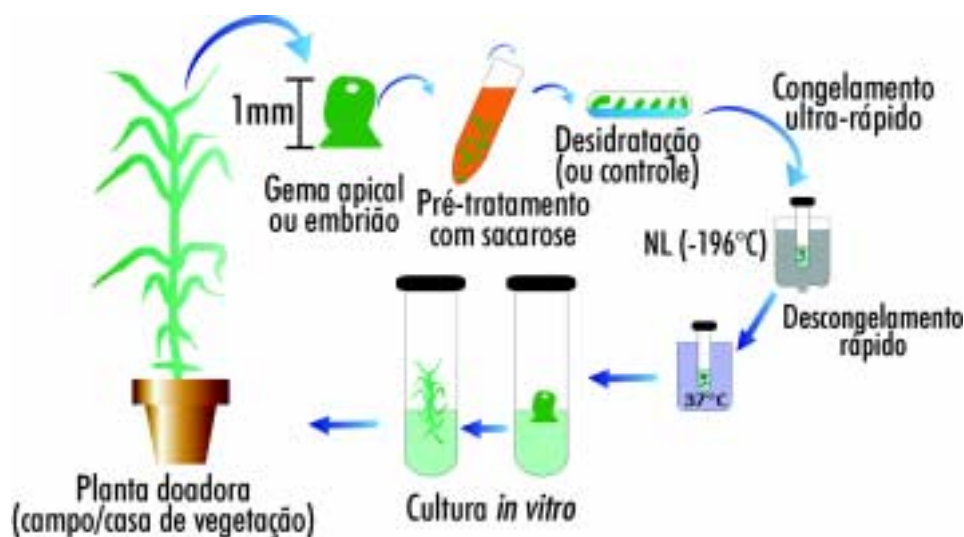


Figura 5. Diagrama mostrando as diferentes fases do congelamento rápido (metodologia contemporânea)

gelation dans l'azote liquide: Effet d'un durcissement préalable au froid. C R Acad Sci Paris Ser **3** (310) 317-323

Deureudde J, Fabre J, Bassaglia C (1988) Resistance to freezing in liquid nitrogen of carnation (*Dianthus caryophyllus* L. var. Eolo) axillary shoot tips excised from different aged in vitro plantlets. Plant Cell Rep **7**: 170-173

Dumet D, Engelmann F, Charbrillange N, Duval Y, Dereudde J (1993) Importance of sucrose for the acquisition of tolerance to desiccation and cryopreservation of oil palm somatic embryos. Cryo-Letters **14**:243-250

Ellis RH, Hong TD, Roberts EH (1990) An intermediate category of seed storage behaviour? I. Coffee. J Exp Bot **41**(230): 1167-1174

Ellis RH, Hong TD, Roberts EH (1991) An intermediate category of seed storage behaviour? II. Effects of provenance, immaturity, and imbibition on desiccation-tolerance in coffee. J Exp Bot **42**(238): 653-657

Engelmann F (1997) Importance of desiccation for the cryopreservation of recalcitrant seed and vegetatively propagated species. Plant Genetic Resources Newsletter **112**: 9-18

Fabre J, Dereudde J (1990) Encapsulation-dehydration: a new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot-tips. Cryo-Letters **11**: 413-426

Fahy GM, MacFarlane DR, Angell CA, Meryman HT (1984) Vitrification as an approach to cryopreservation. Cryobiology **21**: 407-426

Franks F (1982) The properties of aqueous solutions at subzero temperatures. In F Franks, ed., Water: a comprehensive treatise, Plenum Press, New York, pp. 215-218

Fukai S (1990) Cryopreservation of chrysanthemum shoot tips. Sci Hortic **45**: 167-174

Gonzales-Rio F, Gurriaran MJ, Gonzales-Benito E, Revilla MA (1994) Desiccation and cryopreservation of olive (*Olea europea* L.) embryos. Cryo-Letters **15**: 337-342

Hirsh AG (1987) Vitrification in plants as a natural form of cryoprotection. Cryobiology **24**: 214-228

Hoekstra FA, Haight AM, Tette-

roo FAA, Roekel, T van (1994) Changes in soluble sugars in relation to desiccation tolerance in cauliflower seeds. Seed Sci Res **4**: 143-147

Imanishi HT, Suzuki T, Masuda K, Harada T (1998) Accumulation of raffinose and stachyose in shoot apices of *Lonicera caerulea* L. during cold acclimation. Scientia Horticulturae **72**: 255-263

Kartha KK (1985) Meristem culture and germplasm preservation. In KK Kartha, ed, Cryopreservation of plant cells and organs, CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 115-134

Koster KL (1991) Glass formation and desiccation tolerance in seeds. Plant Physiol **96**: 302-304

Kramer PJ, Boyer JS (1995) Water relations of plants and soils. Academic Press, San Diego, CA, pp 495

Luyet BJ (1937) The vitrification of organic colloids and of protoplasts. Biodynamica **1**:1

Marin ML, Mafla G, Roca WM, Withers LA (1990) Cryopreservation of cassava zygotic embryos and whole seeds in liquid nitrogen. Cryo-Letters **11**: 257-264

Marin ML, Duran-Vila N (1988) Survival of somatic embryos and recovery of plants of sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osb.) after immersion in liquid nitrogen. Plant Cell Tissue and Organ Culture **14**: 51-57

Mazur ML 1963 Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. J Gen Physiol **47**: 347-369

Mazur P (1969) Freezing injury in plants. Ann Rev Plant Physiol **20**: 419

Niwata E (1995) Cryopreservation of meristems of garlic (*Allium sativum* L.) and high subsequent regeneration. Cryo-Letters **16**: 102-107

Oliver MJ (1996) Desiccation tolerance in vegetative plant cells. Physiol Plant **97**: 779-787

Panis B, Withers LA, De Langhe E (1990) Cryopreservation of *Musa* suspension cultures and subsequent regeneration of plants. Cryo-Letters **11**: 337-350

Paulet F, Engelmann F, Glazmann J-C (1993) Cryopreservation of apices of *in vitro* plantlets of sugarcane (*Saccharum* sp.) hybrids using encapsulation-dehydration. Plant Cell Reports **12**: 525-529

Plessis P, Leddet C, Collas A, Dereudde J (1993) Cryopreservation of *Vitis vinifera* L. cv Chardonnay shoot-tips by encapsulation dehydration: effects of pretreatment, cooling and postculture conditions. Cryo-Letters **14**:309-320

Roberts EH (1973) Predicting the storage life of seeds. Seed Sci Tech **1**: 499-514

Runthala P, Jana MK, Mohanan K (1993) Cryopreservation of groundnut (*Arachis hypogea* L.) embryonic axes for germplasm conservation. Cryo-Letters **14**: 335-338

Sakai A (1995) Cryopreservation of germplasm of woody plants. In YPS Bajaj, ed, Biotechnology in agriculture and forestry, vol 32, Cryopreservation of plant germplasm I, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp 53-69

Sakai A, Yoshida S (1968) The role of sugar and related compounds in variations of freezing resistance. Cryobiology **5**: 160-174

Schneibel-Preikstas B, Earle ED, Steponkus PL (1992) Cryopreservation of sweet potato shoot tips by vitrification. Cryobiology **29**: 738-739

Steponkus PL, Webb MS (1992) Freeze-induced dehydration and membrane destabilization in plants. In GN Somero, CB Osmond, CL Bolis, eds, Water and Life: Comparative Analysis of Water Relationships at the Organismic, Cellular and Molecular Level. Springer-Verlag, Berlin, pp 338-362

Stushnoff C, Seufferheld M (1995) Cryopreservation of Apple (*Malus* species) Genetic Resources. In YPS Bajaj, ed, Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol. 32, Cryopreservation of Plant Germplasm I. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp 87-101

Vertucci CW, Farrant JM (1995) Acquisition and loss of desiccation tolerance. In J Kigel, G Galili, eds, Seed development and germination, Marcel Dekker Inc., New York, pp. 237-271

Yongjie W, Engelmann F, Fratarella A, Damiano C, Withers LA (1997) Cryopreservation of strawberry cell suspension cultures. Cryo-Letters **18**: 317-324

