

# CRIOCONSERVACIÓN DE ÁPICES DE CRISANTEMO (*Dendranthema grandiflorum* Kitam) POR ENCAPSULACIÓN-DESHIDRATACIÓN Y POR VITRIFICACIÓN

Antelmo Osorio Saenz<sup>1</sup>; José Oscar Mascorro Gallardo<sup>1</sup>; José Luis Rodríguez de la O<sup>1</sup>;  
Carlomagno Melchor López<sup>1</sup>; María Teresa González Arnao<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo, km 38.5 carretera México-Texcoco, Chapingo, Estado de México. C. P. 56230. MÉXICO.  
Correo-e: joscar@correo.chapingo.mx (<sup>1</sup>Autor para correspondencia).

<sup>2</sup>Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Veracruzana. Prol. Oriente 6, No. 1009. Orizaba, Veracruz, C.P. 94340. MÉXICO

## RESUMEN

El desarrollo de métodos biotecnológicos de crioconservación permite el almacenamiento de forma segura y a largo plazo del germoplasma de especies valiosas como el crisantemo, que es uno de los cultivos de mayor interés ornamental en México y en el mundo. En este trabajo se presentan los estudios realizados con crisantemo cv. Indianápolis White aplicando los métodos criogénicos de encapsulación-deshidratación y vitrificación para ápices aislados de plantas cultivadas *in vitro*. Los resultados obtenidos mostraron un comportamiento similar en la recuperación de los tejidos con ambos procedimientos. Los niveles máximos de sobrevivencia después de la crioconservación alcanzaron el 60 % con la encapsulación-deshidratación y el 74 % con la vitrificación. Sin embargo, las tasas de regeneración de nuevas plantas fueron bajas, del 12 y 10 %, respectivamente, transitando por una fase primaria de formación de callo. La optimización de las condiciones crioprotectoras permitirá mejorar la recuperación y hacer más efectivas ambas estrategias para la conservación de germoplasma de crisantemo.

**PALABRAS CLAVE ADICIONALES:** Biotecnología, cultivo de tejidos, germoplasma, Indianápolis White, nitrógeno líquido.

## CRYOPRESERVATION OF CHRYSANTHEMUM SHOOT-TIPS

### (*Dendranthema grandiflorum* Kitam) BY ENCAPSULATION-DEHYDRATION AND VITRIFICATION

## ABSTRACT

The development of biotechnological methods of cryopreservation allows safe, long-term germplasm storage of valuable species such as chrysanthemum, which is one of the most important ornamental plants in Mexico and around the world. This study used the cryogenic methods of encapsulation-dehydration and vitrification to conserve chrysanthemum cv. Indianapolis White plants grown *in vitro*. Results showed similar behavior with both procedures during tissue recovery. The highest survival rates after cryopreservation were 60 % for encapsulation-dehydration and 74 % with vitrification. However, regeneration in both cases passed through a primary phase of callus formation and rates of obtention of new plants were low, 12 and 10 %, respectively. Therefore, further research is needed to improve cryoprotective conditions in order to increase rate of recovery of chrysanthemum plants.

**ADDITIONAL KEY WORDS:** Biotechnology, tissue culture, germplasm, Indianapolis White, liquid nitrogen.

## INTRODUCCIÓN

El crisantemo (*Dendranthema grandiflorum* Kitam) es una de las especies ornamentales más importantes en la industria de las flores a escala mundial. Las semillas de crisantemo son altamente heterocigóticas, y por esta razón la planta se propaga vegetativamente (Teixeira da Silva, 2004). El principal uso del crisantemo es como una flor de corte, aunque también es utilizado para decorar interiores, ya sea en maceta o en jardines. Recientemente, se han descubierto otros usos, como tener propiedades culinarias, medicinales y además, como un interesante etnofármaco (Teixeira da Silva, 2003). La demanda de esta planta ornamental es gracias a la gran diversidad de formas y colores que presenta. El mejoramiento genético de este cultivo ha llevado a la generación de muchas variedades, mismas que resulta difícil mantener en campo, por lo que se ha recurrido a la conservación *in vitro* para concentrar el mayor número de accesiones posibles a largo plazo en poco espacio y a bajo costo.

Existen dos estrategias para el almacenamiento de germoplasma vegetal *in vitro*: los métodos de crecimiento lento o reducido para la preservación por meses, y la criopreservación, que consiste en el almacenamiento en nitrógeno líquido (NL) a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Fukai, 2003), lo cual garantiza el almacenamiento por años. Diversas técnicas criogénicas, tales como el método clásico de congelación programada, la encapsulación-deshidratación, la vitrificación y la gota-vitrificación se han aplicado a ápices de diferentes especies de crisantemo (Fukai, 1990; Fukai *et al.* 1991; Hitmi *et al.* 1997; Hitmi *et al.* 2000; Halmagyi *et al.* 2004; Martín y González-Benito, 2005), sin embargo, el cultivar Indianápolis White no ha sido sometido antes a la criopreservación bajo ningún tipo de protocolo.

El objetivo de este trabajo fue comparar la aplicación de las técnicas criogénicas de encapsulación-deshidratación y vitrificación, para almacenar en nitrógeno líquido ápices de crisantemo aislados de plantas *in vitro* del cultivar Indianápolis White.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se creó un lote de plantas madre de crisantemo (*Dendranthema grandiflorum* Kitam cv. Indianápolis White *in vitro* a partir de esquejes [6 a 8 cm de longitud] de plantas crecidas en invernadero y que se multiplicaron *in vitro* en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) semisólido suplementado con AIA  $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , BA  $3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  y sacarosa  $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , solidificado con agar  $7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , a un pH de 5.7, para los procesos de Encapsulación-Deshidratación y Vitrificación. El medio MS contenido en frasco Gerber® se esterilizó en autoclave a  $120\text{ }^{\circ}\text{C}$  a una presión de  $1.5\text{ kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Los cultivos fueron incubados a  $25\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  bajo un fotoperiodo de 16/8 h (día/noche) con una intensidad lumínica de  $68\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , provista por lámparas fluorescentes de luz blanca.

## INTRODUCTION

Chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* Kitam) is one of the most important ornamental species for the global flower industry. Because chrysanthemum seeds originate highly heterogenous plants, this crop is propagated vegetatively (Teixeira da Silva, 2004). The chrysanthemum is mainly used as a cut flower, but also as an indoor potted plant or in gardens. Recently, other uses have been found, including for culinary, medicinal and (ethno) pharmacological purposes (Teixeira da Silva, 2003). Demand for this ornamental plant is due to the wide variety of shapes and colors it comes in. Breeding of this crop has led to the generation of many varieties, which makes it difficult to maintain in the field; therefore, *in vitro* conservation has been used to concentrate the largest number of accessions possible for long-term storage in a small space and at low cost.

There are two strategies for *in vitro* storage of plant germplasm: slow or reduced growth methods to preserve for months, and cryopreservation, which involves storage in liquid nitrogen (LN) at  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Fukai, 2003), which ensures storage for years. Several cryogenic techniques, such as the classic method of programmed freezing, encapsulation-dehydration, vitrification and drop-vitrification, have been applied to shoot tips of different species of chrysanthemum (Fukai, 1990; Fukai *et al.* 1991; Hitmi *et al.*, 1997; Hitmi *et al.*, 2000; Halmagyi *et al.*, 2004; Martín and González-Benito, 2005); however, the cultivar Indianapolis White has not been subjected to cryopreservation under any type of protocol.

The aim of this study was to compare the application of the cryogenic techniques of encapsulation-dehydration and vitrification in liquid nitrogen storage of chrysanthemum shoot tips from *in vitro* plants of the cultivar Indianapolis White.

## MATERIALS AND METHODS

A vegetative population of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* Kitam) cv. Indianapolis White plants was obtained from cuttings [6 to 8 cm in length] of plants grown in a greenhouse, and multiplied *in vitro* conditions using semisolid MS (Murashige and Skoog, 1962) tissue culture medium supplemented with  $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  IAA,  $3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA and  $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  sucrose, solidified with  $7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  agar, at pH 5.7, for both Encapsulation-Dehydration and Vitrification processes. The MS medium contained in small glass bottles was sterilized by autoclaving at  $120\text{ }^{\circ}\text{C}$  at a pressure of  $1.5\text{ kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ . The cultures were incubated at  $25\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  under a photoperiod of 16/8 h (day/night) with a light intensity of  $68\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , supplied by white florescent lamps.

### Cryopreservation

*In vitro* chrysanthemum plantlets of four weeks of age were used. From them, shoot tips (0.5 to 1 cm in length)

## Crioconservación

Se usaron plántulas de crisantemo *in vitro* de cuatro semanas de edad, a partir de las cuales se extrajeron, con ayuda del microscopio estereoscópico, los ápices (0.5 a 1 cm de longitud) consistentes del domo meristemático y dos a tres primordios foliares. Los tejidos aislados se transfirieron a frascos con medio MS semisólido para su cultivo y se mantuvieron incubados bajo las mismas condiciones descritas para las plantas madre.

## Encapsulación-Deshidratación (E-D)

La técnica de E-D se llevó a cabo según el procedimiento de González-Arno *et al.* (1993), probando diferentes tratamientos en las etapas preparativas a, c y d, antes de la inmersión en nitrógeno líquido: a) precultivo de los ápices en medio MS semisólido con sacarosa a 0.1 M o 0.3 M por 24 o 48 horas; b) encapsulación de los ápices precultivados en 3 % de alginato de sodio (SIGMA-ALDRICH®), polimerizado con cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) a 0.1 M, para formar cápsulas de alginato de calcio de aproximadamente 5 mm de diámetro; c) pretratamiento de los ápices encapsulados en medio MS líquido suplementado con sacarosa a 0.5 M o 0.75 M por 24 o 48 h, o pretratamiento progresivo aumentando la concentración de 0.5 a 0.75 M por 24 h en cada condición. Todos los pre-tratamientos en medio líquido se realizaron colocando las muestras a 25 °C en un agitador orbital a 90 rpm; d) deshidratación de las cápsulas en contenedores de vidrio sellados herméticamente con 250 g de gel de sílice y colocando 10 cápsulas con tejido por contenedor a 25 °C por 2.5, 4 o 7 h equivalentes a contenidos de humedad en la cápsula de 30, 26 y 22 %, respectivamente; e) transferencia de las muestras deshidratadas a crioviales para su congelamiento en LN; f) almacenamiento por una hora en LN y extracción de las muestras de los crioviales para su descongelamiento mediante la exposición a la temperatura ambiente en la campana de flujo laminar (1 a 3 min); g) cultivo de los ápices encapsulados y descongelados en el medio MS durante una semana en la oscuridad y posteriormente transferidos a las condiciones de iluminación descritas para las plantas madre por al menos otros 30 días.

## Vitrificación (V)

El método de vitrificación utilizado y los tratamientos probados en la etapa c (Cuadro 4) se describen a continuación: a) precultivo de ápices en medio MS semisólido con sacarosa a 0.3 M por 48 h, incubados bajo las mismas condiciones descritas anteriormente para la planta madre; b) tratamiento de carga de los ápices mediante su exposición a la solución compuesta por glicerol a 2 M + sacarosa a 0.4 M por 20 min a 25 °C; c) deshidratación osmótica de los ápices con las soluciones de vitrificación PVS2 (glicerol 30 % + etilen glicol 15 % + dimetil sulfóxido 15 % + sacarosa 0.4 M) (Sakai *et al.*, 1990) o PVS3 (glicerol 50 % + sacarosa 50 %) (Nishizawa *et al.*, 1993), en 0.7

consisting of the meristematic dome and two to three leaf primordia were extracted with the aid of a stereoscopic microscope. The isolated tissues were transferred to flasks containing semisolid MS medium for cultivation and kept incubated under the same conditions described for the mother plants.

## Encapsulation-Dehydration (E-D)

The E-D technique was carried out using the procedure described by González-Arno *et al.* (1993), testing different treatments in the preparatory stages a, c and d, before immersion in liquid nitrogen: a) preculture of shoot tips on semisolid MS medium with sucrose at 0.1 M or 0.3 M for 24 or 48 hours; b) encapsulation of the precultured shoot tips in 3 % sodium alginate (SIGMA-ALDRICH®), polymerized with calcium chloride ( $\text{CaCl}_2$ ) at 0.1 M, to form calcium alginate capsules approximately 5 mm in diameter; c) pretreatment of the encapsulated shoot tips in liquid MS supplemented with 0.5 or 0.75 M sucrose for 24 or 48 h, or progressive pretreatment by increasing the concentration from 0.5 to 0.75 M for 24 h in each condition, with all the pretreatments in liquid medium being performed by placing the samples at 25 °C on an orbital shaker at 90 rpm; d) dehydration of the capsules in hermetically-sealed glass containers with 250 g of silica gel and placing 10 tissue-containing capsules per container at 25 °C for 2.5, 4 or 7 h, equivalent to capsule moisture content of 30, 26 and 22 % respectively; f) storage for an hour in LN and extraction of cryovial samples for thawing by exposure to room temperature in the laminar flow hood (1 to 3 min); g) cultivation of the encapsulated and thawed shoot tips on the MS medium for one week in the dark and then transferred to the lighting conditions described for the mother plants for another 30 days.

## Vitrification (V)

The vitrification method used and the treatments tested in stage c (Table 4) are described below: a) preculture of shoot tips in semisolid MS solution with 0.3 M sucrose for 48 h, incubated under the same conditions described above for the mother plant; b) loading treatment of the shoot tips by exposure to the solution composed of 2 M glycerol + 0.4 M sucrose for 20 min at 25 °C; c) osmotic dehydration of the shoot tips with the vitrification solutions PVS2 (30 % glycerol + 15 % glycol ethylene + 15 % dimethyl sulphoxide + 0.4 M sucrose) (Sakai *et al.*, 1990) or PVS3 (50 % glycerol + 50 % sucrose) (Nishizawa *et al.*, 1993), with 0.7 mL of each solution contained in cryovials and the treatment performed at 4 or 25 °C for 0, 30 or 60 min of exposure; d) immersion of the shoot tips into LN in cryovials with fresh solution of the respective PVS used for osmotic dehydration and storage for one hour in LN; e) extraction of the cryovial samples for thawing in a 40 °C water bath, removing the PVS solutions with two washes for 15 min in liquid MS medium with 1.2 M sucrose (pH 5.7) at 25 °C; and f) cultivation of the thawed shoot tips on MS solution for

ml de cada una contenida en crioviales y realizando el tratamiento a 4 ó 25 °C por 0, 30 o 60 min de exposición; d) inmersión de los ápices al NL en los crioviales con solución fresca de las respectivas PVS utilizadas para la deshidratación osmótica y almacenamiento por una hora en NL; e) extracción de las muestras de los crioviales para su descongelamiento en un baño de agua a 40 °C, removiendo las soluciones PVS con dos lavados por 15 min en medio MS líquido con sacarosa 1.2 M (pH 5.7) a 25 °C, y f) cultivo de los ápices descongelados en medio MS para su recuperación, en oscuridad por una semana y transferidos posteriormente a las condiciones de iluminación en las que se mantuvieron las plantas madre por al menos otros 30 días.

### Evaluación de la viabilidad

La sobrevivencia y regeneración de nuevos brotes a partir de los ápices sometidos a ambos procedimientos criogénicos (E-D y V) se evaluaron a los 15 y 45 días respectivamente después de iniciado el recultivo de los ápices. Todos los resultados se expresaron en porcentajes y para el caso del protocolo de E-D se evaluaron ambos parámetros después de cada una de las etapas del proceso. Cuando se aplicó el método de V, la sobrevivencia y regeneración de los ápices se registraron solamente después de realizada la inmersión en NL de las muestras previamente sometidas a las condiciones de temperatura y tratamientos crioprotectores descritos para las dos soluciones PVS.

### Análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con 12 repeticiones por tratamiento probado en la técnica de E-D e igual en la de V. La unidad experimental consistió de una caja petri con 10 ápices. Los datos se analizaron mediante pruebas de comparación de dos proporciones binomiales por pares de tratamientos (Infante y Zárate, 1984) con  $P \leq 0.05$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Encapsulación-Deshidratación

La totalidad de los ápices precultivados en medio semisólido suplementado con 0.1 M de sacarosa, sobrevivió a los dos tiempos de tratamiento estudiados (Cuadro 1). Esto demuestra que a tan baja concentración no se produce un efecto de acumulación intracelular de este azúcar que afecte la viabilidad de los tejidos. En cambio, a la concentración de 0.3 M, la sobrevivencia se redujo a medida que aumentó la duración del precultivo, pero al no encontrarse diferencias estadísticas ( $P \leq 0.05$ ) entre 24 y 48 h, se determinó en lo sucesivo aplicar el precultivo en 0.3 M de sacarosa por 48 h, para garantizar una mayor asimilación de este azúcar en todos los tejidos, ya que esto puede ser favorable para soportar mejor las siguientes etapas de la crioconservación

recovery in the dark for a week and then transferred to the lighting conditions in which the mother plants were kept for at least another 30 days.

### Viability assessment

The survival and regeneration of new shoots from shoot tips subjected to both cryogenic procedures (E-D and V) were evaluated at 15 and 45 days respectively after beginning the recultivation of the shoot tips. All results are expressed as percentages and in the case of the E-D protocol, both parameters were evaluated after each step of the process. When the V method was applied, the survival and regeneration of the shoot tips were recorded only after the LN immersion of the samples previously subjected to the temperature conditions and cryoprotectant treatments described for the two plant vitrification solutions.

### Statistical analysis

We used a completely randomized experimental design with 12 replications per treatment tested in the E-D and V techniques. The experimental unit consisted of a petri dish with 10 shoot tips. Data were analyzed using comparison tests of two binomial proportions per treatment pairs (Infante and Zárate, 1984) with  $P \leq 0.05$ .

## RESULTS AND DISCUSSION

### Encapsulation-Dehydration

All the shoot tips precultured in semisolid medium supplemented with 0.1 M sucrose survived both treatment times studied (Table 1). This shows that such a low sucrose concentration does not produce an intracellular accumulation of this sugar that affects tissue viability. By contrast, at the 0.3 M concentration, survival decreased as the preculture time increased, but as there were no statistical differences ( $P \leq 0.05$ ) between 24 and 48 h, it was determined to thereafter apply the preculture in 0.3 M sucrose for 48 h to ensure greater uptake of this sugar in all tissues, as this may be conducive to better withstanding the subsequent stages of cryopreservation (González Arnao and Engelmann, 2006).

The survival of shoot tips pretreated in semisolid medium with 0.3 M sucrose for 48 h, encapsulated and subjected to the next pretreatment in liquid medium also decreased in proportion to the increase in sucrose concentration and treatment duration (Table 2).

However, the progressive pretreatment at increasing sucrose concentrations (0.5 M + 0.75 M for 24 h c/u) produced results at an intermediate level with no significant differences between the longer treatment at the lower concentration (0.5 M for 48 h) and the shorter one (24 h) at 0.75 M. This response indicates that if sucrose concentrations are increased gradually, it can induce a greater penetration of sucrose into the cells, causing less stress. Although this treatment decreases survival rates, one must also con-



**CUADRO 1. Efecto de la concentración de sacarosa y la duración del tratamiento de precultivo en medio semisólido en la sobrevivencia de los ápices extraídos de vitroplantas de crisantemo cv. Indianápolis White en el método E-D.**

**TABLE 1. Effect of sucrose concentration and preculture treatment duration in semisolid medium on survival of shoot tips extracted from *in vitro* chrysanthemum cv. Indianapolis White plants in the E-D method.**

Sacarosa (M)	Duración (h)	Sobrevivencia <sup>z</sup> (%)
0.1	24	100±0.0 <sup>a</sup>
	48	100±0.0 <sup>a</sup>
0.3	24	95±4.1 <sup>b</sup>
	48	80±3.5 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>Valores con la misma letra en la misma columna indica proporciones iguales de acuerdo con las pruebas de hipótesis sobre parámetros  $p$  de la distribución binomial a una  $P \leq 0.05$ .

<sup>a</sup>Values with the same letter in the same column indicate equal proportions according to the tests of hypothesis on parameters  $p$  of the binomial distribution at  $P \leq 0.05$ .

**CUADRO 2. Efecto de la concentración de sacarosa y del tipo de pretratamiento en medio líquido en la sobrevivencia de ápices de crisantemo var. Indianápolis en el método E-D.**

**TABLE 2. Effect of sucrose concentration and the type of pre-treatment in liquid medium on survival of shoot tips of chrysanthemum var. Indianapolis White in the E-D method.**

Sacarosa (M) / Duración (h)	Sobrevivencia (%) <sup>z</sup>
0.5 / 24	100±0.0 <sup>a</sup>
0.5 / 48	80±6.1 <sup>b</sup>
0.75 / 24	60±3.5 <sup>c</sup>
0.75 / 48	40±3.5 <sup>d</sup>
0.5 + 0.75 / 24 c/u	70±5.8 <sup>bc</sup>

<sup>a</sup>Valores con la misma letra en la misma columna indica proporciones iguales de acuerdo con las pruebas de hipótesis sobre parámetros  $p$  de la distribución binomial a una  $P \leq 0.05$ .

<sup>a</sup>Values with the same letter in the same column indicate equal proportions according to the tests of hypothesis on parameters  $p$  of the binomial distribution at  $P \leq 0.05$ .

(González Arnao y Engelmann, 2006)

La sobrevivencia de los ápices pretratados en medio semisólido con 0.3 M de sacarosa por 48 h, encapsulados y sometidos al siguiente pretratamiento en medio líquido, disminuyó igualmente en proporción con el incremento de la concentración de sacarosa y de la duración del tratamiento (Cuadro 2).

Sin embargo, el pretratamiento progresivo a concentraciones crecientes de sacarosa (0.5 M + 0.75 M por 24 h c/u) produjo resultados a un nivel intermedio y sin diferencias significativas entre el tratamiento más prolongado a la menor concentración (0.5 M por 48 h) y el más corto (24 h) en 0.75 M. Esta respuesta indica que si las concentraciones de sacarosa se van incrementando paulatinamente, se puede inducir una mayor penetración de sacarosa a las células provocando un menor estrés. A pesar de que con este pretratamiento ocurre una disminución

consider that greater sugar accumulation can help generate greater tolerance to more severe dehydration conditions (González-Arnao and Engelmann, 2006). Therefore, this pretreatment condition was deemed the most appropriate, considering that it may confer greater protection to the tissues by drying the capsules, especially during immersion in LN.

With the desiccation process performed in the presence of silica gel, the viability of the chrysanthemum shoot tips was further reduced compared to pretreatment on liquid medium and, in turn, to the extent that the moisture content of the calcium alginate matrix was lower. However, survival was the same before and after immersion in LN when the moisture content in the capsule was 26 %, as it was the only variant that allowed shoot regeneration from tissue after cryopreservation in LN (Table 3).

When the capsules were dehydrated to 22 % moisture, apparently an over dehydrating of tissues occurred, as there was a dramatic drop in survival both before and after freezing in LN, completely blocking the regeneration of shoot tips.

The regeneration of chrysanthemum shoot tips cryopreserved by E-D went through a primary and transient callus phase (Figures 1 and 2), apparently originating in the region associated with the meristematic zone and basal leaf primordial, as has been reported in the regeneration of yam apices (Mandal, 2000). González-Arnao and Engelmann (2006), by applying the E-D method on sugarcane apices, managed to preserve the structural and functional integrity of the apical meristem and were thus able to regenerate whole plants without passing through the callus phase.

Observations on apice recovery clearly show a phase of cell disruption or apical callus formation before the formation of new shoots, demonstrating that cell recovery must first take place before growth and differentiation can restart.

Figure 2 shows the E-D protocol that yielded 60 % survival and 12 % regeneration of whole plants from the cryopreserved shoot tips of chrysanthemum cv. Indianapolis White, which can be a good starting point for testing other treatments in the critical stages of the procedure (preculture, pretreatment and capsule drying) to help raise recovery efficiency after cryopreservation (Martín and González Benito, 2005; González-Arnao and Engelmann, 2006).

### Vitrification

With the V technique, which involved comparing the effect of two plant vitrification solutions at two exposure temperatures, the results shown in Table 4 were obtained.

Shoot-tip survival decreased as exposure time to the vitrification solutions increased, regardless of the applica-

en las tasas de sobrevivencia, es importante considerar que una mayor asimilación de azúcar puede contribuir a generar una mayor tolerancia a condiciones más severas de deshidratación (González-Arno y Engelmann, 2006). Por lo tanto, esta condición de pretratamiento se definió como la más adecuada, considerando que puede conferir mayor protección a los tejidos al secar las cápsulas y sobre todo durante la inmersión en NL.

Con el proceso de desecación realizado en presencia de gel de sílice, la viabilidad de los ápices de crisantemo se redujo aún más en comparación con el pre-tratamiento en medio líquido y, a su vez, en la medida en que el contenido de humedad de la matriz de alginato de calcio fue menor. Sin embargo, la sobrevivencia fue la misma antes y después de la inmersión en NL cuando la humedad en la cápsula fue del 26 %, siendo la única variante que permitió la regeneración de brotes a partir de los tejidos después de la crioconservación en NL (Cuadro 3).

Cuando las cápsulas fueron deshidratadas hasta un 22 % de humedad, aparentemente ocurrió una sobredeshidratación de los tejidos, ya que se observa una pérdida drástica de la sobrevivencia tanto antes como después de congelar en NL, anulándose totalmente la regeneración de los ápices.

La regeneración de los ápices de crisantemo crioconservados por E-D, pasó por una fase primaria y transitoria de callo (Figuras 1 y 2), originada aparentemente en la región asociada a la zona meristemática y basal de los primordios de hoja, tal y como se reporta en la regeneración de ápices de yuca (Mandal, 2000). González-Arno y Engelmann (2006); aplicando el método de E-D en ápices de caña de azúcar lograron conservar la integridad estructural y funcional del meristemo apical, pudiendo regenerar plantas completas sin pasar por la fase de callo.

Las observaciones en la recuperación de los ápices, muestran claramente una fase de desorganización celular o formación de callo de los ápices antes de la formación de nuevos brotes, evidenciando que primero es necesaria

tion temperature. The immediate transfer to LN, when tissues were immersed in the PVS3 vitrification solution at 25 °C, ensured the best results and was the only variant that allowed the regeneration of the material after freezing in LN.

This may be because at 25 °C the PVS2 mixture, which contains very penetrating components such as dimethyl sulfoxide, is more cytotoxic since it penetrates cells and tissues faster than PVS3. In general, the treatments with vitrification solutions at the two temperatures tested caused a decrease in survival that was lower or equal to 50 % when applied for longer than 30 min; moreover, there was no regeneration of new shoots after freezing in either case.

For the cryopreservation of rose shoot tips (Halmagyi and Pinker, 2006) and chrysanthemum cv. Escort shoot tips (Halmagyi *et al.*, 2004), extending the duration of dehydration with PVS2 to 25 min and applying a two-stage protocol (50 % of the vitrification solution concentration for 10 min + 100 % of the concentration for 15 min) improved the survival and regeneration of cryopreserved tissues. This evidence confirms that cryoprotection with PVS2 can be very efficient if tolerance is induced in susceptible tissues through progressive exposure to increasing concentrations of PVS2 vitrification solution, which enables the tissues to better tolerate the osmotic stress imposed by the 100 % solution.

In general, the plant vitrification solutions were not excessively toxic to the chrysanthemum cv. Indianapolis White shoot tips when the treatments did not exceed 30 min of exposure. However, the failure to obtain good regeneration from cryopreserved materials shows that the cryoprotection conditions must be improved, as well as those pertaining to the recovery phase. The values obtained for Indianapolis White are still low when compared with those reported in the literature for other cryopreserved chrysanthemum cultivars.

As in the case when the E-D technique was applied, the production of new shoots, recorded only in the treatment

**CUADRO 3. Efecto del porcentaje de humedad de la cápsula en la sobrevivencia y regeneración antes (- NL) y después del congelamiento en nitrógeno líquido (+ NL) de ápices de crisantemo cv. Indianápolis White, en el método E-D.**

**TABLE 3. Effect of capsule moisture content on survival and regeneration before (- LN) and after freezing in liquid nitrogen (+ LN) of shoot tips of chrysanthemum cv. Indianapolis White, in the E-D method.**

	30 %		26 %		22 %	
	Sv (%)	Reg (%) <sup>z</sup>	Sv (%)	Reg (%) <sup>z</sup>	Sv (%)	Reg (%) <sup>z</sup>
-NL	80±3.4	80 <sup>a</sup>	60±4.3	60 <sup>a</sup>	30±3.0	30 <sup>a</sup>
+NL	40±2.8	0 <sup>b</sup>	60±4.5	12 <sup>b</sup>	10±3.3	0 <sup>b</sup>

<sup>z</sup>Valores con la misma letra en la misma columna indica proporciones iguales de acuerdo con las pruebas de hipótesis sobre parámetros *p* de la distribución binomial a una *P*≤0.05. (Sv, Sobrevivencia; Reg, Regeneración).

<sup>z</sup>Values with the same letter in the same column indicate equal proportions according to the tests of hypothesis on parameters *p* of the binomial distribution at *P*≤0.05. (Sv, Survival; Reg, Regeneration).

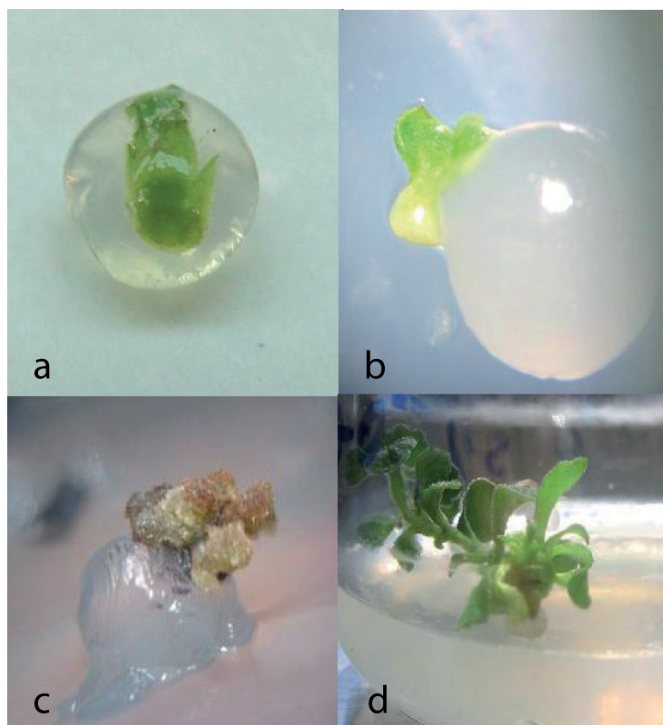


FIGURA 1. Regeneración directa de ápices de crisantemo Indianapolis White en la etapa de encapsulación antes de congelar (a y b) y mediante una fase transitoria de formación de callo después de crioconservar las muestras (c y d).

FIGURE 1. Direct regeneration of chrysanthemum Indianapolis White shoot tips in the encapsulation stage before freezing (a and b) and through a transitory stage of callus formation after cryopreserving the samples (c and d).

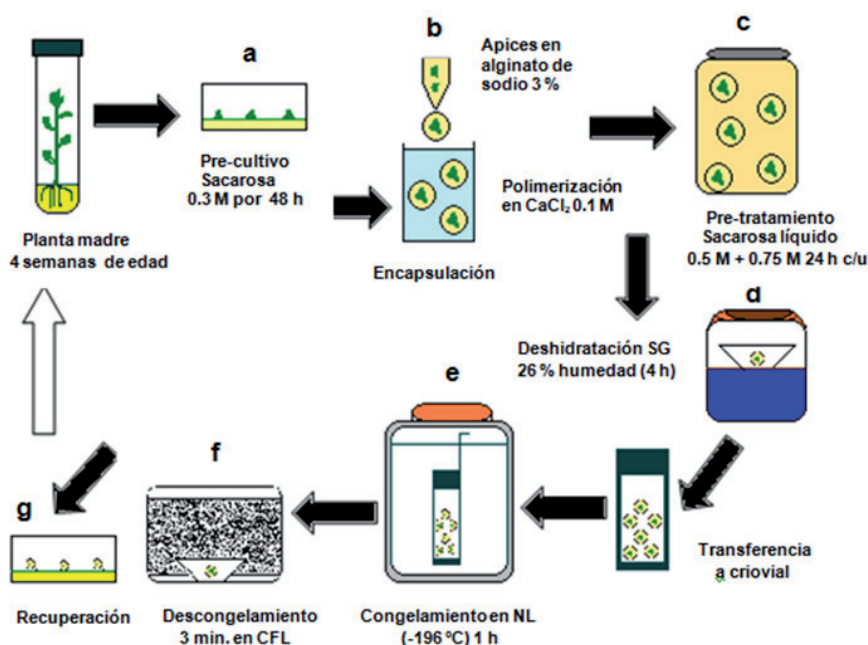


FIGURA 2. Esquema del protocolo de crioconservación por Encapsulación-Deshidratación para ápices de crisantemo: a) pre-cultivo, b) encapsulación, c) pre-tratamiento, d) deshidratación, e) congelamiento, f) descongelamiento y g) recuperación. SG, Silica Gel; NL, Nitrógeno Líquido; CFL, Campana de Flujo Laminar.

FIGURE 2. Schema of cryopreservation protocol by Encapsulation-Dehydration for chrysanthemum shoot tips: a) preculture, b) encapsulation, c) pretreatment, d) dehydration, e) freezing, f) thawing and g) recovery. SG, Silica Gel; NL, Spanish acronym for Liquid Nitrogen; CFL, Spanish acronym for Laminar Flow Hood.

la recuperación de las células antes de que el crecimiento y la diferenciación puedan reiniciar.

En la Figura 2 se presenta el protocolo de E-D que permitió obtener una sobrevivencia del 60 % y una regeneración a plantas completas del 12 % de los ápices criopreservados de crisantemo Indianapolis White, lo que puede ser un buen punto de partida para probar otros tratamientos en las etapas críticas del procedimiento (precultivo, pretratamiento y desecación de las cápsulas) que permitan elevar la eficiencia de recuperación después de la criopreservación (Martín y González Benito, 2005; González-Arno y Engelmann, 2006).

### Vitrificación

Con la técnica de V, comparando el efecto de dos soluciones PVS, a dos temperaturas de exposición, se obtuvieron los resultados que se muestran en el Cuadro 4.

La sobrevivencia de los ápices disminuyó en la medida en que aumentó el tiempo de exposición a las soluciones vitrificadoras, independientemente de la temperatura de aplicación. La transferencia inmediata al NL, cuando los tejidos fueron inmersos en la solución vitrificadora PVS3 a 25 °C, garantizó los mejores resultados y fue la única variante que permitió la regeneración del material después del congelamiento en NL.

Esto puede deberse a que a 25 °C, la mezcla PVS2, que contiene componentes muy penetrantes como es el caso del dimetil sulfóxido, resulte más citotóxica debido a que logra penetrar más rápidamente que la PVS3 a las

with PVS3 at 25 °C and immediate immersion in LN, initially went through a primary phase of callus formation. Viable cells retained a greenish color, which subsequently regenerated to whole plants (Figure 3), while non-viable cells showed a high degree of dead cells (black to white).

The apparent bleaching of the cells is a symptom of cryo-injury, plasmolysis and oxidative stress (Korn, 1980; Grout and Henshaw, 1980), as it was distinguishable after a day of cultivation following the thawing process.

Figure 4 shows the vitrification protocol, indicating the stages of the process for regeneration of whole plants from chrysanthemum cv. Indianapolis White shoot tips, as determined in this work.

There are reports that show that survival and regeneration depend on the genotype used (Fukai *et al.*, 1991; Bagniol and Engelmann, 1992; Halmagyi *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005). Therefore, this is another factor that should be assessed, since the ideal is to develop a cryopreservation method that is applicable to the largest number of genotypes possible.

Upon comparing the E-D and vitrification cryogenic techniques, no differences were found in the efficiency of regenerating shoot tips after freezing in LN (12 and 10 %, respectively). This suggests that either strategy can be used for cryopreservation of chrysanthemum cv. Indianapolis White shoot tips. However, it should be noted that the E-D protocol is more time-consuming but facilitates the ma-

**CUADRO 4.** Efecto de la temperatura y el tiempo de adición de las PVS en la sobrevivencia y regeneración de ápices de crisantemo cv. Indianapolis White después del congelamiento en NL.

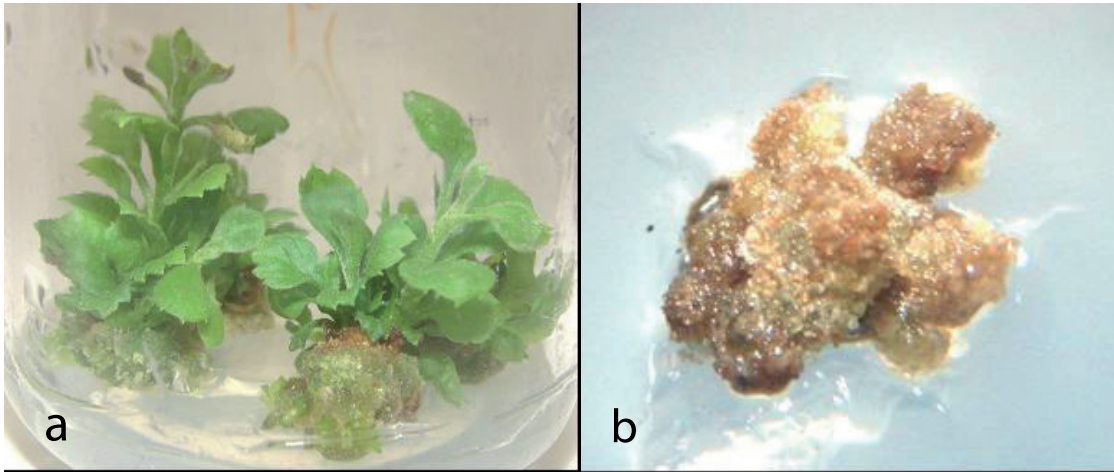
**TABLE 4.** Effect of temperature and PVS addition time on survival and regeneration of chrysanthemum cv. Indianapolis White shoot tips after freezing in LN.

Solución PVS	Temperatura	Duración (min.)	Sobrevivencia (%) <sup>z</sup>	Regeneración (%) <sup>z</sup>
PVS2	25±1 °C	0	68±4.2 <sup>ab</sup>	0±0.0 <sup>b</sup>
		30	42±3.4 <sup>cd</sup>	0±0.0 <sup>b</sup>
		60	26±2.5 <sup>e</sup>	0±0.0 <sup>b</sup>
	4 °C	0	55±3.54 <sup>b</sup>	0±0.0 <sup>b</sup>
		30	38±6.29 <sup>d</sup>	0±0.0 <sup>b</sup>
		60	21±4.18 <sup>e</sup>	0±0.0 <sup>b</sup>
PVS3	25±1 °C	0	74±2.6 <sup>a</sup>	10±1.4 <sup>a</sup>
		30	50±3.4 <sup>bc</sup>	0±0.0 <sup>b</sup>
		60	37±3.4 <sup>d</sup>	0±0.0 <sup>b</sup>
	4 °C	0	59±4.95 <sup>b</sup>	0±0.0 <sup>b</sup>
		30	48±3.67 <sup>c</sup>	0±0.0 <sup>b</sup>
		60	27±3.08 <sup>e</sup>	0±0.0 <sup>b</sup>

<sup>z</sup>Valores con la misma letra en la misma columna indican proporciones iguales de acuerdo con las pruebas de hipótesis sobre parámetros *p* de la distribución binomial a una *P*≤0.05. (T, Temperatura).

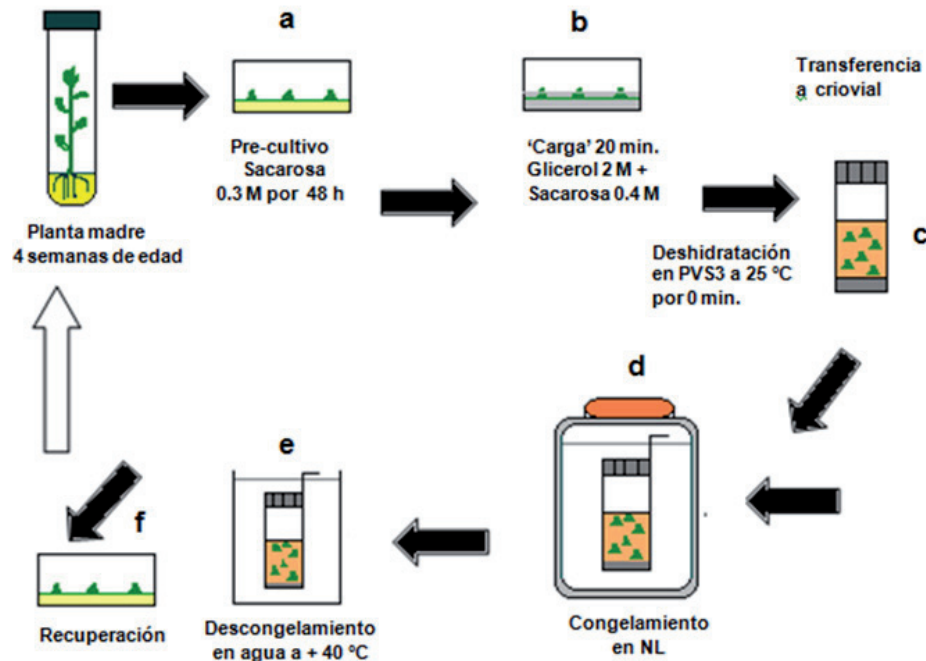
<sup>z</sup>Values with the same letter in the same column indicate equal proportions according to the tests of hypothesis on parameters *p* of the binomial distribution at *P*≤ 0.05.





**FIGURA 3.** Proceso de regeneración de ápices congelados en NL mediante la formación transitoria de callo (a) a los 15 días después del congelamiento y la subsecuente regeneración de planta completa, y (b) a los 45 días después de la formación de callo, con el método de vitrificación.

**FIGURE 3.** Regeneration process of shoot tips frozen in LN through the transitory formation of callus (a) at 15 days after freezing and the subsequent regeneration of the whole plant, and (b) at 45 days after callus formation, with the vitrification method.



**FIGURA 4.** Esquema del procedimiento establecido para la crioconservación de ápices de crisantemo empleando el protocolo de vitrificación: a) precultivo, b) tratamiento de carga, c) deshidratación, d) congelamiento, e) descongelamiento y f) recuperación. NL, Nitrógeno Líquido.

**FIGURE 4.** Schema of the procedure established for the cryopreservation of chrysanthemum shoot tips using the vitrification method: a) preculture, b) loading treatment, c) dehydration, d) freezing, e) thawing and f) recovery. NL, Spanish acronym for liquid nitrogen.

células y los tejidos. En general, los tratamientos con las soluciones vitrificadoras a las dos temperaturas evaluadas, provocaron una disminución de la sobrevivencia inferior o igual al 50 %, cuando se aplicaron más allá de los 30 min, sin que se obtuviera tampoco regeneración de nuevos brotes después de congelar en ninguno de los casos.

Para la crioconservación de ápices de rosa (Halmagyi y Pinker, 2006) y ápices de crisantemo cv. Escort (Halmagyi *et al.*, 2004), al extender la duración de la deshidratación con PVS2 a 25 min y aplicar un protocolo de 2 etapas (50 % de la concentración de la solución vitrificadora durante 10 min + 100 % de la concentración por 15 min), se mejoró la sobrevivencia y regeneración de los tejidos crioconservados. Esta evidencia corrobora que la crioprotección con la PVS2 puede ser muy eficiente, si se induce tolerancia en los tejidos susceptibles a través de la exposición progresiva a concentraciones crecientes de la solución vitrificadora PVS2, con lo cual se soporta mejor el estrés osmótico que impone el 100 % de la solución.

En general, las PVS no resultaron excesivamente tóxicas para los ápices de crisantemo cv. Indianápolis White cuando los tratamientos no sobrepasaron los 30 min de exposición. No obstante, el hecho de no obtenerse una buena regeneración a partir del material crioconservado, muestra que las condiciones de crioprotección deben ser mejoradas, así como las pertinentes a la fase de recuperación. Los valores obtenidos para Indianápolis White son aún bajos si se comparan con los reportados en la literatura para otros cultivares de crisantemo crioconservados.

Al igual que cuando se aplicó la técnica de E-D, la producción de nuevos brotes registrada sólo en el tratamiento con PVS3 a 25 °C e inmersión inmediata en NL, pasó inicialmente por una fase primaria de formación de callo. Las células viables retuvieron un color verdoso, que posteriormente regeneraron a plantas completas (Figura 3), mientras que las células no viables mostraron un alto grado de células muertas (oscuro a blanco). El blanqueamiento aparente de las células son síntomas de crio-daño, plasmólisis y estrés oxidativo (Korn, 1980; Grout y Henshaw, 1980), que ya era distinguible después de un día de cultivo a partir del descongelamiento de las mismas.

En la Figura 4 se presenta el protocolo de vitrificación indicando las fases del proceso para obtener regeneración a plantas completas a partir de ápices de crisantemo Indianápolis White, según se determinó en este trabajo.

Existen reportes en los cuales se ha demostrado que la sobrevivencia y regeneración dependen del genotipo tratado (Fukai *et al.*, 1991; Bagniol y Engelmann, 1992; Halmagyi *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005). Por lo tanto, este es otro factor que se debe valorar, ya que lo ideal es desarrollar un método de crioconservación que sea aplicable a la mayor cantidad de genotipos.

Al comparar las dos técnicas criogénicas de E-D y vitrificación, no se encontraron diferencias en la eficiencia

nipulation of a large amount of tissue at the same time; on the other hand, the vitrification method requires less time to perform the protocol but is more complicated when one has to handle many small tissues.

Based on the results of this study, we recommend exploring more conditions during preculture and pre-treatments that are conducive to better tissue protection during immersion in LN, in order to increase the regeneration rates of new plants after cryopreservation and prevent callus formation during the initial development stage.

## CONCLUSIONS

Shoot tips of chrysanthemum cv. Indianapolis White can be cryopreserved after fast cooling using encapsulation-dehydration or vitrification procedures. Encapsulation-dehydration technique, showed 60 % of plant survival, with 12 % regeneration of complete plants, while vitrification technique resulted in 74 % survival and 10 % plant regeneration. Therefore, further research is needed to explore other treatments before ultra-freezing for both protocols to increase regeneration efficiency, and prevent primary callus formation on the recovered materials. It is also necessary to test these procedures in other chrysanthemum cultivars.

## End of English Version

de regeneración de los ápices después del congelamiento en NL (12 y 10 %, respectivamente). Esto sugiere que se puede utilizar cualquier estrategia para la crioconservación de los ápices de crisantemo cv. Indianápolis White. No obstante, debe considerarse que el protocolo de E-D es más tardado, pero facilita la manipulación de gran cantidad de tejido al mismo tiempo; en cambio, la metodología de vitrificación si bien consume menos tiempo para realizar el protocolo, resulta más complicada cuando se tienen que manipular muchos tejidos de pequeñas dimensiones.

La recomendación de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo es explorar más condiciones durante el precultivo y los pretratamientos que propicien una mejor protección de los tejidos durante la inmersión en NL, para poder incrementar los índices de regeneración de nuevas plantas después de la crioconservación y evitar la formación de callo durante la etapa inicial de desarrollo.

## CONCLUSIONES

Los ápices de crisantemo cv. Indianápolis White pueden ser crioconservados aplicando los procedimientos de encapsulación-deshidratación o vitrificación con un régimen de enfriamiento rápido. Con la técnica de encapsulación-deshidratación se obtuvo 60 % de sobrevivencia, con un 12 % de regeneración de plantas

completas, en tanto que con la técnica de vitrificación la sobrevivencia fue del 74 % y una regeneración del 10 %. Es necesario explorar más tratamientos previos a la ultracongelación en ambos protocolos para incrementar la eficiencia de regeneración y evitar la formación primaria de callo en el material recuperado. También se recomienda probar estos procedimientos en otros cultivares de crisantemo.

### LITERATURA CITADA

- BAGNIOL, S.; ENGELMANN, F. 1992. Effect of thawing and recovery conditions on the regrowth of meristems of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) after cryopreservation in liquid nitrogen. *Cryoletters* 13: 253-260.
- FUKAI, S. 1990. Cryopreservation of chrysanthemum shoot tips. *Scientia Horticulturae* 45: 167-174.
- FUKAI, S.; GOI, M.; TANAKA M. 1991. Cryopreservation of shoot tips of *Chrysanthemum morifolium* and related species native to Japan. *Euphytica* 54: 201-204.
- FUKAI, S. 2003. *Dendranthema* species as chrysanthemum genetic resources. *Acta Horticulturae* 620: 223-240.
- GONZÁLEZ-ARNAO, M. T.; ENGELMANN, F.; HUET, C.; URRÁ C. 1993. Cryopreservation of encapsulated apices of sugarcane: effect of freezing procedure and histology. *Cryoletters* 14: 303-308.
- GONZÁLEZ-ARNAO, M. T.; ENGELMANN F. 2006. Cryopreservation of plant germplasm using the encapsulation-dehydration technique: review and case study of sugarcane. *Cryoletters* 27(3): 155-168.
- GROUT, B. W. W.; HENSHAW, G. G. 1980. Structural observations on the growth of potato shoot-tips cultures after thawing from liquid nitrogen. *Annals of Botany* 46: 243-248.
- HALMAGYI, A.; FISCHER-KLÜVER, G.; MIX-WAGNER, G.; SCHUMACHER, H.M. 2004. Cryopreservation of *Chrysanthemum morifolium* (*Dendranthema grandiflora* Ramat.) using different approaches. *Plant Cell Reports* 22: 371-375.
- HALMAGYI, A.; PINKER, I. 2006. Cryopreservation of rosa shoot tips: importance of preculture conditions. *Acta Horticulturae* 725: 351-396.
- HITMI, A.; SALLANON, H.; BARTHOMEUF, C. 1997. Cryopreservation of *Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis. cells and its impact on their pyrethrin biosynthesis ability. *Plant Cell Reports* 17: 60-64.
- HITMI, A.; SALLANON, H.; BARTHOMEUF C. 2000. Cryopreservation of *Chrysanthemum cinerariaefolium* shoot tips. *Journal of Plant Physiology* 156: 408-412.
- INFANTE, S.; ZÁRATE, G. 1984. Métodos Estadísticos. Un enfoque interdisciplinario. Editorial Trillas. Distrito Federal, México, 643 pp.
- KORN, R. W. 1980. The changing shape of plant cells: transformations during cell proliferation. *Annals of Botany* 46: 649-666.
- MANDAL, B. B. 2000. Cryopreservation of yam apices: a comparative study with three different techniques, pp. 233-237. In: *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm*. TAKAGI, H.; ENGELMANN, F. (eds.). IPGR, Rome, Italy.
- MARTÍN, C.; GONZÁLEZ-BENITO, E. 2005. Survival and genetic stability of *Dendranthema grandiflora* Tzvelev shoot after cryopreservation by vitrification and encapsulation-dehydration. *Cryobiology* 51:281-289.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologie Plantarum* 15: 473-479.
- NISHIZAWA, S.; SAKAI A.; AMANO Y.; MATSUZAWA T. 1993. Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification. *Plant Science* 91: 67-73.
- SAKAI, A.; KOBAYASHI S.; OIYAMA I. 1990. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Reports* 9(1): 30-33.
- TEIXEIRA DA SILVA, J. A. 2003. Chrysanthemum: advances in tissue culture, cryopreservation, postharvest technology, genetics and transgenic biotechnology. *Biotechnology Advances* 21: 715-716.
- TEIXEIRA DA SILVA, J. A. 2004. Ornamental chrysanthemums: improvement by biotechnology. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 79: 1-18.
- WANG, Y. L.; FAN, M. J.; LIAW, S. I. 2005. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of papaya (*Carica papaya* L.) by vitrification. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 46: 29-34.