

# Genebank - Cryopreservation of Potato - OP106

**Date** : September, 2015

**Reference** : Vollmer, R.; Villagaray, R.; Egusquiza, V.; Panta, A.; Barkley, N.; Ellis, D. 2016.  
Genebank: Cryopreservation of potato, v.2. CIP-OP106. 30 pps. Not for general distribution. For most current version of the procedure, please contact Rainer Vollmer (r.vollmer@cgiar.org) 1-34 pp.

Not for general distribution.

`$metadata.from("CONTACT")`



Genebank - Cryopreservation of Potato, v.2. CIP-OP106 by International Potato Center (CIP) is licensed under a Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0 International License. Permissions beyond the scope of this license may be available at <http://www.cipotato.org/>

# Table of Contents

---

ENGLISH VERSION	3
INTRODUCTION	4
SCOPE	4
HEALTH & SAFETY	5
PROCEDURE	7
VERSION EN ESPAÑOL	18
INTRODUCCIÓN	18
ALCANCE	18
SALUD Y SEGURIDAD	19
MATERIALES	19
PROCEDIMIENTO	21

<b>TITLE</b>	<b>Genebank - Cryopreservation of Potato - OP106</b>
<b>OWNER *</b>	Head Cryopreservation Unit
<b>APPROVER *</b>	Head Genebank
<b>APPROVAL DATE *</b>	<b>Pending approval, under revision and edition.</b>
<b>LAST REVIEW DATE *</b>	September, 2015
<b>ISSUE DATE</b>	Apr 26, 2016 14:52
<b>CONTRIBUTORS *</b>	Vollmer, Rainer (CIP), Villagaray, Rosalva (CIP), Egusquiza, Veronica (CIP), Panta, Ana (CIP), Ellis, David (CIP)
<b>CITATION</b>	106
<b>KEYWORDS</b>	procedure, non-accredited
<b>DOCUMENT ID *</b>	OP106
<b>VERSION NUMBER</b>	V2
<b>COMPETENT PERSONNEL *</b>	Villagaray, Rosalva (CIP), Egusquiza, Veronica (CIP), Cardenas, Jose (CIP), Castro, Mario (CIP), Torres, Maria, Panta, Ana (CIP), Vollmer, Rainer (CIP)
<b>COMPETENCE TEST *</b>	
<b>DATE OF NEXT COMPETENCE TEST *</b>	
<b>CITATION OF THIS DOCUMENT *</b>	Vollmer, R.; Villagaray, R.; Egusquiza, V.; Panta, A.; Barkley, N.; Ellis, D. 2016. Genebank: Cryopreservation of potato, v.2. CIP-OP106. 30 pps. Not for general distribution. For most current version of the procedure, please contact Rainer Vollmer (r.vollmer@cgiar.org)

- All fields marked with \* are required

## ENGLISH VERSION

## INTRODUCTION

---

Cryopreservation is an effective strategy for the long-term conservation of plant genetic resources collections. Plant material is stored at ultra low temperatures in liquid nitrogen ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) and at such low temperatures physiological and chemical activities are reduced to a point where germplasm should remain viable for centuries. As of April 2016, CIP's cryobank holds about 1450 potato accessions. By the end of 2016, the potato cryobank will be a safety back-up for 35% of CIP's native potato varieties.

## SCOPE

---

The following is CIP's standard operating procedure for the cryopreservation of potato using the PVS2-droplet vitrification method.

# HEALTH & SAFETY

1. CIP's Health & Safety Manual
2. CIP's Manual for "Safe Use, Handling and Storage of Liquid Nitrogen"
3. Protocol for the "Supply, Monitoring and Transfer of Liquid Nitrogen (LN)" at CIP's cryobank
4. Wear safety glasses (or goggles) and mask when working in the laminar flow chamber. Wear a long lab coat during all laboratory work.
5. Do not sterilize tools longer than 30 seconds in the glass bead sterilizer to avoid burns on fingers.
6. Point the scalpel edge away from your body to avoid cutting accidents during installation and deinstallation. Installation and desinstallation should be done smoothly without using much force or pressure.
7. Wear hermetic safety goggles and mask during freezing, thawing, and transfer of cryovials. People working near the person who is freezing, thawing, or transferring cryovials also have to wear hermetic safety goggles.
8. Wear cryogenic gloves (lab model), hermetic safety goggles, and cryo-apron when pouring liquid nitrogen (LN) from dewars to freezing containers or pans. People working near the person who is pouring LN also have to wear hermetic safety goggles.
9. Wear cryogenic gloves (industrial), hermetic safety goggles, cryo-apron, and face shield when handling high-pressure tanks or transferring bigger volumes of LN (i.e. filling dewars, refilling cryotanks, dispensing LN with hoses, etc.)
10. Always wear closed-toe shoes, and long pants or skirts which fully cover the legs. Never wear sandals or open-toed shoes in the laboratory or cryobank.
11. Take periodic active breaks when working in a static or fixed position (i.e. do a 2 minute stretching exercise every working hour).
12. When working with a stereoscope, close eyes and focus on different distances every 15 minutes (to reduce eye strain).
13. Wear surgical gloves, mask, and safety glasses when handling chemical products.

## MATERIALS

Equipment	
Barcode printers (desktop and hand-held)	Laminar Flow Chamber
Cryotank for Temporary Storage (Taylor Wharton LS-4800)	Large Cryotank (CHART MVE-819P-190AF-GB equipped with TEC3000) (= <b>cryobank</b> )

<b>Equipment</b>	
Dewar for liquid nitrogen (4 liters)	Medium-sized cryotanks (= working tanks) (CHART MVE XC47/11 and CHART Cryosystem 2000)
Flake Ice Machine	Pocket PC
Laboratory Mixer (Maxi Mix 2)	Stereoscope
<b>Other materials</b>	
Aluminium foil	Glass petri dishes (100 x 15 mm)
Barcode labels for desktop printer (polypropylene, 1.3" x 1.38")	Glass test tubes with caps (25x150 mm)
Barcode labels for hand-held printer (polypropylene, PolyPro 4000D, 2" x 1")	Glass test tubes with caps (sterile) (13x100 mm) (*)
Blades (#10 and #11)	Glass vessel with wide mouth (approx. 250 mL)
Coolbox system (CF 30 Cool Box System)	Long forceps (23 cm, fine point of 1 mm)
Cotton	Magic Touch lab ice pan (capacity: 9 liter)
Cotton forceps (stainless steel)	Parafilm
Cryo Apron	Pencil
Cryobox (for 25 and 100 cryovials)	Pieces of sterile filter papers (two dimensions: 10x10 mm and 25x30 mm) (*)
Cryogenic gloves (Tempshield)	Rubber bulbs (2 mL) for glass pasteur pipette
Cryogenic labels (ZEBRA 8000T)	Safety glasses
Cryogenic marker	Safety goggles (hermetic)
Cryovials (Thermo Scientific, 1.8 mL, round, internal thread, starfoot base) (*)	Sharp-point pliers
Deep petri dishes (100 x 25 mm; disposable) (*)	Small stickers (approx. 1x1 cm)
Digital Chronometer	Standard petri dishes (100x15 mm; disposable)
Dissecting knife handle	Sterile screw test tubes (15 ml, 70 mm, Ø20 mm) (*)
Face shield	Sterile strips of aluminium paper (5x15 mm) (*)
GA7 magenta vessels (sterile; with lid) (*)	Sterile bond paper (*)
Glass pasteur pipettes (5.75 ") (*)	Test tube racks (for screw test tubes, 13x100 mm and 25x150 mm test tubes)

(\*) for details on preparation, usage, sterilization or washing please see the related document RD200.

Chemicals
Flaked ice
Liquid Nitrogen (LN)
Loading Solution (LS-P) (**)
Potato Propagation Medium (MSA) (**)
Plant Vitrification Solution 2 (PVS2-P) (**)
Potato Recovery Medium I (PRM-0.3 M) (**)
Potato Recovery Medium II (PRM-0.2 M) (**)
Potato Recovery Medium III (PRM-0.1 M) (**)
Potato Recovery Medium IV (PRM-25 g) (**)
Rewarming Solution (RS-P) (**)

(\*\*) For composition and preparation of solutions and culture media please see: Genebank - Cryopreservation - Solutions and Culture Media - OP108

## PROCEDURE

### 1. General selection and quality criteria for cryopreservation

**1.1.** Select accessions to be cryopreserved according to the following priorities (in this order): (a) Accessions included in the International Treaty on Plant Genetic Resources for Food and Agriculture (PGRFA), (b) True-to-type identity confirmed, (c) Phytosanitarily clean (HS2) (if no accessions in HS2 are available, select HS2R), (d) Accessions forming part of the core collection.

**1.2.** For each accession and repetition cryopreserve a group of 150 shoot tips. Each vial contains 10 shoot tips. For viability assessment thaw 30 out of 150 shoot tips after a minimum LN exposure of 24 hours. Assess survival and regrowth rates at 30 and 60 days after thawing. Transfer accessions without fungal or bacterial contamination and that meet the minimum viability criteria (points 1.4 to 1.6) to the cryobank and safety back-up tanks. Accept samples as recovered if they grow in an *in vitro* plant with normal attributes, including elongated stem, apex, leaves and root(s).

**1.3.** If the average viability of the three routinely tested vials of the first run is **equal or higher than 30%**, only a single run is required. Place 2 vials in a box for cryo safety back-up and 10 vials into CIP's cryobank. (\*)

**1.4.** If the average viability of the three routinely tested vials of the first run is **between 20% and 30%**, do a second run of 150 shoot tips. The following process will be used based on the results from the second run:

**(a)** If the second run has an average viability of equal or higher than 20%, place both runs in the cryobank and safety back-up tanks. For the first run place 4 vials in a box for cryo safety back-up and 8 vials into CIP's cryobank (\*\*). The distribution of vials between cryobank and safety back-up of the second run depends on its viability rate:

- If the second run has a viability rate of equal or higher than 20% but less than 30%, place 4 vials in a box for cryo safety back-up and 8 vials into CIP's cryobank (\*\*).
- However, if the second run shows a viability of equal or higher than 30%, place 2 vials in a box for cryo safety back-up and 10 vials into CIP's cryobank (\*).

**(b)** If the second run shows an average viability of less than 20%, discard and redo the second run. If the redone second run shows a viability rate of equal or higher than 20%, proceed as described in step 1.4.a. If the redone second run shows a viability of less than 20%, discard the second run, only store the first run, and label the accession with "low viability" in the database.

**1.5.** If the average viability of the routinely tested samples of the first run is **less than 20%**, do not cryopreserve a second run and discard the first run. Label the accession with "low viability" (less than 20% but not 0%) or "cryo recalcitrant" (0% viability) in the database. These accessions will be cryopreserved with an improved protocol in a later time.

If less than 12 vials are stored, since a contamination recheck is required (see step 10), the distribution of vials between cryobank and safety back-up boxes is as follows:

**(\*)**

- 11 vials --> safety back-up box: 2 vials, cryobank box: 9 vials
- 10 vials --> safety back-up box: 2 vials, cryobank box: 8 vials
- 9 vials --> safety back-up box: 2 vials, cryobank box: 7 vials

**(\*\*)**

- 11 vials --> safety back-up box: 3 vials, cryobank box: 8 vials
- 10 vials --> safety back-up box: 3 vials, cryobank box: 7 vials
- 9 vials --> safety back-up box: 3 vials, cryobank box: 6 vials

## **2. In vitro culture of mother plants**

**2.1 First multiplication cycle:** Propagate axillary sections (with 2-3 nodes) of *in vitro* potato plants on MSA medium (see OP 108) placing four explants per 25x150 mm test tube. Propagate a total number of 6-7 test tubes. Propagate with long forceps and sharp No. 10 scalpel on a stack of 2-3 sterile bond papers. Periodically replace the stack to avoid cross contamination. Label each tube with preprinted barcode labels containing the labcode, CIP number, common name of accession, propagation date, health status, batch of culture media, and ID of person who printed the labels. Incubate for 2-3 weeks at 20±2 °C and 85±20 µmol.m-2.s-1 light intensity, provided by cool daylight fluorescent tubes with a 16h/8h photoperiod.

**2.2. Second multiplication cycle:** Propagate axillary sections (with 2-3 nodes) of *in vitro* potato plants on MSA medium (see OP 108) placing four explants per 25x150 mm test tube. Propagate a total number of 14-16 test tubes. Label each tube with preprinted barcode labels containing labcode, CIP number, common name of accession, propagation date, health status, batch of culture media and ID of person



who printed out the labels. Incubate for 3 weeks at  $20\pm 2$  °C and  $85\pm 20$   $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  light intensity, provided by cool daylight fluorescent tubes with a 16h/8h photoperiod.

**2.3. Third multiplication cycle:** Propagate uni-nodal axillary sections of *in vitro* potato plants on MSA medium (see OP 108), with 25 explants per magenta vessel. Propagate a total number of 8 magenta vessels. Label each magenta vessel with preprinted barcode labels containing labcode, CIP number, common name of accession, propagation date, health status, batch of culture media and ID of person who printed out the labels. Magenta vessels (8) of the same accession are placed on a single GA7 rack to avoid mix-ups and facilitate handling. Incubate for 2 weeks at  $20\pm 2$  °C and  $85\pm 20$   $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  light intensity, provided by cool daylight fluorescent tubes with a 16h/8h photoperiod.

**2.4 .Final multiplication cycle (= Installation):** Propagate uni-nodal **apical** sections on MSA medium (see OP 108), with 60-70 apical explants per deep petri dish. Propagate a total number of three petri dishes (180-210 explants). Label each petri dish with preprinted barcode labels containing labcode, CIP number, common name of accession, propagation date, health status, batch of culture media and ID of person who printed out the labels. Incubate for 2-3 weeks (genotype dependent) at  $7\pm 1$  °C and  $15\pm 5$   $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  light intensity, provided by cool daylight fluorescent tubes with a 16h/8h photoperiod.

### **3. Excision of apical shoot tips**

**3.1.** For each accession, distribute 15 small filter papers (10x10 mm) onto a petri dish containing sterile MSA medium (see OP 108).

**3.2.** Under a stereoscope (10x) carefully excise shoot tips from 2 to 3-week-old *in vitro* potato plants. Excise with long forceps and sharp No. 11 on a stack of 2-3 sterile bond papers. Periodically replace the stack to avoid cross contamination. Shoot tips should contain 2-4 leaf primordia, have a length of 0.8-1.2 mm and a width of 0.3-0.7 mm . The reference value of the width of the shoot tip was taken at the height of the meristem, and varies depending on the genotype. For each accession excise 150 shoot tips and place them successively onto the small filter papers until each of the 15 filter papers contains 10 shoot tips (first place one shoot tip on each of the 15 papers, then a second on each, than a third, and so on). At the end of the cryopreservation process, 120 shoot tips will be conserved in liquid nitrogen for long-term conservation and 30 will be thawed to determine viability (after a minimum of 24 hours in liquid nitrogen).

### **4. Preparative steps for cryoprotection**

**4.1.** Disinfect rubber bulbs (2 mL) in a glass vessel with alcohol (96%). Set up sterile standardized glass pasteur pipettes for Loading Solution (LS) and Plant Vitrification Solution 2 (PVS2) with its rubber bulbs and store pipettes individually in sterile 15 ml screw test tubes. Always pipette LS and PVS2 with its corresponding standardized glass pasteur pipette to avoid mixing solutions and problems during shoot tip handling. For composition and preparation of LS and PVS2 please see OP 108. If the pipette tip comes in contact with non-sterile items or absorbs an improper solution, immediately replace the pipette with a new sterile standardized pipette of the same type (LS or PVS2).

**4.2.** Fill lab ice pan (9 liter capacity) with flaked ice. Homogenize LS and PVS2 with a laboratory mixer (Maxi Mix II). Place Eppendorf containing PVS2 on flaked ice (0 °C) at a depth of approx. 3/4 of the

Eppendorf. Print 15 small labels for the LS/PVS2 test tubes (15 mL) and stick them on the caps of 15 sterile test tubes. The LS-PVS2 labels list the labcode of accession, "LS: " and "PVS2: ". Using the corresponding LS pipette dispense 2 mL of LS per screw test tube.

**4.3.** Using the pocket PC, record the following information in the database: ID of run (1st or 2nd), date of excision and freezing, name of person who has excised and frozen the shoot tips, number of cryopreserved shoot tips, abbreviation of protocol, and notes (if necessary). Using the pocket PC print, 15 cryogenic barcode labels per accession.

The barcode labels should contain the following information: CIP number of the accession, labcode of the accession, freezing date, and abbreviation of protocol. Using a cryogenic marker, label 13 sterile cryotubes with their lab-code and freezing date. Label cryotubes with corresponding barcode labels. Locate open cryovials in the coolbox system holder (CF 30 Cool Box System) and label the corresponding rows of the holder with cryogenic labels.

12 of 15 labels identify the vials assigned to the cryobank and safety copy. 1 label identifies the vial that will contain the 3 aluminum strips (30 samples) for routine viability assessment. 1 label identifies the location (rows) of the accession within the freezing container. 1 label is printed as a back-up.

**4.4.** Place previously sterilized aluminum strips (0.5 x 2.0 cm) in a sterile plastic petri dish. Using cotton forceps gently fold the strips on one end (approx. 3 mm from the end of the strip).

## **5. Cryoprotection: Loading (LS) and Plant Vitrification Solution 2 (PVS2)**

**5.1.** Using cotton forceps, introduce the small filter papers holding 10 apical shoot tips into test tubes with LS. Shake smoothly. Verify that all shoot tips are submerged in LS. Treat shoot tips for 20 minutes with LS. Using a pencil, note the time of finishing the LS treatment on the sticker and monitor the exposure time with a digital clock. Make a break of 1-2 minutes between each test tube.

**5.2.** Place a sterile glass vessel in the flow chamber. After 20 minutes of LS exposure, carefully remove the solution with a pasteur pipette such that the shoot tips remain in the test tube. Discard the used LS in the sterile glass vessel. Using a separate pipette, place approx. 2.0 mL of ice-cooled PVS2 (0 °C) into the tube containing the shoot tips. Close tube with a sterile cap. Verify that all shoot tips are submerged in PVS2. Treat shoot tips for 50 minutes with PVS2 (at 0 °C). Using a pencil, note the time of finishing the PVS2 treatment on the sticker. Place the test tube on flaked ice (0 °C) at a depth of approx. 3/4 of the tube. Monitor the PVS2 exposure time with a digital clock.

## **6. Freezing in liquid nitrogen**

**6.1.** Two minutes before the PVS2 treatment is complete, carefully pour LN from a 4 liter dewar into the coolbox system container (wear cryogenic gloves and safety glasses). If necessary, relocate cryovials (without cap) in the supporting holes of the coolbox system holder. The nitrogen level always should be approx. 1.0 cm above the opening of the cryovials. Also place and submerge the cryovial caps in LN for additional sterilization.

**6.2.** Using the PVS2 pasteur pipette, suck up the 10 shoot tips contained in PVS2, lean the pipette's tip on the bottom of the tube and slowly expel the PVS2 from the pipette. The shoot tips should be contained within a very small volume of PVS2 (approx. 10 µL) in the tip of the pipette.

**6.3.** Place the shoot tips, along with the PVS2 droplet on a thin sterile aluminum strip (5 x 20 mm). The aluminum strip should be folded at one end to facilitate manipulation by cotton forceps.

**6.4.** Quickly plunge the aluminum strip into the coolbox system container with liquid nitrogen (fast freezing) and transfer it to the corresponding labelled cryovial. Move the strip only under the surface of liquid nitrogen. Place only one strip (= 10 shoot tips) per vial. Periodically refill the coolbox system container with liquid nitrogen to assure that the cryovials are always submerged. Place the three aluminum strips (= 30 shoot tips) used for viability assessment together in one single cryovial.

**6.5.** When the freezing process of all accessions to be cryopreserved is finished (during the working day), assign 12 cryovials (= 120 shoot tips ) for cryobanking and safety back-up. Using sharp-pointed pliers, tightly close cryovial caps. The three aluminum strips (= 30 shoot tips) for routine viability assessment will be thawed in RS and cultured on recovery media, after a minimum exposure of 24 hours to LN.

**6.6.** Place the cryo-cane based working tank (CHART MVE XC47/11) next to the laminar flow chamber and open the tank. Using an ultra-low temperature resistant pencil, label cryo-canes with the labcode of the accession they will hold. Canes have a capacity of 4 cryovials each. Using an ultra-low temperature resistant pencil, label 3 cryo-canes per accession with their corresponding labcodes and pre-freeze them in LN (in tank holders). Using sharp-pointed pliers, quickly transfer cryovials (12 cryovials per accession) from coolbox system container to the corresponding pre-frozen aluminum cryocane and immediately submerge the cryocane in LN. Expose the cryovials to room temperature for a minimum of time and quickly re-submerge them in LN. The cryo-cane based working tank contains 6 cylindrical holders with a capacity of approx. 45 cryo-canes per holder. The total capacity of the cryo-cane based working tank is 75 accessions.

Locate the cryovial that contains the three aluminum strips (=30 shoot tips) used for routine viability assessment in a separated holder of the working tank. Regularly check the LN level of the cryo-cane based working tank and refill as needed.

## **7. Thawing in Rewarming Solution (RS)**

**7.1.** Disinfect rubber bulbs (2 mL) in a glass vessel with alcohol (96%). Set up sterile standardized glass pasteur pipette for Rewarming Solution (RS) with its rubber bulbs and store the pipette in a sterile 15 mL test tube. For composition and preparation of RS please see OP 108. If the pipette tip comes in contact with non-sterile objects, immediately replace the pipette with a new sterile standardized pipette.

**7.2.** Thaw in groups of 6 accessions. Fill 18 sterile 15 mL test tubes with RS (4 mL of RS per tube) and arrange them in the test tube rack in 6 rows of 3 tubes each. Each row will correspond to an accession. Using a pocket PC, print 4 small labels per accession. The RS labels contain labcode of accession, and "RS:". 3 of 4 labels are used to identify each of the test tubes of the corresponding accession, and the fourth label identifies the petri dish with sterile Potato Recovery Medium I (PRM-0.3 M, see OP108) to which the shoot tips will be transferred to.

**7.3.** Using the pocket PC, create the list of accessions ready for thawing. Fill CF 30 Cool Box System with LN. Using sharp-pointed pliers, transfer viability assessment vials of 12 accessions from the small cryotank to CF 30 Cool Box System holder. Place cryovials in the holder in two columns of 6 accessions each. Separate columns with an empty column. Using sharp-pointed pliers, open the cryovials. Process accessions according their positions in the column.

**7.4.** Place 6 large filter papers (approx. 25x30 mm) on a stack of 3-6 sterile paper sheets. On each of the large filter papers, place 3 small sterile filter papers (approx. 10x10 mm). The "filter paper sandwich" absorbs the excess of RS after thawing. Place 3 sterile large filter papers (approx. 25x30 mm) on each petri dish with sterile Potato Recovery Medium I (PRM-0.3 M, see OP108). The large filter papers support the shoot tips during the first three stages of the recovery process (Recovery Medium I to III, see OP108). Label petri dishes with remaining RS label. The order of accessions within the stack of petri dishes should coincide with the order the accessions are processed (= position of accession within column of cool box).

**7.5.** Using cotton forceps, quickly transfer the 3 aluminum strips of the first accession from the cryovial to the corresponding RS test tubes (one strip per test tube). Remove empty cryovials from freezing container. Place the accession's cryovial label on the corresponding recovery cycle petri dish as an additional quality control (the label has to dry first).

**7.6.** Immediately shake the test tube to ensure rapid thawing. Take care that all shoot tips are submerged in RS and avoid sticking to the test tube wall. Treat shoot tips for 20 minutes in RS (at room temperature). Note the finishing time of thawing with RS on the sticker and monitor the RS exposure time with a digital clock.

## **8. Recovery Cycle**

**8.1.** Using the RS pipette, suck up the shoot tips from RS and place them for approx. 1-3 minutes on small sterile filter papers to drain excess of RS. For transfer of shoot tips from draining paper to recovery media, carefully unload shoot tips slipping the small filter papers, with shoot tips oriented downwards, over one of the large filter papers supported on Recovery Medium I of the respective accession. Check that labcode on petri dish label and the RS test tubes match.

**8.2.** Seal the petri dish with parafilm. Identify petri dish with original cryovial label. After completing 6 accessions, scan petri dish labels and record thawing data with the pocket PC. Using the hand-held barcode printer, print detailed labels for petri dish identification. Label petri dishes. Labels contain the following information: accession number, labcode, ID of person that cryopreserved the accession, date of freezing, date of thawing, and the date shoot tips were placed on Potato Recovery Medium I. Wrap petri dishes with aluminum foil (darkness). Incubate shoot tips for 3 days at  $20\pm 1$  °C in darkness.

**8.3.** After 3 days on Recovery Medium I, transfer filter papers holding shoot tips to sterile Recovery Medium II (PRM-0.2 M, see OP108). Transfer the lid of the original petri dish, the Recovery Medium I petri dish, to the new petri dish with Recovery Medium II (to facilitate labeling). Scan original petri dish labels with pocket PC, record transfer data, and print new labels with the hand-held barcode printer. Labels contain the following information: accession number, labcode, ID of person that cryopreserved the accession, date of freezing, date of thawing, and the dates shoot tips were placed on Potato Recovery Medium I and II. Place new label over original label. Wrap petri dish in aluminum foil (darkness) and incubate for 3 days at  $20\pm 1$  °C.

**8.4.** After 3 days on Recovery Medium II, transfer filter papers holding shoot tips to sterile Recovery Medium III (PRM-0.1 M, see OP108). Transfer the lid of the original petri dish, the Recovery Medium II petri dish, to the new petri dish with Recovery Medium III (to facilitate labeling). Scan original petri dish labels with the pocket PC, record transfer data, and print new labels with hand-held barcode printer. Labels contain the following information: accession number, labcode, ID of person that cryopreserved the

accession, date of freezing, date of thawing, and the dates shoot tips were placed on Potato Recovery Medium I, II and III. Place new label over original labels. Wrap petri dish with aluminum foil (darkness) and incubate for 3 days at  $20 \pm 1$  °C.

**8.5.** After 3 days on Recovery Medium III, transfer shoot tips to sterile Recovery Medium IV (PRM-25 g, see OP108). Before transferring an accession, scan the petri dish barcode label with the pocket PC and print 3 labels per accession (using the hand-held barcode printer). At this stage, place the shoot tips directly on the culture medium without a filter paper support. Transfer the 10 shoot tips supported on each of the filter papers to an individual petri dish with Recovery Medium IV. The labels contain the following information: accession number, labcode, ID of person that cryopreserved the accession, date of freezing, date of thawing, the dates shoot tips were placed on Potato Recovery Medium I, II and III and IV, IDs of the cryorun (1<sup>st</sup> or 2<sup>nd</sup>), and the petri dish number ("1", "2" or "3"). Incubate shoot tips for 4 days at  $20 \pm 1$  °C under diffuse light with a photoperiod of 16h/8h (light/darkness). For diffuse light, place a aluminium paper sheet onto the petri dishes. Petri dishes with signs of fungal/bacterial contamination are processed as described in step 10, without transferring the shoot tips.

**8.6.** After 4 days, remove the aluminum foil from the petri dishes and incubate shoot tips for approx. 18 additional days at  $20 \pm 2$ °C and  $85 \pm 20$   $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$  light intensity, provided by cool daylight fluorescent tubes with a 16h/8h photoperiod.

**8.7.** 30-35 days after thawing, transfer the surviving and recovered shoot tips to 13x100 mm test tubes with Recovery Medium IV. Placing one sample per tube (see step 9).

## **9. Routine Viability Evaluations (30-35 and 60-65 days after thawing)**

**9.1.** Evaluate survival and re-growth rates 30-35 and 60-65 days after thawing. In the first evaluation, 30-35 days after thawing, a shoot tip is classified as survived when green tissue is observed, and as recovered when a shoot grows directly or laterally from the meristematic dome without any intermediate callus formation. Using a permanent marker, label survived shoot tips with a black unfilled circle on the base of the petri dish (externally). Label recovered shoot tips with a filled black circle. Dead or phenolized samples are not marked at all. Evaluate each petri dish separately. Scan the petri dish label with the pocket PC and record the following data: date of evaluation, ID of person that has done the evaluation, total number of shoot tips per petri dish, an the number of survived and regrown shoot tips per petri dish. The ID of the cryo-run (1st or 2nd), and the petri dish number ("1", "2" or "3") are included in the bi-dimensional barcode label of the Recovery Medium IV petri dishes and are therefore recorded automatically. For all 3 petri dishes, obtain complete data. Process petri dishes with signs of fungal /bacterial contamination as described in step 10, without transferring the shoot tips to test tubes.

**9.2.** For transfer to test tubes, process each petri dish individually, 1-5 days after the first evaluation. Stack petri dishes ordered by labcode of the accession. Using the pocket PC scan the barcode label of the petri dish that contains the shoot tips to be transferred. The display of the pocket PC shows the evaluation data, ID of the petri dish, and the run number. Check if physical identifiers (black circles) coincide with recorded evaluation data. Using the hand-held printer, print labels for 13x100 mm test tubes. Based on the evaluation data of 30-35 days , a database algorithm selects how many labels to print for each petri dish that is transferred. The labels contain the following information: accession

number, labcode, ID of person that performed the transfer, dates of freezing and thawing, current date, IDs of the cryorun (1st or 2nd) and the petri dish number ("1", "2" or "3"). Label test tubes before transferring samples.

**9.3.** Using long forceps, carefully transfer samples from petri dishes to 13x100 mm test tubes with Potato Recovery Medium IV (PRM-25 g, see OP108), placing 1 sample per test tube. Handle each petri dish separately and transfer only surviving and/or regrown shoot tips to test tubes. Rooted samples are transferred directly (= transplanting). If the sample has an elongated stem without rooting, slightly cut the sample's base before transferring to stimulate root formation. Directly transfer small but living samples (bud without stem elongation). Store test tubes in racks organized by labcode and petri dish number (in rows).

**9.4.** Perform the second and final viability assessment 60-65 days after thawing (in test tubes). Only samples that developed into complete, normal-looking *in vitro* plants with elongated stem, apex, leaves and roots are counted as recovered. For assessment, evaluate and record each of the different petri dish groups separately ("1", "2" or "3"). Using the pocket PC, scan the label of one test tube corresponding to a particular petri dish group. Check that the remaining test tubes correspond to the same accession, cryorun (1st or 2nd) and petri dish group ("1", "2" or "3"). Using the pocket PC record the following data: date of evaluation, ID of person that has done the evaluation, total number of shoot tips, and the number of survived and regrown shoot tips. The ID of the cryo-run (1st or 2nd) and petri dish group ID ("1", "2" or "3") are included in the bi-dimensional barcode label of the test tubes and are therefore recorded automatically. Additionally, record the following information: number of complete plants (recorded as recovered shoot tips), number of plants without roots (to be cut at its base and transferred to fresh culture medium), number of plants with deformation (recorded as survived shoot tips), phenolized samples (recorded as dead shoot tips), number of samples with small buds (to be transferred directly to fresh culture medium), number of white/dead samples (recorded as dead shoot tips). Groups of test tubes with signs of fungal/bacterial contamination are processed as described in step 10 ("Contamination Recheck").

**9.5.** Transfer samples that can't clearly be classified as recovered (e.g. survived shoot tips), or that still haven't developed into a complete *in vitro* plant (i.e. missing roots) to 13x100 mm test tubes containing fresh Recovery Medium IV (according to the criteria described in step 9.4.). Re-evaluate the plants 3 weeks later and update the evaluation data accordingly.

## **10. Contamination recheck**

**10.1.** Exceptionally, accessions might show signs of contamination in one of the following stages of the recovery cycle: (a) shoot tip transfer to petri dishes with Recovery Medium III or IV, (b) viability evaluations after 30-35 or 60-65 days. Using the pocket PC, scan the barcode label of the contaminated petri dish(es) or test tube(s) and record the following information: type of contamination (fungal or bacterial), date of record of contamination, and the ID of person that recorded the contamination. The ID of the cryo-run (1st or 2nd) and petri dish ("1", "2" or "3") are included in the bi-dimensional barcode label of the petri dish(es) or test tube(s) and are therefore recorded automatically. In order to obtain complete and reliable viability data for all three petri dishes, remove the required additional cryovials from the working or temporal storage tanks. Record cryovial removal from the tanks with the pocket PC to update stock and location of the accession. For contamination recheck, evaluate the viability of the removed cryovials as described in step 9 ("Routine Viability Evaluation").

**10.2.** If the recheck confirms the contamination, discard the respective run of the accession from the working or temporal storage tanks and cryopreserve again. If the recheck does not show any signs of contamination, record the evaluation data of the rechecked vials as original routine data, replacing the data of the contaminated vials. The removal of vials for contamination recheck can be done in parallel with the processes of discarding of accessions (see step 13) and transferring of accessions to the cryobank and temporary safety back-up tanks (see step 14).

### **11. Transferring of accessions to working tank (in cryo-laboratory)**

**11.1.** During the complete transfer process, personnel should wear ultra-low temperature gloves, cryo-apron, and safety goggles. For transferring, place a lab ice pan (capacity of 9 liter) in the laminar flow chamber and fill the container with approx. 3.5 cm of liquid nitrogen. If a transitory cryobox is labeled the first time (or re-labeled), collocate its cryobox ID on the four sides of the box (using ultra-low temperature resistant pencil). Using the pocket PC, print 4 cryo-resistant labels per cryobox and place them onto the hand-written identifiers (for security reasons, cryoboxes are identified both with cryogenic marker and bidimensional cryo-resistant barcode label). Unique IDs of transitory cryoboxes can range from Temp\_001 to Temp\_071 (for details, see next section on "Transfer of accessions to transitory tanks 1 and 2").

In general, the transitory cryo-boxes re-circulate between transitory tank 1 or 2 (Taylor Wharton LS-4800) and the cryo-box based working tank (CHART Cryosystem 2000). Consequently, they are already labeled adequately and can be used without additional identification.

Scan the cryobox label with the pocket PC. Place the cryobox in the lab ice pan with LN and submerge it half way into LN (using long forceps) without splashing, spilling or coming in contact with LN. If necessary, fill additional LN into the pan.

**11.2.** Place the cryo-cane based (CHART MVE XC47/11) and cryo-box-based working tank (CHART Cryosystem 2000) next to laminar flow chamber. The cryo-cane based tank contains the accessions to be transferred (see step 6.6.) and the cryo-box based tank will receive the accessions (stored in cryo-boxes). The cryobox-based tank has 4 box holders with a maximum capacity of 5 cryoboxes per holder (total capacity of tank: 20 cryoboxes). Place a maximum of 5 accessions in the transitory cryobox (12 cryovials per accession). The standard cryoboxes can hold 100 cryovials. Accessions occupy two rows within the cryobox. The remaining free positions within a row are not occupied by cryovials of another accession. For example: the first accession in the cryobox will occupy the positions 1 to 12, but the 8 free positions of the second row (position 13-20) will not be occupied. The second accession of the box will occupy the positions 21-32, and so on.

**11.3.** Using sharp-pointed pliers, quickly transfer accessions from the cryo-canes to the cryobox. Check that cryovials of the same accession have the same label. When the box is completely full, scan the first vial of each accession (positions 1, 21, 41, 61, and 81) with the pocket PC. The pocket PC will automatically assign the position to each accession (i.e. 1-12, 21-32, 41-52, 61-72 and 81-92). Check that the physical and electronically recorded numbers and positions of the cryovials coincide. Using the pocket PC, also record and check the following information: date of transfer, ID of the person who transferred the accession, ID of the cryorun of each accession (1st or 2nd), and number of cryopreserved shoot tips.

**11.4.** Carefully close the cryobox with its lid. A second person lifts a holder (with free positions) from the cryo-box based tank and removes the security bar, while the first person lifts the closed cryobox by one of its sides with long forceps, takes the box at its lifted side and places it in the corresponding slot of the tank holder. As soon as the box is in the slot, the second person inserts the security bar and re-submerges the holder in the tank. Close the tank. Proceed the same way with the other accessions to be transferred.

## **12. Transferring accessions from working tank (CHART Cryosystem 2000) to transitory tanks 1 or 2 (Taylor Wharton LS-4800)**

**12.1.** When the cryobox-based working tank is full (max. 20 cryoboxes), transfer boxes to the transitory tanks 1 and 2 (Taylor Wharton LS-4800). The transitory cryotanks have 6 holders each, with a capacity of 8 cryoboxes per holder. The total capacity per tank is 48 cryoboxes. The location of the cryoboxes within the transitory cryotanks is pre-defined. Transitory tank 1 holds the cryoboxes "Temp\_01" to "Temp\_48" and transitory tank 2 holds the cryoboxes "Temp\_49" to "Temp\_71". The transitory cryoboxes "Temp\_01" to "Temp\_08" are located in holder 1 of Transitory tank 1. The cryobox "Temp\_01" is located in the highest position of holder 1 (next to the tank's lid). "Temp\_02" in the second upper position, "Temp\_03" in the third upper position, and so on. The transitory cryoboxes "Temp\_09" to "Temp\_16" are located in holder 2 of transitory tank 1. "Temp\_09" is located in the highest position, "Temp\_10" in the second upper position, "Temp\_11" in the third upper position, and so on.

In this manner, the position of each of the transitory cryoboxes ("Temp\_01" to "Temp\_71") is exactly pre-defined, both within the transitory tanks and their holders. Holders 4 to 6 of transitory tank 2 are used for the transitory storage of sweetpotato accessions.

**12.2.** Place working tank (CHART Cryosystem 2000) next to transitory cryotanks 1 and 2 (Taylor Wharton LS-4800). While a second person lifts for a short moment the holder of the working tank, so that the first person can scan the barcode labels of the cryoboxes (using a pocket PC). An algorithm of the database automatically assigns the corresponding tank ID (T1 or T2) and holder (1 to 6) to the cryoboxes. Therefore, the boxes' position is pre-defined and fixed. Record and check the date of transfer and ID of person that performed the transfer with the pocket PC.

Transfer transitory cryoboxes from the working tank (CHART Cryosystem 2000) to their corresponding positions within the transitory cryotanks 1 and 2 (Taylor Wharton LS-4800).

## **13. Discarding accessions**

**13.1.** Accessions may be discarded from the cryotanks for different reasons: (a) confirmed fungal /bacterial contamination, (b) low routine recovery rates, (c) viability reassessment shows low recovery rate, (d) sub-optimal storing conditions, or (e) low stock.

**13.2.** Using the pocket PC, load the list of accessions to be discarded. Locate the tank and cryobox that contain the accession(s) to discard. Transfer the cryobox to a lab ice pan (capacity of 9 liters) that was previously filled with approx. 3.5 cm of LN. Scan the barcode label of the accession to be discarded (only the 1st cryovial of the corresponding accession). Using the pocket PC, record the date of discarding, the ID of the person who discarded the accession, and reason for discard. A record of all historical data will



be automatically saved in the database. Physically discard the corresponding cryovials. If no additional accessions will be discarded from the cryobox, close cryobox and place it back to its original location. Cryoboxes and tanks are handled as described before.

Discarding of accessions can be done in parallel with the processes of contamination recheck (see step 10) and transferring of accessions to the cryobank and temporary safety back-up tanks (see step 14).

#### **14. Transferring of accessions to cryobank and temporary safety back-up tanks**

**14.1.** Transfer accessions that meet the minimum recovery and quality criteria described in the step 1 from the transitory tanks (T1,T2) to the cryobank (P1, P2) and temporary safety back-up tank (BB-1). Boxes for the cryobank and safety back-up have unique identifiers that range from P001 to P480 and BBP001 to BBP180, respectively, where "P" stands for Potato and "BBP" for Black Box Potato (= Safety Back-up). Label cryobank and safety-back up boxes with cryogenic marker. Using the pocket PC, print 4 cryo-resistant labels per cryobox and place them onto the hand-written identifiers. For security reasons, cryoboxes are identified both with cryogenic marker and bidimensional cryo-resistant barcode label.

**14.2.** The cryobank and safety back-up tanks (CHART MVE-819P-190AF) have 4 sections. Each of the sections can hold 3 holders for standard cryoboxes (100 vials/box) and 1 holder for small cryoboxes (25 vials/box). Both types of holders have a capacity of 15 cryoboxes. The total capacity of one of the CHART MVE-819P-190AF tanks is 180 standard boxes (100 vials/box) and 60 small cryoboxes (25 vials/box). The location of the cryoboxes within the cryobank and safety back-up tanks are pre-defined, similar as described before for the Transitory Tanks 1 and 2, with the difference that the order of the cryo-boxes within the holder are inverted.

For example: The cryobank boxes "P001" to "P015" are located in holder 1 of cryobank tank 1 (P1), where "P001" is located in the lowest position (next to the bottom of the tank), "P002" in the second lowest position, "P003" in the third lowest position, and so on. The cryobank boxes "P016" to "P030" are located in holder 2 of cryobank tank 1 (P1), where "P016" is located in the lowest position (next to bottom of tank), "P017" in the second lowest position, "P018" in the third lowest position, and so on. The 100-vial cryobox holders have IDs ranging from 1-3, 5-7, 9-11 and 13-15, while the 25-vial box holders have the IDs 4, 8, 12 and 16. The temporal safety-back up tank (BB-1) is organized in a homologous manner, but cryoboxes are identified with "BB"-prefixes. In the safety-back up tank, the holders 1-3, 5-7 and 9-11 (100-vial boxes) and 4, 8, and 12 (25-vial-boxes) are assigned to potato, while the holders 13-16 are used for the sweetpotato cryo-backup. First fill the 100-vial boxes, then the 25-vial boxes.

**14.3.** Make sure that the cryobox-based working tank (CHART cryosystem 2000) is empty and can be used as temporary storing facility during the transfers. Set up two lab ice pans (capacity of 9 liter) and fill them with approx. 3.5 cm of LN. Place cryobank and safety-back up boxes (without lids) in the closest pan and submerge them half way into LN (using long forceps) without splashing, spilling or coming in contact with LN. If necessary, pour additional LN into the pans. Using the pocket PC, scan the cryobox ID labels of cryobank and safety-back up box (= destiny).

Using the pocket PC, load the list of accessions ready to be transferred and order them descending by their cryobox IDs (of the transitory cryoboxes). Place the transitory cryobox (for example: Temp\_03) that contains accessions to be transferred in the other lab ice pan. Using the pocket PC, scan the cryobox ID label of transitory cryobox (= source).

Using the pocket PC, scan cryovial label of the accession to be transferred. The pocket PC will automatically show the distribution of cryovials between cryobank and safety back-up cryoboxes and their position in the cryoboxes. Using long or cotton forceps, transfer accessions from the temporary storage box to the cryobank and safety back-up boxes. Confirm transfer in the pocket PC.

**14.4.** Once all cryovials have been transferred to the cryobank and safety-back up boxes, close the transitory cryobox and return it to its position in the transitory tank (T1 or T2) or use the box-based working tank (CHART Cryosystem 2000) for temporal storage and transfer transitory cryoboxes by groups to T1 and T2. Transfer next cryobox (with accessions to transfer) from the transitory tank to the polystyrene container with LN and proceed as described before. It is not necessary to scan the cryobank or safety-back box labels again (only if they are replaced by a new empty one). Every time the transitory cryobox is replaced by a new one, scan the cryobox ID barcode label of the transitory cryobox. Always monitor the LN level in the polystyrene boxes and refill if necessary.

**14.5.** When the cryobank or safety back-up box is full, check the following information before closing the box with its lid: date of transfer, person who performed the transfer, number of vials and samples per box, ID of cryobox, position of cryobox, position of vials within cryobox, and the cryorun ID (1st or 2nd). All this information is filled out automatically by an algorithm, but it is necessary to check that the electronic data, physical position, and identification coincide. Transfer the cryobank or safety back-up box to the box-based working tank (CHART Cryosystem 2000) for temporal storage, and transfer them at the end of the working day to the cryobank and safety back-up tanks (less manipulation of cryobank and safety back-up tanks). Continue processing all accessions that meet the criteria for transfer. Every time an accession is transferred, it is automatically highlighted in the transfer list of the pocket PC (additional control).

Transferring of accessions to the cryobank and temporary safety back-up tanks can be done in parallel with the processes of contamination recheck (see step 10) and discarding of accessions (see step 13).

## VERSION EN ESPAÑOL

## INTRODUCCIÓN

La criopreservación es una estrategia efectiva para la conservación a largo plazo de colecciones de Recursos Genéticos. El material vegetal es almacenado en nitrógeno líquido (NL) a una temperatura ultra baja (-196°C). A esta temperatura todas las actividades fisiológicas y químicas se reducen a tal nivel que el material vegetal puede teóricamente mantenerse viable por siglos. A la fecha de Abril 2016, el criobanco del CIP conserva aprox. 1450 accesiones de papa. Se planea hasta fines del 2016 tener un criobanco de papa que mantenga en copia de seguridad el 35% de las variedades nativas del CIP.

## ALCANCE

El presente documento describe el procedimiento operativo standard del CIP para la criopreservación de papa, utilizando el método de la gota pequeña de PVS2.

## SALUD Y SEGURIDAD

1. Manual de Salud y Seguridad del CIP.
2. Manual de "Uso, Manejo y Almacenamiento seguro de Nitrógeno Líquido" del CIP
3. Protocolo para el "Suministro, Monitoreo y Transferencia de Nitrógeno Líquido" del criobanco (CIP)
4. Utilizar lentes de seguridad (o lentes) y mascarilla durante el trabajo en la cámara de flujo laminar. Vestir un mandil de laboratorio largo durante todos los trabajos de laboraotrio.
5. Para evitar quemaduras en los dedos, esterilizar las herramientas por un tiempo máximo de 30 segundos (en el esterilizador de perlas de vidrio).
6. Para evitar accidentes de corte, orientar el filo de bisturí a dirección opuesta del cuerpo durante la instalación o desinstalación de las hojas de bisturí. Realizar la instalación y desinstalación de la hoja de bisturí suavemente, sin usar mucha fuerza o presión.
7. Usar lentes de seguridad herméticas y mascarilla durante los procesos de congelamiento, descongelamiento y transferencia de crioviales. Personas que trabajan cerca de la persona que congela, descongela o transfiere crioviales, deben usar también lentes de seguridad herméticas.
8. Usar guantes criogénicos (modelo de laboratorio), lentes de seguridad herméticas y delantal criogénico para vaciar nitrógeno líquido (NL) desde dewars hacia contenedores de congelamiento o bateas (aptas para contener NL). Personas que trabajan cerca de la persona que vacía NL deben usar lentes de seguridad herméticas.
9. Usar guantes criogénicos (modelo industrial), lentes de seguridad herméticas, delantal criogénico y protector de rostro cuando se maneja tanques de alta presión o se transfiere volúmenes grandes de NL (por ejemplo llenado de dewars, relleno de criotanques, dispensado de NL con mangueras, etc.)
10. Vestirse con zapatos cerrados y pantalones o faldas largas durante todos los trabajos de laboraotrio y criobanco. No vestir sandalias o zapatos abiertos.
11. Realizar periódicamente pausas activas cuando se trabaja por periodos prolongados en una posición estática o fija (p.ej. hacer un ejercicio de estiramiento de 2 minutos después de cada hora de trabajo).
12. Al trabajar bajo el estereoscopio cerrar cada 15 minutos los ojos y focalizar la vista hacia un punto lejano (para reducir el esfuerzo para la vista).
13. Durante el manipuleo de químicos usar guantes quirúrgicos, masacarilla adecuada y lentes de seguridad.

## MATERIALES

<b>Equipos</b>	
Cámara de flujo laminar	Estereoscopio
Dewar para nitrógeno líquido (4 litros)	Impresoras para etiquetas de código barra (estación fija e impresora de mano)
Criotanque grande (CHART MVE-819P-190AF-GB equipado con TEC3000) (= criobanco)	Máquina de hielo en escarcha
Criotanque para el almacenamiento transitorio (Taylor Wharton LS-4800)	Mezclador de vibración (Maxi Mix 2)
Criotanques de trabajo (CHART MVE XC47/11 y CHART Cryosystem 2000)	Pocket PC
<b>Otros materiales</b>	
Algodón	Hoja de bisturí (#10 y #11)
Alicate de punta	Hojas de papel Bond estéril (*)
Batea apta para contener nitrógeno líquido (Magic Touch, de 9 litros)	Lapicero
Bulbos de jebes (2 mL) para pipeta pasteur de vidrio	Lentes de seguridad
Contenedor de congelamiento (CF 30 Cool Box System)	Mango de bisturí
Criocaja (capacidades de 100 y 25 crioviales)	Marcador criogénico
Crioviales (Thermo Scientific, 1.8 mL, redondo, rosca interna, base de estrella) (*)	Papel aluminio (extrafuerte)
Cronómetro digital	Papeles filtros estériles de dos tamaños (10x10 mm y 25x30 mm; Whatman, Grado 2) (*)
Delantal criogénico	Parafilm
Envase de vidrio de boca ancha (approx. 250 mL)	Pinzas para cultivo de tejidos (23 cm, punta fina de 1 mm)
Envases de magentas GA7 estériles (con tapa) (*)	Pinzas para algodón (de acero inoxidable)
Etiquetas criogénicas (ZEBRA 8000T)	Pipetas pasteur de vidrio estériles (5.75 ") (*)
Etiquetas de código barra para impresora desktop (polietileno, 1.3" x 1.38")	Placas petri standard estériles (100 x 15 mm; descartables)
Etiquetas de código barra para impresora de mano (polietileno, PolyPro 4000D, 2" x 1")	Placas petri profundas estériles (100 x 25 mm; descartables) (*)

<b>Equipos</b>	
Etiquetas pequeñas (approx. 1x1 cm)	Placas petri de vidrio (100 x 15 mm)
Franjas de papel aluminio estériles (5x15 mm) (*)	Protector de rostro
Gafas de seguridad (herméticas)	Tubos de ensayo con tapa en rosca estériles (15 mL, 70 mm, Ø20 mm) (*)
Gradillas de acero inoxidable (para tubos de ensayo con tapa en rosca, de 13x100 mm y 25x150 mm)	Tubos de ensayo de vidrio con tapa estériles (13x100 mm) (*)
Guantes criogénicos (Tempshield)	Tubos de ensayo de vidrio con tapa (25x150 mm)

(\*) Los detalles para la preparación, uso, esterilización o lavado están descrito en el documento relacionado RD200.

<b>Químicos</b>
Hielo en escarcha
Medio de Propagación de Papa (MSA) (**)
Medio de Recuperación de Papa I (PRM-0.3 M) (**)
Medio de Recuperación de Papa II (PRM-0.2 M) (**)
Medio de Recuperación de Papa III (PRM-0.1 M) (**)
Medio de Recuperación de Papa IVI (PRM-25 g (**)
Nitrógeno Líquido (NL)
Solución de carga (LS-P) (**)
Solución de descongelamiento (RS-P) (**)
Solución de Vitrificación de Plantas 2 (PVS2-P) (**)

(\*\*) Para la composición y preparación de soluciones y medios de cultivo ver: Banco de Germoplasma - Criopreservación - Soluciones y medios de cultivo - OP108

## PROCEDIMIENTO

### 1. Criterios de selección y calidad generales para la criopreservación

1.1. Seleccionar las accesiones a criopreservar de acuerdo al siguiente orden de prioridad: (a) accesiones que están incluidas en el Tratado Internacional sobre los Recursos Fitogenéticos para la

Agricultura y Alimentación (PGRFA), (b) accesiones que tienen su identidad genética verificada y confirmada ("true-to-type"), (c) accesiones que son fitosanitariamente limpias (HS2) (si no hay accesiones disponibles en HS2, utilizar accesiones con estado fitosanitario HS2R) y, (d) accesiones que forman parte de la colección núcleo.

**1.2.** Criopreservar 150 yemas apicales por accesión y repetición, colocando 10 yemas por criovial. Descongelar 30 de 150 yemas apicales para la evaluación rutinaria de viabilidad, después que las yemas se encontraron por un tiempo mínimo de 24 horas en nitrógeno líquido (NL). Evaluar sobrevivencia y recrecimiento, 30 y 60 días después del descongelamiento. Transferir solamente aquellas accesiones a los tanques de criobanco y copia de seguridad, que no muestran signos de contaminación fúngica o bacteriana y que cumplan los criterios mínimos de viabilidad (ver puntos 1.4 a 1.6). Aceptar las muestras como recuperadas si desarrollan en plantas *in vitro* con atributos normales, incluyendo tallo elongado, ápice, hojas y raíces.

**1.3.** Si los tres viales de la evaluación rutinaria de la primera repetición muestran una viabilidad **igual o mayor a 30%**, se requiere una sola repetición. Colocar 2 viales en una criocaja para fines de copia de seguridad y 10 viales en una criocaja del criobanco. (\*)

**1.4.** Si los tres viales de la evaluación rutinaria de la primera repetición muestran una viabilidad **entre 20% y 30%**, realizar una segunda repetición de 150 yemas. La toma de decisión depende de los resultados de la segunda repetición:

**(a)** Si la segunda repetición muestra una viabilidad igual o mayor a 20%, conservar ambas repeticiones en los tanques de criobanco y copia de seguridad. Para la primera repetición, asignar 4 viales a una criocaja de la copia de seguridad, y 8 viales a una criocaja del criobanco (\*\*). La distribución de los viales de la segunda repetición depende de su viabilidad:

- Si la segunda repetición muestra una viabilidad igual a 20% pero menos que 30%, asignar 4 viales a la copia de seguridad y 8 viales al criobanco (\*\*).
- Sin embargo, si la segunda repetición muestra una viabilidad de igual o mayor a 30%, asignar 2 viales a la copia de seguridad y 10 viales al criobanco (\*).

**(b)** Si la segunda repetición muestra una viabilidad menor a 20%, eliminar y rehacer la segunda repetición. Si el nuevo intento de la segunda repetición muestra una viabilidad igual o mayor a 20%, proceder como está descrito en paso 1.4.a. Sin embargo, si el nuevo intento de la segunda repetición muestra una viabilidad menor a 20%, descartar la segunda repetición, guardar solamente la 1ra repetición y marcar la accesión con "baja viabilidad" en la base de datos.

**1.5.** Si la primera repetición muestra una viabilidad **menor a 20%**, no criopreservar una segunda repetición, y descartar la primera repetición. Marcar la accesión en la base de datos con "baja viabilidad" (menor a 20% pero no 0%) o de "crio-recalcitrante" (0% de viabilidad). Aquellas accesiones se criopreservarán en el futuro con un protocolo mejorado.

Si se almacena menos que 12 viales por accesión y repetición, a causa de una verificación de contaminación (ver paso 10), la distribución de crioviales entre criobanco y copia de seguridad es la siguiente :

**(\*)**

-11 viales --> caja de la copia de seguridad: 2 viales, caja del criobanco: 9 viales

-10 viales --> caja de la copia de seguridad: 2 viales, caja del criobanco: 8 viales  
-9 viales --> caja de la copia de seguridad: 2 viales, caja del criobanco: 7 viales

(\*\*)

-11 viales --> caja de la copia de seguridad: 3 viales, caja del criobanco: 8 viales  
-10 viales --> caja de la copia de seguridad: 3 viales, caja del criobanco: 7 viales  
-9 viales --> caja de la copia de seguridad: 3 viales, caja del criobanco: 6 viales

## **2. Cultivo *in vitro* de plantas madres**

**2.1 Primer ciclo de multiplicación:** Propagar explantes axilares (con 2-3 nudos) de plantas *in vitro* de papa en medio de cultivo MSA (ver OP 108), colocando cuatro explantes por tubo de ensayo de 25x150 mm. Propagar un número total de 6-7 tubos. Realizar la propagación con pinzas largas y bisturí No. 10, encima de una pila de 2-3 hojas bond estériles. Reemplazar la pila de hojas periódicamente para evitar contaminación cruzada. Etiquetar tubos con etiquetas de código de barra que contienen código de laboratorio de la accesión, número CIP de la accesión, nombre común de la accesión, fecha de propagación, estado sanitario, lote de medio de cultivo y el ID de la persona que ha impreso las etiquetas. Incubar por 2-3 semanas a una temperatura de  $20\pm 2$  °C e intensidad de luz de  $85\pm 20$   $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Como fuente de luz utilizar tubos fluorescentes de luz fría del día, con un fotoperiodo de 16h/8h de luz/oscuridad.

**2.2 Segundo ciclo de multiplicación:** Propagar explantes axilares (con 2-3 nudos) de plantas *in vitro* de papa en medio de cultivo MSA (ver OP 108), colocando cuatro explantes por tubo de ensayo de 25x150 mm. Propagar un número total de 14-16 tubos. Etiquetar tubos con etiquetas de código de barra que contienen código de laboratorio de la accesión, número CIP de la accesión, nombre común de la accesión, fecha de propagación, estado sanitario, lote de medio de cultivo y el ID de la persona que ha impreso las etiquetas. Incubar por 3 semanas a una temperatura de  $20\pm 2$  °C e intensidad de luz de  $85\pm 20$   $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Como fuente de luz utilizar tubos fluorescentes de luz fría del día, con un fotoperiodo de 16h/8h de luz/oscuridad.

**2.3 Tercer ciclo de multiplicación:** Propagar explantes axilares (de un nudo) de plantas *in vitro* de papa en medio de cultivo MSA (ver OP 108), colocando 25 explantes por envase de magenta GA7. Propagar un número total de 8 magentas. Etiquetar cada magenta con etiquetas de código de barra que contienen código de laboratorio de la accesión, número CIP de la accesión, nombre común de la accesión, fecha de propagación, estado sanitario, lote de medio de cultivo y el ID de la persona que ha impreso las etiquetas. Colocar los 8 envases de GA7 magentas de la misma accesión en una sola gradilla para evitar mezclas y facilitar el manejo. Incubar por 2 semanas a una temperatura de  $20\pm 2$  °C e intensidad de luz de  $85\pm 20$   $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Como fuente de luz utilizar tubos fluorescentes de luz fría del día, con un fotoperiodo de 16h/8h de luz/oscuridad.

**2.4 Ciclo final de multiplicación (= Instalación):** Propagar explantes **apicales** (de un nudo) de plantas *in vitro* de papa en medio de cultivo MSA (ver OP 108), colocando 60-70 explantes apicales por placa petri profunda. Propagar un número total de tres placas petri (180-210 explantes). Etiquetar cada placa petri con etiquetas de código de barra que contienen código de laboratorio de la accesión, número CIP de la accesión, nombre común de la accesión, fecha de propagación, estado sanitario, lote de medio de cultivo e ID de la persona que ha impreso las etiquetas. Incubar por 2-3 semanas (dependiente del genotipo) a

una temperatura de  $7\pm 1$  °C e intensidad de luz de  $15\pm 5$   $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Como fuente de luz utilizar tubos fluorescentes de luz fría del día, con un fotoperiodo de 16h/8h de luz/oscuridad.

### **3. Escision de yemas apicales**

**3.1.** Distribuir por acesión 15 papeles filtro pequeños (10x10 mm) en una placa petri descatalogada con medio de cultivo MSA estéril (ver OP 108).

**3.2.** Escindir bajo el estereoscopio (10x) yemas apicales de plantas *in vitro* de papa de 2-3 semanas de edad. Hacer la escisión con ayuda de pinzas largas y bisturí No. 11, encima de una pila de 2-3 hojas bond estériles. Reemplazar la pila de papel periódicamente para evitar contaminación cruzada. Las yemas apicales deben contener 2-4 primordios foliares, tener una longitud de 0.8-1.2 mm y un ancho de 0.3-0.7 mm. El valor referencial del ancho de yema se ha tomado a la altura del meristemo y varía dependiendo del genotipo. Escindir por acesión 150 yemas apicales, colocándolas sucesivamente encima de los 15 papeles de filtro pequeños hasta cada uno contiene 10 yemas (primero colocar una sola yema encima de cada uno de los 15 papeles, luego colocar la segunda yema encima de cada uno, luego la tercera, y así sucesivamente). Al final del proceso de criopreservación, 120 de 150 yemas se conservarán en NL (criobanco y copia de seguridad), y 30 yemas se descongelarán para determinar la viabilidad (después de un tiempo mínimo de 24 horas en NL).

### **4. Pasos preparativos para la criopreservación**

**4.1.** Desinfectar bulbos de jebe (2 mL) en un recipiente de vidrio con alcohol (96%). Instalar bulbos de jebe en las pipetas pasteur estériles estandarizadas de la Soluciones de Carga (LS) y Vitrificación de Plantas 2 (PVS2). Colocar pipetas individualmente en tubos de ensayo estériles con tapa en rosca (de 15 mL). Las soluciones LS y PVS2 pipetear siempre con su correspondiente pipeta pasteur de vidrio estandarizada para evitar mezclar soluciones y problemas durante el manejo de las yemas apicales. Para la composición y preparación de las soluciones LS y PVS2 ver OP 108. Si la punta de pipeta entra en contacto con objetos no estériles, o absorbe una solución no apropiada, reemplazar la pipeta por una nueva estéril del mismo tipo (LS o PVS2).

**4.2.** Llenar batea de hielo (capacidad de 9 litros) con hielo en escarcha. Homogenizar LS y PVS2 con mezclador de vibración (Maxi Mix 2). Colocar Eppendorf con PVS2 en hielo en escarcha (0 °C) a una profundidad de aprox. 3/4 del tubo Eppendorf. Imprimir 15 etiquetas pequeñas para los tubos de ensayo con LS/PVS2 (15 mL) y pegarlas encima las tapas de los 15 tubos. Las etiquetas LS-PVS2 contienen código de laboratorio de la acesión, "LS: " y "PVS2: ". Utilizando la pipeta pasteur de la solución LS, dispensar aprox. 2.0 mL de la solución LS por tubo de ensayo con tapa en rosca.

**4.3.** Utilizando la pocket PC registrar la siguiente información en la base de datos: identificador de la repetición (1ra o 2da repetición), fechas de escisión y congelamiento, nombre de la persona que realiza la escisión y el congelamiento, número de yemas a criopreservar, identificador del protocolo usado y observaciones (opcional, solamente si se requiere). Vía pocket PC imprimir 15 etiquetas criogénicas de código de barra.

Las etiquetas deben contener la siguiente información: número CIP de la acesión, código de laboratorio de la acesión, fecha de congelamiento y abreviatura del protocolo utilizado. Usando un marcador criogénico identificar 13 criotubos con código de laboratorio de la acesión y fecha de congelamiento.



Etiquetar crioviales con su correspondiente etiqueta de código barra. Colocar crioviales abiertos en el soporte del sistema de congelamiento (CF 30 Cool Box System) e identificar las filas respectivas del soporte con una de las 15 etiquetas de código barra criogénicas impresas.

12 de las 15 etiquetas identifican los crioviales que están designados al criobanco y copia de seguridad. 1 etiqueta identifica el criovial que contendrá los 3 papeles de aluminio (30 muestras) para la evaluación rutinaria de viabilidad, 1 etiqueta identifica la ubicación (filas) de la accesión en el soporte de congelamiento, y 1 etiqueta puede ser usada como adicional en el caso que se presentaría alguna inconveniente durante el etiquetado.

**4.4.** Colocar franjas pequeñas de aluminio previamente esterilizadas (0.5 x 2.0 cm) en una placa petri standard estéril. Doblar con una pinza de algodón ligeramente uno de los extremos de la franja de aluminio (dobladura de aprox. 3 mm).

## **5. Crioprotección: Soluciones de Carga (LS) y Vitrificación de Plantas (PVS2)**

**5.1.** Utilizando pinzas de algodón, introducir el papel filtro con las 10 yemas apicales en uno de los tubos de ensayo con LS. Agitar suavemente. Verificar que todas las yemas están sumergidas en LS. Tratar las yemas por 20 minutos con LS. Utilizando un lapicero registrar la hora de término del tratamiento con LS en la etiqueta del tubo y monitorear el tiempo de tratamiento con un cronómetro digital. Hacer una pausa de 1-2 minutos entre cada tubo de ensayo.

**5.2.** Colocar un vaso de vidrio estéril en la cámara de flujo laminar. Cuando el tratamiento con LS ha concluido (20 minutos), absorber con la pipeta pasteur la solución LS restante, de tal manera que las yemas se mantengan en el tubo de ensayo. Descartar la solución LS al vaso de vidrio estéril. Utilizando la pipeta pasteur que corresponde a la solución PVS2, colocar aprox. 2.0 mL de PVS2 frío (0 °C) al tubo de ensayo que contienen las yemas. Cerrar el tubo con su tapa estéril. Verificar que todas las yemas están sumergidas en PVS2. Tratar las yemas por 50 minutos con PVS2 (a 0 °C). Utilizando un lapicero, registrar la hora de término del tratamiento con PVS2 en la etiqueta del tubo. Colocar el tubo en hielo en escarcha a una profundidad de aprox. 3/4 del tubo. Monitorear el tiempo de tratamiento de PVS2 con un cronómetro digital.

## **6. Congelamiento en NL**

**6.1.** Dos minutos antes de terminar el tratamiento con PVS2, vaciar cuidadosamente NL desde el dewar de 4 litros hacia el contenedor de congelamiento (utilizar guantes criogénicos y lentes de seguridad herméticos). Si es necesario, recolocar los crioviales (sin tapa) con pinza de algodón en los orificios correspondientes del soporte de congelamiento. El nivel de nitrógeno debe estar aprox. 1.0 cm encima de la boca de los crioviales. Colocar y sumergir las tapas de los crioviales en NL para su esterilización adicional.

**6.2.** Absorber con la pipeta de PVS2 las 10 yemas apicales contenidas en la solución PVS2, apoyar la punta de la pipeta en el fondo del tubo y expulsar lentamente el PVS2 de la pipeta. Las yemas apicales deben estar contenidas en un volumen muy pequeño de PVS2 (aprox. 10 µL) en la punta de la pipeta.

**6.3.** Colocar las yemas junto con la gota de PVS2 encima de una franja delgada de aluminio (5 x 20 mm). La franja de aluminio debe estar doblada en uno de sus extremos para facilitar su manipulación con la pinza de algodón.

**6.4.** Introducir la franja de aluminio rápidamente al NL (= congelamiento rápido) y transferirla al correspondiente criovial etiquetado. Mover la franja solamente por debajo de la superficie del NL. Colocar una sola franja por criovial (= 10 yemas apicales). Rellenar el contenedor del sistema de congelamiento periódicamente con NL para asegurar que los crioviales siempre están sumergidos adecuadamente. Colocar las tres franjas de aluminio (= 30 yemas) de la verificación de viabilidad juntos en un solo criovial.

**6.5.** Una vez que se ha terminado el proceso de congelamiento de todas las accesiones (del día laboral), asignar 12 crioviales para el criobanco y copia de seguridad. Utilizando alicate de punta, cerrar las tapas de los crioviales fuertemente. Las 3 franjas de aluminio (= 30 yemas) para la verificación de viabilidad rutinaria son descongeladas en RS y cultivadas en medio de recuperación, después de haber estado por un tiempo mínimo de 24 horas en NL.

**6.6.** Colocar el criotank de trabajo (equipado con cañas de aluminio) al lado de la cámara de flujo laminar. Abrir el tanque. Utilizando un marcador criogénico, identificar las cañas de aluminio con los códigos de laboratorio de las accesiones que van a contener. Las cañas de aluminio tienen una capacidad de 4 crioviales por caña. Por accesión, identificar 3 cañas con el código de laboraotrio de la accesión correspondiente y pre-congelar las cañas en NL (dentro de los vasos del tanque). Con ayuda de un alicate de punta, transferir los crioviales rápidamente (12 crioviales por accesión) desde el contenedor de congelamiento hacia la correspondiente caña de aluminio pre-congelada , y sumergir la caña inmediatamente en NL. Exponer los crioviales solamente por un tiempo mínimo a condiciones ambientales normales y re-sumergirlos rápidamente en NL. El criotank de trabajo (equipado con cañas de aluminio) contiene 6 vasos cilíndricos con una capacidad máxima de approx. 45 cañas por vaso. La capacidad total del tanque de trabajo de cañas es de approx. 75 accesiones.

Colocar el criovial que contiene las 3 franjas de aluminio (= 30 yemas apicales) de la verificación de viabilidad rutinaria en un vaso separado del tanque de trabajo. Verificar regularmente el nivel de NL en el tanque de trabajo y rellenar cuando es necesario.

## **7. Descongelamiento en Solución de Recalentamiento (RS)**

**7.1.** Desinfectar los bulbos de jebes (2 mL) en un envase de vidrio con alcohol (96%). Instalar bulbo de jebes en la pipeta pasteur estéril estandarizada para la Solución de Recalentamiento (RS) y colocar la pipeta en un tubo de ensayo estéril con tapa en rosca (de 15 mL). La composición y preparación de la solución RS están descritos en OP 108. Si la punta de la pipeta entra en contacto con algún objeto no estéril, reemplazar la pipeta inmediatamente por una nueva pipeta estéril y estandarizada.

**7.2.** Descongelar en grupos de 6 accesiones. Llenar 18 tubos de ensayo con tapa en rosca estériles con RS (4 mL de RS por tubo) y disponer los tubos en la gradilla de tubos de ensayo en 6 filas con 3 tubos por fila. Cada fila corresponderá a una accesión. Utilizando la pocket PC, imprimir 4 etiquetas pequeñas por accesión. Las etiquetas de RS contienen el código de laboratorio de la accesión, y "RS:". 3 de 4 etiquetas son utilizadas para identificar cada uno de los tubos RS de la accesión correspondiente, y la cuarta etiqueta identifica la placa petri que contiene el Medio de Recuperación de Papa I a cual se transfiere la yemas apicales.

**7.3.** Utilizando la pocket PC, crear la lista de las accesiones por descongelar. Llenar el contenedor de congelamiento con NL. Con ayuda de un alicate de punta, transferir los crioviales de verificación de viabilidad de 12 accesiones desde el tanque de trabajo al soporte del contenedor de congelamiento (CF 30 Cool Box System). Colocar los crioviales en 2 columnas con 6 crioviales por columna. Separar las 2 columnas por una columna vacía. Abrir los crioviales con un alicate de punta. Procesar las accesiones de acuerdo a su posición en la columna.

**7.4.** Colocar 6 papeles filtro grandes (de aprox. 25x30 mm) encima de una pila de 3-6 hojas bond estériles. Colocar 3 papeles filtro pequeños (de aprox. 10x10 mm) encima de cada uno de los papeles filtros grandes. El "sándwich de papeles filtro" absorbe el exceso de la solución RS después del descongelamiento. Por accesión colocar 3 papeles filtro estériles grandes (de aprox. 25x30 mm) en cada una de las placas petri con medio de Recuperación de Papa I estéril (PRM-0.3M, ver OP 108). Los papeles filtro grandes soportan las yemas apicales durante los tres primeras etapas del proceso de recuperación (Medios de Recuperación I a III, ver OP 108). Colocar la correspondiente cuarta etiqueta RS (ver paso 7.2) en la tapa de la placa petri con medio de Recuperación de Papa I. El orden de accesiones dentro de la pila de placas petri debe coincidir con el orden en que las accesiones son procesadas (= posiciones de las accesiones dentro del contenedor de congelamiento).

**7.5.** Utilizando pinzas de algodón, transferir rápidamente las 3 franjas de aluminio de la primera accesión del criovial hacia los tubos de ensayo con RS correspondientes (una franja por tubo de ensayo). Remover el criovial vacío del contenedor de congelamiento. Como control de calidad adicional, colocar la etiqueta del criovial en la tapa de la correspondiente placa petri con medio de Recuperación de Papa I (dejar la etiqueta primero secar antes de colocarla).

**7.6.** Inmediatamente agitar el tubo de ensayo con RS para asegurar un descongelamiento rápido. Tener cuidado que todas las yemas apicales quedan sumergidas en RS y evitar que las yemas se adhieren a la pared del tubo. Tratar las yemas apicales por 20 minutos en RS (a temperatura ambiental). Utilizando un lapicero, registrar la hora de término del tratamiento con RS en la etiqueta del tubo. Monitorear el tiempo de tratamiento de RS con un cronómetro digital.

## **8. Ciclo de recuperación**

**8.1.** Utilizando la pipeta de RS, absorber las yemas apicales de la solución RS y colocarlas por aprox. 1-3 minutos en los pequeños papeles filtro estériles (para drenar el exceso de la solución RS). Para transferir las yemas apicales desde el papel filtro de drenaje hacia el medio de recuperación, deslizar el papel filtro pequeño, con las yemas dirigidas hacia abajo, encima de uno de los papeles filtros grandes que se soportan encima de Medio de Recuperación de Papa I, de tal manera que se descargan las yemas en el papel filtro del medio de recuperación. Verificar que el tubo de ensayo de la solución RS y la placa petri con medio de recuperación están identificados con el mismo código de laboratorio.

**8.2.** Sellar placas petri con parafilm. Colocar etiqueta del criovial en la tapa de la correspondiente placa petri con medio de recuperación (ver paso 7.5). Después de cada 6 accesiones, leer con la pocket PC las etiquetas de código barra de las placas petri y registrar la data de descongelamiento. Utilizado la impresora de mano imprimir etiquetas detalladas. Etiquetar las placas petri. Las etiquetas contienen la siguiente información: número CIP de la accesión, código de laboratorio de la accesión, ID de la persona

que ha criopreservado la accesión, fecha de congelamiento, fecha de descongelamiento, y la fecha en cual se colocaron las yemas en Medio de Recuperación de Papa I. Envolver las placas petri en papel aluminio (oscuridad). Incubar yemas por 3 días a  $20\pm 1$  °C.

**8.3.** Después de 3 días en Medio de Recuperación de Papa I, transferir papeles filtros con yemas apicales a medio de Recuperación de Papa II estéril (PRM-0.2M, ver OP108). Transferir la tapa de la placa petri original, proveniente de la placa con Medio de Recuperación de Papa I, hacia la placa petri nueva von Medio de Recuperación de Papa II (para facilitar el etiquetado). Utilizando la pocket PC, leer la etiqueta de código barra de la placa petri original, registrar data de transferencia e imprimir nuevas etiquetas con la impresora de mano. Las etiquetas contienen la siguiente información: número CIP de la accesión, código de laboratorio de la accesión, ID de la persona que ha criopreservado la accesión, fecha de congelamiento, fecha de descongelamiento, y las fechas en cuales se colocaron las yemas en Medio de Recuperación de Papa I y II. Colocar la etiqueta nueva encima de la antigua. Envolver las placas petri en papel aluminio (oscuridad). Incubar yemas por 3 días a  $20\pm 1$  °C.

**8.4.** Después de 3 días en Medio de Recuperación de Papa II, transferir papeles filtros con yemas apicales hacia Medio de Recuperación de Papa III estéril (PRM-0.3M, ver OP108). Transferir la tapa de la placa petri original, proveniente de la placa con Medio de Recuperación de Papa II, hacia la placa petri nueva von Medio de Recuperación de Papa III (para facilitar el etiquetado). Utilizando la pocket PC, leer la etiqueta de código barra de la placa petri original, registrar data de transferencia e imprimir nuevas etiquetas con la impresora de mano. Las etiquetas contienen la siguiente información: número CIP de la accesión, código de laboratorio de la accesión, ID de la persona que ha criopreservado la accesión, fecha de congelamiento, fecha de descongelamiento, y las fechas en cuales se colocaron las yemas en Medio de Recuperación de Papa I, II y III. Colocar la etiqueta nueva encima de la antigua. Envolver las placas petri en papel aluminio (oscuridad). Incubar yemas por 3 días a  $20\pm 1$  °C.

**8.5.** Después de 3 días en Medio de Recuperación de Papa III, transferir las yemas apicales hacia Medio de Recuperación de Papa IV estéril (PRM-25g, ver OP108). Antes de transferir una accesión, leer la etiqueta de código barra de la placa petri con pocket PC e imprimir 3 etiquetas por accesión (utilizando la impresora a mano). En esta etapa, colocar las yemas apicales directamente encima del medio de cultivo, sin soporte de papel filtro. Transferir las 10 yemas apicales de cada papel filtro a una placa petri individual con Medio de Recuperación de Papa IV estéril. Las etiquetas contienen la siguiente información: número CIP de la accesión, código de laboratorio de la accesión, ID de la persona que ha criopreservado la accesión, fecha de congelamiento, fecha de descongelamiento, las fechas en cuales se colocaron las yemas en Medio de Recuperación de Papa I, II, III y IV, ID de la repetición (primera o segunda), y el número de la placa petri ("1", "2" o "3"). Incubar yemas por 4 días a  $20\pm 1$  °C, bajo luz difusa con un fotoperiodo de 16h/8h (luz/oscuridad). Para simular la luz difusa, colocar una hoja de papel aluminio encima de las placas petri. Placas petri con signos de contaminación bacteriana o fúngica son procesadas como descrito en paso 10, sin proceder con la transferencia de las yemas.

**8.6.** Después de 4 días, remover el papel de aluminio de las placas petri e incubar las yemas por aprox. 18 días bajo normales condiciones ambientales de  $20\pm 2$  °C y  $85\pm 20$   $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$  de intensidad luminosa, suministrada por tubos fluorescentes (luz fría del día) con un fotoperiodo de 16h/8h.

**8.7.** 30-35 días después del descongelamiento, transferir las yemas sobrevivientes y recuperadas a tubos de ensayo de 13x100 mm con Medio de Recuperación de Papa IV. Colocar un explante por tubo de ensayo (ver paso 9).

## **9. Evaluaciones rutinarias de viabilidad (30-35 y 60-65 días después del descongelamiento)**

**9.1.** Evaluar las tasas de sobrevivencia y recuperación 30-35 y 60-65 días después del descongelamiento. En la primera evaluación, 30-35 días después del descongelamiento, clasificar una yema como sobreviviente si presenta tejido verde, y como recuperada si crece un brote directa- o lateralmente a partir del domo meristemático, sin la formación intermedia de callo. Utilizando un marcador permanente, identificar las yemas sobrevivientes con un círculo negro vacío en la parte externa de la base de la placa petri. Identificar yemas apicales recuperadas con un círculo negro lleno. Yemas muertas o fenolizadas no son marcadas. Evaluar cada placa petri separadamente. Leer la etiqueta de código barra de la placa petri con la pocket PC y registrar la siguiente data: fecha de evaluación, ID de la persona que realizó la evaluación, número total de yemas por placa petri, número de yemas sobrevivientes y recuperadas en cada placa petri. El ID de la repetición (primera o segunda), y el número de la placa petri ("1", "2" o "3") son incluidos en el código barra bi-dimensional de las etiquetas de las placas petri, y por eso se registran automáticamente. Para las tres placas petri debe obtenerse data completa. Procesar placas petri con signos de contaminación fúngica o bacteriana de acuerdo a lo descrito en paso 10, sin transferir las yemas a tubos de ensayo.

**9.2.** Para la transferencia a tubos de ensayo, procesar cada placa petri individualmente, 1-5 días después de la evaluación de 30-35 días. Ordena y apila las placas petri según código de laboratorio de las accesiones. Utilizando la pocket PC, leer la etiqueta de código barra de la placa petri que contiene las yemas a transferir. La pantalla de la pocket PC muestra la data de evaluación, ID de la placa petri e ID de la repetición. Verificar que los identificadores físicos (círculos negros) coincidan con la data de evaluación registrada. Utilizando la impresora a mano, imprimir etiquetas para los tubos de ensayo de 13x100 mm. Basado en la data de evaluación de 30-35 días, un algoritmo de la base de datos imprime el número de etiquetas necesarias para cada placa petri por transferir. Las etiquetas contienen la siguiente información: número CIP de la accesión, código de laboratorio de la accesión, ID de la persona que ha realizado la transferencia, fechas de congelamiento y descongelamiento, fecha actual, ID de la repetición (primera o segunda) y el número de la placa petri ("1", "2" y "3"). Antes de transferir las muestras., etiquetar los tubos de ensayo.

**9.3.** Utilizando pinzas de algodón, transferir muestras cuidadosamente desde las placas petri a los tubos de ensayo de 13x100 mm con Medio de Recuperación de Papa IV (PRM-25g, ver OP108). Colocar una muestra por tubo de ensayo. Manejar cada placa petri por separado y transferir solamente las yemas sobrevivientes y/o recrecidas a tubos de ensayo. Muestras enraizadas son transferidas directamente (= trasplante). Si la muestra tiene un tallo elongado sin raíces, cortar ligeramente la parte basal del explante para estimular la formación de raíces. Transferir directamente yemas pequeñas (yemas sin elongación de tallo). Almacenar tubos de ensayo en gradillas, organizado por accession e ID de placa petri (en filas).

**9.4.** Realizar la segunda y final evaluación de viabilidad 60-65 días después del descongelamiento (en tubos de ensayo). Solamente las muestras que desarrollaron en plantas in vitro completas son contadas como recuperadas. Las plantas deben tener un aspecto normal (sin deformaciones o vitrificación) y tener tallo elongado, apices, hojas y raíces. Evaluar las tres filas de cada accession, donde cada una corresponde a un grupo de placa petri distinto ("1", "2" ó "3"). Utilizando la pocket PC, leer la etiqueta de uno de los tubos de ensayo del grupo de placa petri a evaluar. Verificar que los restantes tubos de ensayo de la fila corresponden a la misma accession y grupo de placa petri. Registrar con la pocket PC la siguiente información: fecha de evaluación, ID de la persona que realizó la evaluación, número total de

yemas, número de yemas sobrevivientes y recuperadas. Los IDs de la repetición (primera o segunda) y de los grupos de placa petri (“1”, “2” ó “3”) son incluidos en las etiquetas de código de barra bidimensional y por consiguiente son registrados automáticamente. Adicionalmente registrar la siguiente información: número de plantas completas (registradas como yemas recuperadas), número de plantas sin raíz (cortar en su base y transferirlas a medio de cultivo fresco), número de plantas con deformaciones (registradas como yemas sobrevivientes), muestras fenolizadas (registradas como yemas muertas), número de muestras con yema pequeña (transferir directamente a medio de cultivo fresco), número de muestras blancas/muertas (registradas como yemas muertas). Los grupo de tubos de ensayo con signos de contaminación fúngica o bacterial son procesadas como descrito en paso 10 (“Verificación de Contaminación”).

**9.5.** Transferir aquellas muestras a tubos de ensayo de 13x100 mm (con Medio de Recuperación IV), que no se pueden clasificar claramente en recuperadas (p.ej sobrevivientes), o que aún no han desarrollado en una planta *in vitro* completa (p.ej. falta de raíces), de acuerdo a los criterios descritos en paso 9.4. Reevaluar las plantas tres semanas más tarde y actualizar la data de evaluación acordemente.

## **10. Verificación de Contaminación**

**10.1.** Excepcionalmente, las accesiones pueden mostrar signos de contaminación en alguna de las siguientes etapas del ciclo de recuperación: (a) transferencia de yemas apicales a Medio de Recuperación III ó IV, (b) evaluaciones de viabilidad de 30-35 y 60-65 días. Leer con la pocket PC las etiquetas de código barra de la(s) placa(s) petri o tubo(s) de ensayo contaminados y registrar la siguiente información: tipo de contaminación (fúngica o bacteriana), fecha de registro de contaminación e ID de la persona que registró la contaminación. Los IDs de la repetición (primera o segunda) y placa petri (“1”, “2” ó “3”) son incluidos en el código bara bidimensional de la(s) placa(s) petri o tubo(s) de ensayo, y por consiguiente son registrados automáticamente. A fin de obtener data de evaluación completa y confiable para las tres placas petri, remover los crioviales adicionales necesarios del tanque de trabajo o de almacenamiento transitorio. Registrar con la pocket PC el retiro de los criovial(es) para actualizar el stock y la ubicación de la accession. Para fines de verificación de contaminación, evaluar la viabilidad de los crioviales retirados como está descrito en paso 9 (“Verificación de Viabilidad Rutinaria”).

**10.2.** Si la verificación confirma la contaminación, descartar la repetición respectiva de la accession del tanque de trabajo o de almacenamiento transitorio y criopreservar la accession de nuevo. Si la verificación no muestra signos de contaminación, registrar la data de evaluación de los viales verificados como data original de la evaluación rutinaria, reemplazando la data de los viales contaminados.

El retiro de crioviales para la verificación de contaminación puede realizarse en paralelo con los procesos de descarte de accesiones (ver paso 13) y transferencia de accesiones a los tanques del criobanco y copia de seguridad temporal (ver paso 14).

## **11. Transferencia de accesiones al tanque de trabajo (en el laboratorio de criopreservación)**

**11.1.** Durante todo el proceso de transferencia, el personal debe vestirse con guantes criogénicos, delantal criogénico y lentes de seguridad herméticas. Para la transferencia, colocar una batea apta para contener NL (Magic Touch, capacidad de 9 litros) en la cámara de flujo laminar y llenar la batea con aprox. 3.5 cm de NL. Si una criocaja transitorio es etiquetado por primera vez (o re-etiquetado), colocar el

ID de la criocaja en los cuatro lados de la caja (utilizando un marcador criogénico). Utilizando la pocket PC, imprimir 4 etiquetas crio-resistentes por criocaja y colocarlas encima de los identificadores escritos a mano (por razones de seguridad, se identifica las criocajas tanto con marcador criogénico como con etiquetas de código barra bidimensional crio-resistentes). Los IDs únicos de las cajas transitorias alcanzan de Temp\_001 a Temp\_071 (para detalles ver la siguiente sección sobre "Transferencia de accesiones hacia los tanques transitorios 1 y 2").

Generalmente, las cajas transitorias re-circulan entre los criotanques transitorios 1 y 2 (Taylor Wharton LS-4800) y el tanque de trabajo de laboratorio de criocajas (CHART cryosystem 2000). Por consiguiente, estas criocajas ya están etiquetadas adecuadamente y pueden ser utilizadas directamente. Leer la etiqueta de la criocaja con la pocket PC. Colocar la criocaja en la batea con NL. Si es necesario, vaciar NL adicional a la batea.

**11.2.** Colocar los tanques de trabajo de cañas de aluminio (CHART MVE XC47/11) y de criocajas (CHART Cryosystem 2000) al lado de la cámara de flujo laminar. El tanque de trabajo con cañas de aluminio contiene las accesiones a transferir (ver paso 6.6) y el tanque a base de criocajas va a recibir las accesiones. El tanque a base de criocajas tiene 4 soportes de cajas, con una capacidad máxima de 5 criocajas por soporte (capacidad total del tanque: 20 criocajas). Colocar un máximo de 5 accesiones por criocaja transitoria (12 crioviales por accesión). La criocaja standard tiene una capacidad de 10 crioviales. Cada accesión ocupa dos filas dentro de la caja. Las posiciones libres restantes de una fila no deben ser ocupadas por otra accesión. Por ejemplo: la primera accesión ocupará las posiciones 1-12 en la criocaja, pero las 8 posiciones libres de la segunda fila (posición 13-20) no serán ocupadas. La segunda accesión de la caja ocupará las posiciones 20-32, y así sucesivamente.

**11.3.** Utilizando un alicate de punta, transferir las accesiones rápidamente desde las cañas de aluminio hacia la criocaja. Verificar que los crioviales de la misma accesión son etiquetados idénticamente. Cuando la criocaja está completamente llena, leer con la pocket PC el primer vial de cada accesión (posiciones 1, 21, 41, 61 y 81). La pocket PC asignará automáticamente las posiciones a cada accesión (es decir 1-12, 21-32, 41-52, 61-72 y 81-92). Verificar que el número de viales y su posición física coinciden con el registro electrónico. Utilizando la pocket PC, registrar y verificar la siguiente información: fecha de transferencia, ID de la persona que transferió la accesión, ID de la repetición (primera o segunda) y número de yemas criopreservadas.

**11.4.** Cerrar la criocaja cuidadosamente con su tapa. Una segunda persona levanta un soporte con posiciones libres del tanque de trabajo (de criocajas) y retira la barra de seguridad, mientras la primera persona levanta la criocaja en una de sus lados con ayuda de pinzas largas, toma la criocaja en el lado levantado y la coloca en la posición correspondiente del soporte. Tan pronto como la caja se encuentra en su ubicación, la segunda persona inserta la barra de seguridad y resumerge el soporte en el tanque. Cerrar el tanque. Proceder de la misma manera con todas las accesiones a transferir.

## **12. Transferencia de accesiones desde el tanque de trabajo (CHART Cryosystem 20000 hacia los tanques transitorios 1 y 2 (Taylor Wharton LS-4800)**

**12.1.** Cuando el tanque de trabajo de cajas está lleno (max. 20 criocajas), transferir las cajas hacia los criotanques transitorios 1 y 2 (Taylor Wharton LS-4800). Los tanques transitorios tienen 6 soportes cada uno, con una capacidad de 8 criocajas por soporte. La capacidad total por tanque es de 48 criocajas. Las ubicaciones de las criocajas dentro de los tanques transitorios son pre-definidas. El tanque transitorio 1

contiene las criocajas "Temp\_01" a "Temp\_48", y el tanque transitorio 2 las cajas "Temp\_49" a "Temp\_71". Las criocajas transitorias "Temp\_01" a "Temp\_08" son ubicadas en el soporte 1 del tanque transitorio 1. La criocaja "Temp\_01" es ubicada en la posición más alta del soporte 1 (cerca de la tapa del tanque). "Temp\_02" se ubica en la segunda posición más alta, "Temp\_03" en la tercera, y así sucesivamente. Las criocajas transitorias "Temp\_09" a "Temp\_16" son ubicadas en el soporte 2 del tanque transitorio 1. "Temp\_09" se ubica en la segunda posición más alta, "Temp\_10" en la tercera, y así sucesivamente.

De esta manera, la posición de cada criocaja transitoria ("Temp\_01" a "Temp\_71") queda pre-definida, tanto dentro de los tanque como en sus soportes. Los soportes 4 a 6 del tanque transitorio 2 son utilizadas para el almacenamiento transitorio de camote.

**12.2.** Colocar el tanque de trabajo (CHART cryosystem 2000) al lado de los criotankes transitorios 1 y 2 (Taylor Wharton LS-4800). Mientras una segunda persona levanta por un momento el soporte del tanque de trabajo, para que la primera persona puede leer las etiquetas de código barra de las criocajas (utilizando la pocket PC). Un algoritmo de la base de datos asigna automáticamente los IDs de los tanques transitorios (T1 o T2) y soportes (1 a 6) a las criocajas. Por consiguiente, la posición de cada caja es pre-definida y fija. a transitoria es predefinida y fija. Registrar y verificar con la pocket PC la fecha de transferencia y el ID de la persona que realizó la transferencia.

Transferir las criocajas transitorias desde el tanque de trabajo (CHART cryosystem 2000) hacia sus posiciones correspondientes en los tanques transitorios 1 y 2 (Taylor Wharton LS-4800).

### **13. Descarte de accesiones**

**13.1.** El descarte de accesiones de los criotankes se realiza por diferentes razones: (a) contaminación fúngica/bacteriana confirmada, (b) baja tasa de recuperación rutinaria, (c) verificación de viabilidad muestra una baja tasa de recuperación, (d) condiciones sub-óptimas de almacenamiento ó (e) bajo stock.

**13.2.** Utilizando la pocket PC, cargar la lista de accesiones por descartar. Ubicar el criotank y criocaja que contienen la(s) accesión(es) por descartar. Transferir la criocaja hacia una batea apta por contener NL (capacidad de 9 litros), que previamente ha sido llenado con approx. 3.5 cm de NL. Leer la etiqueta de código barra de la accesión por descartar (solamente la etiqueta del primer criovial de la accesión). Utilizando la pocket PC, registrar la fecha de descarte, el ID de la persona que realizó el descarte y la razón del descarte. Se graba automáticamente un registro de toda la data histórica en la base de datos. Descartar la accesión físicamente. Si no se descarta accesiones adicionales de la misma criocaja, cerrar la caja y recolocarla en su ubicación original. Las criocajas y tanques se manejan como descrito anteriormente.

El descarte de accesiones puede realizarse en paralelo con los procesos de verificación de contaminación (ver paso 10) y transferencia de accesiones a los tanques del criobanco y copia de seguridad temporal (ver paso 14)

### **14. Transferencia de accesiones a los tanques del criobanco y copia de seguridad temporal**

**14.1.** Transferir las accesiones que cumplen los criterios mínimos de recuperación y calidad (ver paso 1) desde los tanques transitorios (T1, T2) hacia los tanques de criobanco (P1 y P2) y copia de seguridad



temporal (BB-1). Las cajas del criobanco y copia de seguridad tienen identificadores únicos que alcanzan de P001 a P480 y BBP001 a BBP180, respectivamente. Las abreviaturas "P" y "BBP" significan "Papa" y "Black Box Potato" (= Copia de Seguridad de Papa), respectivamente. Identificar las criocajas de criobanco y copia de seguridad temporal con un marcador criogénico. Utilizando la pocket PC, imprimir 4 etiquetas de código barra crio-resistentes por criocaja y colocarlas encima de las identificadores escritos a mano. Por razones de seguridad, las criocajas son identificadas tanto con marcador criogénico como con etiquetas de código de barra bidimensional crio-resistentes.

**14.2.** Los tanques del criobanco y copia de seguridad (CHART MVE-819P-190AF) tienen 4 secciones. Cada una de las secciones puede contener 3 soportes de criocajas estándar (100 viales / caja) y 1 soporte para criocajas pequeñas (25 viales / caja). Ambos tipos de soporte tienen una capacidad de 15 criocajas por soporte. La capacidad total del tanque CHART MVE-819P-190AF es de 180 cajas estándar (100 viales/caja) y 60 criocajas pequeñas (25 viales/caja). Las ubicaciones de las criocajas dentro de los tanques de criobanco y copia de seguridad son pre-definidas, similarmente como anteriormente descrito para los tanques transitorios T1 y T2, con la diferencia que el orden de las criocajas dentro del soporte es invertido.

Por ejemplo: Las criocajas "P001" y "P015" del criobanco son ubicadas en el soporte 1 del tanque del criobanco de papa 1 (P1), donde "P001" es ubicado en la posición inferior (cerca a la base del tanque), "P002" en la segunda posición más baja, "P003" en la tercera, y así sucesivamente. Las criocajas "P016" a "P030" son colocados en soporte 2 del tanque de criobanco de papa 1 (P1), donde "P016" es ubicado en la posición inferior (cerca a la base del tanque), "P017" en la segunda posición más baja, "P018" en la tercera, y así sucesivamente. Los soportes de las criocajas de 100 viales tiene IDs que alcanzan de 1-3, 5-7, 9-11 y 13-15, mientras que los soportes de las cajas de 25 viales tienen los IDs 4, 8, 12 y 16. El criotank de la copia de seguridad temporal (BB-1) es organizado de una manera homóloga, pero las criocajas son identificadas con prefijos de "BB". En el tanque de copia de seguridad, los soportes 1-3, 5-7 y 9-11 (cajas de 100 viales) y 4, 8 y 12 (caja de 25 viales) son asignados a papa, mientras los soportes 13-16 se usan para la copia de seguridad de camote. Primero llenar las cajas de 100 viales, luego las cajas de 25-viales.

**14.3.** Asegurar que el tanque de trabajo de cajas (CHART cryosystem 2000) está vacío para poder utilizarlo como facilidad de almacenamiento transitorio durante las transferencias. Llenar dos bateas aptas para contener nitrógeno líquido (capacidad de 9 litros) con aprox. 3.5 cm de NL. Colocar las criocajas del criobanco y copia de seguridad temporal (sin tapa) en la batea más cercana y sumergirlas hasta la mitad en NL (usando pinzas largas), sin causar salpicaduras, derrames o entrar en contacto con el NL. Si es necesario, vaciar NL adicional a las bateas. Leer con la pocket PC las etiquetas de ID de las criocajas de criobanco y copia de seguridad temporal (= destino).

Usando la pocket PC, cargar la lista de las accesiones que están aptas para la transferencia y ordenar descendientemente por ID de criocaja (criocajas transitorias). Colocar la criocaja transitoria (p.ej. Temp\_03) que contiene la(s) accesion(es) a transferir en la otra batea. Leer la etiqueta de ID de la caja transitoria con la pocket PC (= fuente).

Utilizando la pocket PC, leer el criovial de la accesión a transferir. La pocket PC mostrará automáticamente la distribución de los crioviales entre las cajas de criobanco y copia de seguridad y su

posición dentro de las criocajas. Transferir las accesiones con pinzas largas o de algodón, desde las cajas de almacenamiento transitorio a las criocajas del criobanco y copia de seguridad temporal. Confirmar la transferencia en la pocket PC.

**14.4.** Una vez que se ha transferido todos los crioviales a las cajas del criobanco y copia de seguridad, cerrar la criocaja transitoria y regresarla en su posición correspondiente en el tanque transitorio (T1 o T2) o utilizar el criotank de trabajo (CHART Cryosystem 2000) para su almacenamiento transitorio, para luego transferir las cajas transitorias en grupo hacia los tanques T1 y T2.. Transferir la siguiente criocaja (con accesiones por transferir), desde el tanque transitorio a la batea con NL y proceder como descrito anteriormente. No es necesario leer las cajas de criobanco y copia de seguridad de nuevo hasta no sean reemplazadas por otra nueva y vacía. Cada vez que se reemplaza una criocaja transitoria por otra nueva, leer la etiqueta de ID de la criocaja transitoria. Monitorear continuamente el nivel de NL en las bateas y rellena con NL si es necesario.

**14.5.** Cuando la criocaja del criobanco o copia de seguridad están llenas, verificar la siguiente información antes de cerrar la caja con su tapa: fecha de transferencia, ID de la persona que realizó la transferencia, número de viales y muestras por caja, ID de la criocaja, ubicación de la criocaja, posición de los viales dentro de la caja, y el ID de la repetición (primera o segunda). Toda esta información se llena automáticamente en el momento de transferencia vía un algoritmo de la base de datos, pero es necesario verificar que la data electrónica, ubicación física y su identificación coinciden. Transferir las cajas de criobanco y copia de seguridad hacia el tanque de trabajo de cajas (CHART Cryosystem 2000) para su almacenamiento temporal (menos manipulación de los tanques de criobanco y copia de seguridad). Continuar procesando a todas las accesiones que cumplen los criterios de transferencia. Cada vez que se transfiere una accesión, se marca ésta automáticamente en la lista de transferencia de la pocket PC (control adicional).

La transferencia de accesiones a los tanques del criobanco y copia de seguridad temporal puede realizarse en paralelo con los procesos de verificación de contaminación (ver paso 10) y descarte de accesiones (ver paso 13).