

133

2º

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE CIENCIAS

**EFFECTO DE LA MEZCLA DE CRIOPROTECTORES
(DMSO-GLICEROL) SOBRE APICES CON PLACA
BASAL DE *Allium sativum* in vitro, CONGELADOS
A -196°C**

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
MARTIN MATA ROSAS

MEXICO, D. F.

1992

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

RESUMEN	1
I. INTRODUCCION	3
II. ANTECEDENTES	6
II.1 Conservación <i>in situ</i>	7
II.2 Conservación <i>ex situ</i>	8
II.3 Tipo de colecciones de germoplasma	8
II.4 Problemas con cultivos de propagación vegetativa y semillas recalcitrantes.	10
II.4.1 Cultivos de propagación vegetativa.	11
II.4.2 Especies con semillas recalcitrantes.	13
II.5 Conservación de germoplasma <i>in vitro</i> .	15
II.5.1 Estabilidad genética en cultivos <i>in vitro</i> .	19
II.6 Almacenamiento a plazo largo (Criopreservación).	20
II.6.1 Daño por congelación.	21
II.6.2 Velocidad de enfriamiento	24
II.6.3 Mecanismos de crioprotección natural.	25
II.6.4 Crioprotección artificial.	27
II.6.5 Crioprotectores penetrantes y no penetrantes.	29
II.6.6 Mezclas de crioprotectores.	33
II.6.7 Efecto tóxico de los crioprotectores.	34

II.7	Características del Glicerol y Dimetilsulfóxido.	35
II.7.1	Glicerol.	35
II.7.2	Dimetilsulfóxido (DMSO).	36
II.8	Criopreservación de meristemas y ápices.	37
II.8.1	Técnica para la criopreservación de meristemas.	38
II.8.2	Métodos de congelación de meristemas	38
II.9	Descripción del Ajo.	41
II.9.1	Clasificación taxonómica del ajo.	41
II.9.2	Origen	41
II.9.3	Uso y propiedades del ajo	42
II.9.4	Plagas y enfermedades del ajo.	43
III.	JUSTIFICACION	44
IV.	OBJETIVOS	46
V.	MATERIAL Y METODO	47
V.1	Mejoramiento del sistema económico de enfriamiento.	47
V.2	Determinación del perfil de temperatura.	48
V.3	Elaboración de mezclas crioprotectoras.	49
V.4	Extracción de ápices con placa basal de <i>A. sativum</i> .	51
V.5	Exposición de los ápices a las mezclas crioprotectoras.	53
V.6	Congelación de explantes.	54

VI.	RESULTADOS Y DISCUSION.	58
VI.1	Mejoramiento del sistema económico de conservación.	58
VI.2	Perfil de temperatura.	61
VI.3	Comportamiento de las mezclas crioprotectoras al ser enfriadas.	64
VI.4	Efecto citotóxico de las mezclas de crioprotectores (DMSO-Glicerol) sobre ápices con placa basal de <i>A sativum</i> .	72
VI.5	Congelamiento de explantes.	87
VII.	CONCLUSIONES GENERALES.	94
	BIBLIOGRAFIA.	97

RESUMEN

Debido a los problemas de conservación a largo plazo de las especies que presentan semillas recalcitrantes y que se reproducen por vía vegetativa. En el presente trabajo se intentó establecer el estudio preliminar para la conservación de germoplasma a largo plazo de las especies de difícil almacenamiento, mediante técnicas de crioconservación de bajo costo.

Se intentó crioconservar ápices con placa basal de ajo *Allium sativum* variedad Taiwan. El medio para establecer los cultivos *in vitro* del ajo fue, el de Murashige y Skoog (MS) sólido sin hormonas con 7 g de agar.

Se evaluó el efecto citotóxico que presentan los explantes al exponerlos a las mezclas de las soluciones crioprotectoras dimetil sulfóxido (DMSO) y glicerol en diferentes concentraciones, así como a diferentes tiempos de exposición (15, 30 y 60 min.), observando que las diferentes mezclas y tiempos, presentaron efectos citotóxicos en la mayoría de los casos.

Los ápices con placa basal se expusieron a las diferentes mezclas de soluciones crioprotectoras por lapsos de 30 y 60 min., se congelaron posteriormente mediante el método de enfriamiento lento, hasta llevarlos a una temperatura de -40°C para introducirlos directamente en Nitrógeno Líquido (NL) y así dejarlos almacenados por espacio de 30 min. Posteriormente los explantes fueron descongelados rápidamente, sembrados en MS sólido y puestos en una cámara de cultivo a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 1000 lux y fotoperiodo de 16 hrs., para su recuperación.

Después de siete meses los explantes no reasumieron su crecimiento, aunque presentaron actividad metabólica al

realizarles la prueba de viabilidad con el 2, 3, 5 Cloruro de Trifenil Tetrazolio (CTT), por lo que el método aquí empleado ofrece la posibilidad de continuar investigando en el tema, para lograr la conservación de germoplasma valioso a largo plazo.

Además de establecer las bases para el estudio de la crioconservación, se estableció un método de bajo costo para el enfriamiento mediante el empleo de los vapores que genera el nitrógeno líquido en el interior del termo y la altura a la cual se colocan los explantes, con lo que se logra obtener tasas de enfriamiento lentas, mismas que se han empleado para crioconservar la mayoría de las especies reportadas en la bibliografía sobre el tema.

I. INTRODUCCION

Debido al creciente aumento poblacional, los recursos genéticos vegetales han jugado un importante papel como fuente original de energía, pero la variabilidad genética de muchas especies se ha visto disminuida principalmente porque las poblaciones silvestres han sufrido alteraciones o pérdida de su hábitat natural y a la necesidad de producir especies mejoradas para lograr grandes producciones que las hace altamente homogéneas. De lo anterior surge la necesidad de conservar los recursos naturales, la propuesta de cualquier técnica diseñada para la conservación de los recursos vegetales debe estar encaminada a preservar la mayor diversidad posible para su uso en un futuro (Brian, 1990). Una efectiva conservación genética ayudará a cubrir las necesidades del futuro en términos del mantenimiento de las poblaciones vegetales tanto silvestres como cultivadas.

La estrategia de conservación del germoplasma vegetal, dependerá de la naturaleza del material biológico, definida principalmente por su ciclo de vida, el modo de reproducción, el tamaño de los individuos y el estatus ecológico (silvestre o domesticada) (Rubluo, 1985).

La forma tradicional de conservación es mediante el almacenamiento de semillas que Roberts (1973) denominó como ortodoxas, estas semillas pueden mantenerse relativamente fácil, ya que son almacenadas a temperaturas inferiores a -18°C y con contenidos de humedad del 5 al 7%, manteniendo su viabilidad, afortunadamente la mayoría de la especies vegetales producen este tipo de semillas, pero existen especies que no producen semillas y su reproducción es por vía vegetativa, otras especies

producen semillas recalcitrantes (no pueden ser deshidratadas sin que pierdan rápidamente su viabilidad) y por lo tanto no pueden mantenerse por vías tradicionales, para este tipo de material se necesita implementar nuevas técnicas para su conservación, una opción alternativa es la conservación del germoplasma vegetal mediante las técnicas de cultivo *in vitro*. El Buró Internacional para la Conservación de los Recursos Genéticos (IBPGR por sus siglas en inglés), ha propuesto el establecimiento de bancos de germoplasma *in vitro*, y los ha dividido en bancos activos y base.

Los bancos activos de germoplasma *in vitro* o también llamados a corto-mediano plazo, están encaminados a la manutención del germoplasma por periodos cortos de tiempo tratando de que los subcultivos no sean tan frecuentes, esto se consigue utilizando retardadores del crecimiento, inductores del estrés osmótico, alteraciones físicas del medio de cultivo, modificación de la atmósfera en la que se mantienen los cultivos y el uso de bajas temperaturas. El gran problema de esta forma de conservación, es la posible alteración genética que pueden sufrir los explantes cultivados *in vitro*, estas alteraciones dependen principalmente del nivel de organización de los explantes que son empleados para su conservación, siendo los meristemas las estructuras celulares que presentan una mayor estabilidad genética, por lo que los hace los mejores candidatos para aplicar las técnicas de conservación *in vitro* (Kantha, 1984).

La conservación del germoplasma mediante el cultivo de tejidos *in vitro* a largo plazo (banco base de germoplasma *in vitro*) ofrece la mejor alternativa de conservación del germoplasma difícil de almacenar, debido a que se basa en la utilización de la temperatura de ebullición del nitrógeno líquido y el empleo de sustancias con propiedades

crioprotectoras (sustancias que protegen a la célula del daño por congelación), para detener la actividad metabólica de las células sin que éstas sufran alteraciones genéticas. Teóricamente todas las partes de una planta (protoplastos, células, polen, tejidos, embriones, etc.) pueden ser crioconservados.

A pesar que se han logrado conservar un gran número de especies, la crioconservación es una técnica que no ha sido desarrollada lo suficiente para ser aplicada de manera rutinaria, por lo que la necesidad de continuar con la investigación en este campo es altamente prioritaria.

II. ANTECEDENTES

Los recursos genéticos vegetales, han jugado un papel importante a lo largo de la historia, el hombre ha dependido básicamente de los vegetales como fuente original de energía (Rubluo, 1985) y ha procurado mantener estos recursos para su utilización posterior. Los agricultores han sido los custodios de los recursos genéticos vegetales, los han preservado en sus habitats naturales o en campos de cultivo, esta riqueza la han estado mantenido desde hace 10.000 años, salvando y almacenando semillas y clones para sus cultivos subsecuentes, generalmente al año siguiente. También los cultivos propagados vegetativamente, los han mantenido durante unos meses, mediante el almacenamiento de tubérculos en lugares fríos y secos (Plucknett, *et al.*, 1987)

Pero la necesidad de alimentar a una población cada vez más creciente que sobrepasa los 5.500 millones, ha obligado el incremento del uso de tierras para la producción, penetrando hasta los centros de origen de la especies vegetales y destruyendo material genético valioso, aunado a esto, el hombre ha seleccionado plantas por su sabor, color, aroma, textura y cualidades alimenticias, originando una "erosión genética" (pérdida de la plasticidad en la respuesta del genoma frente a las alteraciones ambientales) al homogenizar sus cultivos (Rubluo, 1985; Plucknett, *et al.*, 1987).

De lo anterior surge la necesidad de conservar el germoplasma, para mantener de una manera posible, la mayor variabilidad genética de la población de especies vegetales, ya sean silvestres o domesticadas.

Hoy en día el material vegetal valioso esta preservado en bancos de germoplasma y la estrategia de conservación dependerá de la naturaleza del material, de los objetivos y alcances de la actividad. La naturaleza del material está definida por la

longitud del ciclo de vida, el modo de reproducción, el tamaño de los individuos y su estatus ecológico, ya sea silvestre o domesticada (Frankel, 1970).

La estrategia de conservación se debe considerar en dos dimensiones en el tiempo, cuando el almacenamiento es: a corto-mediano plazo o a largo plazo y donde será establecido el almacenamiento.

Hay dos propuestas básicas para la conservación de germoplasma, llamadas conservación *in situ* y *ex situ*.

II.1. Conservación *in situ*

La conservación *in situ* se refiere a mantener a las plantas, incluyendo a los parientes silvestres, en lugares naturales, procurando mantener la integridad genética del lugar y de las comunidades en un medio estable. Es una propuesta que se aplica principalmente a especies relacionadas a cultivos forestales y de forraje. (Ford-Lloyd y Jackson, 1986; Plucknett et al., 1987)

Algunos científicos piensan que la diversidad genética de los cultivos y sus parientes silvestres, se conserva mejor *in situ*, ya que de esta manera pueden ser mantenidas bajo condiciones a la cuales están adaptadas, continuando su interacción con su ambiente y así poder continuar su evolución.

El establecimiento de reservas genéticas naturales reconoce los objetivos de largo plazo y las necesidades para continuar la evolución dentro de ambientes naturales. La aplicación de la conservación *in situ* no es una opción viable, por la rápida pérdida de la variación genética a través del remplazo de los cultivos y el germoplasma vegetal no estará disponible para su inmediata utilización por parte de los agricultores (Ford-Lloyd y Jackson, 1986; Plucknett et al., 1987).

II.2. Conservación Ex situ

La conservación ex situ se refiere a que las especies vegetales, semillas o partes de ellas son preservadas fuera de su área de crecimiento original. (Plucknett et al., 1987).

Los jardines botánicos y arboretums, son las formas más antiguas de conservación en Europa desde los siglos XV y XVI, y en sentido amplio, ésta forma de conservación no representan un almacenamiento en una escala global, pero pueden representar un papel importante en un banco de germoplasma ex situ principalmente para la conservación de las especies con semillas recalcitrantes y las que se propagan vegetativamente.

Se han distinguido varias clases de conservación ex situ: "conservación evolutiva" la cual implica la iniciación de una nueva evolución natural (selección natural en el medio ambiente de adopción) y "conservación selectiva", la cual implica la aplicación de presiones de selección contra características claramente indeseables, sin el indebido agotamiento de la diversidad disponible. Otra forma de conservación es la "conservación estática" la cual está encaminada a retener como sea posible la estructura genética de la población original. Es posible distinguir entre conservación de la frecuencia de genotipo y la frecuencia del gen; lo primero sólo puede ser llevado a cabo en el material que se propaga vegetativamente. La meta es prevenir la pérdida de información genética. La conservación estática principalmente toma la forma de almacenamiento de semillas o material vegetativo en un banco de germoplasma. (Ford-Lloyd y Jackson, 1986)

II.3. Tipos de colecciones de germoplasma

Un banco de germoplasma no debe ser visto como un museo de plantas y sus respectivos órganos, donde las reliquias del

pasado son meramente preservadas o exhibidas (Plucknett, *et al.*, 1987), sino un lugar donde el material genético vegetal es mantenido, ordenado y principalmente utilizado.

Para los bancos de germoplasma, el Buró Internacional para los Recursos Genéticos Vegetales (IBPGR) en 1976 clasificó a los recursos genéticos como: colecciones a) base, (llamadas también colecciones a largo plazo), b) activas (ó colecciones a corto y mediano plazo) y c) duplicadas.

El almacenamiento de las colecciones base es destinado a la conservación a largo plazo, en donde las semillas son generalmente deshidratadas hasta un 5% de su contenido de humedad y almacenadas en frascos sellados o paquetes de hojas de aluminio al vacío y colocadas en cuartos con temperatura de entre los -10°C a -20°C, bajo estas condiciones pueden permanecer por largos períodos de tiempo (Ford-Lloyd y Jackson, 1986; Plucknett *et al.*, 1987).

A las colecciones base se les puede dividir en cuatro grupos que comprenden: a) colecciones substanciales de un amplio rango de especies; b) colecciones substanciales de un rango limitado de especies; c) colecciones especiales propuestas, significativas y originales y d) réplicas de unas o todas las anteriores (Bass, 1984). Las colecciones base estarán bajo la custodia de un banco de germoplasma para la posteridad y no podrán ser extraídas excepto para realizar pruebas de viabilidad y regeneración subsecuente o si la semilla es urgentemente requerida y no se puede obtener de ninguna otra fuente (Ford-Lloyd y Jackson, 1986). Las colecciones activas o de trabajo engloban a las colecciones tanto de corto como las de mediano plazo.

En las colecciones de corto plazo, el material es usado frecuentemente, por lo menos una vez al año y muestras de esta colección pueden ser incorporadas a las colecciones de plazo mediano o largo (Plucknett *et al.*, 1987).

En el almacenamiento a mediano plazo, el material es

mantenido a temperaturas cercanas a la congelación, en frascos de vidrio o plástico y paquetes de hojas de aluminio. (Plucknett et al., 1987). Las colecciones activas (corto y mediano plazo), se usan para la multiplicación, evaluación, documentación, distribución y uso (Bass, 1984). Las muestras pueden fácilmente ser enviadas a científicos que trabajen en otros centros u otorgadas a cultivadores en general (Ford-Lloyd y Jackson, 1986).

Las colecciones duplicadas son réplicas de las colecciones base que están alojadas en una localidad geográficamente diferente para mayor seguridad contra la pérdida por desastres naturales, errores humanos o trastornos políticos. (Bass, 1984; Plucknett et al., 1987).

En términos de conservación estática, la forma más conveniente de mantener el germoplasma vegetal es almacenando semillas ortodoxas que soportan contenidos bajos de humedad (3 a 5%) y a temperaturas bajas (hasta -20°C) con una pérdida pequeña o ninguna en su viabilidad (Bass, 1984).

La principal excepción a lo anterior son las plantas que se propagan normalmente por vía vegetativa y no producen semillas viables, y cultivos en donde las semillas que producen son de vida muy corta, estas últimas son las llamadas semillas recalcitrantes, (no sobreviven a la desecación y a la exposición a bajas temperaturas) (Bass, 1984; Plucknett et al., 1987).

II.4. Problemas con cultivos de propagación vegetativa y semillas recalcitrantes.

Como se indicó anteriormente, la conservación de los recursos genéticos debe efectuarse utilizando semillas, siempre y cuando éstas puedan ser almacenadas y deben ser conservadas con el fin de incrementar la diversidad disponible cuando sean requeridas y así lograr economía en las operaciones de manutención. (Wilkins y Dodds, 1983; IBPGR, 1986).

Pero existen especies a las cuales no se les puede mantener mediante la técnica de preservación tradicional para las semillas (Kantha, 1984; Chen y Kantha, 1987) debido a que:

1) Algunas plantas no producen semillas y se propagan por vía vegetativa mediante tubérculos, raíces, esquejes etc.

2) En algunas especies las semillas permanecen viables por un período limitado de tiempo (semillas recalcitrantes que al ser secadas son dañadas de inmediato y pierden su viabilidad).

3) Algunas semillas son muy heterocigas y no es posible mantener el genotipo.

4) Las semillas de ciertas especies se deterioran rápidamente debido a que contiene patógenos.

5) Algunos árboles de vida larga, incluyendo angiospermas y gimnospermas, no producen semillas por muchos años.

II.4.1. Cultivos de propagación vegetativa

La conservación de cultivos que se propagan vegetativamente (Tabla 1) presenta problemas especiales, quizá algunos de esos cultivos son sexualmente fértiles pero no conviene propagarlos comercialmente a través de semillas, porque tienen altos niveles de heterocigocis y los horticultores requieren de clones uniformes. Hay cultivos propagados vegetativamente que son sexualmente estériles o tienen reducida su fertilidad lo cual evita la posibilidad de almacenar sus semillas. (Bass, 1984)

Los órganos vegetativos que son almacenados, ya sea tubérculos, rizomas, esquejes etc., tienen relativamente una vida corta y se deterioran rápidamente después de la cosecha.

Tabla 1 Algunas especies de propagación vegetativa de interés económico.
(Wilkins, y Dodds, 1983; López, 1988)

NOMBRE CIENTIFICO	NOMBRE COMUN
<i>Discorea</i> spp.	Ñame
<i>Musa</i> spp.	Plátano
<i>Solanum</i> spp.	Papa
<i>Xanthos</i> spp.	Casava, Yuca
<i>Ipomoea batatas</i>	Camote
<i>Allium sativum</i>	Ajo
<i>Allium cepa</i>	Cebolla
<i>Allium graveolens</i>	Apio
<i>Daucus carota</i>	Zanahoria
<i>Asparagus officinalis</i>	Espárrago

aún bajo las condiciones ideales de almacenamiento. El cultivo de este tipo de colecciones año tras año es costosa y está expuesta a enfermedades infecciosas, alteraciones climáticas, plagas, errores humanos y muchos otros riesgos. (Kantha, 1982; Bass, 1984)

II.4.2. Especies con semillas recalcitrantes

El método más común de almacenamiento para las especies con semillas recalcitrantes es *ex situ* y al igual que las especies que se propagan vegetativamente, son mantenidas en campos de cultivo, lo que representa una labor intensiva y costosa, además de que las colecciones están expuestas al ataque de microorganismos, insectos, enfermedades y alteraciones climáticas (Kantha, 1984; Plucknett *et al.*, 1987)

El pequeño progreso que se ha hecho en el almacenamiento de semillas recalcitrantes (Tabla 2) ha sido encaminado a procurar mantener las semillas viables el tiempo suficiente para sobrevivir al período de colección. Las semillas recalcitrantes son susceptibles al daño por desecación, daño por enfriamiento, ataques de hongos y germinación durante el almacenamiento (Bass, 1984) El mejor método registrado involucra el almacenamiento en un estado completamente embebido en un medio húmedo en condiciones aeróbicas (en una bolsa de polietileno no cerradas herméticamente), donde las semillas han recibido un tratamiento preliminar con agua caliente o un fungicida para inhibir el crecimiento microbiano. (Ford-Lloyd y Jackson, 1988; Wilkins, y Dodds, 1983).

Tabla 2 Algunas especies de importancia económica que poseen semillas recalcitrantes
(Wilkins y Dodds, 1983; Withers, 1980; Kartha, 1985)

NOMBRE CIENTIFICO	NOMBRE COMUN
<i>Elaeis guineensis</i>	Palma de aceite
<i>Mangifera indica</i>	Mango
<i>Hevea brasiliensis</i>	Caucho
<i>Castanea</i> spp.	Castaño
<i>Quercus</i> spp.	Roble
<i>Juglans</i> spp.	Nogal
<i>Cinnamomum</i> sp.	Canela
<i>Persea americana</i>	Aguacate
<i>Cocos nucifera</i>	Coco
<i>Coffea</i> spp.	Café
<i>Theobroma cacao</i>	Cacao
<i>Zizania aquatica</i>	Arroz
<i>Thea sinensis</i>	Té

II.8. Conservación de germoplasma *in vitro*

Las técnicas de cultivo *in vitro* se comenzaron a concebir desde que el botánico alemán Haberland en 1902, planteo la hipótesis del potencial de regeneración de una planta a partir de una sola célula (concepto de la totipotencialidad celular), y fue hasta los años cincuentas cuando una planta en su totalidad fue regenerada de un cultivo de células aisladas (Wilkins y Dodds, 1983). A partir de estos descubrimientos, se ha planteado la posibilidad de establecer bancos de germoplasma mediante cultivo de tejidos vegetales (Rubluo, 1985).

El término *in vitro* o cultivo de tejidos vegetales, cubre un amplio rango de técnicas que involucran el crecimiento bajo condiciones asépticas de la totalidad de órganos vegetales como meristemas, raíces, anteras, óvulos, polen y embriones, o el cultivo de masas de células desorganizadas (callo) o células individuales y aún células desprovistas de su pared celular llamadas protoplastos. (Wilkins y Dodds, 1983).

Las técnicas de cultivo celular pueden ser ampliamente categorizadas como:

- a) Cultivo de órganos
- b) Cultivo de callo
- c) Cultivo de células en suspensión
- d) Aislamiento y cultivo de células individuales y protoplastos.
- e) Cultivo de anteras y polen.

Las técnicas mencionadas, se han empleado para la conservación de germoplasma y es evidente que la aplicación de unas técnicas son más factibles que otras para determinado fin. (Wilkins y Dodds, 1983).

Para las especies con semillas recalcitrantes y de propagación vegetativa, se ha propuesto un número de técnicas *in*

vitro para su conservación, éstas pueden efectuarse de dos formas: a corto-mediano plazo y a largo plazo (crioconservación), o bancos de germoplasma activos in vitro y bancos de germoplasma base in vitro respectivamente (IBPGR, 1986) (figura 1.).

Las técnicas de conservación a corto-mediano plazo, se refieren a periodos de almacenamiento de germoplasma de al menos un año sin subcultivos y pueden ser agrupadas en tres categorías: (Wilkins y Dodds, 1983; Rubluo, 1985).

1) Alteración de las condiciones físicas del cultivo. Esto puede incluir la temperatura, o las condiciones gaseosas dentro del mismo.

2) Alteración del medio de cultivo básico, por ejemplo la disponibilidad de los nutrientes a condiciones sub o supernormales, la omisión/reducción de algún factor el cual es esencial para el crecimiento normal.

3) Adición de retardadores de crecimiento como al ácido abscísico (ABA) o compuestos con efectos osmóticos como los alcoholes azucarados manitol y sorbitol.

Las técnicas arriba mencionadas, pueden usarse de manera independiente o en conjunción de dos o más de ellas.

La reducción de la temperatura para el almacenamiento de germoplasma in vitro a mostrado ser efectiva para su conservación, y muchas especies se han almacenado mediante este método (Tabla 3).

Pero se debe considerar que las especies estén adaptadas a diferentes condiciones ecológicas, por lo que la temperatura empleada tendrá que variar con cada una de ellas. (Rubluo, 1985; Wilkins y Dodds, 1983).

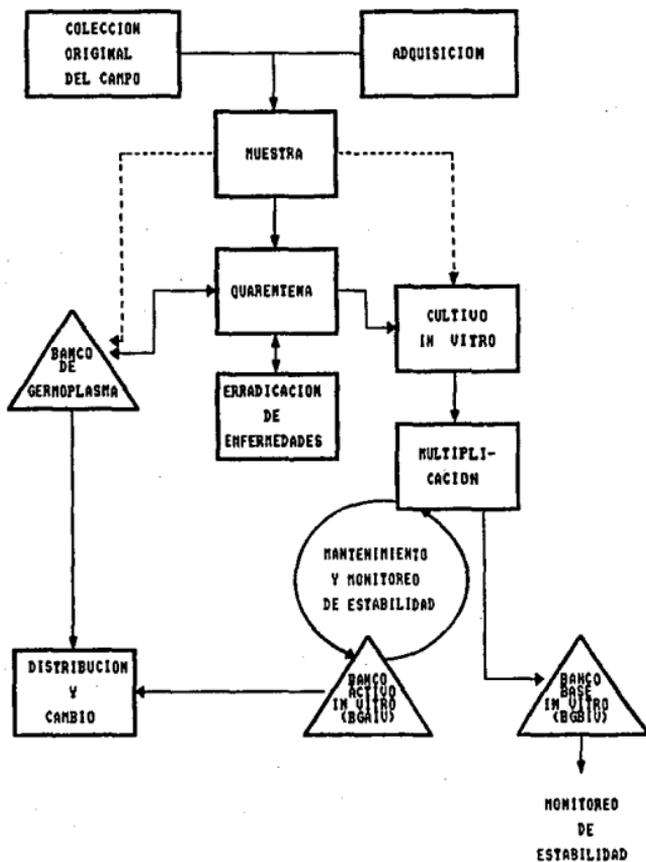


FIGURA 1 Procedimiento para el establecimiento de bancos de germoplasma in vitro (tomado de IBPGR, 1986)

Tabla 3 Especies que se han conservado *in vitro* a mediano plazo mediante la reducción de la temperatura.

NOMBRE CIENTIFICO	NOMBRE COMUN	TEMPERATURA (°C)
<i>Beta vulgaris</i>	Remolacha	12
<i>Fragaria vesca</i>	Fresa	0 a -6
<i>Ipomoea batatas</i>	Camote	-15 a -20
<i>Malus domestica</i>	Manzana	0 a -6
<i>Manihot esculentum</i>	Casava	-15 a -20
<i>Solanum spp.</i>	Papa	0 a -6
<i>Vitis rupestris</i>	Uva	-9
Varias herbáceas		0 a -6

El agua ha sido señalada como uno de los factores que inducen un período de retraso en el desarrollo de las poblaciones celulares, ocasionado por una detención del crecimiento, se ha usado manitol y sacarosa para este fin (Rubluo, 1995). Henshaw *et al.* (1980), elevó el nivel de sacarosa de 3 a 8% para retardar el crecimiento de meristemas de *Solanum spp.* Los retardadores de crecimiento empleados en cultivo de tejidos vegetales son: ácido abscísico (ABA), manitol, sorbitol, fosfán D, hidrazida málica, diaminazida, clorhído de trimetil amonio, entre otros. (Wilkins y Dodds, 1983).

También se ha logrado suprimir el crecimiento alterando las condiciones atmosféricas de los cultivos de callo de *Chrysanthemum morifolium*; *Lycopersicon esculentum* y *Nicotiana tabacum*, bajando la presión atmosférica a 40 mm Hg y la presión parcial de oxígeno a 7.6 mm Hg (Withers, 1980).

II.5.1. Estabilidad genética en cultivos *in vitro*

Los métodos de cultivo *in vitro* son esenciales para conservar el germoplasma de especies en donde es impráctica, difícil o imposible la conservación mediante semillas. (IBPGR, 1985). Pero el preservar el germoplasma *in vitro* por periodos largos de tiempo, puede llevar a producir variaciones somaclonales, el mantenimiento de una línea genética a través de varias generaciones requiere de un proceso ordenado de replicación cromosómica tan preciso como ocurre en las células del ápice y de las demás regiones meristemáticas, por lo que los cultivos de células desorganizadas como el callo y células en suspensión que son más propensas a la inestabilidad genética, lo que es alarmante, debido a que el fin principal de la conservación es lograr mantener la estabilidad genética de las especies almacenadas. (Pluncket *et al.*, 1987; Ford-Lloyd y Jackson, 1986).

Anormalidades como euploidia y aneuploidia, es decir niveles de ploidia, estructura cromosómica, características morfológicas, bioquímicas y cambios en el genoma, pueden ser encontradas en los cultivos de tejidos vegetales así como en las plantas regeneradas a partir de dichos cultivos. Estas anomalías pueden estar relacionadas a la heterogeneidad de la planta parental, genotipos, niveles de ploidia y naturaleza del explante pero aparentemente se desarrollan con más frecuencia durante la iniciación del cultivo, La IBPGR (1985) afirma que este tipo de variaciones somaclonales, ocurren si no en todos, si en la mayoría de los sistemas de propagación *in vitro*. (IBPGR, 1985; Withers, 1980). La inestabilidad genética se puede presentar en cultivo de tejidos vegetales de un grado menor a uno mayor, en los cultivos de meristemas, brotes adventicios, embriogénesis somática, organogénesis de callo, células en suspensión y cultivo de protoplastos (IBPGR, 1985).

A pesar de que la inestabilidad genética de callos es muy

frecuente, existen ejemplos de que estas estructuras mantienen estabilidad genética. Rubluo *et al.* (1984), demostraron estabilidad genética en cultivo *in vitro* de callo de chícharo, al no encontrar diferencias significativas en sus características morfológicas, patrones electroforéticos de 4 isoenzimas y número cromosómico.

A pesar de lo anterior, los métodos de conservación a corto-mediano plazo *in vitro*, no pueden garantizar la estabilidad genética por periodos largos de cultivo, además de que puede existir el riesgo de contaminación microbiana y/o fallas en el equipo (Kantha, 1982). Por lo que la conservación a largo plazo (crioconservación), es decir el almacenamiento del material biológico en nitrógeno líquido (NL) a -196°C , la cual produce la inmovilización de casi todas las actividades metabólicas, puede seguramente suspender los cambios progresivos en el genoma. El almacenamiento a temperaturas superbajas de órganos vegetales posee el potencial de conservación de germoplasma, en una "suspensión animada" (Kantha, 1984; Henshaw, 1984)

II.6. Almacenamiento a largo plazo (Crioconservación)

La crioconservación se puede definir como la conservación en estado congelado del material biológico mediante la reducción y subsecuente suspensión de la actividad metabólica al ser expuesto a temperaturas superbajas del nitrógeno líquido (-196°C) (Kantha, 1986). A esta temperatura casi toda la actividad metabólica de las células está suspendida, por lo que la muestra puede ser preservada en tal estado por periodos extensos de tiempo. Pero solamente muy poco material en su estado natural puede ser congelado a temperaturas superbajas, sin afectar su viabilidad celular (Kantha, 1987). Por lo que se han tenido que usar compuestos químicos que protejan a las

células del daño causado por los fenómenos que ocurren en la congelación. El descubrimiento de compuestos crioprotectores ha permitido tener un avance significativo en el desarrollo de las técnicas criogénicas para el almacenamiento a largo plazo de germoplasma vegetal (Chen y Kartha, 1987).

Como las células vegetales son inherentemente totipotenciales, las técnicas de cultivo de tejidos vegetales pueden, en conjunción con una manipulación de métodos criobiológicos, provechosamente ser usados para el almacenaje y conservación de especies de importancia económica.

Antes de explicar los pasos que se deben seguir para la crioconservación de germoplasma vegetal, se explicarán los fenómenos físicos y químicos que ocurren durante el enfriamiento (baja de temperatura) y la congelación (transformación de fase líquida a fase sólida) de una solución.

II.6.1 Daño por congelación

Existía la confusión de los efectos directos e indirectos del hielo; Mazur en 1965 disipó esto, formulando la hipótesis del doble factor para el daño por congelación, el cual propone que el daño celular resulta, ya sea de la concentración de solutos por el hielo extracelular que genera una salida de agua para equilibrar la presión de vapor, que refirió como "efecto de solución" o por la presencia de hielo intracelular causante probablemente del daño mecánico. (Meryman y Williams, 1985)

También los daños se puede dividir en efectos físico y fisicoquímicos:

a) Mecanismos físicos o mecánicos: son los daños producidos por la formación de cristales intracelulares cuando la tasa de enfriamiento es rápida. (Valenzuela, 1988)

b) Mecanismos fisicoquímicos o de concentración: son los daños producidos por la deshidratación generada durante el

enfriamiento lento. Esta deshidratación causa reducción del volumen celular, aumento intracelular de la concentración de sales tóxicas y pérdida del agua que rodea a los componentes celulares, es decir, agua estructural (Valenzuela, 1988).

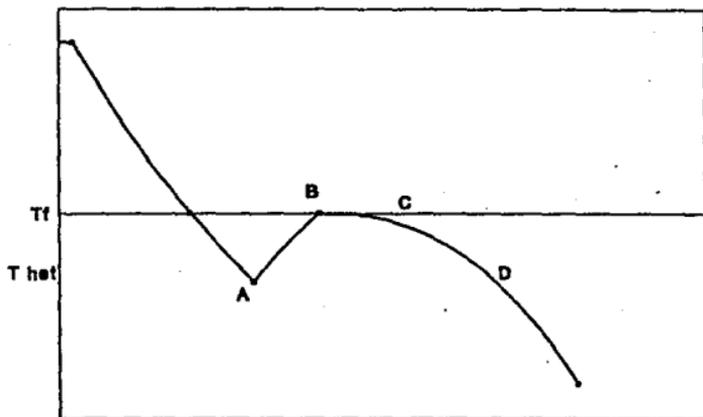
El agua tiene un punto de fusión de 0°C, al ser congelada tiene puntos de nucleación, estos son regiones de superficie no acuosa: paredes de los contenedores, partículas de polvo o macromoléculas las que actúan como base para el crecimiento de cristales a lo que se le ha denominado nucleación heterogénea (N. het.) (Meryman y Williams, 1985; Valenzuela, 1988).

En ausencia de núcleos, podemos obtener agua en su estado líquido por debajo de su punto de fusión, logrando una "sobrefusión" en donde el agua puede ser superenfriada a -40°C, en este estado las moléculas del agua actúan como nucleadores para dar la congelación, fenómeno llamado, nucleación homogénea (Meryman y Williams, 1985; Franks, 1985).

La presencia de solutos disueltos en el agua, bajan el punto de congelación en proporción aproximada a la concentración molar de la solución acuosa debido a que el agua es congelada primeramente, la solución empieza a ser más concentrada y el punto de congelación es reducido (Meryman y Williams, 1985).

Cuando se enfría el agua, hasta el punto de nucleación (Gráfica 1) y se comienza a transformar en hielo se libera energía, la cual es llamada calor latente de fusión. Esta energía se propaga rápidamente y la temperatura se eleva hasta alcanzar el punto de fusión normal, donde esta temperatura es mantenida por algún tiempo, durante el cual la acumulación de hielo se presenta y la solución residual se concentra, este retardo en el congelamiento se presenta cuando se agota el agua y existe competencia por el espacio, al pasar esta etapa se presenta el congelamiento (Meryman y Williams, 1985; Franks, 1985).

Cuando el congelamiento es lento, como generalmente se presenta en la naturaleza, la formación de hielo se da en los



Gráfica 1 Curva de enfriamiento típica de una solución, en donde A es la temperatura de nucleación, AB es la liberación de calor latente, de BC se acumula el hielo y de CD se logra la congelación total. (Tomado de Franks, 1985)

espacios extracelulares. En el caso de las células vegetales, el hielo invade la pared celular pero no el plasmalema. (Meryman y Williams, 1985). Al crecer los hielos la solución se concentra por lo que la presión osmótica aumenta, lo que causa que el agua deje la célula, reduciendo el volumen de ésta y concentrando sus contenidos celulares, ocasionándole una deshidratación osmótica y la precipitación de los elementos celulares. (Meryman y Williams, 1985).

El hielo es un cristal de agua pura y como se forma extracelularmente, excluye a los solutos tales como sales.

azúcares y proteínas, por lo que los fluidos llegan a ser cada vez más concentrados, lo que ocasiona un "estrés osmótico", es decir, el agua fluye fuera de la célula y los solutos entran. El proceso se detiene cuando la concentración de solutos llegan a ser lo suficientemente alta para prevenir la pérdida de agua en hielo (Storey y Storey, 1990).

Se ha observado que cuando las células llegan a cierta temperatura se da una pérdida de agua, debido a la presión osmótica y éstas mueren. Se ha postulado que para cada célula hay un volumen más allá del cual la célula no puede ser reducida sin causar daño, concepto que se le denominó "hipótesis del volumen mínimo". Se ha encontrado que al reducir el volumen por la presión osmótica que ejercen los efectos del congelamiento, existe pérdida de material de la membrana (Meryman y Williams, 1985).

Cuando existe congelación rápida se presenta formación de hielo intracelular, o cuando existe la ruptura de la membrana, ocasiona nucleación intracelular, causada por el hielo extracelular, lo que es de consecuencia letal, debido al daño mecánico producido a las organelos celulares.

II.6.2. Velocidad de enfriamiento

Cuando la velocidad de enfriamiento es lenta, hay un tiempo adecuado para que el agua se difunda fuera de la célula, se cristalice a hielo y así el sistema entero pueda aprovechar el equilibrio de presión de vapor y la congelación intracelular no pueda ocurrir, a partir del punto de congelación de la solución intracelular la temperatura a la cual se encuentre será idéntica a la de la muestra y presumiblemente, no habrá nucleación intracelular heterogénea, bajo estas condiciones el daño celular será por el resultado de la deshidratación y reducción del volumen (Meryman y Williams, 1985).

El enfriamiento rápido no da el tiempo suficiente para que el agua intracelular pueda difundir fuera de la célula para contribuir a la formación de hielo extracelular, como resultado, el interior de la célula es progresivamente superenfriado conforme la temperatura de la muestra baja. Al pasar por debajo de -40°C se da la nucleación homogénea y una gran cantidad de microcristales del interior celular son formados. Hay evidencia de que si la velocidad de enfriamiento es muy rápida la formación de núcleos intracelulares no crece, y si la velocidad de descongelamiento es lo suficientemente rápida para prevenir el crecimiento de los cristales, la células podrían sobrevivir al congelamiento intracelular, ya que si existe crecimiento de hielo intracelular, éste resulta generalmente letal.

La velocidad óptima de enfriamiento para minimizar el daño por deshidratación y el congelamiento intracelular, dependeran de la velocidad a la cual el agua deja la célula. Esto depende de la viscosidad de la solución intracelular, la proporción superficie-volumen de la célula y la cercanía de los cristales de hielo y la viscosidad de la solución sin congelar.

II.6.3. Mecanismos de crioprotección natural

Bajo condiciones naturales de congelación, después de unos grados de superenfriamiento, los organismos empiezan a congelarse y el hielo se forma en todas las cavidades y fluidos extracelulares, estos fluidos extracelulares se concentran, por la pérdida osmótica del agua celular y plasmolisis de la célula. En general la deshidratación de las células vegetales es tolerada hasta que el 55 - 75 % del agua se ha perdido. En este punto ocurre un daño irreversible de la membrana por la ruptura de ésta o por la pérdida de algún constituyente, ocasionando la entrada del hielo extracelular al interior de la célula (Moryman y Williams, 1985).

Existen especies de insectos terrestres como la oruga productora de lana (*Gynaephora groenlandica*) que soporta temperaturas hasta de -50°C . Al igual que algunos percebes, mejillones y caracoles marinos que llegan a estar a temperaturas bajo cero (Storey and Storey, 1990).

Se ha encontrado que cuatro especies de ranas comunes: La rana del bosque (*Rana sylvatica*), la rana saltadora (*Hyla crucifer*), la rana gris (*Hyla versicolor*) y la rana rayada (*Pseudacris triseriata*) pueden sobrevivir por semanas cuando el 85% de su agua corporal es hielo. La salamandra siberiana (*Hynobius keyserlingi*) puede sobrevivir a -35°C , la tortuga pintada (*Chrysemys pica*) eclosiona al final del verano, pero emerge hasta la primavera, conservandose a -5°C . (Storey and Storey, 1990).

Algunas ranas usan la sacarosa como crioprotector. Además los animales tolerantes al frío, bajan su tasa metabólica de 1 a 10% de su metabolismo normal. (Storey and Storey, 1990).

Mientras estan congelados todos estos animales, no muestran movimientos respiratorios, latidos del corazón o circulación sanguínea, solo muestran actividad neurológica apenas apreciable. Estos animales tolerantes al frío, han desarrollado dos estrategias para crioconservar sus órganos y evitar el daño por congelamiento:

1) Algunos animales como los peces marinos polares y muchos artrópodos terrestres desarrollan proteínas anticongelantes que evitan la formación de hielo hasta temperaturas de -15°C , lo cual les permite mantenerse activos en el invierno. (Storey and Storey, 1990).

2) Otros animales que requieren una mayor protección, han desarrollado anticongelantes en lugar de proteínas para bajar el punto de fusión. Existen insectos que producen moléculas de bajo peso como alcoholes polihidroxiados (Azúcares).

La oruga (*Epiblema scudderiana*), presenta 40% de glicerol en su cuerpo, lo que le permite soportar temperaturas hasta de -38°C . (Storey and Storey, 1990).

La elaboración de glicerol para evitar la deshidratación no es poco común. Ciertos insectos de Alaska pueden llegar a tener en el cuerpo concentraciones del orden de 4.5 M (25%) en respuesta a temperaturas subcongelantes. *Dunaliella* sp., una alga marina presenta concentraciones de 4 M para afrontar el medio marino. Los carbohidratos sorbitol y trehalosa han mostrado ser un sustituto del glicerol como un crioprotector natural en insectos (Meryman y Williams, 1985).

Para sobrevivir a la congelación, los animales deben controlar la formación de hielo, el crecimiento debe ser iniciado en los fluidos extracelulares y deben mantener la velocidad de enfriamiento lenta y el tamaño de los cristales muy pequeños.

La mayoría de los animales tolerantes al frío, sintetizan sustancias crioprotectoras durante el otoño, así que poseen altas concentraciones de solutos no tóxicos, para que cuando ocurra el congelamiento, la reducción del volumen celular pueda ser minimizado.

Algunas orugas almacenan glicogeno en su cuerpo en otoño que lo transforman en glicerol y sorbitol. Los crioprotectores persisten a través del invierno y son nuevamente convertidos en azúcares en la primavera (Storey and Storey, 1990).

II.6.4. Crioprotección artificial.

En los métodos criogénicos, la actividad metabólica celular se detiene, debido a la falta de la disponibilidad de agua líquida, con lo que los cambios genéticos son minimizados. Desafortunadamente, poco material vegetal como las especies de madera dura de invierno y los bulbos vegetativos de varios

árboles frutales, pueden ser congelados a la temperatura de -196°C , sin tener un efecto adverso en su viabilidad. (Chen y Kartha, 1987) por lo que se ha tenido que intensificar la búsqueda de compuestos químicos con propiedades crioprotectoras. Por lo que ha sido necesario encontrar compuestos químicos que sean capaces de evitar o minimizar el daño celular durante los eventos de congelación.

Las soluciones crioprotectoras se han estudiado desde principios del siglo, Maximow en 1912, detectó la protección de la glucosa, alcoholes y sales de ácidos inorgánicos y orgánicos al enfriamiento; Woodcock *et al.* en 1941 reportó efectiva crioprotección a -190°C en eritrocitos de oveja tratados con glucosa al 5 y 8 %. Polge *et al.* en 1949 usó glicerol para crioconservar células espermáticas humanas, 10 años después se introdujo el dimetil sulfóxido (DMSO), uno de los más efectivos crioprotectores conocidos para tejidos tanto vegetales como animales (Citado por Finkle, Zavala y Ulrich, 1985)

La crioconservación de células animales y humanas, a tenido grandes éxitos y se han crioconservado, eritrocitos, plaquetas, leucocitos, células de la médula ósea, protozoarios, insectos, helmintos parásitos de animales y del hombre (Kartha, 1982). El almacenamiento de espermatozoides en nitrógeno líquido y su subsecuente uso para la inseminación artificial es en la actualidad un procedimiento rutinario (Bajaj, 1976).

A comparación de los avances que se ha tenido en la crioconservación de células animales, la crioconservación de vegetales está todavía en la infancia, el primer reporte de crioconservación exitosa para material vegetal fué realizada por Seidert (1976) (citado por Kartha, 1984) con ápices de clavel (*Dianthus caryophyllus*).

Existen dos tipos de daño celular, deshidratación y congelamiento intracelular, ambos son realmente dependientes de un solo parámetro, deshidratación. Para evitar el daño se puede considerar que cualquier soluto puede funcionar como

crioprotector coligativo (puede bajar el punto de fusión de una solución), con tal que cumpla con dos requerimientos:

1) Debe llegar al interior de la célula, de lo contrario causará deshidratación osmótica y producirá un daño muy severo, efecto contrario para lo cual está diseñado (Meryman y Williams, 1985).

2) No debe ser tóxico en concentraciones suficientemente altas para producir una cantidad útil de depresión del punto de congelamiento. Solutos penetrantes como el etanol, metanol, una variedad de glicerol y dimetil sulfoxido (DMSO) son igualmente efectivos en una base molar (Meryman y Williams, 1985).

Debido a que el DMSO tiene una propiedad más efectiva de penetración a la célula que la del glicerol, permitió introducir el concepto de crioprotectores penetrantes y no penetrantes.

II.6.8. Crioprotectores penetrantes y no penetrantes

La aplicación de sustancias crioprotectoras, son esenciales para la crioconservación de material vegetal en nitrógeno líquido, los crioprotectores tienen la función de evitar los daños celulares tanto físicos-químicos como mecánicos causados por el congelamiento-descongelamiento y sobre todo mantener la viabilidad celular (Chen y Kartha, 1987).

El agente crioprotector ideal debe cumplir los siguientes puntos (Baja J 1978)

- 1) Bajo peso molecular
- 2) Ser fácilmente miscible con el disolvente
- 3) No ser tóxico aún a altas concentraciones
- 4) Ser fácilmente lavable de las células
- 5) Permear rápidamente al interior de la célula

Las sustancias crioprotectoras usadas para el congelamiento del material vegetal se pueden dividir en dos categorías dependiendo de su velocidad de penetración, con respecto a la membrana del plasmalema: (Chen y Kartha, 1987; Meryman, 1971)

a) Agentes penetrantes, los cuales a concentraciones molares protegen a las células vivas contra el daño durante la congelación lenta.

b) Agentes no penetrantes, que protegen en concentraciones molares bastante bajas y generalmente requieren tasas más rápidas de congelación y descongelación para ofrecer un efecto protector.

Los agentes penetrantes deben introducirse rápidamente a la célula o de otra manera ellos mismos deshidratarán osmóticamente a la célula y estimulará el daño por congelación, además no deben ser tóxicos en altas concentraciones molares lo cual es necesario para prevenir la excesiva formación de hielo (Meryman, 1971; Valenzuela, 1988). Los agentes penetrantes, son de bajo peso molecular y ofrecen una protección coligativa, este agente permite que exista agua no congelada que actúa como agua estructural y como disolvente de las sustancias tóxicas que se encuentran intracelular y extracelularmente, reduciendo la presión osmótica causada por la congelación extracelular (Valenzuela, 1988). Entre los agentes penetrantes se han utilizado el etanol, metanol, glicerol, diversos glicoles y DMSO (Tabla 4) (Kartha, 1984).

Los agentes no penetrantes, son compuestos de alto peso molecular que no entran a la célula, por lo que la acción protectora se da extracelularmente, pueden proteger en concentraciones molares bajas y generalmente requieren de tasas más rápidas de enfriamiento y calentamiento para conferir

protección (Valenzuela, 1988). Los mecanismos de protección que confieren estos agentes, no están bien establecidos, pero se cree que la protección que dan es por permitir un flujo interno y externo de solutos durante la congelación y descongelación, de esta manera permite a las células evitar los efectos irreversibles de gradientes excesivamente osmóticos (Meryman, 1971).

Entre los crioprotectores que actúan extracelularmente se encuentran la sacarosa, glucosa, lactosa, manitol, sorbitol, prolina y algunos polímeros como el PVP (polivinilpirrolidona), PEG (polietilén glicol), dextrán y HES (hidroxietil almidón) (Tabla 4) (Chen y Kartha, 1987).

Tabla 4 Crioprotectores penetrantes y no penetrantes usados en métodos criogénicos

COMPUESTOS O GRUPOS	CONCENTRACION (molar)	METODO	NOTAS
Dimetil-sulfoxido (DMSO)	0.5 - 2	Rápida o lenta	Puede ser aplicada al procedimiento; toxicidad a altos niveles; efectiva sola o en mezcla, especialmente con glicerol.
Glicerol	0.5 - 2	Rápida o lenta	Pre dispone a las células al daño por desplasmolisis anticongelante natural.
Azúcares, sacarina, glucosa, sorbitol, manitol.	> 2	Rápida o lenta	Raramente efectiva sola; efectiva en precrecimiento.
Amino ácidos: prolina, hidroxiprolina, aspartato, glicina, betaina.	0.5 - 2	Lenta	Efectiva con células y organelos, muy baja toxicidad y algo efectiva en mezclas.
Metanol	> 2.5	Lenta	Efectiva con animales y células de algas; virtualmente inexplorada en células vegetales.
Polímeros de alto peso molecular: PVP, almidón hidroxietil.	---	Lenta	Existe controversia sobre eficiencia y modo de acción.
Mezclas: 2 a 3 componentes de los compuestos de bajo peso molecular; también se incluyen al etilen glicol y polietilen glicol	1.0 - 2	Lenta	Ampliamente efectivo; gran cantidad de mezclas posibles; usualmente contiene un crioprotector convencional (DMSO o glicerol) puede tener gran estabilidad física a ultrabajas temperaturas que un solo crioprotector.

II.6.6. Mezclas de crioprotectores

En la mayoría de los casos de adición de crioprotectores en los procedimientos de congelación, se utiliza un sólo compuesto crioprotector. El DMSO es el compuesto que domina en la literatura vegetal, con el glicerol o sacarosa apareciendo también en otros tantos experimentos. Presumiblemente algún efecto sinérgico es obtenido mediante la combinación de diferentes tipos de crioprotectores. (Finkle et al., 1985)

Se han realizado intentos para mejorar los efectos de los compuestos crioprotectores mediante el uso de mezclas, debido a que la aplicación de un solo compuesto, no proporciona una alta sobrevivencia de las muestras congeladas.

Burton y colaboradores al estudiar modelos físicoquímicos, indicaron la ventaja de usar mezclas de crioprotectores como la de glicerina-DMSO (citado por Finkle et al., 1985). La mezcla de crioprotectores ha sido benéfica para aumentar la sobrevivencia de explantes expuestos al congelamiento (Chen y Kartha, 1987), por ejemplo Chen en 1978, encontró para la caña de azúcar, que el DMSO al 10% proporciona mayor protección que al 5%, pero la combinación con glicerol dió la mayor protección. (Chen et al., 1979). Una mezcla similar (DMSO 5% y glicerol al 15 o 20% para cultivo de células en suspensión de arroz fue usada para su crioconservación (Sala et al., 1979). Otra mezcla que favoreció la crioconservación de caña de azúcar fue la usada por Ulrich et al. la mezcla involucró a: PEG, glucosa y DMSO, (10-8-10 v/v respectivamente). Withers y colaboradores han aplicado mezclas crioprotectoras de DMSO 0.5M + glicerol 0.5M + sacarosa 1M o DMSO 0.5M + glicerol 0.5M + prolina 1M, para una variedad de cultivos celulares (citado por Chenn y Kartha, 1987).

Las ventajas de usar mezclas crioprotectoras de acuerdo a Finkle et al. (1985) son:

1) Pueden tener mayores efectos en mantener la viabilidad postcongelamiento que los compuestos sencillos (comparada con

base a molaridad combinada total presente en la solución crioprotectora).

2) La proporción de los componentes son importantes para que puedan ser mezclados.

3) Un aumento del efecto crioprotector es capaz de llevarse a cabo mediante la disminución de la concentración de los compuestos que poseen efectos perjudiciales ó tóxicos hacia la célula, además que el efecto crioprotector de los compuestos combinados puede ser aditivo.

II.6.7. Efectos tóxicos de los crioprotectores

Un grado de toxicidad de la adición de compuestos crioprotectores a tejido vegetal ha sido reportado. Tales efectos han sido observados simplemente por la adición y remoción de compuestos, por ejemplo el DMSO a concentraciones mayores del 10%, ya sea sin congelar, congelado o después de un período de crecimiento en un medio conteniendo el compuesto, llega a ser tóxico, en el caso del DMSO al 10-20% o a niveles más altos es tóxico. La toxicidad se debe a varios factores: efectos osmóticos, efectos del disolvente y efecto como compuesto específico (Finkle et al., 1985), pero la naturaleza de toxicidad de los agentes crioprotectores no ha sido bien establecida, pero es claro que un gradiente excesivamente osmótico produce la remoción de agentes que pueden ser dañinos para la célula (Meryman, 1971).

La mayoría de los crioprotectores exhiben varios grados de citotoxicidad, abarcando desde la muerte completa a modificaciones en la respuesta morfogénica de las células en cultivo. En todos los casos, altas concentraciones de estos compuestos ejercen citotoxicidad, ésta puede ocurrir cuando los meristemas son expuestos a bajas concentraciones por largos periodos (Finkle et al., 1985). También la toxicidad involucra

efectos irreversibles de la solubilidad de lípidos de la membrana o la desnaturalización de las proteínas.

II.7. Características del Glicerol y Dimetil sulfóxido (DMSO).

II.7.1. Glicerol

El glicerol ($C_3H_5(OH)_3$) tiene un punto de ebullición de $290^\circ C$ y es considerado un compuesto fuertemente electronegativo por presentar grupos funcionales OH.

Dentro de las soluciones que se han estudiado por sus efectos crioprotectores; el glicerol ocupa una posición privilegiada debido a su poca toxicidad en altas concentraciones, además de que es el más parecido al agua en la habilidad de mantener las fuerzas hidrofóbicas que son esenciales para la conformación terciaria y cuaternaria de las macromoléculas y la estabilidad de la bicapa de la membrana (Meryman y Williams, 1985).

Desde el punto de vista de crioprotección artificial, el principal y quizá el único defecto del glicerol es su relativamente baja velocidad de difusión a través de la membrana celular lo que puede ocasionar daño celular si se coloca a la célula en un medio concentrado de glicerol, por la presión osmótica que ejerce, es decir, si una célula es transferida abruptamente de un medio libre de glicerol a uno que contenga una concentración alta de éste, el agua saldrá rápidamente de la célula en respuesta al gradiente osmótico antes que el glicerol pueda entrar, ocurriendo un daño hiperosmótico. Durante la

eliminación del glicerol el agua penetra antes de que el crioprotector salga, incrementándose el volumen celular y ocurre un daño por lisis hipotónica. Esto último no se aplica a células con pared celular ya que ésta lo protege contra la lisis (Valenzuela, 1988).

McGann (1978) indicó que la permeabilidad del glicerol en las células animales a 0°C es muy lenta y alta a 20°C, por lo que se le puede utilizar como agente penetrante y no penetrante respectivamente.

II.7.2. Dimetilsulfóxido (DMSO)

El DMSO es un compuesto orgánico altamente polar, miscible en agua y en algunos disolventes orgánicos como el alcohol, éter y solventes clorados aromáticos. Se obtiene por oxidación en el aire del dimetil sulfuro en presencia de óxidos nitrogenados. Su molécula está compuesta por un átomo de azufre central, unido por medio de una doble ligadura a un átomo de oxígeno que presenta una marcada electronegatividad, lo cual le confiere la propiedad de ser aceptor de hidrógenos, las valencias restantes son ocupadas por dos grupos metilo; tiene un punto de fusión de -18.5°C y un punto de ebullición de 189°C (López, 1988).

Una cualidad de este agente es su penetración universal, el DMSO actúa en forma similar al glicerol gracias a sus propiedades coligativas, minimizando los daños que se producen al ser congelados. Generalmente es utilizado al 5 o 10% debido a que a concentraciones más altas puede llegar a ser tóxico.

II.8. Criopreservación de meristemas y ápices

Los meristemas y ápices tienen muchas ventajas sobre los cultivos en suspensión o callos, debido a que son estructuras de gran estabilidad genética lo cual se debe presumiblemente a su continuo crecimiento organizado después del almacenamiento (IBPGR, 1985). Los meristemas son tejidos en el que las células son anatómicamente indistinguibles, de pared delgada, altamente citoplasmáticas presentan pequeñas vacuolas, están agrupadas arbitrariamente, en capas como la túnica, cuerpo, células madres centrales y meristemas laterales. El meristemo apical es el que se forma primero durante el desarrollo embrionario y permanece excepto por los periodos de dormancia, en un estado activo de división a través de la fase vegetativa de la planta (Kantha, 1985; IBPGR, 1985).

Los cultivos *in vitro* de meristemas y ápices presentan un crecimiento rápido y tienen una gran aplicación en la agricultura. Las células constituyentes del meristemo son genéticamente estables, la regeneración de plantas resulta en individuos idénticos a la planta donadora. La estabilidad genética es deseable y muy necesaria, particularmente en material experimental (Kantha, 1981).

Una de las aplicaciones más importantes del cultivo de meristemas es la producción de plantas libres de patógenos especialmente de virus, esta técnica en conjunción con la criogenia, garantiza el almacenamiento de germoplasma a largo plazo libre de enfermedades (Kantha, 1984).

II.8.1. Técnica para la criopreservación de meristemas

La técnica para una criopreservación exitosa de meristemas vegetales involucra los pasos siguientes:

- 1) Aislamiento aséptico de ápices o meristemas.
- 2) Condicionamiento al frío de meristemas *in vitro*.
- 3) Precultivo de meristemas en un medio de cultivo apropiado suplementado con crioprotectores por un período de tiempo que se determina experimentalmente.
- 4) Adición de crioprotectores al explante antes del congelamiento.
- 5) Control de enfriamiento y congelación del explante.
- 6) Almacenamiento en nitrógeno líquido.
- 7) Descongelación rápida de los meristemas congelados.
- 8) Remoción del crioprotector.
- 9) Recultivo *in vitro* de los meristemas recuperados e inducción de la regeneración de la planta.

II.8.2. Métodos de congelación de meristemas

La conservación de germoplasma a través de la criopreservación ha tenido un mayor desarrollo durante las últimas dos décadas, los métodos que se han empleado son diversos, éstos principalmente se basan en las características del material que se quiere criopreservar. Los métodos empleados para criopreservar meristemas o ápices, se agrupan (Kartha, 1985) principalmente en:

1) Congelamiento rápido: En este método, generalmente se practica la inmersión directa en nitrógeno líquido de los meristemas pretratados con el crioprotector. Al bajar rápidamente la temperatura la células no tienen el tiempo suficiente para equilibrarse con el hielo exterior mediante el

flujo de agua hacia afuera causando congelamiento intracelular, el cual es letal para la mayoría de los especímenes biológicos (Kartha, 1985). Sin embargo este método se ha usado con éxito para crioconservar, clavel, papa, y *Brassica napus* entre otras especies.

2) Congelamiento lento: Este método se basa en la disminución gradual de la temperatura, empleando tasas de enfriamiento de alrededor de 0.2 a 1°C/min, hasta llegar a una temperatura entre -30°C a -40°C, entonces la estructura vegetal se introduce en el nitrógeno líquido. Esto permite que el agua intracelular pueda salir y que se forme hielo fuera de la célula evitando el daño por congelación intracelular, que como se ha mencionado es letal. La velocidad de enfriamiento varía según la especie, por ejemplo la crioconservación de meristemos de chícharo se realizó con una tasa de enfriamiento de 0.8°C/min, y mientras que los meristemos de fresa requirieron de 0.84°C/min. Aumentar o disminuir la tasa óptima resulta en una reducción de la viabilidad (Kartha, 1985).

3) Congelamiento por pasos: Este método consiste en congelar la muestra en etapas y temperaturas predeterminadas. Cuando la muestra alcanza entre -35°C y -40°C, el agua congelable de la célula ha salido para convertirse en hielo externo, entonces la muestra biológica se pasa directamente al nitrógeno líquido sin que se provoque mayor daño en sus estructuras; este método es utilizado generalmente en cultivos en suspensión. (López, 1988)

4) Método de la gotita congelada: La base del congelamiento por goteo es idéntica a la del congelamiento lento. Esta técnica fue desarrollada para crioconservar meristemos de casava y puede ser útil en especies tropicales muy sensibles al frío (Kartha, 1985).

En este método, la solución crioprotectora es puesta en pequeñas gotas de 2-3 μ l en una hoja de papel aluminio contenida en una caja de Petri. Cada meristemo (tratado con la misma solución crioprotectora), es transferido a las gotas y congeladas a una velocidad de enfriamiento lenta (0.5°C/min) hasta alcanzar varias puntos (temperaturas bajo cero -20, -25, -30, y -40°C) y finalmente son almacenadas en nitrógeno líquido.

II.9. DESCRIPCION DEL AJO

II.9.1. Clasificación taxonómica del ajo

La clasificación taxonómica del ajo según Cronquist (1981), es:

REINO	Vegetal
DIVISION	Magnoliophyta
CLASE	Liliopsidae
SUBCLASE	Liliidae
ORDEN	Liliales
FAMILIA	Liliaceas
GENERO	Allium
ESPECIE	<i>Allium sativum</i>

II.9.2. Origen

El ajo junto con la cebolla son de las plantas cultivadas más antiguas, el origen del ajo parece localizarse en Asia central, se considera que *Allium longicuspis* Regel, endémico de Asia central, es el ancestro silvestre del ajo. De ahí se difundió a través de Asia menor y Egipto a toda Europa y fue llevado al hemisferio oeste por los españoles, portugueses y franceses. (Block, 1985; López, 1988).

II.9.3. Uso y propiedades del ajo

El ajo por miles de años, ha formado parte de la medicina tradicional. Desde los Hebreos, Egipcios, Griegos y Romanos, se menciona al ajo como remedio para una variedad de enfermedades, incluyendo dolores de corazón, de cabeza, mareos, antihelmíntico y tumores (Block, 1985). Sus propiedades medicinales fueron reconocidas desde hace mucho tiempo, pero no están establecidas oficialmente en las farmacopeas del oeste moderno. Fué considerado como un poderoso antídoto contra venenos de todo tipo (Valenzuela, 1988). Algunas de las enfermedades que se cree que combate son: bronquitis, inflamaciones del intestino, presión alta, diabetes. Ciertos extractos del ajo son antibacterianos y antifúngicos, otros son antitrombóticos, evita la formación de coágulos sanguíneos (Block, 1985; Valenzuela, 1988).

El jugo del ajo inhibe el crecimiento de bacterias del género *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Vibrio* (incluyendo *V. cholerae*) y *Bacillus*, también exhibe un gran espectro contra la actividad zoonosológica (Block, 1985). En la India se ha usado como una loción antiséptica.

El ajo es usado como condimento y se consume macerado, en jugo, como infusión de los dientes o trozos crudos, masticado. Su sabor crudo se debe a un compuesto antibiótico poderoso, la alicina que es fungicida y bactericida. El ajo deshidratado en polvo o granulado, reemplaza los bulbos frescos para el uso doméstico o industrial en algunos países (López, 1988; Valenzuela, 1988).

Cada 100 g de porción comestible del ajo contiene:

Agua	81.0 g	Niacina	0.7 mg
Próteínas	4.0 g	Vitamina C	9-10 mg
Lípidos	0.5 g	Calcio	10-24 mg
Glúcidos	20.0 g	Fósforo	40-125 mg
Tiamina	0.20 mg	Hierro	1.7-2.3 mg
Riboflavina	.11 mg	Potasio	540 mg
Carbono	15 mg	Magnesio	32 mg
Sodio	10 mg		

(Tomado de López, 1988)

II,9,4. Plagas y Enfermedades del ajo

El ajo puede ser atacado por plagas en el campo como en los bulbos almacenados. Entre los organismos que atacan al ajo se encuentran:

El nemátodo *Ditylenchus dipsaci* que ataca el tallo y bulbo.

El ácaro *Aceria tulipae* que actúa sobre las hojas y tallos.

Entre los hongos que lo atacan:

Pyrenochaeta terrestris en raíz (raíz rosada)

Botrytis allii que produce la pudrición blanca

Penicillium corymbiferum causando pudrición

El moho *Trips tabaci* ataca hojas y tallos

Sclerotium que causa pudrición.

(Novák, Havel y Dolezel 1986; Valenzuela, 1988)

III. JUSTIFICACION

Como se ha mencionado, existen especies que presentan semillas recalcitrantes o se reproducen vegetativamente, como es el caso del ajo (*Allium sativum*) que es una especie apomictica (todas las formas son estériles). Por esta razón el germoplasma de esta especie se conserva en campos de cultivo (Plunckett *et al.*, 1987), lo que provoca problemas muy serios, ya que está expuesta a factores climáticos adversos, plagas, enfermedades y errores humanos en la manipulación, lo que podría llevar a perder parte del germoplasma valioso de esta especie. La IBPGR (1983) mencionó al género *Allium* como de alta prioridad para la conservación de germoplasma, la cual se puede realizar mediante el cultivo *in vitro* a corto mediano plazo utilizando inductores del estrés osmótico o bajas temperaturas (Miranda, 1992), pero mediante el uso de esta técnica, la estabilidad genética a largo plazo no se puede garantizar, solamente el empleo de técnicas criogénicas puede garantizar la estabilidad genética de la especie (Kantha, 1987).

Los sistemas comerciales para la crioconservación son muy costosos y ante la necesidad de tratar de preservar células vegetales, resultaría muy útil poder contar con un equipo más económico en el que se puedan variar y controlar tasas de enfriamiento, así como estudiar el comportamiento de las soluciones crioprotectoras durante el proceso de enfriamiento, como requisito previo para intentar el almacenamiento de germoplasma a largo plazo.

Los sistemas de enfriamiento de bajo costo están diseñados para obtener tasas de enfriamiento que se puedan controlar, mediante la cantidad de nitrógeno líquido y los vapores generados por éste, así como la altura de la solución crioprotectora con o sin explante en la ampollita de almacenamiento colocada en el interior del termo criogénico.

éstos son los factores que determinarían en gran medida la tasa de enfriamiento.

Se han realizado intentos por preservar el germoplasma de ajo mediante el empleo de un sistema de criopreservación de bajo costo, con los que se obtuvo resultados prometedores al emplearlo (López, 1988; Valenzuela, 1988).

El diseño anteriormente usado por López et al., 1989 consistía de un termo criogénico con 40 litros de capacidad, que contenía una cuarta parte de nitrógeno líquido de la capacidad total, las temperaturas generadas por los vapores de éste, eran detectadas por un termopar de cobre-constantan. Un extremo de éste registra las temperaturas en el interior del termo y el otro extremo se coloca en contacto con una referencia a 0°C (vaso de precipitados con hielos y agua destilada). Ambos extremos del termopar estaban conectados a un multímetro digital, que registra las lecturas en milivolts, para ser convertidas en grados centígrados mediante el uso de la tabla de conversión específica para el termopar de cobre-constantan.

El termopar, se colocaba en una varilla graduada en centímetros, la cual estaba sujeta a un soporte universal, mediante una pinza de tres dedos para permitir su ascenso y descenso en el interior del termo criogénico.

El sistema antes mencionado, poseía muchas deficiencias debido a que los materiales utilizados (varilla, soporte universal y pinza de tres dedos) no estaban fijos entre sí, lo que ocasionaba imprecisiones y complicaciones para su manejo y hacía muy difícil tratar de realizar repeticiones experimentales bajo las mismas condiciones, pues el margen de error era muy grande en la manipulación al ascender o descender la varilla con el termopar. La varilla de acero no poseía ningún soporte para la colocación de las soluciones, éstas se fijaban a la punta terminal mediante telas adhesivas.

Con estos antecedentes se ha retomado estas investigaciones con el interés de lograr los siguientes objetivos:

IV. OBJETIVOS

1) El mejoramiento de un sistema económico de enfriamiento, establecido anteriormente en el laboratorio de Biotecnología Vegetal y Genética del Jardín Botánico del Instituto de Biología, UNAM, que permita aplicar los métodos criogénicos.

2) Evaluación del efecto citotóxico de 16 mezclas de crioprotectores (DMSO-Glicerol) sobre el desarrollo de los ápices de ajo en cultivos *in vitro*.

3) Monitorear el comportamiento de las 16 mezclas de DMSO-Glicerol al ser enfriadas para determinar la velocidad de enfriamiento a emplear.

4) Crioconservación de los ápices con placa basal del ajo, utilizando el nuevo sistema y su subsecuente recuperación y desarrollo bajo condiciones *in vitro*

V. MATERIALES Y METODOS

V.1. Sistema de enfriamiento de bajo costo.

El mejoramiento del diseño se hizo mediante la implementación de una estructura de acero inoxidable, que consiste en una varilla en forma de cinturón del ancho del termo (146 cm), al cual se mantiene fija mediante tres tornillos de 3/4 de pulgada, del cinturón salen tres varillas de 150 cm de longitud dispuestas a distancias similares del perímetro del cinturón y que sostienen un pequeño arco de 12.2 cm de diámetro por encima de la boca del termo, de este arco salen tres varillas unidas en forma de riel de 91 cm de largo que posee una cinta métrica graduada en milímetros, paralelamente a ésta se encuentra una varilla cilíndrica de aluminio de 100 cm de longitud, ambas están unidas entre si por un soporte que posee un tornillo que permite a la varilla ser desplazadas de manera ascendente o descendente a lo largo del riel y detenerlo a cualquier altura del mismo, la varilla de aluminio posee en la parte final una tuerca que permite fijar una canastilla circular de aluminio de 6 cm de largo por 4 cm de diámetro interno, con capacidad de contener siete ampollitas de dos ml (AC/II, calibre 4 de Ampollitas de México). En la base de la canastilla presenta pequeñas perforaciones que permiten la salida del nitrógeno.

Dentro de los mejoramientos, se cuenta con un termómetro digital (Hand Held Thermometers Digital Series 450, mod. 450-ATT, tipo T, Omega) y un termopar de cobre-constantan. El termopar se coloca a la largo de la varilla y su punta terminal unida llega hasta la base de la canastilla. Las lecturas que proporciona el termómetro digital son en décimas de grado centígrado.

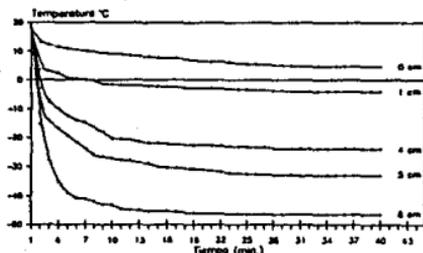
V.2. Determinación del perfil de temperatura

Un volumen conocido de nitrógeno líquido produce un gradiente de temperatura ascendente desde su superficie hasta la boca del termo, estas temperaturas se detectaron utilizando el termopar de cobre-constantan conectado al termómetro digital y adherido a la varilla de aluminio con la punta terminal en el interior de la canastilla.

Para medir las diferentes temperaturas, se tomó la boca del termo como referencia (cero centímetros) y se registraron la temperatura cada minuto hasta que ésta se mantenía constante. para bajar la varilla un centímetro más y se tomó la lectura respectivas y así se procedió sucesivamente (gráfica 2). A las distintas temperaturas finales registradas se les denominó temperatura externa (T. ext.) (López, 1988)

Con las diferentes T. ext., se estableció el perfil de temperatura, en relación a la cantidad de nitrógeno líquido que contenga el termo, que sirve para determinar la altura y T. ext. a la que serán expuestas las soluciones y explantes para que se lleve a cabo una tasa de enfriamiento lenta, por ejemplo 0 a 2°C/min.

GRAFICA 2 Relación entre la altura a la que se coloca el termopar dentro del termo y la T. ext. que se registra



V.3. Elaboración de mezclas crioprotectoras

Se prepararon dieciséis mezclas diferentes utilizando dos sustancias crioprotectoras, el DMSO y glicerol en varias concentraciones, (Tabla 5) disueltas en medio líquido de Murashige y Skoog MS (1962).

A la par de la elaboración de las mezclas, se preparó medio basal MS líquido, así como medio basal MS sólido a un pH de 5.7 y se esterilizaron en un autoclave a 20 lb/pulg de presión y 120°C durante 15 min. para utilizarlo como medio de cultivo y recuperación de los explantes.

Tabla 5 Mezclas de soluciones crioprotectoras (DMSO y Glicerol) en medio basal MS líquido usadas en los diferentes experimentos

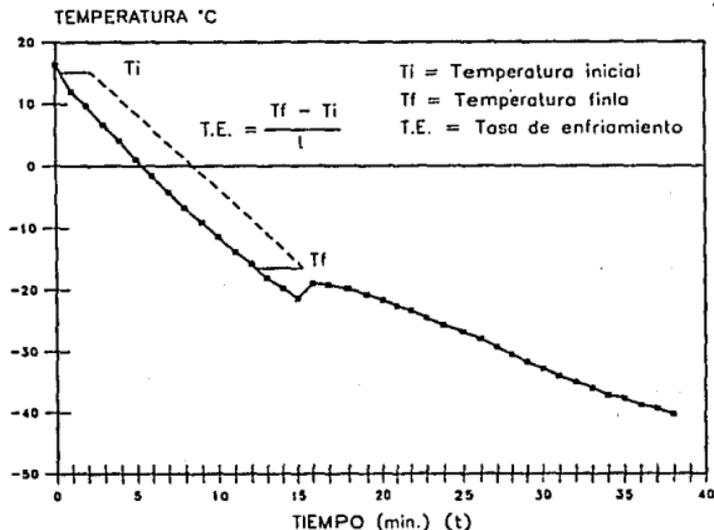
SOLUCION C%	NUMERO DE MEZCLA															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
DMSO	20	20	15	5	20	20	15	5	20	20	15	5	20	20	15	5
GLICEROL	5	5	5	5	15	15	15	15	20	20	20	20	20	20	20	20
MS-L	65	75	80	90	55	65	70	80	50	60	65	75	40	50	55	65

Para evaluar el comportamiento que presentan las 16 mezclas elaboradas al ser superenfriadas, se colocó un mililitro de cada solución en ampollitas abiertas con capacidad de dos mililitros, éstas fueron colocadas de manera individual y en contacto con el termopar, en la canastilla del sistema mecánico dentro del termo criogénico a una T.ext. predeterminada. Se tomó el registro del descenso de la temperatura mediante el termómetro digital cada minuto.

Con los datos obtenidos, se realizaron gráficas de temperatura de la solución contra el tiempo (curvas de enfriamiento), para obtener la tasa de enfriamiento y el punto de fusión de cada solución. La tasa de enfriamiento fue medida en la sección de línea recta de cada curva (gráfica 3) utilizando la siguiente fórmula:

$$T.E. = \frac{T_f - T_i}{t}$$

donde T.E. es la tasa de enfriamiento; T_f es la temperatura final alcanzada en la parte lineal de la curva; T_i es la temperatura inicial de la parte recta de la curva y t es el tiempo en minutos.



Gráfica 3 Curva de enfriamiento de una solución acuosa que nos ayuda a determinar la velocidad de enfriamiento de la misma.

V.4. Extracción de ápices con placa basal de *Allium sativum*

El material biológico utilizado en el presente estudio fue la especie *Allium sativum* variedad Taiwan, donada por el Centro de Investigaciones Agrícolas del Bajío, El Roque, Carretera a San Miguel de Allende, Gto. (CINIFAP).

Los explantes utilizados fueron los ápices con placa basal de ajo, éstos se localizan en la parte basal de cada "diente" (semilla agronómica), unidos a la placa basal o tallo verdadero.

La técnica de extracción de ápices utilizada es una modificación a la desarrollada por López, 1988 y Valenzuela, 1988 (figura 2).

Los bulbos fueron separados en sus unidades o "dientes", a los cuales se les eliminaron las hojas que lo rodeaban, a cada "diente" y con la ayuda de un bisturí y pinzas de disección, se le realizó un corte transversal al eje de crecimiento para eliminar su parte superior. A la parte basal que contiene el ápice con su placa basal, se le retiró el tejido que la rodeaba realizando dos cortes a los lados del tejido para exponer el ápice y así no dañarlo. Al ápice se le disectaron los primordios foliares, hasta dejar únicamente el primer o segundo par de ellos, con lo que se obtuvieron explantes de 5 a 8 mm de longitud.

Los explantes se lavaron en agua corriente por espacio de 10 min, posteriormente se introdujeron a una campana de flujo laminar para su desinfección, la cual se llevó a cabo en 4 pasos:

- 1) Agitación de los explantes en alcohol etílico al 96% durante 1 minuto.

- 2) Cambio de los explantes a alcohol etílico al 70% durante 2 minutos.

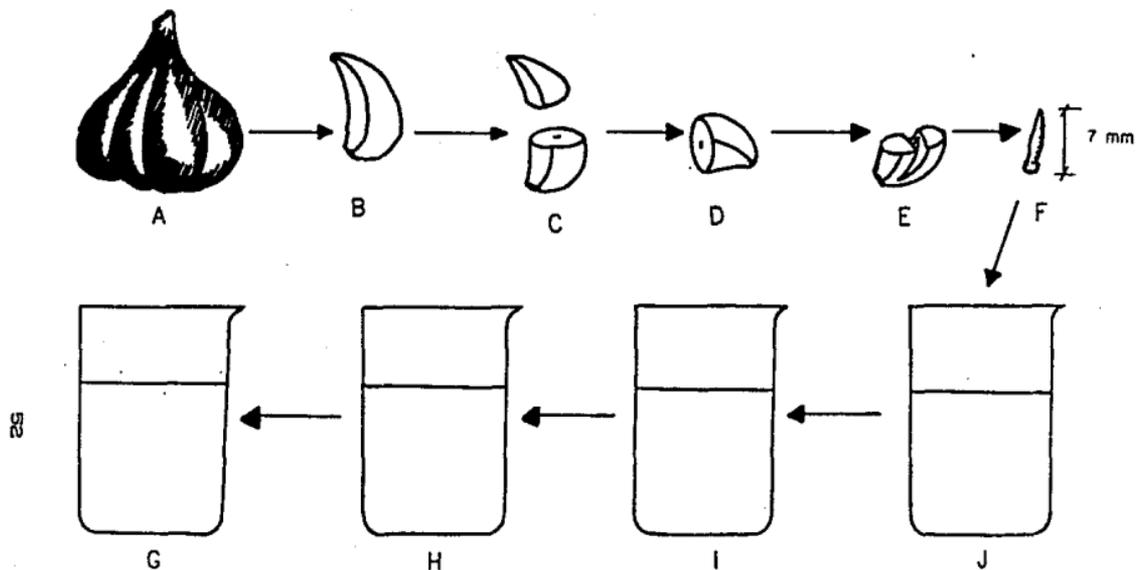


FIGURA 2 Metodología para la desinfección de ápices con placa basal del ajo *Allium sativum*

- A) Cabeza de ajo B) Separación en unidades "dientes" C) Corte horizontal del "diente"
 D) Parte basal del "diente" que contiene al ápice E) Cortes longitudinales para exponer al ápice
 F) Apice con placa basal G) Lavado con agua corriente H) Lavados con alcohol etílico al 96% durante 1 min. y alcohol etílico al 70% durante 2 min. I) Lavado con hipoclorito de sodio comercial al 4% por 10 min. J) Lavado con agua destilada y esterilizada, de 3 a 4 enjuagues

3) Hipoclorito de sodio comercial al 4% por un lapso de 10 min. y finalmente.

4) De 3 a 4 enjuagues con agua destilada y esterilizada.

Después de lo anterior y para su utilización posterior, se depositaron en un frasco de vidrio de 100 ml de capacidad con una pequeña cantidad de agua destilada y esterilizada para evitar su desecación.

V.5. Exposición de los ápices a las mezclas crioprotectoras

Los efectos citotóxicos de las mezclas crioprotectoras, se evaluaron mediante la exposición de los explantes a las diferentes mezclas a tres tiempos diferentes, 15, 30 y 60 minutos.

Se introdujeron 15 ápices previamente desinfectados y bajo condiciones de asepsia, (5 ápices por cada tiempo de exposición, 15, 30 y 60 min., respectivamente) en cada uno de los frascos de vidrio de 100 ml de capacidad que contenían 50 ml de cada mezcla crioprotectora (tabla 5), y se depositaron en una plataforma de agitación orbital a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Al transcurrir cada uno de los tiempos y siempre bajo condiciones asépticas, se extrajeron los 5 ápices para eliminar la mezcla de crioprotectores mediante un lavado por un periodo de 30 min. en medio basal MS líquido, el cual se mantuvo en agitación y a temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Transcurrido el tiempo de lavado de los explantes, éstos se sembraron en medio MS basal sólido contenido en tubos de ensayo de 150 X 25 mm y puestos en una cámara de cultivo a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, con fotoperiodo de 16 horas de luz y 1000 lux de intensidad luminosa.

El efecto citotóxico se determinó mediante la medición de longitud de las plántulas así como de sus características morfofisiológicas a los 30, 60 y 90 días de su siembra.

V.6. Congelación de explantes

Para realizar la congelación de los explantes, se introdujeron 5 de ellos disectados y esterilizados, en ampollitas, a las que se les adicionó con ayuda de una pipeta Pasteur, un mililitro de una de las soluciones crioprotectoras (tabla 5), en sus tres diferentes tiempos de exposición (15, 30 y 60 min.), las ampollitas fueron selladas al calor con un mechero Bunsen, al cumplir el tiempo respectivo de exposición, se colocaron en la canastilla del sistema mecánico de enfriamiento y en una ampollita abierta se colocó 1 ml de la misma solución, a la cual se le introdujo el termopar para registrar el comportamiento de la solución mientras se enfriaba, la canastilla se colocó dentro del termo a una T. ext. predeterminada, dependiendo de la concentración de la solución y de la cantidad de nitrógeno líquido, para lograr obtener una tasa de enfriamiento lenta, se realizó el registro del descenso de temperatura mediante el termómetro digital cada minuto hasta que la temperatura de la solución alcanzara -40°C , entonces se sumergió la canastilla con las ampollitas en NL y se dejó almacenada por 30 min., a una temperatura de -196°C .

Después del 30 min. de almacenamiento las ampollitas se extrajeron y se descongelaron sumergiéndolas en un baño de agua caliente a 40°C por 1.5 min., realizando movimientos circulares suaves, ya descongelados, se llevaron a la campana de flujo laminar para abrirlas asépticamente, extraer el contenido y vaciarlo dentro de frascos de vidrio de 100 ml de capacidad, conteniendo 20 ml de medio MS líquido para eliminar la mezcla de

crioprotectores mediante la agitación de los frascos durante 30 min. en iguales condiciones que las mencionadas previamente.

Transcurrido el tiempo de lavado, los ápices fueron sembrados al igual que un lote testigo de 5 explantes, en medio MS basal idéntico al usado para evaluar el efecto citotóxico de las mezclas y puesto bajo las mismas condiciones.

Periódicamente se revisaron los cultivos, para poder observar si había ocurrido alguna recuperación de los explantes congelados, para evaluar el efecto crioprotector de las diferentes mezclas y determinar la mejor metodología aquí usada que pueda permitir la crioconservación de germoplasma del ajo.

VI. RESULTADOS Y DISCUSION

VI.1 Mejoramiento del sistema de orioconservación de bajo costo

El dispositivo para enfriar explantes vegetales, del presente trabajo, se basó en el empleado por López (1988), dicho diseño se mejoró debido a que presentaba varios puntos que era necesario modificar, para poder obtener una mayor precisión y facilidad en la manipulación del material experimental.

El primer cambio que se realizó fue el del multímetro por un termómetro digital (Hand Held Thermometers Digital Series 450, mod. 450-att, tipo T Omega), ya que el multímetro proporcionaba datos en milivolts que había que convertir a grados centígrados, mediante la tabla específica de conversión para termopar de cobre-constantan, además que el multímetro necesita una referencia de cero grados centígrados (agua destilada con hielo) para proporcionar las lecturas.

En la tabla 6 se comparan las lecturas tomadas por los dos instrumentos de medición y se puede observar que, en el caso del multímetro, al convertir los milivolts a grados centígrados, estos últimos descienden en intervalos de ± 0.3 °C, lo cual es una desventaja cuando se quieren realizar mediciones más exactas, sobre todo cuando los cambios de temperatura a medir son pequeños, como los que se presentan cuando una solución llega a su punto de fusión, momento en el cual se presentan cambios en la temperatura de la solución que son de gran importancia registrar.

Para evitar todos los problemas expuestos arriba, se adquirió un termómetro digital con termopar de cobre-constantan, que además de facilitar el trabajo, proporciona lecturas directamente en décimas de grado centígrado y no utiliza una referencia como la del multímetro para poder proporcionar los

registros, debido a que esta calibrado internamente a 0°C y no presenta el problema de manejarse dentro de un rango ya que las lecturas son continuas, ventaja que se tiene cuando se necesita medir los cambios finos de temperatura.

TABLA 6 Comparación de los rangos de temperaturas (°C) tomadas con dos diferentes aparatos de medición (multímetro y termómetro digital)

MULTIMETRO		TERMOMETRO DIGITAL
milivots (mV)	°C	°C
+ 0.68	17.0	17.0
+ 0.65	16.8	16.9
+ 0.64	16.5	16.8
+ 0.63	16.2	16.7
+ 0.62	16.0	16.6
- 1.14	-31.0	-31.0
- 1.15	-31.2	-31.1
- 1.16	-31.5	-31.2
- 1.17	-31.8	-31.3
- 1.18	-32.0	-31.4

El segundo cambio fue la modificación de la parte mecánica del sistema de crioconservación, el cual consistió de una estructura de acero inoxidable, que consistió de una varilla en forma de cinturón del ancho del termo (146 cm) que es mantenida

fiaja mediante tres tornillos de 3/4 de pulgada, del cinturón salen tres varillas de 150 cm de longitud dispuestas a distancias similares del perímetro de éste y doblados por la mitad en un ángulo de 120° y que permite sostener un pequeño aro de 12.2 cm de diámetro por encima de la boca del termo, de este aro salen tres varillas unidas en forma de riel de 91 cm de largo que posee una cinta métrica graduada en milímetros, paralelamente a esta se encuentra una varilla cilíndrica de aluminio de 100 cm de longitud, ambas están unidas entre sí por un soporte que cuenta con un tornillo que permite a la varilla ser desplazada de manera ascendente o descendente a lo largo del riel y detenerlo a cualquier altura del mismo. La varilla de aluminio posee en la parte final una canastilla circular de aluminio de 8 cm de diámetro interno, con capacidad de contener siete ampollitas de vidrio de 2 ml de capacidad, la canastilla presenta pequeñas perforaciones que permiten la salida del nitrógeno líquido. La canastilla puede ser desmontada de la varilla para un manejo más cómodo mediante una tuerca localizada en la parte inferior.

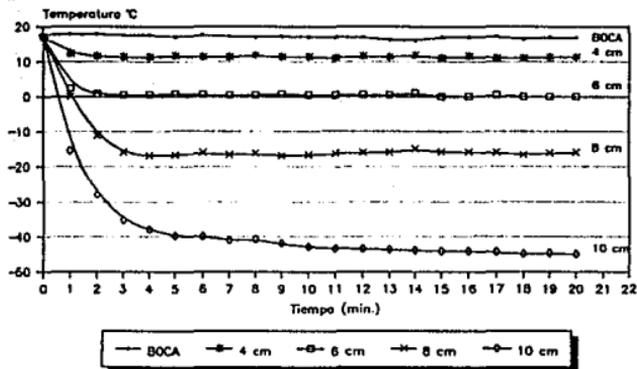
Dicha estructura permite un manejo más fácil y con mayor precisión, puesto que al contar con una escala graduada en milímetros que puede ser utilizada por más de un operador, sin que el error de medición sea muy grande, ventaja que el diseño anteriormente empleado para este fin no podía ofrecer, ya que contaba con una escala en centímetros, la cual no era muy confiable debido a que las lecturas variaban de acuerdo a la apreciación de cada operador. Una ventaja más del nuevo diseño es que sus piezas están fijas entre sí lo cual asegura que al realizar manipulaciones, éstas no varíaran de su postura original, es decir, el riel que contiene la escala mantiene fija a la varilla circular, mediante una estructura de acero que posee un tornillo que permite a la varilla ascender ó descender en el interior del termo, al final posee una canastilla que es la que porta las ampollitas, lo que facilita la colocación de

éstas y que la condiciones experimentales sean iguales todas las veces que se introduzcan. El diseño anterior al estar conformado por diversos piezas: soporte universal, pinza universal y varilla cilíndrica, no se podía mantener en una sola posición ya que las piezas no estaban fijadas entre sí. lo que originaba que cada vez que se manipulara, la posición de las muestras experimentales variaba, ocasionando que las condiciones experimentales no fueran las mismas, aunado a esto, las ampollitas eran adheridas mediante una cinta adhesiva al final de la varilla, lo que originaba variaciones cada vez que eran colocadas, ya que no existía ningún patrón de colocación

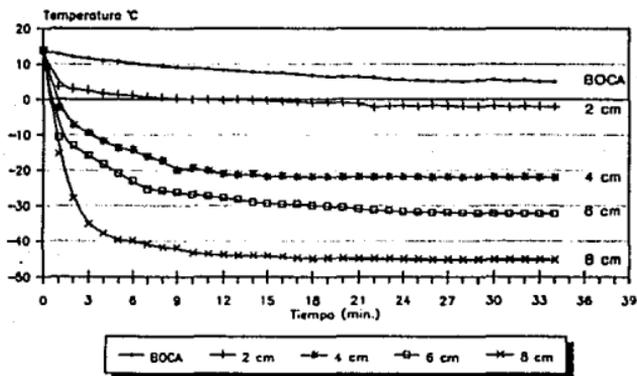
Las gráficas 4 y 5, nos muestran los perfiles de temperatura obtenidos con los dos distintos mecanismos empleados. Se puede observar que las diferentes curvas obtenidas a partir del dispositivo original presentan una variación mayor que las obtenidas con el nuevo mecanismo, dichas variaciones son de alrededor de 0.5 a 2 °C, éstas son más evidentes en las primeras líneas, cuando el termopar está más expuesto a corrientes de aire que hacen que fluctúen las lecturas. En la gráfica 5, se puede observar que las variaciones son menores, alrededor de 0.5 °C, las fluctuaciones al igual que el diseño anterior, se presentan principalmente cuando el termopar está más en contacto con las corrientes de aire, pero éste al estar protegido por la canastilla, evita que las lecturas fluctúen en rangos más amplios.

Las equipos de enfriamiento comerciales son muy variadas, las hay desde los sistemas computarizados de enfriamiento, que son de costos muy elevados y que manejan tasas de enfriamiento controladas y constantes que van desde 0.1 a 10 °C/mín., pero también existen las unidades que trabajan manualmente, controlando la cantidad de ampollitas y la altura de las mismas con respecto al nitrógeno líquido, con el fin de proporcionar tasas de enfriamiento lentas al igual que los sistemas computarizados. Dentro de esta última categoría se ubica el

GRAFICA 4 Perfil de temperatura °C
generada en el interior del termo, con
el dispositivo anterior.



GRAFICA 5 Perfil de temperatura °C
generado en el interior del termo, con
el dispositivo nuevo



diseño utilizado para el actual trabajo, ya que se busca un sistema de enfriamiento de muy bajo costo, de fácil manejo y de una alta eficiencia, con el fin de poder ser utilizado en cualquier lugar con la única dificultad de conseguir el NL y que además ofrezca buenos resultados, sobre todo en un país como México donde en muchos lugares que no se cuenta con el capital para adquirir aparatos de mayor costo. La unidad aquí propuesta puede ofrecer una opción real para experimentar con diversos materiales a crioconservar con una alta posibilidad de obtener resultados satisfactorios, por lo que es necesario realizar mayor investigación utilizando otro tipo de plantas como modelo experimental.

VI.2 Perfil de temperatura

Como se pudo observar en las gráficas 4 y 5, existe un gradiente de temperatura generado por los vapores del nitrógeno líquido desde su superficie hasta la boca del termo, lo cual permite controlar la temperatura externa a la cual se quiere trabajar en el interior del termo, en la tabla 7 se muestran las diferentes alturas (h) del termopar en el interior del termo con su respectiva temperatura. Con los datos se construyó la gráfica 6 en la que se puede observar que el descenso de la temperatura está en función de la altura a la que es colocado el termopar, presentándose un comportamiento lineal, los resultados del ajuste de la recta, se muestran en la tabla 7, por lo que se puede decir que la temperatura generada por los vapores de nitrógeno líquido es directamente proporcional a la altura a la cual se le registra en el interior del termo.

Tabla 7 Datos obtenidos al registrar la temperatura en el interior del termo con 10 lts. de nitrógeno líquido mediante el termopar de cobre-constantan a diferentes alturas, así como los datos obtenidos para las mismas alturas al linealizar la recta, mediante la ecuación ($Y = -6.53(h) + 6.84$)

Altura (cm)	Temperatura observadas (°C)	Temperaturas calculadas (°C)
0	5	6.84
2	-2	-6.22
4	-22	-19.28
6	-32.2	-32.34
8	-45.2	-45.40

Ecuación de la recta

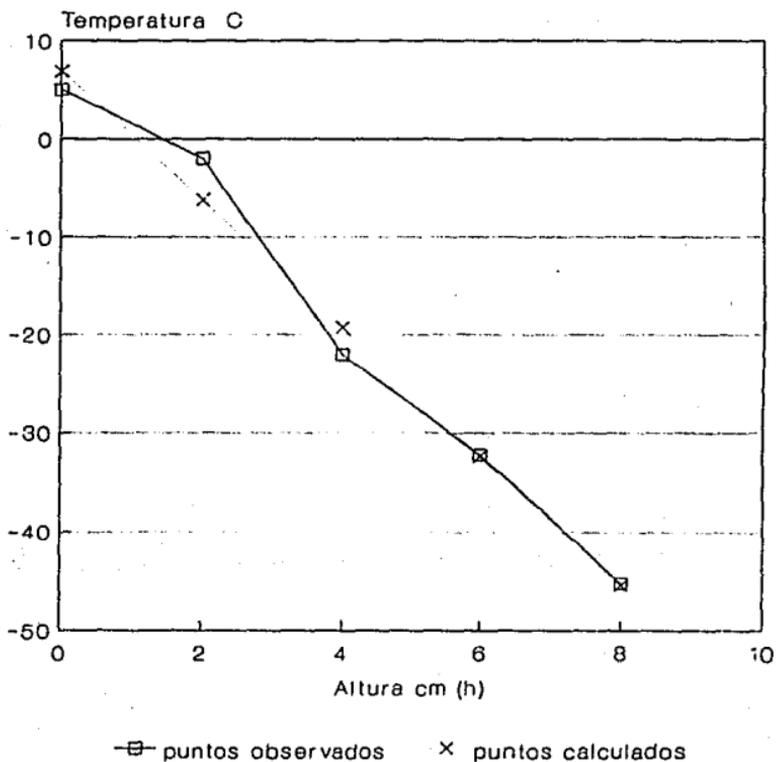
$$Y = -6.53(h) + 6.84$$

$$m = -6.53 \pm 0.49$$

$$\text{Error estandar} = 3.09$$

Con la ecuación encontrada para la recta, ($Y = -6.53(h) + 6.84$) se puede calcular la temperatura externa generada en el interior de termo con 10 lts. de nitrógeno líquido hasta los -50 °C, para cualquier altura con un error estandar de ± 3.09 °C, la ecuación variará cuando la cantidad de nitrógeno cambie, es decir la altura se desplazará de acuerdo a la cantidad del NL. Valenzuela (1988) encontró que el valor de las pendientes obtenidas con cantidades variables de NL, se mantuvo constante.

GRAFICA 6 Perfil de temperatura generada en el interior del termo con 10 lts de nitrógeno líquido



Los puntos calculados se determinaron mediante la fórmula $y = -6.53h + 8.84$

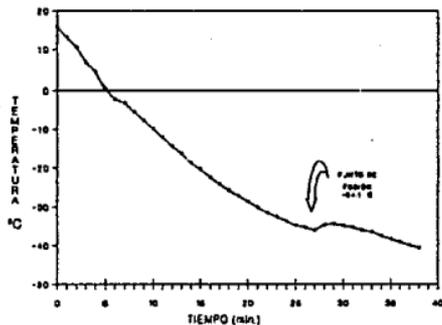
VI.3 COMPORTAMIENTO DE LAS MEZCLAS CRIOPROTECTORAS AL SER ENFRIADAS

El registro del comportamiento de las mezclas de las soluciones crioprotectoras, se realizó a una temperatura exterior predeterminada (-20 °C), la cual fué detectada con el termopar en el interior del termo a una profundidad de 8 cm a partir de la boca del mismo. El registro del descenso de temperatura se realizó cada minuto, con los datos obtenidos de cada mezcla se elaboraron gráficas de tiempo contra temperatura (gráficas 7 a 22).

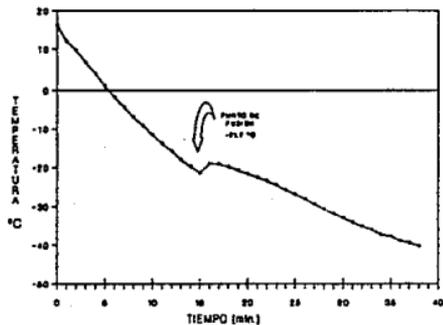
En la mayoría de las soluciones se puede observar que presentaron un comportamiento similar a la curva típica de enfriamiento de una solución acuosa, en la que existe una parte en donde la solución permanece sin congelarse, hasta llegar a su punto de nucleación, en donde existe liberación del calor latente por lo que la temperatura se incrementa unos cuantos grados para dar paso al congelamiento y llegar a su punto de fusión para luego continuar superenfriándose, hasta llegar a su temperatura final, que en ninguno de los casos estudiados corresponde a la temperatura externa a la que se colocaron, sino que en todos los ensayos la temperatura final alcanzada fue menor que la temperatura externa.

En estudios anteriores sobre el comportamiento de soluciones crioprotectoras (López, 1988; Valenzuela, 1988), se ha encontrado que tanto el DMSO y el glicerol, bajan el punto de fusión de una solución acuosa al ser enfriada, conforme aumenta su concentración, característica necesaria para conferir protección celular (vegetal o animal) cuando son congeladas. Este mismo efecto se presenta cuando las dos soluciones crioprotectoras (DMSO y glicerol) se mezclan en una sola, es decir, bajan el punto de fusión conforme se concentran, (gráfica 23), Franks (1985), señala que el incrementó en la concentración

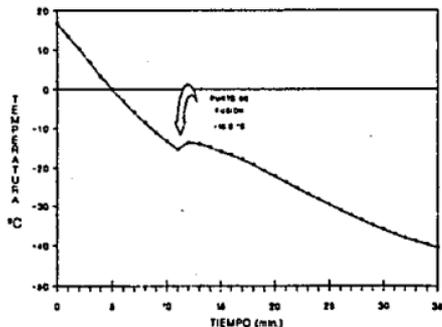
GRAFICA 7 CURVA DE ENFRIAMIENTO DE LA
MEZCLA CRIOPROTECTORA 1
(30% DMSO Y 5% GLICEROL)



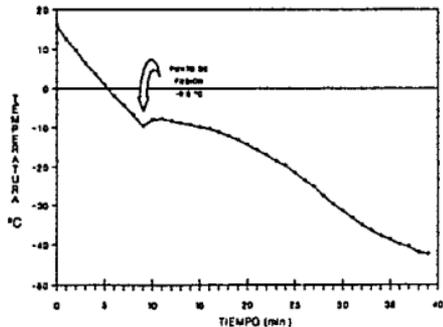
GRAFICA 8 CURVA DE ENFRIAMIENTO DE LA
MEZCLA CRIOPROTECTORA 2
(20% DMSO Y 5% GLICEROL)



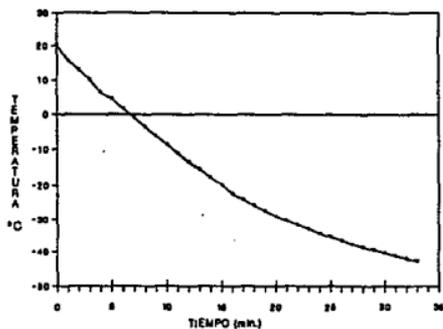
GRAFICA 9 CURVA DE ENFRIAMIENTO DE LA
MEZCLA CRIOPROTECTORA 3
(15% DMSO Y 5% GLICEROL)



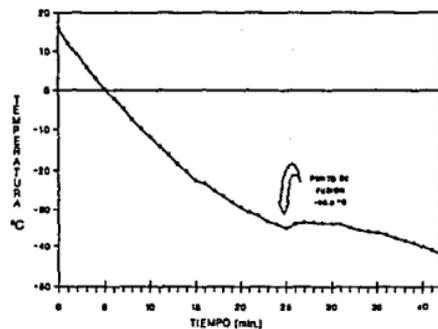
GRAFICA 10 CURVA DE ENFRIAMIENTO DE LA
MEZCLA CRIOPROTECTORA 4
(5% DMSO Y 5% GLICEROL)



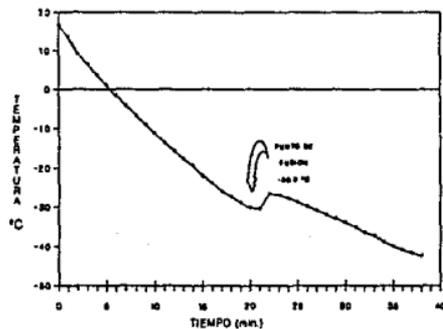
GRAFICA 11 CURVA DE ENFRIAMIENTO DE LA
MEZCLA CRIOPROTECTORA 5
(30% DMSO Y 15% GLICEROL)



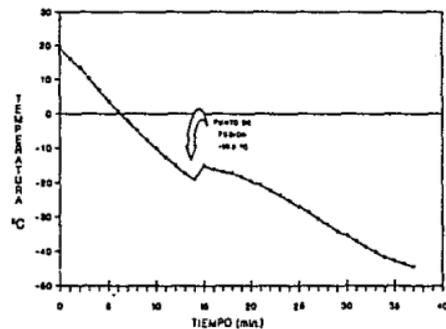
GRAFICA 12 CURVA DE ENFRIAMIENTO DE LA
MEZCLA CRIOPROTECTORA 6
(20% DMSO Y 15% GLICEROL)



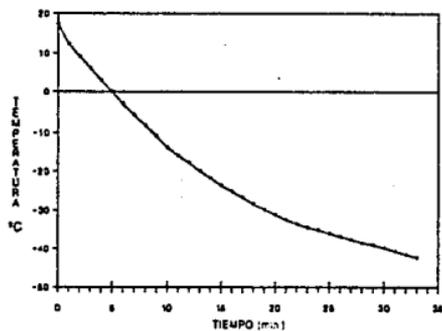
GRAFICA 13 CURVA DE ENFRIAMIENTO DE LA
MEZCLA CRIOPROTECTORA 7
(15% DMSO Y 15% GLICEROL)



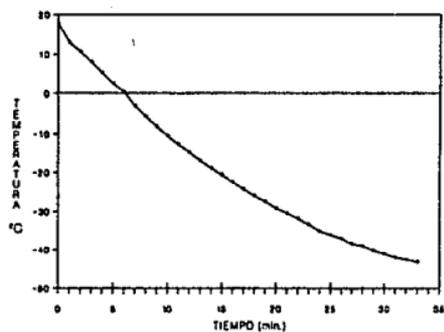
GRAFICA 14 CURVA DE ENFRIAMIENTO DE LA
MEZCLA CRIOPROTECTORA 8
(5% DMSO Y 15% GLICEROL)



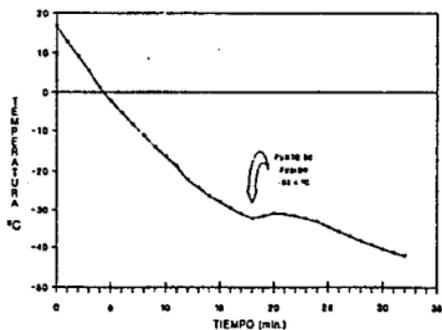
GRAFICA 16 CURVA DE ENFRIAMIENTO DE LA
MEZCLA CRIOPROTECTORA 9
(30% DMSO Y 20% GLICEROL)



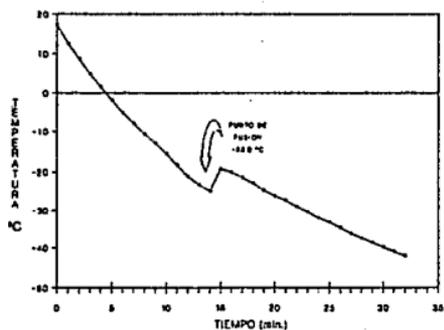
GRAFICA 18 CURVA DE ENFRIAMIENTO DE LA
MEZCLA CRIOPROTECTORA 10
(20% DMSO Y 20% GLICEROL)



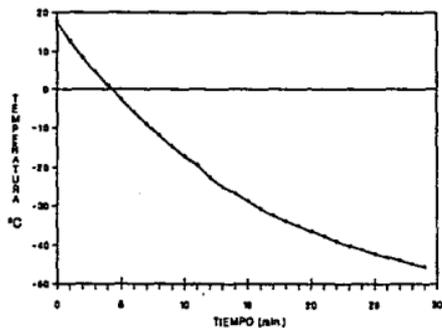
GRAFICA 17 CURVA DE ENFRIAMIENTO DE LA
MEZCLA CRIOPROTECTORA 11
(15% DMSO Y 20% GLICEROL)



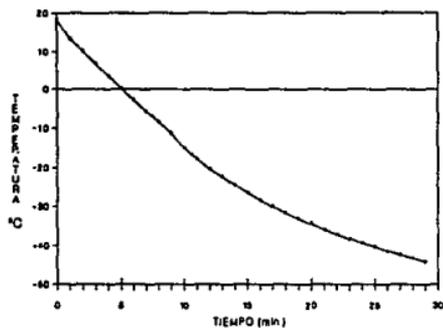
GRAFICA 15 CURVA DE ENFRIAMIENTO DE LA
MEZCLA CRIOPROTECTORA 12
(5% DMSO Y 20% GLICEROL)



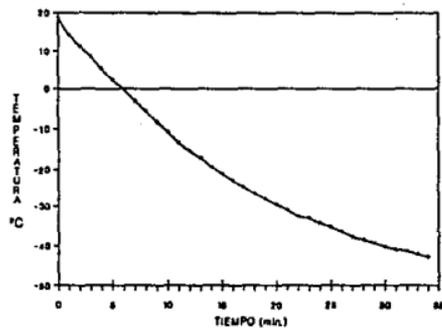
GRAFICA 19 CURVA DE ENFRIAMIENTO DE LA
MEZCLA CRIOPROTECTORA 13
(30% DMSO Y 30% GLICEROL)



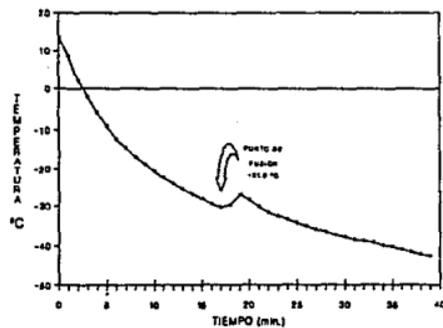
GRAFICA 20 CURVA DE ENFRIAMIENTO DE LA
MEZCLA CRIOPROTECTORA 14
(20% DMSO Y 30% GLICEROL)



GRAFICA 21 CURVA DE ENFRIAMIENTO DE LA
MEZCLA CRIOPROTECTORA 15
(15% DMSO Y 30% GLICEROL)



GRAFICA 22 CURVA DE ENFRIAMIENTO DE LA
MEZCLA CRIOPROTECTORA 16
(5% DMSO Y 30% GLICEROL)



de solutos de bajo peso molecular no solo baja el punto de fusión, sino que reduce la cantidad de agua que es capaz de congelarse.

En la tabla 8 se muestran los puntos de fusión alcanzados por las 16 mezclas de crioprotectores empleadas. El punto de fusión de algunas mezclas, 5, 9, 10, 13, 14 y 15, no se pudo determinar a la temperatura externa colocada, por lo que dicho punto se debe localizar por debajo de las temperaturas alcanzadas por las soluciones (alrededor de -40°C), esto se debe a que la concentración de los crioprotectores fue alta (mayor a 15% en ambos).

Tabla 8 Puntos de fusión alcanzados por las 16 mezclas de DMSO-Glicerol empleadas como soluciones crioprotectoras.

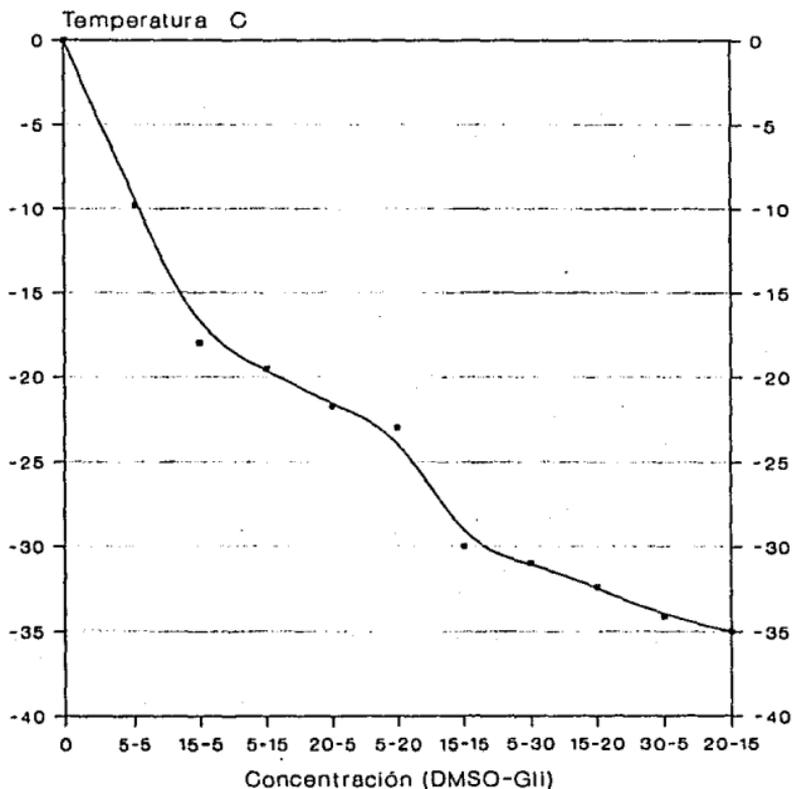
MEZCLA	DMSO %	GLICEROL %	PUNTO DE FUSION
1	30	5	-34.1
2	20	5	-21.7
3	15	5	-18.0
4	5	5	- 9.8
5	30	15	**
6	20	15	-35.0
7	15	15	-30.0
8	5	15	-19.5
9	30	20	**
10	20	20	**
11	15	20	-32.4
12	5	20	-23.0
13	30	30	**
14	20	30	**
15	15	30	**
16	5	30	-31.0

** A la temperatura externa empleada (-20°C) no se pudo determinar su punto de fusión.

En el resto de las mezclas, se llegó a su punto de fusión conforme se incrementó la concentración total de las soluciones crioprotectoras, ya que se puede observar que los puntos de fusión resultaron muy similares al comparar las mezclas 3 y 8 (gráficas 9 y 15); 2 y 12 (gráficas 8 y 18); 1, 6, 11 y 16 (gráficas 7, 12, 17 y 22), por lo que no se puede establecer alguna dominancia por parte de alguno de los dos crioprotectores, ya que si uno aumentaba y el otro disminuía o viceversa se producía un punto de fusión muy similar, por lo que se puede decir que tanto el DMSO y el glicerol contribuyeron de manera similar para bajar el punto de fusión de las soluciones acuosas.

Las mezclas que presentan un punto de fusión entre -30 y -35 °C, presentan un descenso de temperatura más lento, que aquellas que presentan un punto de fusión más alto, por lo que las mezclas 1, 6, 7, 11 y 16 serían las soluciones que podrían conferir mayor protección celular cuando estas son congeladas.

GRAFICA 23 Puntos de fusión alcanzados por las diferentes concentraciones de las mezclas de DMSO-Glicerol.



VI.4 Efecto citotóxico de las mezclas de crioprotectores (DMSO-GLI) sobre ápices con placa basal de *A sativum*.

En las técnicas de crioconservación, es necesario emplear soluciones con propiedades crioprotectoras. (compuestos químicos que tienen la función de proteger a la célula de los daños fisicoquímicos o mecánicos causados por el congelamiento), debido a que sólo muy poco material biológico en su estado natural puede ser congelado a temperaturas subcongelantes sin afectar adversamente la viabilidad celular (Kantha, 1987), pero este tipo de soluciones presentan generalmente diversos grados de citotoxicidad, que se pueden catalogar desde la muerte del explante a modificaciones en la respuesta morfogénica de las células en cultivo (Finkle et al., 1985).

Los explantes que son pretratados con soluciones crioprotectoras, pueden presentar alteraciones morfogénicas, éstas dependen tanto de las concentraciones así como del tiempo al que son expuestos en la solución.

En el presente estudio se analizó el efecto que presentaron 16 diferentes mezclas de crioprotectores (tabla 5), sobre ápices con placa basal de ajo sometidos a tres diferentes tiempos de exposición es decir 15, 30 y 60 min. Los ápices se recultivaron en medio MS basal. Los posibles efectos citotóxicos, se evaluaron a los 90 días de cultivo, período en el cual los explantes bajo condiciones de control, presentaron características bien desarrolladas y distinguibles. Se tomaron como malformaciones de los explantes al crecimiento irregular, es decir, cuando los explantes adquirían tallas por debajo de lo normal, ensanchamiento y enroscamiento de las hojas, formación de estructuras semejantes a callos, aspecto rugoso de las hojas e inclusive, pobre desarrollo general seguido por la muerte del explante, la tabla 9 muestra el porcentaje de plantas con desarrollo normal así como de malformaciones obtenidos a partir del pretratamiento con las 16 diferentes mezclas con sus

diferentes tiempos de exposición y cultivadas *in vitro* por un lapso de 90 días.

TABLA 9 Efecto de mezclas crioprotectoras, DMSO-glicerol sobre el desarrollo de ápices con placa basal de ajo *A sativum* cultivados *in vitro*. Resultados registrados 90 días después del tratamiento.

TIEMPOS DE EXPOSICION (min.)

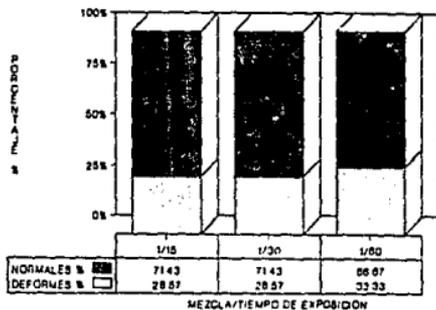
	15		30		60		
	NORM. %	DEF. %	NORM. %	DEF. %	NORM. %	DEF. %	
T	1	71.43	28.57	71.43	28.57	66.67	33.33
R	2	80.0	20.0	80.0	20.0	50.0	50.0
A	3	80.0	20.0	100.0	0.0	80.0	40.0
T	4	75.0	25.0	100.0	0.0	80.0	20.0
A	5	60.0	40.0	50.0	50.0	0.0	100.0
M	6	80.0	20.0	80.0	20.0	40.0	60.0
I	7	75.0	25.0	100.0	0.0	100.0	0.0
E	8	60.0	40.0	75.0	25.0	66.67	33.33
N	9	0.0	100.0	25.0	75.0	16.67	83.33
T	10	0.0	100.0	20.0	80.0	0.0	100.0
O	11	25.0	75.0	0.0	100.0	0.0	100.0
S	12	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0
	13	20.0	80.0	0.0	100.0	0.0	100.0
	14	16.67	83.33	60.0	40.0	60.0	40.0
	15	55.56	44.44	25.0	75.0	42.86	57.14
	16	44.44	55.56	50.0	50.0	80.0	20.0

Con los datos de la tabla 9 se realizaron gráficas por cada tratamiento y tiempo de exposición (gráficas 24 a la 39), en las

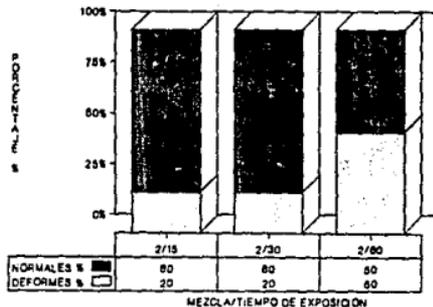
cuales se puede observar que casi todos los tratamientos con sus tres respectivos tiempos de exposición, presentaron alteraciones en la respuesta morfológica de los explantes a los 90 días de cultivo *in vitro*, presentándose con un mayor porcentaje de malformación en los tratamientos del 9 al 13, en donde las concentraciones de glicerol fueron altas (20 %); los explantes expuestos a los tratamientos 1, 2, 5 y 6 presentaron un porcentaje mayor de malformaciones al incrementarse el tiempo de exposición y las mezclas respectivas poseen concentraciones altas de DMSO (20 y 30 %), los tratamientos restantes presentaron diversos comportamientos, por ejemplo los tratamientos 4, 7, 8, 14, y 15 mostraron un porcentaje de malformaciones más alto a los 15 min. de exposición con respecto a los dos tiempos restantes; se encontraron dos particularidades, los explantes expuestos al tratamiento 3 presentan bajos efectos de toxicidad a los 15 min. (20%) pero a los 30 min. no hubo efecto citotóxico, pero éste se incremento considerablemente a los 60 min. (40%), en el tratamiento 4 se presenta un comportamiento similar, con la única diferencia que las malformaciones a los 60 min disminuyen un poco con respecto a las obtenidas a los 15 min.

Los efectos citotóxicos de las mezclas de crioprotectores empleadas, son de un porcentaje considerable, ya que en la mayoría de los tratamientos se presentaron alteraciones, en un alto porcentaje (25%), y el tiempo de exposición al parecer no fué un factor determinante en el efecto citotóxico, ya que se esperaba que al aumentar el tiempo de exposición las alteraciones se presentarían en un mayor grado, comportamiento que se presentó únicamente en los tratamientos 1, 2, 5, 6, 11 y 13, (gráficas 24, 25, 28, 29, 34 y 36), en los demás tratamientos, el efecto varió, esto se puede deber a que la concentración total de soluciones crioprotectoras, pareció ser el factor que estaba gobernando el porcentaje de malformaciones, ya que se observó que en las mezclas que presentaban una

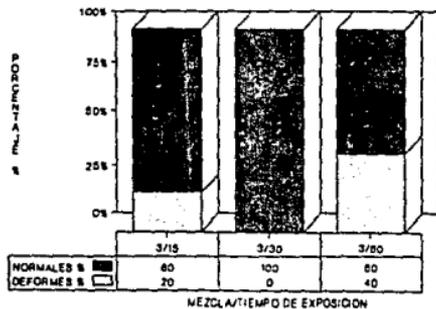
GRAFICA 24 PORCENTAJE DE MALFORMACIONES DE LOS EXPLANTES EXPUESTOS A TRES TIEMPOS DIFERENTES EN LA MEZCLA 1



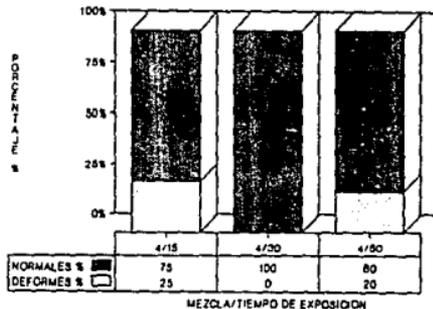
GRAFICA 25 PORCENTAJE DE MALFORMACIONES DE LOS EXPLANTES EXPUESTOS A TRES TIEMPOS DIFERENTES EN LA MEZCLA 2



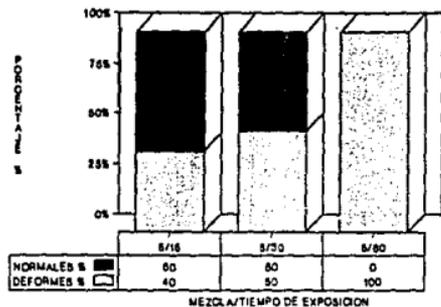
GRAFICA 26 PORCENTAJE DE MALFORMACIONES DE LOS EXPLANTES EXPUESTOS A TRES TIEMPOS DIFERENTES EN LA MEZCLA 3



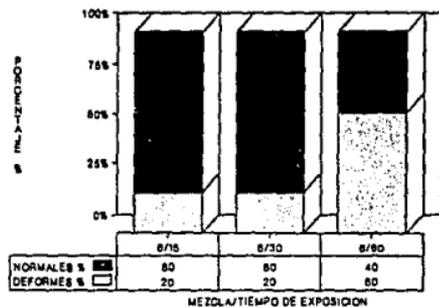
GRAFICA 27 PORCENTAJE DE MALFORMACIONES DE LOS EXPLANTES EXPUESTOS A TRES TIEMPOS DIFERENTES EN LA MEZCLA 4



GRAFICA 28 PORCENTAJE DE MALFORMACIONES DE LOS EXPLANTES EXPUESTOS A TRES TIEMPOS DIFERENTES EN LA MEZCLA 8

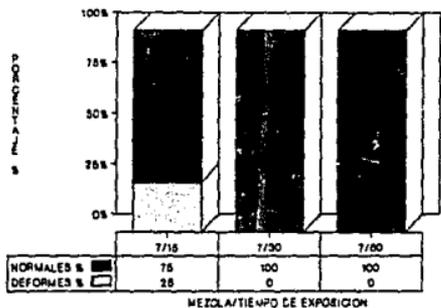


GRAFICA 29 PORCENTAJE DE MALFORMACIONES DE LOS EXPLANTES EXPUESTOS A TRES TIEMPOS DIFERENTES EN LA MEZCLA 8

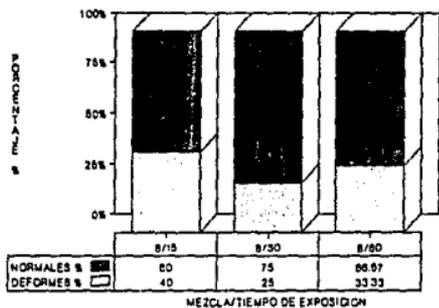


78

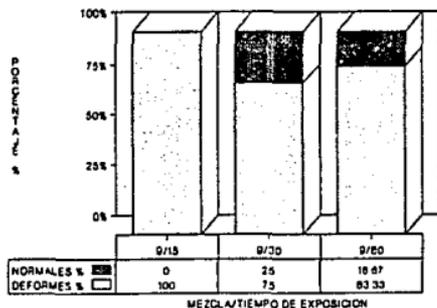
GRAFICA 30 PORCENTAJE DE MALFORMACIONES DE LOS EXPLANTES EXPUESTOS A TRES TIEMPOS DIFERENTES EN LA MEZCLA 7



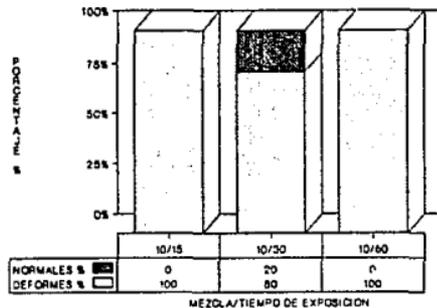
GRAFICA 31 PORCENTAJE DE MALFORMACIONES DE LOS EXPLANTES EXPUESTOS A TRES TIEMPOS DIFERENTES EN LA MEZCLA 8



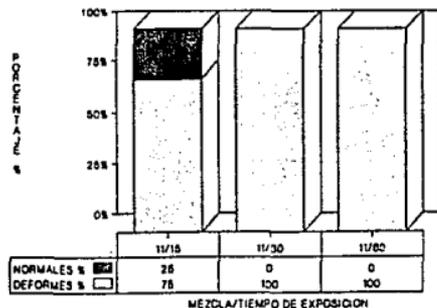
GRAFICA 32 PORCENTAJE DE MALFORMACIONES DE LOS EXPLANTES EXPUESTOS A TRES TIEMPOS DIFERENTES EN LA MEZCLA 9



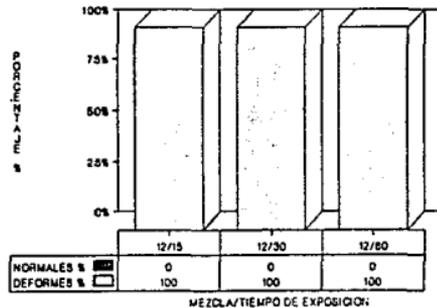
GRAFICA 33 PORCENTAJE DE MALFORMACIONES DE LOS EXPLANTES EXPUESTOS A TRES TIEMPOS DIFERENTES EN LA MEZCLA 10



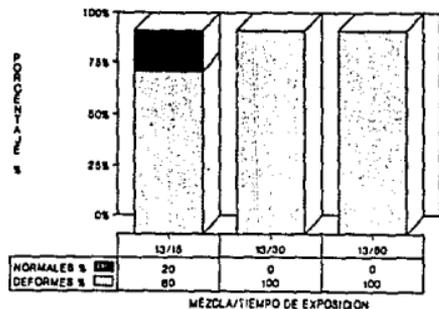
GRAFICA 34 PORCENTAJE DE MALFORMACIONES DE LOS EXPLANTES EXPUESTOS A TRES TIEMPOS DIFERENTES EN LA MEZCLA 11



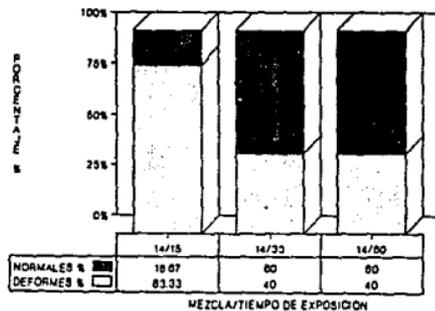
GRAFICA 35 PORCENTAJE DE MALFORMACIONES DE LOS EXPLANTES EXPUESTOS A TRES TIEMPOS DIFERENTES EN LA MEZCLA 12



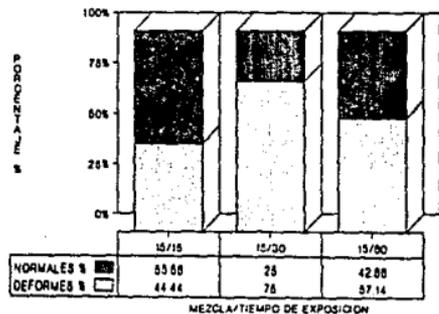
GRAFICA 36 PORCENTAJE DE MALFORMACIONES DE LOS EXPLANTES EXPUESTOS A TRES TIEMPOS DIFERENTES EN LA MEZCLA 13



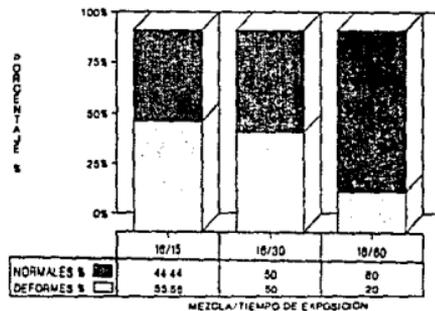
GRAFICA 37 PORCENTAJE DE MALFORMACIONES DE LOS EXPLANTES EXPUESTOS A TRES TIEMPOS DIFERENTES EN LA MEZCLA 14



GRAFICA 38 PORCENTAJE DE MALFORMACIONES DE LOS EXPLANTES EXPUESTOS A TRES TIEMPOS DIFERENTES EN LA MEZCLA 15



GRAFICA 39 PORCENTAJE DE MALFORMACIONES DE LOS EXPLANTES EXPUESTOS A TRES TIEMPOS DIFERENTES EN LA MEZCLA 16



ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

concentración alta de estas soluciones, el efecto citotóxico fue mayor y en donde la concentración era más baja, generalmente presentaron un comportamiento de mayor a menor, es decir el efecto citotóxico disminuye conforme transcurre el tiempo de exposición, esto sugiere que los explantes al entrar en contacto con la mezcla, sufren alteración, la cual se expresa en su desarrollo, debido a que sufren repentinamente un efecto osmótico desfavorable y al transcurrir el tiempo, este cambio de condiciones es compensado, por lo que al equilibrar o compensar la deshidratación, el explante puede posiblemente disminuir el efecto citotóxico y desarrollarse normalmente (gráficas 30, 31, 37 y 39).

Para evaluar la respuesta en el crecimiento de los explantes, así como el número de hojas obtenidas para cada tratamiento y tiempo de exposición, se realizó un análisis de varianza, mediante el paquete estadístico statgraphics versión 2.1, para lo cual se partió de la formulación de una hipótesis nula de que no existía diferencia significativa entre la altura alcanzada y/o el número de hojas formadas por los explantes con respecto a la mezcla empleada así como el tiempo de exposición.

El análisis de varianza para la altura alcanzada por las plántulas se realizó con un nivel de significancia de 0.05. (Tabla 10)

TABLA 10 Tabla de análisis de variancia para la variable respuesta (altura de los explantes) con respecto a dos factores fijos (tratamiento y tiempo de exposición)

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	Razón de Variancia	Nivel significativo
Entre los tratamientos	8093.170	48	181.1078	0.741	***
Dentro de los tratam.	5211.051	194	26.8652		
Total	13305.027	242			

*** DIFERENCIA ALTAMENTE SIGNIFICATIVA

En la tabla 10, se puede observar que existe una diferencia altamente significativa, por lo que la hipótesis nula se rechaza y se puede establecer que los tratamientos (mezcla y tiempo de exposición), ocasionan diferentes repuestas en la altura de los explantes de *A sativum*. De modo semejante, se encontró diferencias entre los tiempos de exposición a la mezcla crioprotectora (15, 30 y 60 min.) con respecto a la altura alcanzada por los explantes. Así mismo la interacción de ambos factores (tratamiento y exposición) producen efectos diferentes cuando se les combina.

El mismo análisis de la variancia, se realizó para el número de hojas formadas al ser tratadas con las diferentes mezclas y tiempos de exposición (tabla 11).

TABLA 11 Tabla de análisis de variancia para la variable respuesta (Número de hojas formadas) con respecto a dos factores fijos (tratamiento y tiempo de exposición)

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	Razón de Variancia	Nivel significativo
Entre los tratamientos	1642.9228	48	34.22758	7.008	***
Dentro de los tratam.	839.6780	194	4.32824		
Total	2482.6018	242			

*** DIFERENCIA ALTAMENTE SIGNIFICATIVA

Al encontrar una diferencia altamente significativa, se tiene que rechazar la hipótesis nula planteada, estableciéndose que las diferentes mezclas crioprotectoras empleadas, así como el tiempo de exposición y la interacción de ambas, producen diferencias en la variable de respuesta (número de hojas).

TABLA 12 Análisis de rango múltiple (Tukey) para el número de hojas formadas con respecto a las mezclas y tiempos de exposición empleados.

MEZCLA	DMSO-GLI %	EXPOSICION (min)	NUMERO (n)	PROMEDIO (cm)	GRUPOS HOMOGENEOS
10	20-20	30	5	0.88	*
9	30-20	60	5	1.00	*
13	30-30	60	5	1.00	*
9	30-20	30	5	1.20	**
10	20-20	15	5	1.20	**
9	30-20	15	5	1.40	***
10	20-20	60	5	1.40	***
12	5-20	60	5	1.60	****
11	15-20	60	4	1.75	*****
11	15-20	30	5	2.00	*****
13	30-30	30	4	2.00	*****
13	5-20	15	5	2.20	*****
12	5-20	30	5	2.20	*****
13	30-30	15	5	2.20	*****
15	15-30	60	5	3.40	*****
5	30-15	60	5	3.60	*****
11	15-30	15	5	3.60	*****
16	5-30	30	5	4.00	*****
5	30-15	30	5	5.00	*****
14	20-20	15	5	5.00	*****
3	15-5	60	5	5.20	*****
7	15-15	15	5	5.40	*****
8	5-15	15	5	5.40	*****
15	15-30	30	5	5.40	*****
1	30-5	60	5	6.20	*****
4	5-5	60	5	6.20	*****
5	30-15	15	5	6.20	*****
6	20-15	60	5	6.40	*****
3	15-5	30	5	6.60	*****
4	5-5	15	5	6.60	*****
1	30-5	15	5	6.60	*****
2	20-5	15	5	6.60	*****
2	20-5	30	5	6.60	*****
8	5-15	60	5	6.60	*****
16	5-30	30	5	7.00	*****
14	20-30	60	5	7.20	*****
8	5-15	30	5	7.40	* ****
2	20-5	60	5	7.60	* ***
3	15-5	15	5	7.60	* ***
6	20-15	30	5	7.60	* ***
1	30-5	30	5	7.80	***
4	5-5	30	5	7.80	***
6	20-15	15	5	7.80	***
14	20-30	30	5	7.80	***
7	15-15	30	5	8.00	***
16	5-30	15	5	8.00	***
CONTROL	---	--	5	8.60	***
7	15-15	60	5	9.20	**
15	15-30	15	5	9.40	*

TABLA 13 Análisis de rango múltiple (Tukey) para las alturas alcanzadas por las plántulas con respecto a las mezclas y tiempos de exposición empleados.

MEZCLA	(DMSO-GLI) %	EXPOSICION (min)	NUMERO (n)	PROMEDIO (cm)	GRUPOS HOMOGENEOS
9	30-20	60	5	0.70	M
10	20-20	30	5	0.70	M
13	30-30	60	5	0.70	M
10	20-20	15	5	0.76	M
10	20-20	60	5	0.80	M
9	30-20	30	5	0.84	M
12	5-20	60	5	0.96	M
13	15-5	30	4	1.03	MM
9	30-20	15	5	1.08	MMM
11	15-20	60	4	1.68	MMMM
12	5-20	30	5	1.80	MMMMM
12	5-20	15	5	2.16	MMMMM
11	15-20	30	5	2.24	MMMMM
11	15-20	15	5	2.46	MMMMM
16	5-30	60	5	3.98	MMMMMMM
5	30-15	60	5	4.18	MMMMMMMM
13	30-30	15	5	4.66	MMMMMMMM
14	20-30	15	5	4.72	MMMMMMMM
16	5-30	60	5	4.94	MMMMMMMM
14	20-30	60	5	7.64	MMMMMMMM
3	15-5	60	5	7.96	MMMMMMMM
8	5-15	15	5	8.34	MMMMMMMM
15	15-30	30	5	9.34	MMMMMMMM
7	15-15	15	5	9.66	MMMMMMMM
8	30-15	15	5	9.68	MMMMMMMM
2	20-5	60	5	9.86	MMMMMMMM
1	30-5	60	5	9.88	MMMMMMMM
6	20-15	60	5	9.96	MMMMMMMM
2	20-5	30	5	10.08	MMMMMMMM
2	20-5	15	5	10.38	MMMMMMMM
14	20-30	30	5	10.48	MMMMMMMM
5	30-15	30	5	10.78	MMMMMMMM
4	5-5	15	5	11.66	MMMMMMMM
3	15-5	30	5	12.36	MMMMMMMM
4	5-5	60	5	12.48	MMMMMMMM
3	15-5	15	5	12.70	MMMMMMMM
1	30-5	15	5	13.22	MMMMMMMM
7	15-15	60	5	13.44	MMMMMMMM
8	5-15	60	5	13.66	MMMMMMMM
6	20-15	30	5	14.72	M MMMMM
6	5-15	30	5	14.74	M MMMMM
6	20-15	15	5	15.72	M MMMM
16	5-30	30	5	16.48	MMMM
4	5-5	30	5	16.62	MMM
16	5-30	15	5	17.36	MM
1	30-5	30	5	17.88	MM
15	15-30	15	5	18.42	M
7	15-15	30	5	19.18	M
CONTROL	---	--	5	20.62	M

Al encontrar la existencia de diferencias, se realizó la prueba de Tukey, para poder establecer la homogeneidad entre los tratamientos con respecto a la altura alcanzada por los explantes, así como el número de hojas formadas, con sus tres respectivos tiempos de exposición (Tablas 12 y 13).

Para realizar la prueba de Tukey, se tomó a cada mezcla y tiempo de exposición como un solo tratamiento por lo que se obtuvo un total de 49 diferentes tratamientos, 48 de las mezclas más uno del control, de esta manera se podrían establecer los grupos homogéneos con base a la mezcla empleada así como a su tiempo de exposición. La tabla 12 muestra la formación de 11 grupos homogéneos verticales, no se puede observar un patrón de comportamiento claro, pero se puede decir que la mayoría de los datos, se encuentran muy alejados de los últimos 3 grupos, los cuales presentan un promedio de hojas de 7.60 a 9.40, la particularidad de estos datos es que el control no es el que presentó el mayor número de hojas sino que existen dos tratamientos que lo superaron, el tratamiento 7 con 60 min. de exposición y el 15 con 15 min. de exposición, el cual presentó el mayor promedio (9.40 cm).

En el caso de la altura alcanzada por las plántulas (tabla 13) se presentó un patrón similar al anterior, es decir, se encuentran 10 grupos homogéneos, los primeros grupos presentan características únicas, ante una concentración alta de DMSO y glicerol, arriba de 20% de cada crioprotector, a partir de aquí no se observa un patrón definido, ya que las concentraciones así como el tiempo de exposición, son muy variados, la mayoría de los tratamientos conforman el grueso de los grupos homogéneos, la gran particularidad de este análisis es que el último grupo, conformado por el tratamiento 15 con 15 min. de exposición, el tratamiento 7 con 30 min. de exposición y el control, son los que presentaron la mayor altura de las plántulas.

Como se ha mencionado anteriormente existe un efecto osmótico sobre las células causado por la concentración de

solutos de las soluciones crioprotectoras, cuando éstas son expuestas en un medio que las contenga, este efecto puede llegar a ser tan severo que puede causar algún daño a las células en su totalidad o a sus organelos, lo que llamamos citotoxicidad, ésta puede ser provocada por la naturaleza del compuesto, la concentración a la cual se encuentra, el tiempo de exposición al que las células son expuestas y al tipo de explante empleado (Kartha, 1985). El factor tiempo en el pretratamiento con crioprotector, puede también influenciar la sobrevivencia del material a congelar. En el chícharo se observó que al incrementar el tiempo de exposición de embriones en la mezcla de crioprotectores (glicerol-DMSO) presentaron efectos deletéreos en su germinación y desarrollo, ya que la mezcla les produjo hinchazón. (Mycock et al., 1991)

En trabajos anteriores con ajo (López, 1988; Valenzuela, 1988), se cuantificó el efecto citotóxico del DMSO y glicerol, por separado, encontrándose que para la variedad Taiwan, el DMSO incrementó su toxicidad conforme su concentración aumento (de 10% a 30%) así como al incrementar el tiempo de exposición, lo cual generó un porcentaje de malformaciones del 82.2%. En el caso del glicerol, se encontró que también se presentó un aumento de citotoxicidad conforme aumentó la concentración y el tiempo de exposición de compuesto, ya que a una hora de exposición y a diferentes concentraciones de glicerol no se presentaron efectos citotóxicos, pero al exponer los explantes por 24 hrs. la toxicidad se incrementó considerablemente (100%). No obstante se ha reportado que el glicerol es un agente crioprotector menos tóxico para las células vegetales que el DMSO (Kartha, 1985)

En la mayoría de los trabajos, se reportan periodos cortos de exposición, aunque el tiempo al cual se expone un explante a un crioprotector puede variar, Grout (1979) dió un pretratamiento a ápices meristemáticos de tomate con DMSO por un lapso de 48 hrs. y solamente así pudo obtener sobrevivencia.

Los efectos tóxicos de las soluciones tienen que ver directamente con los fenómenos osmóticos que causan las soluciones sobre las células, ya que si se coloca una célula ó un explante en una solución hipertónica, las células sufren deshidratación o plasmólisis y el protoplasto de cada célula se retrae alrededor de sus vacuolas, esto ocasiona la salida repentina de agua hacia el exterior de la célula y la entrada de solutos. La deshidratación es un proceso complejo para la célula viva, debido a que el agua no es únicamente un solvente para sustancias químicas sino que actúa como espaciador que ayuda a mantener los fluidos complejos en una configuración estable, cuando son eliminadas, las partículas o superficies con carga se aproximan entre sí y no solo se concentran las soluciones sino que las superficies coloidales respectivas se aproximan unas a otras hasta que se unen y éstas se desnaturalizan (Bidwell, 1979).

La deshidratación o plasmólisis no siempre causa efectos dañinos, si las células se coloca en una solución hipotónica, el agua perdida se recuperará rápidamente volviendo a su turgencia normal, pero si se dejan más tiempo las células se hincharán, la pared celular compuesta por fibrillas de celulosa evitará que la célula continúe creciendo indefinidamente, por lo que la lisis celular no puede ocurrir.

Las mezclas de las soluciones crioprotectoras (DMSO y glicerol) empleadas en el presente estudio actúan como solución hipertónica, conforme se concentran causan mayor deshidratación y como consecuencia mayor daño, al no permitir que las células logren recuperarse, debido a que causan un desbalance de los procesos bioquímicos causados por las concentraciones anormalmente altas, lo que puede contribuir a la desorganización molecular y a la precipitación de proteínas.

En la literatura criobiológica vegetal, el DMSO es el compuesto que predomina, seguido por el glicerol, sus efectos en mezclas, se ha reportado que ofrecen un efecto sinérgico

(Meryman y Williams, 1985) pero no se ha reportado cual es su efecto citotóxico, generalmente el DMSO es usado a niveles bajos (5 a 10%) debido a que a mayor concentración produce efectos tóxicos. El glicerol del 10 al 20 % es adecuado para la mayoría del material vegetal, aunque lo anterior no es un patrón a seguir, ya que se ha utilizado al DMSO al 15% para crioconservar ápices de espárrago, coles de Bruselas, clavel y especies de madera dura (Kantha, 1987), López (1988) crioconservo ápices con placa basal de ajo a concentraciones de DMSO al 30%

Los resultados obtenidos con ápices con placa basal de *A sativum* var Taiwan, sometidos a 16 mezclas de DMSO y glicerol, demostraron un efecto tóxico en la mayoría de los casos. Esto se explica por las características de ambos crioprotectores. El DMSO al ser una molécula pequeña penetra rápidamente al interior de la célula, deshidratandola parcialmente, sin que el daño causado sea severo aún en concentraciones altas, pero al actuar en conjunto con el glicerol que es una molécula de mayor tamaño y por lo tanto no penetra rápidamente al interior celular, provocan una deshidratación severa, ya que la cantidad de agua extraída de la célula es mucho mayor que la del soluto que puede entrar, ocasionando así un daño irreversible.

VI.8 Congelamiento de explantes

Los explantes utilizados como modelo, fueron ápices con placa basal de *Allium sativum* variedad Taiwan, los que se sometieron a dos tiempos de exposición (30 y 60 min) en las mezclas de crioprotectores, colocando 5 explantes en una ampollita con 1 ml de la mezcla crioprotectora en cada uno de los casos y selladas al calor, con excepción a una ampollita a la cual únicamente se le colocó un mililitro, de la mezcla a emplear, realizado todo lo anterior se procedió a congelarlas, colocandolas en la canastilla y ubicandolas en el interior del termo a una temperatura externa predeterminada (-20°C) a la ampollita abierta con la mezcla a emplear se le introdujó el termopar para poder registrar el descenso de la temperatura cada minuto, con los datos obtenidos se realizaron gráficas de temperatura contra tiempo, para cada una de las mezclas empleadas, que sirvieron para determinar sus puntos de fusión y las tasas de enfriamiento de las soluciones empleadas. Las tasa de enfriamiento se midieron en la parte lineal de la curva antes de llegar a su punto de fusión (gráfica 3).

Las tasas de enfriamiento que se aplicaron fueron las mismas para los dos tiempos de exposición empleados para los explantes en cada uno de los tratamientos, ya que las ampollitas respectivas, fueron colocadas al mismo tiempo en el interior del termo, cada tratamiento (mezcla con sus dos tiempos de exposición) se congeló en dos ocasiones con temperaturas externas diferentes, obteniéndose dos tasas de enfriamiento diferentes para cada ocasión, los datos de la tabla 14 muestra las tasas obtenidas para las diferentes mezclas así como su punto de fusión respectivo, en algunos casos dicho punto no se pudo determinar debido a que al llegar las soluciones a -40°C, tiempo en el cual toda el agua congelable de la célula ha salido para formar hielo extracelular (Kantha, 1985), las soluciones no

se habian congelado todavia por lo que su punto de fusion debe de localizarse aun por debajo de dicha temperatura.

TABLA 14. Tasas de enfriamiento obtenidas al congelar en dos ocasiones diferentes, ápices con placa basal de *A sativum*, en las 16 mezclas, así como sus puntos de fusión respectivos.

Número de mezcla	DMSO (%)	Glicerol (%)	Tasas de enfriamiento (-°C/min)		Punto de fusión (°C)
1	30	5	1.5	0.7	-34.1
2	20	5	2.0	1.0	-21.7
3	15	5	2.6	1.2	-18.0
4	5	5	2.5	1.4	-9.8
5	30	15	1.5	0.8	**
6	20	15	1.2	0.6	-35.0
7	15	15	1.8	1.1	-30.0
8	5	15	2.5	1.6	-19.5
9	30	20	1.5	1.0	**
10	20	20	1.6	0.9	**
11	15	20	2.0	1.1	-32.4
12	5	20	2.6	1.4	-23.0
13	30	30	1.8	0.9	**
14	20	30	1.9	1.0	**
15	15	30	1.5	0.8	**
16	5	30	2.2	0.7	-31.0

** No se determinó su punto de fusión.

El descenso de temperatura (tasas de enfriamiento) está en un rango de 0.5 a 2.5°C/min., lo que se puede tomar como tasas de enfriamiento lentas. Kartha (1985) menciona que el enfriamiento lento para células vegetales se le considera en un rango de 0.5 a 2.0°C/min. El rango utilizado en el presente estudio para congelar el material vegetal empleado, entró en su gran mayoría en dicho rango por lo que se esperaba que con referencia a este factor la recuperación de los explantes pudiera ser favorable.

Las ápices con placa basal de ajo se sumergieron (después de llegar a -40°C), directamente en NL y se dejaron almacenados durante 30 min., pasado este lapso las ampollitas fueron extraídas, descongeladas rápidamente en agua a 40°C por 1.30 min. y se lavaron en medio MS líquido, para extraer la mezcla crioprotectora. Una vez realizado lo anterior y para su recuperación, se sembraron en medio MS basal sin hormonas y puestos en una cámara de cultivo, con un fotoperíodo de 16 h, 1000 lux de intensidad luminosa y a 25 ± 2 °C de temperatura.

Se dejaron los ápices por siete meses en los medios de cultivo sin que hubieran reasumido su crecimiento. No obstante no se descarta que estén vivos pues, se considera que los explantes pueden presentar un "crioshock", el cual tienen que vencer para poder desarrollarse, generalmente se lleva mayor tiempo en la recuperación de los explantes criocconservados, dicho crioshock puede ir desde tres días hasta seis meses (Jørgensen, 1989)

Los problemas fisiológicos producidos por los fenómenos de criocconservación de meristemas están relacionados a los mecanismos de acción de los crioprotectores y al estado fisiológico del material vegetal, el cual puede ser uno de los factores principales para la sobrevivencia después del congelamiento en nitrógeno líquido (Doreudra et al., 1988), además que existen cambios en la ultraestructura, que pueden ser inducidos por diversos factores, algunos o todos se pueden

presentar durante los tratamientos criogénicos ya sea por las bajas temperaturas o por el estrés causado por el crioprotector (Finkle *et al.*, 1985). Aunque el crioprotector puede ocasionar la desorganización celular, ésta no siempre resulta en la muerte de la célula. Las soluciones crioprotectoras son necesarias cuando se congelan células a -196°C . se descongelan y finalmente se intenta su recuperación, ya que sin algún crioprotector frecuentemente no presentan características estructurales reconocibles, los crioprotectores efectivamente preservan algo de la integridad estructural, pero quizá la organización celular es fuertemente trastornada (Finkle *et al.*, 1985).

Teóricamente un crioprotector puede proteger a las células vivas contra el daño por congelamiento, de manera extracelular a la membrana, intracelularmente un crioprotector puede actuar para estabilizar los arreglos intra e intermoleculares de los componentes estructurales y finalmente puede asociarse al agua de la membrana (Chen *et al.*, 1984)

Se han empleado varias sustancias con propiedades crioprotectoras, siendo el DMSO y el glicerol los de mayor empleo, pero se ha reportado que el uso de mezclas proporciona un mayor porcentaje de recuperación de los explantes crioconservados, el agente no penetrante únicamente protege la membrana exteriormente por lo que es necesario la adición de un agente penetrante para evitar la cristalización de hielo intracelular (Finkle *et al.*, 1985). por lo que se esperaba que al utilizar la mezcla de glicerol (no penetrante) y DMSO (penetrante), proporcionara resultados favorables en el proceso de congelación de los ápices con placa basal de ajo. López (1988) logró obtener una recuperación del 80 % de ápices con placa basal de ajo utilizando DMSO al 30%. En el presente trabajo con el empleo de 18 diferentes mezclas crioprotectoras, se esperaba una recuperación de explantes igual o mayor y en mejores condiciones, debido al efecto sinérgico que se ha reportado que pueden ofrecer las mezclas. Sakai (1985) obtuvo

con clavel una mayor recuperación cuando se utilizaron mezclas de DMSO y glucosa; DMSO con sacrosa ó sorbitol que al utilizarlas separadamente, sin embargo cuando se ensayó la mezcla DMSO y glicerol ó solo glicerol la recuperación fue la menos efectiva.

Pero no solamente la mezcla empleada es la que puede garantizar la criopreservación, sino que existe un número de factores como la tasa de enfriamiento, los crioprotectores y sus concentraciones, la temperatura a la cual se congelan los explantes antes del almacenamiento en NL, el tipo y el estado fisiológico del material vegetal (Kantha, 1985).

Con respecto a las tasas de enfriamiento y como se mencionó anteriormente, el rango para considerarlo como lento es de 0.5 a 2.0°C/min, no siempre puede ser tan amplio. En células animales frecuentemente se presenta una tasa de congelamiento óptima aparentemente limitada por un lado por la sobredeshidratación y por el otro lado por la formación intracelularmente de hielo, esto mismo puede ser aplicado a muchos sistemas vegetales (IBPGR, 1980), ésto se ha comprobado al obtener mayor sobrevivencia a una tasa específica, los ápices de tomate sobreviven mejor con tasas intermedias de 20 a 30°C/min; la fresa a una tasa de 0.5°C/min.; la papa a 1000°C/min.; y el chicharo a 0.8°C/min.

Por otro lado existen métodos químicos que auxilian en la determinación de la sobrevivencia celular de manera cuantitativa, como el método empleado por Steponkus, (1987) que se basa en la reducción del 2,3,5 Cloruro de Trifenil Tetrazolio (CTT), por la respiración mitocondrial, que reduce el CTT a derivados de formazan que presentan una coloración particular que puede ser medida espectrofotométricamente y proporcionar un valor real.

Dicha prueba se ha realizado en el laboratorio de Biotecnología Vegetal y Genética, del Inst. de Biología UNAM, con los mismo tipo de explantes y condiciones utilizadas en el presente trabajo, obteniéndose una tasa de respiración del 50%

con respecto al control, pero sin que los explantes reasumieran su desarrollo (López, comunicación personal). Si lo anterior se presenta en la mayoría del material experimental, sugiere que existe un porcentaje de células que pueden estar vivas o con ciertos daños que necesitan de alguna condición para poder desarrollar una planta nuevamente. la IBPGR (1985) menciona que los meristemas congelados y descongelados no necesariamente tiene que estar intactos para el normal crecimiento y organización de los meristemas, que se puede producir cuando el daño celular no es muy severo. Estudios anatómicos de meristemas criopreservados han mostrado daño en el área del domo del meristemo, Henskins y Kartha (1980) estudiaron ápices meristemáticos de chícharo después de estar almacenados por una hora en NL, las células meristemáticas parecían estar muertas, aunque pudieron observar células aparentemente vivas del tejido del primordio foliar y una porción lateral del meristemo, nuevos brotes meristemáticos se desarrollaron presumiblemente apartir de dichos sitios.

Para lograr y/o mejorar la recuperación de explantes después de la congelación se han hecho investigaciones para la manipulación de las condiciones de post-descongelamiento, Grout y Henshaw (1978) recomendaron un nivel bajo de luz durante la recuperación de meristemas de *Solanum gonocalyx*, Henshaw et al., (1979) demostró un incremento considerable en la sobrevivencia de *Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum* con la adición de NAA 0.5 mg/l y GA₃ 0.2 mg/l en el medio de recuperación.

Para el ajo, no se lograron las condiciones para su recuperación, como se ha discutido, a pesar de que se manejaron varias tasas de enfriamiento, éstas tal vez no fueron las óptimas ó su combinación con las diferentes mezclas, no permitieron que los explantes se desarrollaran, debido a lo anterior sería necesario relizar una invetigación más amplia para poder investigar que factor o factores son los que estan

impidiendo la recuperación de los explantes, dicha investigación podría ser encaminada al empleo de otras mezclas crioprotectoras, variar las tasas de enfriamiento, empleo de la microscopia para detectar los posibles daños celulares, utilización de otros explantes y la experimentación con otras especies.

VII. CONCLUSIONES GENERALES

Debido a los problemas que representa mantener al material vegetal de importancia económica con propagación vegetativa y/o con semillas recalcitrantes, es necesario desarrollar tecnologías adecuadas para lograrlo, por lo que la ventajas que podría ofrecer el empleo de métodos criogénicos de conservación para almacenar el material vegetal sin que sufra alteraciones genéticas, es la mejor opción.

Existen equipos automatizados de crioconservación de costos elevados, pero en países como México, donde existe una gran cantidad de recursos que es necesario conservar, esto no se ha realizado debido a que no se cuenta con el capital para poder adquirir los equipos necesarios, por lo que es necesario desarrollar tecnologías de bajo costo que puedan ser aplicadas en cualquier parte del país y así poder conservar nuestros recursos vegetales.

En el presente trabajo se propone un equipo de crioconservación de bajo costo, el cual es una modificación del utilizado por López *et al.* (1988), las adaptaciones realizadas permiten tener un manejo más fácil, cómodo y de una mayor precisión.

Este sistema de enfriamiento puede proporcionar tasas de enfriamiento lentas (dentro de un rango de 0.5 a 2.5 °C/min.) con las que posiblemente se podría congelar y recuperar la mayoría de las especies mencionadas en la bibliografía sobre este tema, puesto que casi todos los reportes en la literatura abarcan dicho rango, aunque también el sistema podría aplicarse para la crioconservación rápida.

Con el aparato de enfriamiento propuesto es posible variar las tasas de enfriamiento mediante las concentraciones del

crioprotector y la temperatura externa dentro del termo a la cual son colocadas, puesto que si se emplean altas concentraciones la tasa de enfriamiento será más lenta, y de igual forma, conforme se varia la temperatura externa, la tasa de enfriamiento también variara, debido a que existe un gradiente de temperatura ascendente generado por los vapores del nitrógeno líquido desde su superficie hasta la boca del termo.

Este gradiente se determinó para el termo con 10 litros de nitrógeno líquido, encontrándose que el descenso de la temperatura en el interior del termo, se comporta de manera lineal, se pudo determinar la ecuación $Y = -0.53(h) + 0.84$, indicándonos que la temperatura desciende alrededor de 0.53 °C por centímetro con un error estándar de 0.40 °C, por lo menos hasta -50 °C, ya que cerca de la superficie del nitrógeno líquido, el descenso de temperatura se comporta de manera exponencial (Heiras, comunicación personal).

Es importante registrar el comportamiento de las mezclas crioprotectoras al ser expuestas a los vapores del nitrógeno líquido para poder determinar su tasa de enfriamiento y poder manipularlas cuando se congelan las explantes, ya que nos indican a la temperatura externa a la cual se deben colocar para que proporcionen tasas de enfriamiento lentas.

Las mezclas crioprotectoras empleadas (DMSO-glicerol) bajan el punto de fusión de una solución acuosa conforme aumenta su concentración total, por lo que se concluye que tanto el DMSO y el glicerol, bajan el punto de fusión de forma similar. Las mismas mezclas causan efectos citotóxicos sobre los ápices con placa basal de ajo, sobre todo cuando se encuentran concentraciones altas de ambos compuestos, pero aún en concentraciones bajas causan efectos tóxicos, los cuales se expresan en el desarrollo anormal de la plántula, debido presumiblemente a la sobredeshidratación causada por las mezclas, debido a que el DMSO actúa como agente penetrante, el cual al entrar rápidamente a la célula, ésta se deshidrata

parcialmente, sin que ésto dañe fuertemente a la célula, inclusive cuando se encuentra a concentraciones altas, pero al estar en combinación con el glicerol, que es un agente que se le puede catalogar como no penetrante cuando se encuentra en combinación con el DMSO, causa una deshidratación aún mayor, provocando daños que en ocasiones son irreversibles.

A pesar de que los resultados de crioconservación para los ápices con placa basal de *A sativum* var. Taiwan, no han sido favorables, ya que después de 7 meses no han reasumido su crecimiento, pero han mostrado índices de actividad metabólica, mediante la prueba de CTT, por lo que la crioconservación del ajo, ofrece muchas expectativas.

El estudio plantea la facilidad de emplear este sistema de enfriamiento de bajo costo, para la conservación de otras especies a largo plazo, principalmente de aquellas que al igual que el ajo sea difícil su mantención bajo los procedimientos tradicionales de conservación de germoplasma.

BIBLIOGRAFIA

-- Bajaj, Y.P. (1978). Cryobiology of Plant Cell Cultures and Establishment of Gene-Banks. en Bajaj y Reinert (eds) Plant Cell and Organs.

-- Bajaj, Y.P. (1979). Technology and Prospects of Cryopreservation of Germplasm. Euphytica 28: 267-285.

-- Bass, L.N. (1984). Germplasm Preservation. en Conservation of Crop Germplasm an International Prespective. CSSA Special Publication. E.U.A. No. 8: 55-67

-- Bidwell, R.G.S., (1979). Fisiología Vegetal. AGT Editor, S.A. México, D.F. 784 pp.

-- Block, E. (1985). The Chemistry of Garlic and Onions. Scientific American. Marzo: 94-99.

--Brian, W.W. (1990) Genetic Preservation in vitro. pp. 13-22 En: H.J.J. Nijkamp, L.H.W. Van der Plas and Van Aartrijk, editores. Progress in Plant Cellular and Molecular Biology. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.

-- Chen, T.H., Cockburn, W and Street, H.E (1979). Preliminary experiments on freeze-preservation of sugar cane cells. Taiwania, 24. 70-74.

-- Chen, T.H., K.K. Kartha, F. Constabel, and L.V. Gusta, (1984). Freezing characteristic of cultured *Catharanthus roseus* (L) G. Don cells treated with DMSO and sorbitol in relation to cryopreservation. Plant Physiol 75: 720-725.

- Chen, T.H. and K.K. Kartha. (1987) Cryopreservation of Woody Species. En: J.M. Bonga and D.J. Durzan (eds.), Cell and Tissue Culture in Forestry. Vol. 2. Martinus Nijhoff Publisher, Dordrecht-Boston-Lancaster.
- Cronquist, A. (1981). An Integrated System of Classification of Flowering Plants. Columbia Univ. Press. New York.
- Dereuddre, J., J. Fabre and C. Bassaglia (1988). Resistance to freezing in liquid nitrogen of Carnation (*Dianthus caryophyllus* L. var. Eolo) apical and axillary shoot tips excised from different aged *in vitro* plantlets. Plant Cell Reports 7: 170-173.
- Finkle, B.J., M.E. Zavala and J.M. Ulrich (1985). Cryoprotective compounds in the viable freezing of plant tissues. En: K.K. Kartha (ed) Cryopreservation of Plant Cells and Organs, CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 75-113.
- Ford-Lloyd, B. and Jackson, M. (1986). Conservation. pp. 50-67 En: Arnold (ed), Plant Genetic Resources an introduction to their conservation and use. E.U.A.
- Frankel, O. H. (1970). Genetic conservation of plant useful to man. Biol. Conservation, 2, 162-169.
- Franks, F. (1985). Biophysics and Biochemistry at Low Temperatures. Cambridge, University Press.
- Grout, B.W.W. and Henshaw (1978). Freeze-preservation of potato shoot tip cultures. Ann. Bot., 42: 1227-1229.
- Grout, B.W.W. (1979). Low temperature storage of imbibed tomato seeds: A model for recalcitrant seed storage. Cryoletters, 1: 71-76.

-- Hensaw, G. G. (1979) Tissue cultures and germplasm storage. IAPTC Newsletter, (28): 2-7.

-- Hensaw, G. G. O'Hara, J. F. and Westcott, R. J. (1980) Tissue culture methods for the storage and utilization of potato germplasm. En: D. Ingram and J. Helgeson, Tissue culture for Plant Pathologist., Oxford, Blackwell.

-- IBPGR. Recomendations (1983).

-- IBPGR. (1985). Advisory Committee on *in vitro* storage. Report of the Second Meeting. Rome.

-- IBPGR. (1986). Design, Planning and Operation of *in vitro* genebanks. Rome.

-- Jørgensen, J. (1989) Conservation of Valuable Gene Resources by Cryopreservation in some Forest Tree Species. J. Plant Physiol. 136: 373-376.

-- Kartha, K.K. (1981). Meristem culture and cryopreservation methods and applications in agriculture, en T.A. Thorpe (ed.), Plant Tissue Culture Methods and Applications in Agriculture. Academic Press, New York.

-- Kartha K.K. (1982). Cryopreservation of germplasm, en D.T. Thomas (ed.), Application of Plant Cell and Tissue Culture to Agriculture and Industry. University of Guelph, Canada.

-- Kartha, K. K. (1984). Freeze Preservation of Meristems. 621-628 En: Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, vol. 1, Cambridge, Academic Press.

- Kartha K.K. (1985). Meristem culture and germplasm preservation. En: K.K. Kartha (ed.), Cryopreservation of Plant Cells and Organs. CRC Press, Boca Ratón, Florida. pp 115-134.
- Kartha, K. K. (1985). Cryopreservation of Plant Cells and Organ. Newsletter. IAPTC. 45, 2-15.
- Kartha, K.K. (1987). Advances in the Cryopreservation Technology of Plants Cells and Organs. Plant Tissue and Cell Culture, pp. 447-458
- López, A.L. (1989). Acción del DMSO en ápices de *Allium sativum* in vitro sometidos a Nitrógeno Líquido. Tesis Profesional, Fac. Ciencias UNAM, México.
- Manzur, P (1970). Cryobiology: The freezing of Biological System. Science. 168: 939-949
- Mc Gann L.E. (1978). Differing actions of penetrating and nonpenetrating cryoprotective agents. Cryobiology, 15: 382-390.
- Meryman T.H. (1971). Cryoprotective agents. Cryobiology 8: 173-183.
- Meryman, T. H. and Williams, R. J. (1985). Basic Principles of freezing injury to plant cells; natural tolerance and approaches to cryopreservation, en K. K. Kartha (ed.). Cryopreservation of Plant Cells, and Organs, CRC, Press, Boca Ratón, Florida.
- Miranda, T. L. (1992). Analisis preliminar para bancos activos de germoplasma de *Allium sativum* L. in vitro. Tesis Maestría, Fac. Ciencias UNAM, México.

- Murashige, T. and F. Skoog, (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and bioassays with Tobacco Tissue Cultured. *Physiol. Plant* 15: 473-494.
- Mycock, D.J., Watt, M.P. and Berjak, P. (1991) A simple Procedure for Cryopreservation of Hydrated Embryonic Axes of *Pisum sativum*. *J. Plant Physiol* 138: 728-733.
- Novák, F.J., L. Havel y J. Dolezel. *Allium*. 1986 En: Handbook plant cell culture Vol. 4. Techniques and aplicaciones, p. 419-456. Editado por D. A. Evans, W. R. Sharp, P. V. Ammirato. Editorial MacMillan Publishing Company, N.Y., 1986.
- Plucknett, D.L., N>J>H> Smith, J.T. Williams and N.M., Anishetty (1987). *Gene Banks and the World's Food*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey. 247 pp.
- Rubluo, A. (1985). Estrategias para la preservación del germoplasma vegetal *in vitro*, en M. L. Robert y V. M. Loyola (Eds.), *El Cultivo de Tejidos Vegetales en México*. CONACYT, México.
- Rubluo A., K.K. Kartha, L.A. Mroginski and J. Dyck (1984). Plant Regeneration from Pea Leaflets Cultured *in vitro* and Genetic Stability of Regenerants. *J. Plant Physiol* 117: 119-130.
- Sakai, A., S. Kobayashi y I. Oiyama (1991). Survival by Vitrification of Nucellar Cells of Navel Orange (*Citrus sinensis* var. *brasiliensis* Tanaka) Cooled to -196°C. *J. Plant Physiol*. 137: 465-470.
- Steponkus, P.L. and F.O. Lanphear (1967). Refinement of the triphenyl tetrazolium chloride method of determining cold injury. *Plant Physiol.*, 42, 1432-1436.

-- Storey, B. and Storey, J. (1990). Frozen and Alive. Scientific American. 62-67.

-- Tie Gang Lu and Ching San Sun (1992) Cryopreservation of Millet (*Setaria italica* L.). J. Plant Physiol. 139: 295-298

-- Valenzuela, M. L. (1988). Respuesta *in vitro* de ápices de *Allium sativum* sometidos a Nitrógeno Líquido en presencia de glicerol. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias, UNAM, Mexico.

-- Wilkins, Ch, P. and H. Dodds (1983). The application of tissue culture techniques to plant genetic conservation. Sci. Prog., Oxf. 68: 259-284.

-- Withers, L. A. (1980). Tissue Culture for Storage and Genetic Conservation. IBPGR Secretarial Rome.