

00345

5.
221

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CRIOCONSERVACION DE GERMOPLASMA IN VITRO
DE ESPECIES VEGETALES DE INTERES ECONOMICO:
ANALISIS DE LA EFICIENCIA DE UN SISTEMA
SENCILLO DE CONGELACION

FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
(BIOLOGIA VEGETAL)

P R E S E N T A :

MARTIN MATA ROSAS

DIRECTOR DE TESIS: DR. ABRAHAM RUBLUO ISLAS

MEXICO, D. F.

1995



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

EL PRESENTE TRABAJO DE INVESTIGACION SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES DEL JARDIN BOTANICO DEL INSTITUTO DE BIOLOGIA, UNAM, BAJO LA DIRECCION DEL DR. ABRAHAM RUBLUO ISLAS.

EN COORDINACION CON EL LABORATORIO DE BIOQUIMICA ESTRUCTURAL DEL INSTITUTO DE QUIMICA, UNAM, CON LA ASESORIA DEL DR. ROBERTO ARREGUIN ESPINOSA Y DEL LABORATORIO DE MICROSCOPIA ELECTRONICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM, CON LA ASESORIA DEL DR. LUIS FELIPE JIMENEZ GARCIA

DEDICADO A

MI ESPOSA ELBA LUZ

MI PROXIMO BEBE

MIS PADRES, FRANCISCO Y AURORA

MIS HERMANOS, FRANCISCO, BEATRIZ, FERNANDO Y ARMANDO

¡GRACIAS POR SU APOYO!

AGRADECIMIENTOS

Al Jardín Botánico del Instituto de Biología, UNAM por permitirme realizar el presente trabajo de investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgarme la beca para realizara mis estudios de Maestría.

Al Dr. Abraham Rublúo Islas por el apoyo brindado y las facilidades otorgadas para realizar este estudio en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales.

A mi jurado dictaminador:

Dr. Victor Manuel Chávez Avila por sus amistad, consejos y gran apoyo para llevar a buen término el presente trabajo.

Dr. Roberto Arreguín Espinosa por su gran apoyo, ayuda y amistad.

Dra. Margarita Collazo Ortega por sus consejos y al gran apoyo que me brindo para alcanzar mis metas.

Dr. Luis Felipe Jiménez García por su apoyo y paciencia.

Dr. Jesús Heiras Aguirre por su apoyo y su buena disposición hacia nuestro trabajo.

Dra. Judith Márquez Guzmán por su consejos para mejorar el presente trabajo.

Finalmente a mis grandes amigos del Laboratorio de Cultivos de Tejidos Vegetales por todo su gran apoyo brindado, especialmente a Victor, Ana Laura y Paty.

INDICE

Abreviaturas	
Resumen	1
I.- ANTECEDENTES	3
Conservación <i>in situ</i> y <i>ex situ</i>	6
Problemas de almacenamiento de especies con semilla recalcitrantes y/o de reproducción vegetativa	8
Cultivo de tejidos vegetales	10
Métodos de conservación <i>in vitro</i>	11
Bancos de germoplasma <i>in vitro</i>	14
Crioconservación	15
Vitrificación	18
Justificación	21
Objetivo general	22
Objetivos particulares	22
II.- Materiales y Métodos	23
Micropropagación de <i>Opuntia robusta</i> var. <i>larreyi</i>	23
Inducción de brotes en los medios de cultivo	23
Citotoxicidad de los crioprotectores	26
Descripción del sistema sencillo de enfriamiento para intentar la crioconservación de germoplasma en este estudio	29
Curvas de enfriamiento	30

Crioconservación de explantes de <i>O. robusta</i>	30
Inducción de estrés osmótico	31
Prueba de viabilidad	33
Análisis de la ultraestructura de células de <i>O. robusta</i> mediante el empleo de microscopia electrónica de transmisión	35
Determinación del peso molecular de proteínas de <i>O. robusta</i> mediante electroforesis	36
Cuantificación espectrofotométrica de proteínas	38
Cultivos <i>in vitro</i> de <i>Fragaria</i> sp., <i>Pisum sativum</i> y <i>Solanum tuberosum</i>	39
Crioconservación de ápices de tallo	40
III.- Resultados y Discusión	46
Micropropagación de <i>Opuntia robusta</i>	46
Citotoxicidad de las soluciones crioprotectores	53
Comportamiento de las soluciones al enfriarlas	57
Crioconservación de brotes de <i>O. robusta</i>	63
Viabilidad de brotes de <i>O. robusta</i>	65
Inducción de estrés osmótico	68
Variación de tasas de enfriamiento utilizando la mezcla crioprotectora 2 (DMSO 10%, sacarosa 3% y glicerol 15%)	71
Análisis ultraestructural mediante microscopia electrónica de células de <i>O. robusta</i> sometidas a congelación	72
Estudios electroforéticos para la determinación de proteínas totales en <i>O. robusta</i>	78

	Cuantificación espectrofotométrica de proteínas	82
	Crioconservación de mersitemos de fresa, chícharo y papa	82
	Discusión general	87
IV.-	Conclusiones	89
V.-	Bibliografía citada	91

ABREVIATURAS

ABA	Acido abscísico
AIA	Acido indol acético
ANA	Acido naftalén acético
BAP	Bencil aminopurina
BCA	Acido biconínico
B5	Medio de cultivo de Gamborg
CODAGEM	Coordinación de Agricultura del Estado de México
CTT	Cloruro de 2,3,5 trifenil tetrazolio
DMSO	Dimetil sulfóxido
2IP	N-6 dimetil alil aminopurina
FAO	Food and Agriculture Organization of United Nations
GA ₃	Acido giberélico
IBA	Acido indol butírico
IBP	International Biological Program
IBPGR	International Board of Plant Genetic Resources
K	Cinetina
MS	Medio de cultivo de Murashige y Skoog
MSL	Medio de cultivo líquido de Murashige y Skoog
NL	Nitrógeno líquido
T.ext.	Temperatura externa
Z	Zeatina

RESUMEN

Se establecieron condiciones para la regeneración y micropropagación *in vitro* de *Opuntia robusta* var. *larreyi* a partir de secciones de cladodios jóvenes en medio de cultivo MS basal adicionado con tiamina $0.4 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, BAP $0.5 \times 10^{-5} \text{ M}$, sacarosa $20 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, agar 0.6% y pH 5.6, se lograron hasta 9 brotes por explante con una altura promedio de 9.33 mm después de un mes de cultivo. Mediante un equipo sencillo de congelación se intentó la criopreservación de brotes de 5.0 mm de altura, obtenidos de los cultivos *in vitro*, solamente tres explantes pretratados con una mezcla de crioprotectores (dimetil sulfoxido 10%, sacarosa 3% y glicerol 15%) sobrevivieron y reanudaron su crecimiento, pero éstos no se desarrollaron en plantas normales. Para observar posibles daños causados a las células se realizaron observaciones con microscopía electrónica, en las que se pudo determinar que la congelación causó un daño celular generalizado e irreversible que imposibilita reanudar las funciones celulares. También se cuantificó las alteraciones en el contenido de proteínas totales, se encontró que se pierden varias proteínas al congelar los explantes. Hasta donde sabemos, éste es el primer reporte sobre estudios criogénicos en la familia de las cactáceas y la regeneración *in vitro* de *O. robusta* var. *larreyi*. Para evaluar el sistema de enfriamiento utilizado se procedió a la congelación de meristemas de especies para las que se ha reportado éxitos en su criopreservación, como *Pisum sativum* (chícharo), *Fragaria* sp. (fresa) y cuatro variedades de *Solanum tuberosum* (papa) Atzimba, Alpha, Mexiquense y Tollocan. Las cuatro especies trabajadas se congelaron mediante la técnica de tasas lentas de enfriamiento y para la papa también se utilizó el congelamiento ultra rápido. El porcentaje de sobrevivencia (medido en términos de desarrollo de plántulas) fue nulo a excepción del chícharo que en un ensayo presentó el 15% de recuperación. En los estudios en que se han reportado resultados positivos con las especies de *Fragaria*, *Pisum* y *Solanum* se utilizaron equipos automatizados de criopreservación que controlan exactamente las tasas de enfriamiento, factor

fundamental del que carece el equipo sencillo de congelación aquí utilizado y que fue determinante, ya que las tasas de enfriamiento obtenidas no pudieron ser controladas y por lo tanto no fueron constantes. Esto significa que representaban el promedio de varias tasas que se presentan mientras la muestra es expuesta a los vapores del nitrógeno líquido, lo que impidió controlar y repetir los resultados positivos

I.- ANTECEDENTES

En la actualidad existe una tendencia a nivel mundial para incrementar la conservación del germoplasma tanto animal como vegetal, pues debe aceptarse que representan recursos naturales y podrían ser aprovechados en forma racional y sustentable para el bienestar, permanencia y desarrollo de la humanidad. El germoplasma vegetal comprende el total de especies, subespecies, grupos genéticamente definidos, variantes genéticas y mutantes cuya continua existencia es importante para el resto de los organismos presentes y futuros. El germoplasma también es el mensaje hereditario, el cual dicta el desarrollo y evolución de plantas y animales, esta información es pasada de generación a generación en una cadena continua de una célula a otra; una vez que una célula viva se pierde, el germoplasma de esa célula se pierde (Wilkes, 1989; Towill y Roos, 1989).

La urgencia para la conservación genética de germoplasma a surgido fundamentalmente de tres procesos:

- 1) Un incremento de la población humana que ha llevado a la expansión de la agricultura con alteraciones en los ecosistemas naturales y que llevará a serias repercusiones en el futuro.
- 2) La adopción general de germoplasma élite y tecnología agrícola común que promueve la uniformidad genética, algunas veces a nivel mundial, y
- 3) Los centros de variabilidad genética están moviéndose de los sistemas naturales y de la agricultura primitiva hacia bancos de genes y cultivadores de colecciones de trabajo. (Wilkes, 1989).

Históricamente se puede decir que las ideas para la conservación de las especies vegetales cultivadas y sus parientes silvestres, comenzaron a darse a partir de la localización y descripción de los centros geográficos de diversidad genética por Vavilov en los años veinte del presente siglo, que ha permitido generar los conocimientos para que los recursos genéticos estén siendo aprovechados en investigaciones genéticas, citogenéticas, estudios evolutivos y dando a los agricultores

una vasta reserva de material nuevo y original. Pero no se contempló su conservación hasta mediados de los años sesenta, cuando se advirtió que había una gran tasa de desplazamiento de variedades de cultivos primitivos por nuevos cultivares introducidos (Wilkins y Dodds, 1983). En los años sesenta se advirtió que muchas especies silvestres estaban por desaparecer y que la información genética de los cultivos de mayor importancia económica estaba mermándose a una tasa alarmante. No fue sino hasta 1974 que la IBPGR (International Board for Plant Genetic Resources) estableció un programa mundial para la preservación de germoplasma tropical y subtropical. En él los cultivos alimenticios fueron clasificados como prioritarios (Panis *et al.*, 1992). El germoplasma de los recursos cultivables se definió como la disposición total de especies, subespecies y sus variantes genéticas, los cuales son o pueden ser importantes para la humanidad presente o del futuro (Bass, 1984).

La consecuencia del cambio de cultivos primitivos por "avanzados" ha sido una reducción de la base genética que ha ocurrido de dos maneras:

- 1) por selección de descendientes uniformes, resultando en "líneas puras", multilíneas, híbridos sencillos o dobles, etc., y
- 2) por selección de cultivos para objetivos cercanamente definidos. Ambos procesos han resultado en una marcada reducción de la variabilidad genética (Wilkins y Dodds, 1983).

En 1967, en la Conferencia técnica entre la FAO (Food and Agriculture Organization of United Nations) y la IBP (International Biological Program), para examinar la disponibilidad de los recursos genéticos vegetales, el estatus y organización para su explotación, evaluación, utilización y conservación, listaron seis distintas clases de germoplasma que se necesitaba conservar:

- 1) cultivares de uso corriente,
- 2) cultivares obsoletos y cultivos menores,
- 3) almacenes genéticos especiales tales como grupos resistentes, material genético y citogenético de mutaciones inducidas, etc.,
- 4) variedades primitivas,
- 5) especies silvestres y malezas relacionadas con las especies cultivadas, y

6) Organismos que no aparentan una utilidad inmediata pero los cuales son parte de la red ecológica de la vida (Wilkins y Dodds, 1983; Wilkes, 1989).

Lo anterior formó la base para que en la actualidad se brinde una gran atención a la diversidad biológica que se encuentra amenazada, especialmente en la zona de los trópicos y en particular en las selvas, las cuales se estima que están desapareciendo a una tasa de 10.5 millones de hectáreas por año (Heywood, 1992). Es casi inevitable que esta pérdida masiva de hábitats provoque la extinción local o total de muchas especies. Estimaciones de biólogos como Raven (1987, 1988), Wilson (1988), Meyers (1988), Simberloff (1986) citados por Heywood (1992), sugieren, con base a extrapolaciones de estudios de ciertas zonas en particular, que diez de cada mil especies enfrentan un peligro inminente de extinción durante las siguientes décadas. Lo que es un hecho es que diez especies de cada mil están sufriendo una erosión genética, es decir, una pérdida de su capacidad de variación genética de sus poblaciones, por lo que la conservación de toda vida silvestre es prioritaria y no sólo aquellos organismos de interés económico (Heywood, 1992).

Como un resultado de la pérdida acelerada del germoplasma, tanto de las especies tropicales silvestres y cultivadas, la conservación de la diversidad genética es de vital importancia pues es la base de los programas de mejoramiento y disponibilidad de cultivos alimenticios esenciales para la sustentabilidad en general del equilibrio tropical (Villalobos y Abdelnour, 1992).

El punto de partida para toda acción de conservación debería ser el conocimiento de la diversidad de los organismos y el ecosistema en que se desarrollan. Por esta razón es necesario el inventario completo de plantas, animales y microorganismos el cual aún está lejos de ser completado, se tienen 1.5 millones de especies descritas, pero se considera que éstas representan del 5 al 15 % del número total que se cree que existe en la actualidad (Heywood, 1992). Dentro de este universo de posibles recursos, se estima que la humanidad ha empleado en su alimentación alrededor de 5000 especies vegetales desde el comienzo de la agricultura (menos de 1% de las angiospermas del mundo). La población humana ha crecido considerablemente en las últimas cuatro décadas de 2,500 a 5,500 millones (Dirzo,

1993), y tan solo se ha dependido de unas cuantas especies altamente productivas. Hoy en día solo alrededor de 150 especies vegetales con cerca de 250,000 variedades son importantes en la alimentación del hombre (Wilkes, 1989). Por lo anterior cualquier propuesta de conservación y uso sustentable será de suma importancia para la planeación del desarrollo futuro.

Conservación *in situ* y *ex situ*

La diversidad genética vegetal puede ser conservada de varias formas. Para cualquier cultivo o pool genético, se puede aplicar más de un método (Trevor, 1989). Para las estrategias de conservación se debe tomar en cuenta la dimensión del tiempo; si el almacenamiento será a mediano o largo plazo, y el sitio donde se localizará el almacenamiento. Hay dos propuestas básicas para la conservación del germoplasma: conservación *in situ* y *ex situ*, ambas tienen sus ventajas y sus limitaciones (Ford-Lloyd y Jackson, 1986; Heywood, 1992).

Las técnicas más recomendables que se han propuesto para conservar la diversidad biológica se basan en el establecimiento de áreas protegidas (conservación *in situ*) (Heywood, 1992). La FAO y la IBP en 1967 propusieron que la conservación de las fuentes genéticas de las comunidades silvestres y cultivos primitivos pudieran ser preservadas en sus hábitats originales (Wilkins y Dodds, 1983). La conservación *in situ* está encaminada a preservar el hábitat y con ello las especies que contiene. Este es el único método de conservación mediante el cual la diversidad genética tanto como su dinámica dentro de las poblaciones pueden ser protegidas (Heywood, 1992). La conservación *in situ* se aplica principalmente a las especies silvestres relacionadas con plantas cultivadas, a especies forestales y pastos. Se recomienda que estas especies deben ser conservadas manteniendo la integridad genética en su hábitat, como comunidades en ambientes ecológicamente estables. El establecimiento de reservas naturales o genéticas reconoce los objetivos a largo plazo y la necesidad para continuar evolucionando dentro de medios naturales. La

mayoría de los programas están contemplados a nivel de ecosistema o de comunidades multispecíficas y reconocen la necesidad de conservar una amplia base genética (Ford-Lloyd y Jackson, 1986). La conservación *in situ* puede proveer también un modelo óptimo para el muestreo de poblaciones para la conservación *ex situ* de germoplasma (Waldman, 1992).

Existen argumentos tanto técnicos, políticos y financieros, en contra de la conservación *in situ* (Wilkins y Dodds, 1983), por lo que se han generado estrategias de conservación *ex situ*, como son bancos de genes de varios tipos, incluyendo jardines botánicos (Heywood, 1992). Las principales causas para esta segunda alternativa se basan en la fragmentación y pérdida del hábitat. Las poblaciones de muchas especies se han reducido, frecuentemente por debajo del tamaño necesario para continuar su sobrevivencia, en tales casos la conservación *ex situ* puede ser un componente necesario en la estrategia de recuperación o de un plan de reintroducción de especies, la conservación *ex situ* concentra especies en particular y con ello la variación genética que contienen (Heywood, 1992). La conservación *ex situ* en sentido amplio puede ser de dos formas: el uso de jardines botánicos, arboretos por un lado, y bancos genéticos por el otro, los primeros representan las formas más antiguas de conservación, en Europa datan de los siglos XV y XVI (Ford-Lloyd y Jackson, 1986).

Para preservar la variabilidad genética presente, se establecieron bancos de germoplasma donde las semillas o polen pueden ser almacenados bajo condiciones favorables por largos periodos de tiempo. De esta forma el material genético puede estar disponible para futuras generaciones (Jørgensen, 1989). Otra propuesta fue almacenar cierta colección específica de genotipos (banco de genes) representativos de una región del mundo (Wilkins y Dodds, 1983).

Las principales formas de conservación *ex situ* de plantas son: almacenes de semillas bajo condiciones de desecación y baja temperatura; banco de genes en campo como en jardines botánicos o estaciones de investigación; cultivo de tejidos o células; y criopreservación. Todos estos métodos proporcionan opciones para el almacenamiento de genes (Heywood, 1992; Villalobos y Abdelnour, 1992).

La forma más conveniente para mantener viable el germoplasma vegetal es mediante semillas, que son el propágulo más común de almacenamiento. Afortunadamente la mayoría de las plantas cultivadas producen semillas que muestran un comportamiento "ortodoxo", es decir, que son capaces de retener la viabilidad después de ser deshidratadas alrededor del 5% de su contenido de humedad, así como al permanecer en bajas temperaturas (-18 a -20°C), prolongando su longevidad y pueden ser almacenadas por largos periodos. La mayoría de las especies cultivadas tienen semillas ortodoxas (Bass, 1984; Ford-Lloyd y Jackson, 1986; Towill y Roos, 1989).

Las semillas son genéticamente estables, contienen la variabilidad genética de la especie y representan el método más seguro de distribución ya que pueden contener menos enfermedades (Trevor, 1989). Las principales excepciones a lo anterior son por un lado las plantas que normalmente se reproducen por vía vegetativa, no producen semillas viables y por el otro lado las que producen las llamadas semillas "recalcitrantes" (aquellas que pierden su viabilidad después de ser deshidratadas por debajo de un límite crítico, usualmente 12-30% de humedad) (Towill y Roos, 1989).

Problemas de almacenamiento de especies con semilla recalcitrante y/o de reproducción vegetativa.

Las semillas recalcitrantes son producidas por especies acuáticas, aquellas que producen semillas grandes, especies nativas de áreas tropicales y algunas especies de árboles de zonas templadas. El coco, cacao, café, cítricos, palma de aceite, mango, nuez moscada, y plantas de caucho, son ejemplos de especies de importancia económica con semilla recalcitrante (Wilkins y Dodds, 1983; Towill y Roos, 1989; Trevor, 1989), que aún bajo condiciones de almacenamiento húmedo, las semillas son de corta vida y sólo sobreviven unas cuantas semanas o unos cuantos meses dependiendo de la especie (Ford-Lloyd y Jackson, 1986). Tres factores contribuyen a una vida tan corta de estas semillas en almacenamiento:

- 1) sensibilidad a la desecación, daño por enfriamiento,

- 2) problemas tales como contaminación microbiana y germinación durante el almacenamiento
- 3) su alto contenido de humedad.

Para tratar de mantener viables a las semillas recalcitrantes se almacenan a una baja temperatura que les permita retener niveles de humedad relativamente altos y asegurando un suministro de oxígeno para la respiración pero aún bajo estas condiciones su viabilidad es muy corta para una adecuada preservación del genoplasma, por lo tanto estas especies son almacenadas usualmente empleando sus partes vegetativas. Si la diversidad es considerable, se tiene que almacenar una gran cantidad de propágulos lo que demanda grandes espacios y altos costos de mantenimiento (Towill y Roos, 1989).

La conservación de cultivos de propagación vegetativa como la *Solanum tuberosum* (papa), *Manihot esculenta* (yuca), *Dioscorea* sp (ñame), *Ipomoea batatas* (camote), *Saccharum* sp. (caña de azúcar), *Opuntia* sp (nopal), *Musa* sp. (plátano), *Allium sativum* (ajo), entre otros, presentan problemas especiales. Quizá algunos de ellos son sexualmente fértiles, pero para su producción comercial no es conveniente propagarlos a partir de semillas porque presentan altos grados de heterocigocis y lo que se pretende obtener son clones uniformes. Los órganos vegetativos que pueden ser almacenados son: tubérculos, rizomas, bulbos y esquejes, etc., son de vida relativamente corta y frecuentemente se deterioran rápidamente después de ser cosechados, aún bajo las mejores condiciones de almacenamiento, por lo que es necesario tener ciclos anuales de crecimiento (Henshaw *et. al.*, 1980; Wilkins y Dodds, 1983; Ford-Lloyd y Jackson, 1986).

EL cultivo de colecciones vegetativas año tras año es costoso e incrementa el riesgo de perderse por estar expuestos a riesgos de infecciones, enfermedades, desastres naturales y muchos otros factores azarosos (Wilkins y Dodds, 1983; Ford-Lloyd y Jackson, 1986).

Entre las razones para mantener una línea clonal se encuentran: evitar la heterocigocis, dificultad de conseguir semillas, estados juveniles prolongados

(especialmente en líneas de árboles leñosos) y la producción de semillas recalcitrantes. Los clones usualmente son mantenidos *in vivo* en invernaderos o plantaciones en el campo, como huertos o sembradíos. Partes de la planta como esquejes, bulbos, raíces y tubérculos de algunas especies pueden ser almacenados aproximadamente un año en refrigeración (5 a -10°C).

La manutención en el campo o invernaderos requiere espacios considerables y altos costos asociados con la poda, control de enfermedades, maleza y propagación. Las especies presentan diferentes características adaptativas que están ligadas con su sobrevivencia; al colocarlas bajo condiciones climáticas diferentes puede producirles cierto estrés, lo que llega a decrecer su fecundidad y finalmente el germoplasma se pierde (Towill y Roos, 1989).

Cultivo de tejidos vegetales

Como se ha mencionado la conservación *ex situ* puede recomendarse para especies que presentan semillas recalcitrantes y/o las que se propagan por vía vegetativa. Para este tipo de material vegetal, las técnicas de cultivo de tejidos o técnicas *in vitro*, ofrecen una alternativa de reproducción clonal, así como un medio para su conservación.

El término de técnicas "*in vitro*" o cultivo de tejidos cubre un amplio rango de metodologías que involucran el desarrollo, bajo condiciones asépticas, de órganos de las plantas tales como brotes, embriones, hojas entre otras o alternativamente cultivos de masas de células desorganizadas llamadas callos, de células individuales, o aún células desprovistas de su pared celular conocidas como protoplastos. Un punto básico inicial de estos métodos es lograr el establecimiento de explantes (pequeños fragmentos de órganos o tejidos) en una condición de cultivo aséptico y mantenerlos en un medio nutritivo y un ambiente libre de patógenos, haciéndolos disponibles para su uso futuro (Wilkins y Dodds, 1980; Ford-Lloyd y Jackson, 1986; Brian, 1990).

El cultivo de tejidos vegetales tiene su base en el potencial para regenerar una planta completa a partir de una célula (concepto de totipotencialidad de Haberlandt en 1902), pero no fue sino hasta los años cincuenta que una planta fue regenerada de cultivos de células aisladas. A partir de esta fecha el campo del cultivo de tejidos, células y órganos ha tenido un gran desarrollo (Wilkins y Dodds, 1983).

La conservación de material vegetal *in vitro* es aconsejable cuando el almacenamiento convencional de semillas no es posible y cuando la conservación *in situ* es insegura. Esta técnica es particularmente valiosa para las especies de propagación vegetativa; especies con semillas recalcitrantes; y material modificado por las técnicas en biología molecular. En general las técnicas de cultivo de tejidos pueden ser agrupadas en:

- 1) cultivo de órganos (meristemos, ápices, embriones, ovarios, etc.);
- 2) cultivo de callo;
- 3) cultivos en suspensión;
- 4) cultivo de células individuales y protoplastos;
- 5) cultivos de anteras y polen.

Se conoce que la estabilidad genética se mantendrá con el incremento de la organización del cultivo, por lo tanto las plántulas regeneradas son el material más estable de todos (Wilkins y Dodds, 1983; Brian, 1990).

Métodos de conservación *in vitro*

Al hablar de cultivo de tejidos vegetales, se piensa en un sistema de alta multiplicación de las especies cultivadas, que pueden ser mantenidas bajo condiciones de crecimiento de manera virtualmente indefinida, suministrándole los nutrientes necesarios, lo que por sí mismo es una forma de conservación de germoplasma (Towill y Roos, 1989). A un nivel elemental la conservación *in vitro* se logra mediante subcultivos periódicos, manteniendo el suministro de nutrientes y

proporcionando una protección continua contra los ambientes desfavorables y patógenos (Brian, 1990).

Los cultivos *in vitro* con una alta tasa de multiplicación celular como en el caso del callo, no son útiles para la conservación de germoplasma, pues requieren de mantenimiento frecuente, además de que se puede presentar el fenómeno de inestabilidad genética y con ello se ha observado que el potencial morfogénico puede declinar, debido principalmente a la alteración de los niveles de ploidía. Por lo que se prefieren estructuras que ejercen un estricto control en la multiplicación de su DNA, como ocurre en meristemos y yemas cultivadas en condiciones que permitan un crecimiento mínimo a tasas muy lentas. Así, ésta técnica de almacenamiento tiene ventajas considerables, como que el material almacenado está listo para ser utilizado de inmediato y puede detectarse fácilmente si continúa vivo. Los métodos para inducir crecimiento mínimo pueden requerir:

a) alteraciones de las condiciones físicas del cultivo, muy frecuente es la reducción de la temperatura en la que presentan un crecimiento y desarrollo normal con el fin de bajar el metabolismo y desarrollo, con lo que la seguridad de los cultivos se incrementa como una simple consecuencia de la reducción de las intervenciones para realizar los subcultivos; también se emplea la modificación en el ambiente gaseoso para retardar el crecimiento de los cultivos, se ha empleado principalmente el dióxido de carbono y el etileno;

b) alteración del medio básico, mediante la omisión o reducción de algún factor esencial para el crecimiento normal del explante;

c) uso de retardadores del crecimiento, como el ácido abscísico, o componentes con efecto osmótico como el sorbitol, manitol y sacarosa que deshidratan parcialmente a las células prolongando así los periodos entre subcultivos;

d) Mediante la inducción y manipulación de embriogénesis somática se puede contribuir para la conservación *in vitro*. Las metodologías para desecar los embriones

somáticos se han desarrollado en una forma que asemejen o reflejen la fisiología de una semilla normal, usando pretratamientos con compuestos como el ácido abscísico (ABA), ácido indolbutírico (AIB) y sacarosa, han sido aplicados con éxito en especies como uva, trigo y soya (Wilkins y Dodds, 1983; Ford-Lloyd y Jackson, 1986; Towill y Roos, 1989; Brian, 1990).

Estos métodos pueden ser utilizados solos o en combinación, y son aplicables a corto o mediano plazo. De esta manera, el almacenamiento permite que pasen semanas, meses y en algunos casos años antes de que el subcultivo sea necesario. Esto acercaría a un almacenamiento a largo plazo con la eliminación de subcultivos rutinarios (Wilkins y Dodds, 1983; Ford-Lloyd y Jackson, 1986; Towill y Roos, 1989).

Para el almacenamiento de germoplasma *in vitro* el cultivo es iniciado a partir de meristemas, brotes o ápices de tallo y subcultivadas para su propagación a través de divisiones; con lo que las líneas son mantenidas como clones (Towill y Roos, 1989). Si se toma en cuenta que el objetivo final de la conservación del material genético mediante el cultivo de tejidos es la conservación de genotipos a plazo largo, los sistemas que son propensos a cambios genéticos son por lo tanto, menos deseables. Se recomienda que la multiplicación *in vitro* debe ocurrir mediante la proliferación de yemas laterales para evitar selección de variantes somaclonales que puedan originarse de brotes adventicios producidos dentro de la masa de tejido. Los cultivos de callo son propensos a la inestabilidad genética debido a su diferenciación relativamente desorganizada. La estabilidad genética puede ser mantenida más fácilmente cuando se continua un crecimiento organizado de los meristemas en cultivos, es decir, la manutención de una línea germinal consistente a través de varias generaciones requiere un proceso ordenado de replicación de cromosomas en las células del ápice y otras regiones meristemáticas (Ford-Lloyd y Jackson, 1986; Towill y Roos, 1989).

Virtualmente cualquier especie puede ser mantenida *in vitro*, sin embargo para la conservación del germoplasma se debe cuidar la estricta fidelidad del genotipo, por lo que se debe asegurar que las metodologías a emplear permitan alcanzar este fin y no utilizarlas de manera indiscriminada (Towill y Roos, 1989).

Bancos de germoplasma *in vitro*.

Dentro de las técnicas de cultivo *in vitro*, la IBPGR (1986) distingue dos tipos de conservación: banco de germoplasma activo *in vitro* (conservación a corto-mediano plazo); y banco de germoplasma base *in vitro* (crioconservación, conservación a largo plazo).

Las ventajas dentro de la preservación de colecciones activas *in vitro* para un amplio rango de especies incluyen la manutención en un estado libre de enfermedades, tasas de multiplicación relativamente más rápidas, facilidad de enraizamiento (especialmente en material leñoso), pocos insumos y reducidos labores, fácil intercambio de germoplasma internamente y entre países (Towill y Roos, 1989). Algunos aspectos negativos de esta técnica de conservación son la labor demandante y los grandes recursos físicos requeridos que pueden llevar a una pérdida considerable debido a errores humanos o al rompimiento de la seguridad *in vitro*, por ejemplo, la invasión de patógenos en el momento del subcultivo. El riesgo de cambio genético durante el almacenamiento (variación somaclonal) se reduce, pero depende del nivel de organización de los cultivos, esta organización se incrementa desde el callo a las plántulas, el riesgo de cambios realmente se presenta cuando una fase de crecimiento indiferenciado (callo; células en suspensión) persiste de manera prolongada antes de la regeneración (Brian, 1990).

Los requisitos para mantener una colección base de semillas ortodoxas están bien establecidos, ya que la diversidad de especies puede ser conservada a través del almacenamiento de poblaciones de semillas de los cultivos. Para el caso de germoplasma clonal, la preservación a plazo largo de los clones puede realizarse criogénicamente con meristemos y/o yemas laterales. La preservación del polen puede complementar el almacenamiento de semillas o de la preservación clonal (Towill y Roos, 1989).

Crioconservación

La crioconservación se puede definir como la conservación en estado congelado de material biológico mediante la reducción y subsecuente suspensión de su actividad metabólica, al ser expuesto a la baja temperatura de ebullición del nitrógeno líquido (NL) (-196°C) (Kartha, 1987). La conservación congelada de células animales, espermatozoides, ovarios y tejidos embriogénicos, así como embriones completos de animales ha tenido una historia de varias décadas comparadas con las recientes investigaciones con tejido vegetal. El potencial para el almacenamiento de gemoplasma vegetal usando la congelación es inmenso, la aplicación de técnicas de crioconservación está todavía en sus primeros intentos, los procedimientos fiables y de uso rutinario para tejidos vegetativos organizados aún no están disponibles para la mayoría de las especies (Ford-Lloyd y Jackson, 1986).

Durante la preservación congelada en NL (-196°C) de tejidos vegetales cesa la división celular y disminuye considerablemente el metabolismo, por lo que el material biológico puede ser preservado por periodos extensos de tiempo; es importante que el daño por la formación de cristales de hielo dentro de las células se evite o al menos sea minimizado (Ford-Lloyd y Jackson, 1986).

Los procesos de congelación involucran dos diferentes fenómenos, formación de nucleadores de hielo y crecimiento de los cristales. La formación de hielo es un proceso en donde las moléculas del agua pasan de un arreglo azaroso en estado líquido a uno ordenado. Muchos líquidos, incluyendo el agua, no se congelan invariablemente en el punto de congelación de la fase líquida. Tales líquidos pueden ser enfriados a varios grados por debajo de su punto de congelación de la fase sólida y congelarse por efecto de la adición de una sustancia que actúa como catalizador para la transición de la fase líquido-sólido (nucleación heterogénea), a éstos se les conoce como nucleadores del hielo. Existe otro tipo de nucleación, la homogénea en la que los núcleos se forman espontáneamente en el líquido sin la intervención de

cuerpos extraños (catalizadores), a una baja temperatura próxima a -40°C (Sakai, 1993).

Los daños intracelulares se puede causar de dos formas: la primera es por el daño mecánico o físico, el cual se produce por la formación de cristales intracelulares cuando el enfriamiento es rápido; el segundo es por los daños fisicoquímicos o de concentración que son producidos por la deshidratación generada durante el enfriamiento lento. Esta deshidratación causa reducción del volumen celular, aumento intracelular de la concentración de solutos que pueden llegar a ser tóxicos y pérdida del agua que rodea a los componentes celulares, es decir agua estructural (Meryman y Williams, 1985; Ford-Lloyd y Jackson, 1986; Kartha, 1987).

Existen solamente unas cuantas especies como árboles de madera dura de zonas frías y bulbos vegetativos de varios árboles frutales, que en estado natural pueden ser congeladas a temperaturas muy bajas, sin afectar su viabilidad celular (Chen y Kartha, 1987). Las especies que no están aclimatadas a las bajas temperaturas requieren la aplicación de crioprotectores como el dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol o una combinación de éstos con sacarosa, glucosa, polietilén-glicol o prolina entre otros (Towill y Roos, 1989). Los crioprotectores son solutos que tienen la función de bajar el punto de congelación de una solución, deben llegar rápidamente al interior celular para evitar la deshidratación osmótica, no deben ser tóxicos aún en concentraciones altas y deben evitar los daños celulares tanto fisicoquímicos como mecánicos en los procesos de congelación y descongelación. Los crioprotectores tienen la habilidad para reducir el tamaño y el crecimiento de los cristales de hielo, bajan el punto de congelación de los contenidos intracelulares y posibilitan que las células puedan ser sometidas a temperaturas muy bajas sin la ruptura de la membrana o de sus contenidos (Meryman y Williams, 1985; Ford-Lloyd y Jackson, 1986).

La estabilidad genética de ápices, meristemos y brotes laterales puede ser mantenida mediante el almacenamiento en NL. El diseño de un exitoso protocolo de crioconservación para cultivos de células o tejidos es todavía un proceso empírico, quizá hay algunas aplicaciones y procedimientos que parecen más fáciles de ser

utilizadas que otras. Los factores que más comúnmente han sido tomados en cuenta son (Brian, 1990):

- 1) el estado de desarrollo y actividad celular del material,
- 2) los pretratamientos para inducir cualquier resistencia inherente a la baja temperatura o desecación,
- 3) la incubación en una apropiada mezcla de crioprotectores,
- 4) la determinación de una conveniente tasa de enfriamiento lento,
- 5) la selección de una temperatura apropiada (-20, -30, -40 °C) previa a la introducción de la muestra directamente dentro del NL,
- 6) la adopción de una tasa apropiada de descongelamiento,
- 7) el diseño de las condiciones ambientales y los medios para ayudar a la recuperación (reactivación del metabolismo y desarrollo).

Hay varios métodos para la conservación a largo plazo utilizando la congelación. La mayoría de los protocolos exitosos para la criopreservación de células y órganos vegetales *in vitro* se han basado en el uso de tasas de enfriamiento lentas, con algunos éxitos atribuidos a tasas rápidas de enfriamiento. Algunas de las especies que han sido criopreservadas con éxito son: la manzana (*Malus domestica*), clavel (*Dianthus caryophyllus*), casava (*Manihot esculenta*), garbanzo (*Cicer arietinum*), chícharo (*Pisum sativum*), cacahuete (*Arachis hypogaea*), papa (*Solanum tuberosum* y *S. goniocarpum*), fresa (*Fragaria ananassa*), jitomate (*Lycopersicon esculentum*) entre otras (Kantha, 1985).

De manera general la criopreservación a tasas lentas, utiliza explantes (zonas meristemáticas) que pueden provenir de plantas en el campo, invernaderos, cámaras de crecimiento ó plántulas *in vitro*. En algunos casos el pretratamiento al frío de las plantas es benéfico. Después de la disección, la secuencia de pasos involucra el precultivo (de unas cuantas horas a 2 días) en medios de crecimiento adicionado con niveles variables de crioprotectores; tasas controladas de enfriamiento (alrededor de -0.1 a $-2.0^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) hasta llegar a -35 o -40°C seguido de la transferencia directa en NL; rápido descongelamiento; y subcultivo para determinar su viabilidad o alguna otra

prueba cuantitativa. Las variantes en el protocolo básico son muy numerosas (Kantha, 1985; Kantha, 1987; Towill y Roos, 1989). El método lento de congelación depende para su éxito de la congelación extracelular, ya que permite intracelularmente concentrar una fracción de la solución sin cristalizarse en el momento que se introduce la muestra dentro del NL. Este método es el que en forma más amplia y con mayor éxito se ha aplicado (Ford-Lloyd y Jackson, 1986; Sakai, 1993).

La congelación ultra rápida se refiere a la formación de cristales de hielo dentro de las células, que son muy pequeños y por lo tanto no causan rompimiento. Este proceso se logra cuando los explantes son precultivados con algún crioprotector por tiempos variables y se introducen directamente al NL. Las células deben descongelarse de manera rápida para prevenir la recristalización. Este método ha sido aplicado exitosamente a meristemas de papa, clavel y fresa (Kantha, 1987; Ford-Lloyd y Jackson, 1986).

Vitrificación

La vitrificación se refiere a los procesos físicos mediante el cual una solución altamente concentrada es superenfriada a muy baja temperatura y finalmente se solidifica sin cristalizarse (Sakai, 1993). Recientemente se está tratando de aprovechar este proceso en la crioconservación de germoplasma vegetal.

Para lograr realmente la vitrificación del agua pura en cualquier volumen significativo, se requiere de tasas de enfriamiento ultra rápidas. En el caso de las soluciones que se encuentran dentro y alrededor de las células vitrificarán con mayor facilidad en el momento de su crioconservación, cuando se incrementen sus concentraciones y las tasas de enfriamiento sean ultra rápidas (Brian, 1990; Sakai, 1993).

La vitrificación se ha enfocado a eliminar el control de las tasas de enfriamiento y por lo tanto la necesidad de congeladores controlados, facilitando la criopreservación de células y meristemas mediante la inmersión directa en NL.

Este método se ha venido aplicando con mayor frecuencia a principios de los noventa y requiere para una criopreservación exitosa, evitar el congelamiento intracelular letal, el cual ocurre durante el enfriamiento rápido en NL, por lo que los meristemas y células tienen que ser suficientemente deshidratados, es decir, sus líquidos intracelulares deben ser concentrados antes de ser sumergidos dentro del NL (Sakai, 1993).

Método de vitrificación

Para este método se pueden emplear cultivos de células y meristemas, a los cuales se les adicionan soluciones crioprotectoras altamente concentradas antes de que sean enfriadas de manera rápida dentro del NL, es decir, las células o meristemas deben ser suficientemente deshidratadas con una solución vitrificadora alrededor de 20°C o 0°C (eliminando así la necesidad de deshidratación celular durante la congelación lenta) para evitar daños antes de la inmersión en NL. Se ha utilizado una solución a base de mezcla de etilén glicol, DMSO y glicerol llamada PVS2 por Sakai (1993). Para una exitosa criopreservación mediante la vitrificación es necesario un cuidadoso control de los procedimientos de deshidratación y permeación del crioprotector, así como prevenir el daño por toxicidad química o excesivo estrés osmótico durante la deshidratación (Sakai, 1993).

El método de vitrificación no ha resultado en altos niveles de supervivencia en la mayoría de los cultivos de células vegetales excepto para un limitado número de especies o cultivares, únicamente se ha aplicado con éxito a cultivos celulares de naranja, arroz, tabaco, zanahoria, espárragos y meristemoides de trébol blanco (Sakai, 1993).

Método de deshidratación por aire.

Otro método que se utiliza es la deshidratación con la ayuda de una corriente de aire, por este método se han logrado crioconservar células en cultivo, brotes laterales, embriones somáticos y meristemas apicales de plántulas provenientes de cultivos *in vitro*. Aunque la inducción o modificación de la tolerancia a la sequía puede ser el principal factor para que esta técnica de crioconservación sea exitosa. Este método se ha complementado con la técnica de encapsulación-deshidratación de embriones somáticos para la formación de semillas artificiales, ya que es sencilla de manejar y reduce el proceso de deshidratación. En este método, la resistencia a la deshidratación y a la congelación fue inducida mediante el precultivo de meristemas en un medio enriquecido con sacarosa antes de la deshidratación. En la encapsulación-deshidratación, la molaridad de la sacarosa se incrementa marcadamente durante el proceso de secado y alcanza o excede el punto de saturación de la solución de sacarosa resultante en la transición a cristal durante el enfriamiento. Este método parece ser práctico para la crioconservación de meristemas y embriones (Sakai, 1993).

JUSTIFICACION

El presente trabajo forma parte de la idea de que el germoplasma constituye un patrimonio común de la humanidad y toda variedad debe ser protegida sin importar su estatus ecológico o la forma en que dichas variedades se han obtenido. Al existir especies amenazadas o en peligro de extinción, como es el caso de muchas especies de la familia Calceaceae, su conservación se hace prioritaria, al igual que las especies que se reproducen vegetativamente o que poseen semillas recalcitrantes. La conservación a largo plazo, mediante el empleo de la criobiología, es una de las mejores opciones por el momento para estas especies. *Opuntia robusta* var. *larreyi* se utilizó como un modelo de estudio para las especies de la familia Cactaceae, así como aquellas especies que se reproducen de manera vegetativa y que son de importancia económica ya sea alimenticia, médica industrial o ecológica, motivo por el cual se le prestó mayor importancia en el presente estudio. Asimismo para evaluar el funcionamiento del sistema sencillo de congelación que se empleó se utilizaron tres especies: *Fragaria* spp. (fresa), *Pisum sativum* (chicharo) y cuatro variedades *Solanum tuberosum* (papa), que en trabajos previos han mostrado grandes tasas de sobrevivencia después de ser sometidas a la congelación mediante la técnica de lasas lentas de enfriamiento controladas con equipos sofisticados para inducir bajas temperaturas.

OBJETIVO GENERAL

– Analizar el efecto de la crioconservación de germoplasma de especies vegetales de importancia económica provenientes de cultivos *in vitro*, utilizando un sistema sencillo de enfriamiento.

OBJETIVOS PARTICULARES

1) Establecer el cultivo *in vitro* y la micropropagación de *Opuntia robusta* var. *larreyi*.

2) Analizar el efecto citotóxico de las diferentes soluciones crioprotectoras (dimetilsulfóxido, glicerol y sacarosa, solas o en combinación) sobre los explantes cultivados *in vitro*.

3) Realizar la congelación de brotes de *Opuntia robusta* var. *larreyi*, a tasas de enfriamiento lentas y el análisis de su posible recuperación y desarrollo bajo condiciones *in vitro*.

4) Analizar en brotes de *O. robusta*, el efecto de la congelación mediante observaciones de la ultraestructura celular y la cuantificación de proteínas totales.

5) Crioconservar meristemos de *Fragaria* spp., *Pisum sativum* y *Solanum tuberosum*, mediante la técnica de enfriamiento lento y en esta última especie también ensayar el enfriamiento ultra rápido.

II.- MATERIALES Y METODOS

Micropropagación de *Opuntia robusta* var. *larreyi*.

Se trabajó con *Opuntia robusta* var. *larreyi*. Los ejemplares se colectaron en la reserva ecológica del pedregal de San Angel de Ciudad Universitaria, D.F., se seleccionaron plantas donadoras jóvenes, sanas, turgentes y con buen desarrollo, a partir de ellas se obtuvieron cladodios jóvenes de 5 cm de largo por 3 cm de ancho aproximadamente, éstos se lavaron con agua corriente hasta eliminar toda partícula extraña, y posteriormente fueron desinfectados con alcohol etílico al 70% por un minuto, en seguida se sumergieron en una solución al 30 % (v/v) de hipoclorito de sodio comercial (clorálex) por 10 minutos, finalmente bajo condiciones asépticas se enjuagaron tres veces en agua destilada y esterilizada.

Los cladodios desinfectados se cortaron tanto transversal como longitudinalmente en seis segmentos de 1.5 cm de ancho por 1 cm de alto aproximadamente, conteniendo un número variable de areolas y se sembraron en los diferentes medios de cultivo empleados (diagrama 1).

Inducción de brotes en los medios de cultivo.

Se estudió el efecto de la bencil aminopurina (BAP) y la sacarosa en la inducción de brotes. Para todos los experimentos se empleó el medio basal de Murashige y Skoog (MS) (1962), suplementado con tiamina $0.4 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ y agar 0.6%. Se utilizaron diferentes concentraciones de sacarosa y de BAP (Cuadro 1). En todos los casos el pH de los medios se ajustó a 5.6 con HCl o NaOH 0.1 N. El medio se distribuyó en frascos de 120 ml de capacidad, se agregó 20 ml a cada uno, se esterilizaron en una autoclave a 20 lb-pulg² de presión y 126°C durante 15 min.

Los inóculos (cortes de cladodios) se sembraron en medios de cultivo que contenían concentraciones variables de BAP: 0.0 M, 0.5×10^{-5} M, 1.0×10^{-5} M, 2.0×10^{-5} M, 2.5×10^{-5} M y 5.0×10^{-5} M, así como concentraciones de sacarosa de 1, 2, 3, 4, 5 y 7% (cuadro 1). Cada experimento se repitió diez veces con 4 inóculos en cada frasco, para obtener un total de 40 inóculos por tratamiento. Los frascos se colocaron en una cámara de cultivo a $26 \pm 2^\circ\text{C}$ con 1200 lux de intensidad luminosa y un fotoperiodo de 16 hrs luz. Los resultados se cuantificaron con base en el porcentaje de brotes por inóculo y la altura promedio que alcanzaron.

Cuadro 1.- Combinación de bencil aminopurina (BAP) y sacarosa en los medios de cultivo empleados.

		BAP (10^{-5} M)					
		0.0	0.5	1.0	2.0	2.5	5.0
S A C A R O S A (%)	1						
	2						
	3						
	4						
	5						
	6						
	7						

Los primeros brotes inducidos se individualizaron y se seccionaron longitudinalmente para obtener dos partes iguales y se subcultivaron en los medios arriba mencionados para inducir nuevamente la brotación. Para determinar el medio que induce una mayor y mejor brotación se cuantificó nuevamente el porcentaje de brotes por inóculo y la altura promedio de los brotes (diagrama 1).

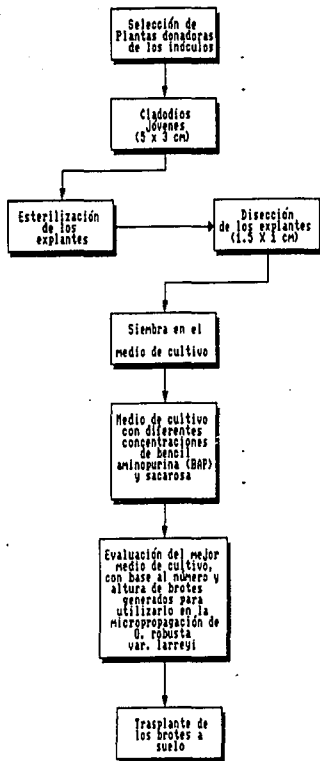


Diagrama 1.- Esquema general para la micropropagación de *Opuntia robusta* var. *larreyi*

Citotoxicidad de los crioprotectores.

Para poder determinar el posible efecto citotóxico de los crioprotectores en los brotes de *O. robusta*, se aplicaron distintas soluciones crioprotectoras (DMSO, sacarosa así como la mezcla de DMSO, sacarosa y glicerol) a los brotes (5 mm de altura) obtenidos cultivos *in vitro*. La exposición de los brotes a las diferentes soluciones se realizó introduciendo 20 explantes en 50 ml de la solución crioprotectora. En todos los casos el tiempo de exposición fue de 60 min. Al término de éste los explantes se lavaron en 50 ml de medio de cultivo de Murashige y Skoog líquido (MSL) basal sin hormonas durante 30 min, para finalmente sembrarlos en el medio de cultivo que previamente se había determinado como el mejor para la regeneración de brotes (diagrama 2). Los resultados fueron evaluados a los 45 días de subcultivo, se consideraron tres parámetros:

- 1) explantes con desarrollo normal, es decir, aquellos brotes que continuaron su desarrollo normal sin ninguna alteración aparente;
- 2) explantes con crecimiento anormal, como hiperhidratación y la formación de callo, y
- 3) muerte de los explantes.

Cuadro 2.-Soluciones crioprotectoras empleadas para evaluar el efecto citotóxico en brotes de *O. robusta*.

Crioprotector	
	DMSO 5% DMSO 10% DMSO 15%
	SACAROSA 10% SACAROSA 15% SACAROSA 20%
MEZCLAS % (DMSO-Sacarosa-Glicerol)	
1	(5-3-10)
2	(10-3-15)
3	(15-3-20)
4	(5-5-10)
5	(10-5-15)
6	(15-5-20)
7	(5-10-10)
8	(10-10-15)
9	(15-10-20)

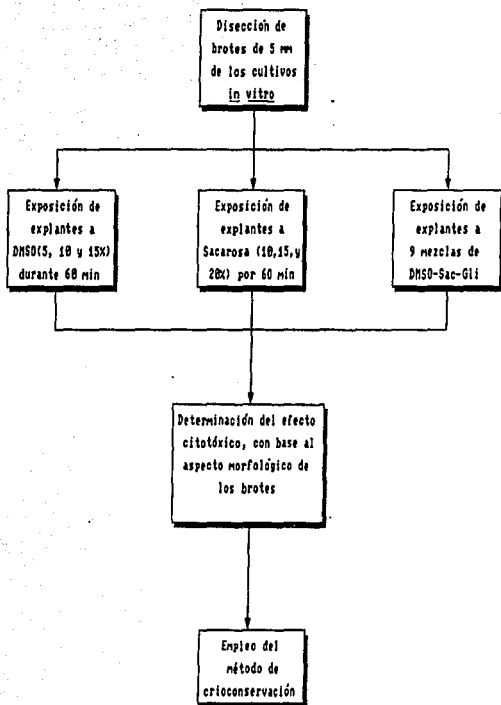


Diagrama 2.- Determinación del efecto citotóxico de los crioprotectores empleados sobre brotes de Opuntia robusta

Descripción del sistema sencillo de enfriamiento para intentar la crioconservación de germoplasma en este estudio.

El sistema de enfriamiento que se utilizó fue el empleado por Mata (1992), el cual consiste de un termo (Dewar) con capacidad de 35 Kg de capacidad; un soporte mecánico de acero inoxidable que se sujeta a manera de un cinturón del ancho del termo y mantiene fijo mediante tres tornillos, de él salen tres varillas que se unen por encima de la boca del termo en un anillo, de este último sale un riel que posee una escala en milímetros, paralelamente a ésta se encuentra una varilla cilíndrica de aluminio, ambas están unidas entre sí por un soporte que posee un tornillo que permite a la varilla ser desplazada a lo largo de riel de manera descendente y ascendente en el interior del termo. La varilla de aluminio posee al final una canastilla de aluminio con capacidad para contener seis viales criogénicos.

Con un termómetro formado por un registrador digital y un termopar de cobre-constantan, unido a lo largo de la varilla de aluminio hasta el interior de la canastilla, se registraron las diferentes temperaturas que genera el NL en el interior del termo.

Como el NL contenido dentro del termo genera un gradiente de temperatura desde su superficie hasta la boca del termo (tomada como referencia (0 cm)) se registraron las temperaturas cada minuto hasta que la temperatura se mantuvo constante, posteriormente se bajó la varilla un centímetro más para tomar sus temperaturas respectivas y así sucesivamente hasta acercarse a la superficie del NL. A las diferentes temperaturas registradas se les denominó temperatura externa (T.ext.).

Con las diferentes T.ext., se estableció el perfil de temperatura en el interior del termo con una cantidad conocida de NL, que sirvió para determinar la altura a la cual se colocaron los viales con las soluciones y los explantes, para obtener tasas de enfriamiento lentas (-0.2 a -2.0 °C·min⁻¹).

Curvas de enfriamiento

Para conocer el comportamiento que presentaron las soluciones crioprotectoras (cuadro 2) al enfriarse, se registraron las temperaturas de las nueve mezclas de crioprotectores (DMSO-Sacarosa-Glicerol), así como del DMSO y la sacarosa, para lo cual se colocó un vial criogénico de polipropileno CORNING (10 x 430 mm con tapa de rosca) con 1.5 ml de una solución crioprotectora y se expuso al gradiente de temperatura generada desde la superficie del nitrógeno líquido y la temperatura atmosférica de la boca del termo, a una T.ext. predeterminada ($-25 \pm 2^{\circ}\text{C}$), la cual fue detectada en el interior del termo a 5 cm de la boca del mismo, los registros se realizaron cada minuto con la ayuda del termómetro digital, con lo que se construyeron las gráficas de tiempo contra temperatura de cada solución crioprotectora para poder determinar los puntos de congelación y las tasas de enfriamiento de cada una de ellas.

Crioconservación de explantes de *O. robusta*

De los cultivos *in vitro* de *O. robusta* se extrajeron brotes de 5 mm de largo y se sometieron a un pretratamiento en las soluciones crioprotectoras por un lapso de 30 min; a continuación los brotes se introdujeron dentro de viales criogénicos con capacidad de 2 ml, se colocaron 15 explantes por vial y un mililitro de la solución crioprotectora, estos se introdujeron en la canastilla del sistema de enfriamiento junto con un vial que contenía la misma solución crioprotectora a la cual se le introdujo el termopar de cobre-constantan conectado al termómetro digital y se colocaron a una T.ext. predeterminada que proporcionara tasas de enfriamiento lentas, y así poder determinar el descenso de la temperatura.

Dicho descenso se registró cada minuto para poder construir su gráfica correspondiente y determinar la tasa de enfriamiento de la solución con explantes. Al llegar alrededor de -40°C (temperatura a la cual toda el agua se encuentra

congelada) los viales se sumergieron directamente en el NL para almacenarlos de 30 a 60 min (diagrama 3).

Al pasar el tiempo de almacenamiento, los viales se extrajeron del termo y se descongelaron rápidamente en un baño de agua caliente a 80°C. Realizado lo anterior a los explantes se les eliminó la solución crioprotectora mediante un lavado en 50 ml de medio de cultivo MS basal líquido y en agitación constante. Posteriormente fueron resembrados en el medio de cultivo elegido para la recuperación de los explantes y/o mediante la técnica del cloruro de 2, 3, 5, trifenil terazolol (CTT) se determinó la actividad metabólica que presentaron los explantes después de haber sido congelados y poder estimar qué explantes poseían la mayor posibilidad de resumir su crecimiento.

Inducción de estrés osmótico

Con el fin de eliminar cierta cantidad de agua de los cultivos *in vitro* de *O. robusta*, se utilizó un agente que produce estrés osmótico, el manitol. Este se incorporó en una concentración de 5% al medio de cultivo para su micropropagación. Se introdujeron 5 a 7 explantes de 5 a 7 mm de altura por frasco y fueron cultivados por un lapso de 30 días. Después se procedió con la metodología de crioconservación a fases lentas de enfriamiento antes señalada.

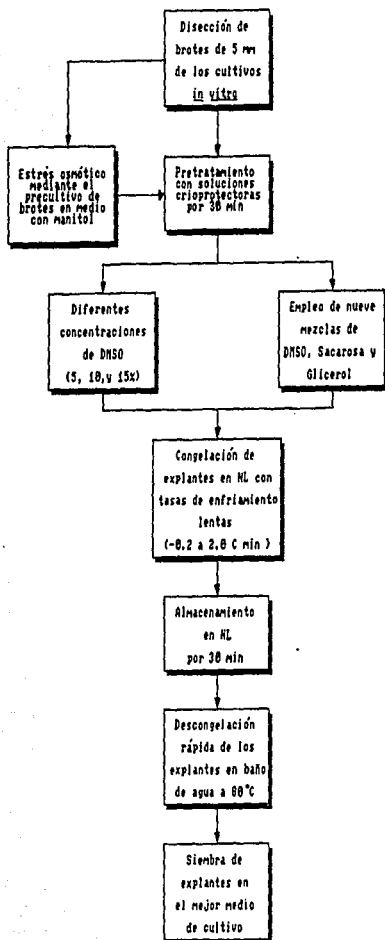


Diagrama 3.- Metodología para la criopreservación de brotes de *Opuntia robusta* var. *larreyi*

Prueba de viabilidad

Se determinó el porcentaje de la actividad metabólica de los explantes crioconservados de *O. robusta* mediante la técnica del Cloruro de 2, 3, 5 trifenil tetrazolio (CTT).

La prueba se realizó con una solución al 0.6% (p/v) de CTT disuelta en una solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M pH 7.4 y 0.05% (v/v) de Tween 80 como agente humectante.

En un vaso de precipitados se colocaron 3 ml de la solución CTT-fosfatos y del Tween 80 (V/V) en proporción 1:1, éste último actúa como un agente que permite que el CTT penetre uniformemente a las células de los explantes, para favorecer esta acción se aplicó vacío durante 30 min, posteriormente, los explantes junto con la solución se incubaron por 15 hrs en oscuridad a $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, con el fin de que se llevaran a cabo las reacciones que permitieron conocer la actividad respiratoria de las células.

Después de la incubación se eliminó la mezcla de CTT y Tween 80 y los explantes se lavaron con agua destilada, se les colocó en baño de agua caliente a 60°C para extraerles el rojo de formazán (producto terminal de la reacción de oxidación de CTT), con alcohol etílico al 95% durante 15 min, la solución final se filtró y se aforó a 10 ml, se tomó su lectura en el espectrofotómetro en un rango de 400 a 600 nm para construir una curva patrón con la que se determinó la longitud de onda que presentó la máxima absorbancia del grupo control, a dicha longitud se tomó la lectura del material congelado y se determinó la tasa de respiración mediante la fórmula (Steponkus, 1971):

$$\text{Tasa de respiración} = \frac{\text{Absorbancia del explante problema}}{\text{Absorbancia del explante control}} \times 100$$

Los explantes que presentaron mayor porcentaje de respiración indicarían que el tratamiento aplicado fue el más adecuado y se esperaría una mayor posibilidad de

recuperación y reanudación del crecimiento y desarrollo de los explantes (diagrama 4).

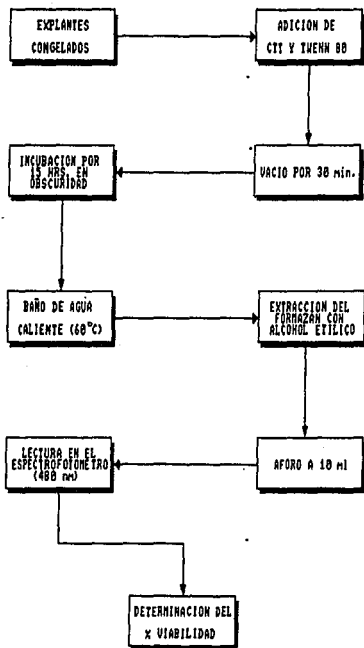


Diagrama 4.- Prueba de viabilidad de los brotes de *Opuntia robusta* mediante la prueba del cloruro de 2,3,5 trifenil terazolico (CTT)

Análisis de la ultraestructura de células de *O. robusta* mediante el empleo de Microscopía Electrónica de Transmisión

Para conocer los posibles daños ultraestructurales causados a los explantes de *O. robusta* por la metodología de criopreservación se utilizó la microscopía electrónica de transmisión, la metodología empleada fue la siguiente:

Se disecaron, con la ayuda de navajas para rasurar, las zonas meristemáticas (areolas) de brotes de *O. robusta* var. *larreyi* de los cultivos *in vitro* y de los brotes que fueron congelados, en fragmentos muy pequeños (2-3 mm³), se colocaron en una solución fijadora de glutaraldehído al 2.5% disuelta en un amortiguador de fosfatos 0.16 M, pH 7.2 y se dejaron dentro de viales durante 16 hrs; posteriormente se realizaron tres cambios de 10 min cada uno con la misma solución amortiguadora; realizado lo anterior se transfirieron a una mezcla de partes iguales de la solución amortiguadora y tetraóxido de osmio al 2%, en este paso las muestras tomaron un color negro; después se lavó la muestra con abundante solución amortiguador para continuar con la deshidratación con alcoholes graduales 30, 50, 70, 80 y 96%, 10 min en cada uno, se realizaron tres cambios más en alcohol absoluto por tres min cada uno. Después las muestras se colocaron en óxido de propileno durante 10 min por 3 veces. Posteriormente se colocaron en una mezcla de resina y óxido de propileno 1:1. Este paso es la preinclusión; finalmente se incluyeron en Epón y se colocaron en una estufa a 60°C por 24 hrs, hasta que la resina polimerizó por completo.

De esta manera las muestras quedaron listas para realizar los cortes en el ultramicrotomo. Los cuales se colocaron en rejillas de cobre. Para contrastar las muestras, éstas se depositaron dentro de una cámara húmeda (caja de Petri con un algodón húmedo) y con la muestra hacia abajo en gotas de acetato de uranilo al 3% por 15 min, posteriormente se lavaron con agua bidestilada en abundancia y se secaron con papel filtro. En una segunda cámara húmeda, con lentejas de hidróxido de sodio (debido a que el plomo precipita en presencia de dióxido de carbono), las muestras se colocaron en gotas de citrato de plomo al 0.3% por 5 min. Luego del enjuague las muestras se pueden observar al microscopio electrónico.

Determinación del peso molecular de proteínas de *O. robusta* mediante electroforésis

Se utilizaron brotes de *O. robusta* en tres condiciones: 1) brotes de 5 cm provenientes de plantas donadoras del pedregal de San Angel las cuales fueron el control; 2) brotes de los cultivos *in vitro* y 3) brotes a los cuales se le aplicó la metodología de criopreservación. Se les determinó el peso molecular de sus proteínas por electroforésis en microgeles de SDS-poliacrilamida (0.45X43X50 mm) con gradiente de 10-15% a 270 V, 10 mA y 15°C. Se utilizaron patrones de peso molecular conocidos desde 14,400 hasta 94,000 daltones (Pharmacia electrophoresis calibration kit). El procedimiento empleado para fijar, teñir y desteñir es el descrito por Neuhoff, *et al.* (1985). La absorción y posición de las bandas se cuantificaron en un densitómetro laser LKB 2202 Ultro Scan, con el fin de lograr una apreciación más exacta de los resultados.

Con los datos de los patrones (proteínas de peso molecular conocido) formados por las siguientes:

Proteína	Daltones
Fosforilasa b	94,000
Albúmina de bovino	67,000
Ovoalbúmina	43,000
Anhidrasa carbónica	30,000
Inhibidor tripsina de Frijol de soya	20,100
alfa-Lactoalbúmina	14,400

Se pudo construir una curva de calibración, para lo cual se trazó el logaritmo de peso molecular contra el logaritmo de la movilidad relativa de los patrones y se obtuvo la ecuación de la recta con la cual se interpoló el logaritmo de la distancia recorrida por las diferentes proteínas de las muestras problema y de esta manera se estimó el peso molecular de cada una de ellas.

Cuantificación espectrofotométrica de proteínas

Se utilizó el ácido biciconínico (BCA) Protein Assay Reagent de acuerdo al método de Smith *et al.* (1985), el cual se describe a continuación.

Este reactivo es muy sensible para la cuantificación espectrofotométrica de proteínas en solución acuosa. El método combina la reacción de Biuret (la proteína reacciona con Cu^{2+} en un medio alcalino para producir Cu^{1+}). Con las características del BCA el color púrpura del producto de la reacción es formado por la interacción de dos moléculas de BCA con una del ion cuproso Cu^{1+} , éste es soluble en agua y presenta una fuerte absorción a 562 nm. La metodología es:

- 1) Se preparó una solución de una proteína conocida (albúmina de bovino), la cual se utiliza como estándar, con una concentración conocida y mediante la dilución de la solución estándar se preparó las diluciones para conocer la cantidad de proteína y así extrapolar con las muestras desconocidas.
- 2) Se colocó con una pipeta 0.1 ml de cada muestra de nopal (control, *in vitro* y congelado) que contienen de 20 a 1,200 μg de proteína, dentro de tubos ependorff de 1 ml de capacidad. Para el blanco se utilizó agua destilada (0.1 ml de diluyente).
- 3) Se añadió 2 ml de la solución de BCA a cada tubo y se mezcló.
- 4) Se incubaron todos los tubos en un baño de agua a 37°C por 30 min.
- 5) Después de la incubación, se enfriaron los tubos a temperatura ambiente.
- 6) Se midió la absorbancia a 562 nm para cada tubo contra la referencia de agua destilada.
- 7) Se restó la absorbancia del blanco a la de los valores encontrados para las muestras (estándar y desconocidas).
- 8) Mediante una curva estándar de calibración de absorbancia a 562 nm contra concentración de proteínas conocidas se determinó la concentración de cada muestra.

Fragaria sp:

Se utilizaron estolones de plantas silvestres colectados en Ciudad Universitaria, UNAM, D.F. de aproximadamente 5 cm de longitud. A éstos se les eliminaron las hojas más grandes con lo que se obtuvieron ápices vegetativos de 2 a 3 cm de longitud. Estos fueron lavados con jabón y agua corriente por 20 min, se desinfectaron superficialmente con alcohol etílico al 70% (v/v) por dos minutos y blanqueador doméstico (6% de cloro activo) al 30% (v/v) por 20 min, bajo condiciones de asepsia se enjuagaron tres veces con agua destilada y esterilizada. Posteriormente se diseccionaron los ápices de 0.5 a 1 mm aproximadamente con la ayuda de un microscopio estereoscópico y fueron sembrados en medio MS basal adicionado con $0.4 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de tiamina, $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de ácido indol acético (AIA), $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de cinetina (k), $8 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ de agar y se ajustó a un pH de 5.7. También se empleó el medio utilizado por Kartha (1985) que consiste en medio MS suplementado con $1 \mu\text{M}$ de BAP y de ácido indol butírico (IBA) y $0.1 \mu\text{M}$ de ácido giberélico (GA_3), 7 g de agar y ajustado a pH de 5.7. Ambos medios se utilizaron para establecer los cultivos control y para la recuperación de los ápices después de los ensayos de crioconservación (diagrama 5).

Pisum sativum:

Se utilizaron semillas que fueron esterilizadas superficialmente con alcohol al 70% (v/v) durante 1 min, blanqueador doméstico (6% de cloro activo) al 30% (v/v) por 20 min, en condiciones de asepsia se enjuagaron tres veces con agua destilada y esterilizada, se colocaron 5 semillas por germinador (frascos de vidrio de 120 ml de capacidad conteniendo un algodón húmedo) y se pusieron a 26°C en obscuridad. Después de 2 a 4 días cuando las plántulas habían germinado, se diseccionaron bajo condiciones asépticas, los ápices meristemáticos de alrededor de 0.5 mm; éstos se sembraron en medio B5 (Gamborg *et al.* 1968) suplementado con $0.5 \mu\text{M}$ de BAP, agar 0.7% y pH de 5.6 (diagrama 6).

Solanum tuberosum:

Se utilizaron cuatro variedades de papa (tollocan, atzimba, mexiquense y alpha). Los cultivos *in vitro* fueron donados por el programa de papa de la Coordinación de Agricultura del Estado de México (CODAGEM). Los cultivos fueron establecidos a partir de meristemas disectados de plantas de invernadero y sembrados en medio MS adicionado con $2.5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de GA_3 , 0.6% de agar y pH de 5.7.

El medio de cultivo empleado para mantener los cultivos fue MS básico Murashige y Skoog (1962), 0.7% de agar y pH de 5.7.

Para inducir la brotación múltiple a partir de nudos de plantas cultivadas *in vitro*, se empleó medio MS adicionado con GA_3 $0.4 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, BAP $0.5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, ácido naftalén acético (ANA) $0.01 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, ácido pantoténico de calcio $0.2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, sacarosa 2.0%, agar 0.6% y pH de 5.6 y se colocaron en las mismas condiciones de cultivo ya mencionadas (PRECODEPA, 1988)

Se empleó otro medio de cultivo para la recuperación de los meristemas de papa después de someterlos a los ensayos de criopreservación (ya fueran a tasas de enfriamiento lentas o ultra rápidas), el cual consistió del medio MS (líquido o sólido) adicionado con $0.5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de zeatina (Z), $0.2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de GA_3 y $0.5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de AIA y un pH de 5.7. En el caso del medio sólido se le agregó 0.7% de agar (diagrama 7).

Criopreservación de ápices de tallo

Para las tres especies ensayadas se disectaron en condiciones de asepsia y con la ayuda de microscopio e instrumental de disección, ápices de 0.5-1 mm de longitud conteniendo el meristemo y 2 a 3 pares de primordios foliares.

a) *Fragaria* sp.

Los ápices de fresa se pretrataron con una mezcla de 3 soluciones crioprotectoras (DMSO 10%, Sacarosa 3% y Glicerol 15%) o únicamente con DMSO al

5%, por espacio de 30 min, y se colocaron 6 ápices por vial con 1 ml de la solución crioprotectora, se realizaron 5 repeticiones. Posteriormente se colocaron en el sistema de congelación a una temperatura externa determinada para obtener una tasa de enfriamiento lenta, al llegar a los -40°C se sumergieron en el NL y se almacenaron por 30 min. Posteriormente los explantes fueron extraídos, se descongelaron en un baño de agua a 60°C y se lavaron con medio de cultivo líquido, se sembraron en medio MS y se colocaron a $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ con 1200 lux de intensidad luminosa y un fotoperiodo de 16 hrs luz.

Para un segundo ensayo se pretrataron 30 meristemos con DMSO al 5% por una hora y se enfriaron a una tasa lenta y se siguió el mismo procedimiento arriba mencionado (diagrama 5).

b) *Pisum sativum*

En el caso del chícharo se utilizaron ápices de tallo. El procedimiento para su criopreservación se basó en el empleado por Kartha (1985), el cual consiste en precultivar a los meristemos provenientes de semillas germinadas asépticamente en medio B5 suplementado con DMSO al 5% por espacio de 2 días, posterior a esto, los explantes se colocaron en viales y se les adicionó 1 ml de medio líquido B5, poco a poco se les agregó otro ml de medio líquido B5 conteniendo DMSO al 10%, con el fin de alcanzar una concentración final de DMSO al 5%. Los pasos siguientes son similares a los empleados para los ensayos con *Fragaria sp.*

Con el fin de observar si los días de precultivo influyen en la respuesta de sobrevivencia de los meristemos, se realizaron otros cuatro ensayos con ápices de chícharo, bajo las mismas condiciones metodológicas empleadas para esta especie, únicamente variando el tiempo de precultivo. En un ensayo los meristemos se precultivaron por 3, 5 y 9 días, en otro fueron de 2, 4 y 7 días y los dos restantes solamente con 1 día de precultivo (diagrama 6).

c) *Solanum tuberosum*

Para intentar la criopreservación de cuatro variedades de papa, los explantes utilizados fueron ápices tomados de yemas axilares de plantas cultivadas *in vitro*, inmediatamente fueron subcultivados en medio de cultivo líquido y en puentes de papel filtro, para este paso se emplearon dos diferentes metodologías (Towill, 1983; Benson, 1989). En la primera se empleó el medio líquido de recuperación para subcultivar los meristemas por dos días con el fin de promover la recuperación de los explantes de la disección. Después de este tiempo, los explantes se colocaron en viales criogénicos y se les agregó medio fresco adicionado con 10% de DMSO, se incubaron por 1 h a 5°C, después se aplicó la metodología de enfriamiento lento (-0.2 a $-2.0^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) hasta llegar a -30°C . Los pasos siguientes fueron similares a los empleados para el nopal y la fresa. Después de 30 a 60 min de almacenamiento los viales que contenían los explantes fueron descongelados en un baño de agua a 37°C por 90 seg, se lavaron con 15 ml de medio líquido de recuperación y fueron subcultivados en medio sólido o líquido de recuperación. Este experimento se realizó en cuatro diferentes ocasiones con cinco viales en cada uno haciendo un total de 50 explantes por ensayo y 50 explantes en total de cada variedad.

En la segunda metodología se intentó la criopreservación de los explantes mediante las técnicas de enfriamiento lento y rápido. En la primera se empleó la misma metodología para papa arriba mencionada, con la única diferencia que los explantes fueron subcultivados a medio MS basal líquido por dos días antes del ensayo de criopreservación. Para la técnica de enfriamiento rápido, los meristemas se subcultivaron a medio MS basal en puentes de papel filtro por dos días, posteriormente los explantes se expusieron en medio MS basal líquido adicionado con DMSO al 10% de 1 a 2 horas, los explantes se colocaron uno por uno en la punta de una aguja hipodérmica y se sumergieron inmediatamente en el NL, se dejaron almacenados por 30 min, se extrajeron la agujas y los meristemas se descongelaron rápidamente en medio líquido de recuperación a temperatura ambiente y se colocaron en puentes de papel que contenían el mismo medio y se cultivaron a $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 1200 lux de intensidad luminosa y un fotoperíodo de 16 hrs luz (diagrama 7).

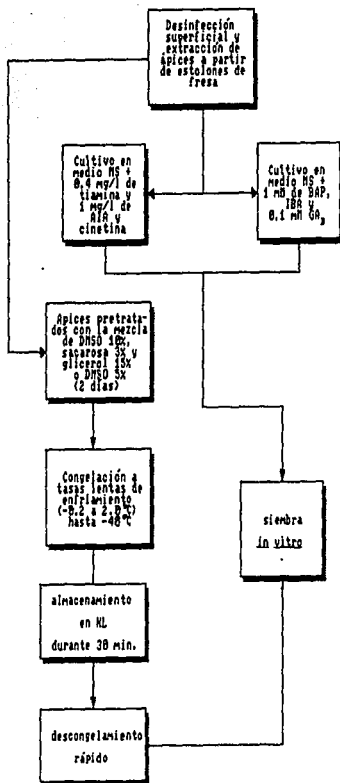


Diagrama 5.- Cultivo *in vitro* y congelación de ápices de *Erasmia* sp.

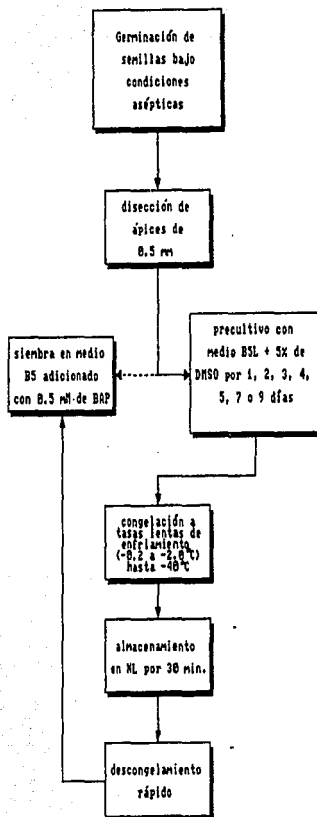


Diagrama 6.- Cultivo *in vitro* y congelación de ápices de *Pisum sativum*

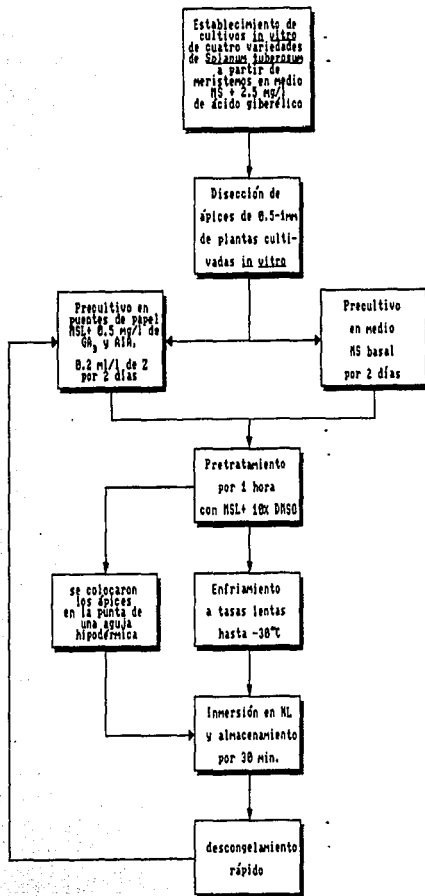


Diagrama 7.- Cultivo in vitro y de ápices de *Solanum tuberosum* y su congelación mediante dos técnicas de enfriamiento (Towill, 1983; Benson, 1989)

III.- RESULTADOS Y DISCUSION

Micropropagación de *Opuntia robusta* var. *larreyi*

Se logró inducir la morfogénesis a partir de areolas de los explantes de *O. robusta* var. *larreyi*, utilizando la citocinina BAP para dar origen a nuevos brotes, los cuales se definieron como aquellas estructuras que se desarrollaron de cada areola, de aspecto similar al explante original, es decir, estructuras largas de color verde y conteniendo areolas (Lámina A).

La tabla 1a muestra el promedio de brotes obtenidos por explante, así como la altura promedio alcanzada por los mismos en cada uno de los tratamientos a los 45 días de cultivo (tabla 1b).

Con estos datos se realizó mediante la ayuda del paquete estadístico Statgraphics ver. 3.1, un análisis de varianza con un nivel de confianza del 95%, para determinar cuál de las treinta y seis combinaciones hormonales utilizadas proporcionó un mayor número de brotes así como la mayor altura alcanzada por éstos, se partió del supuesto que si la probabilidad ($p=0.05$) es menor al resultado obtenido del programa estadístico no se establecería diferencia significativa.

Se obtuvo una $p = 0.05 > 0.0004$ para la formación de brotes y $p = 0.05 > 0.0026$ para la altura promedio alcanzada por los brotes. Esto indicó que tanto para el número de brotes como para su altura alcanzada, fue posible establecer una diferencia significativa, mostrando que si la concentración de sacarosa y BAP varían, la respuesta de los explantes cambia.

Tabla 1 .- Valores promedio del número de brotes formados por explantes de *O. robusta* y altura alcanzada por éstos a los 45 días en los diferentes medios de cultivo empleados.

a) Promedio de brotes por explante.

BAP (10^{-5} M)

	0.0	0.5	1.0	2.0	2.5	5.0	
S A C A R O S A (%)	1	0.00	5.67	5.30	5.87	2.36	1.12
	2	4.73	7.50	5.02	4.67	1.47	2.25
	3	0.00	4.00	4.59	4.33	0.92	0.48
	4	0.00	4.00	5.35	6.00	2.25	1.36
	5	0.00	0.40	1.50	0.50	0.50	0.75
	7	0.00	0.00	1.25	0.00	0.00	0.00

b) Promedio de la altura alcanzada (mm).

BAP (10^{-5} M)

	0.0	0.5	1.0	2.0	2.5	5.0	
S A C A R O S A (%)	1	0.00	6.55	4.44	2.23	1.56	0.58
	2	8.10	9.33	8.00	2.81	9.73	2.74
	3	0.00	9.47	5.84	3.35	5.91	1.88
	4	0.00	8.48	5.35	4.84	2.56	3.27
	5	0.00	3.55	6.10	0.00	1.50	3.50
	7	0.00	0.00	5.40	0.00	0.00	0.00

Tabla 2.- Análisis de rango múltiple (Tukey) para determinar las diferencias entre el promedio del número de brotes por explante así como la altura promedio alcanzada por los brotes de *O. robusta*.

Trat. No. de Sac/BAP brotes			Trat. altura Sac/BAP (mm)		
1/0.0	0.00	a	1/0.0	0.00	a
3/0.0	0.00	a	3/0.0	0.00	a
4/0.0	0.00	a	4/0.0	0.00	a
5/0.0	0.00	a	5/0.0	0.00	a
7/0.0	0.00	a	7/0.0	0.00	a
7/0.5	0.00	a	7/0.5	0.00	a
7/2.0	0.00	a	5/2.0	0.00	a
7/2.5	0.00	a	7/2.0	0.00	a
7/5.0	0.00	a	7/2.5	0.00	a
5/0.5	0.40	a	7/5.0	0.00	a
3/5.0	0.48	a	1/5.0	0.58	a
5/2.0	0.50	a	5/2.5	1.50	ab
5/2.5	0.50	a	1/2.5	1.56	ab
5/5.0	0.75	a	3/5.0	1.88	ab
3/2.5	0.92	a	1/2.0	2.23	ab
1/5.0	1.12	a	4/2.5	2.56	ab
7/1.0	1.25	a	2/5.0	2.74	ab
4/5.0	1.36	a	2/2.0	2.81	ab
2/2.5	1.47	a	4/5.0	3.27	ab
5/1.0	1.50	a	3/2.0	3.35	ab
4/2.5	2.25	ab	5/5.0	3.50	ab
2/5.0	2.25	ab	5/0.5	3.55	ab
1/2.5	2.36	ab	1/1.0	4.44	ab
3/0.5	4.00	bc	4/2.0	4.84	ab
4/0.5	4.00	bc	4/1.0	5.35	bc
3/2.0	4.33	bc	7/1.0	5.40	bc
3/1.0	4.59	bc	3/1.0	5.84	bc
2/2.0	4.67	bc	3/2.5	5.91	bc
2/0.0	4.73	bc	5/1.0	6.10	bc
2/1.0	5.02	bc	1/0.5	6.55	bc
1/1.0	5.30	bc	2/1.0	8.00	cd
4/1.0	5.35	bc	2/0.0	8.10	cd
1/0.5	5.67	bc	4/0.5	8.48	cd
1/2.0	5.87	bcd	2/0.5	9.33	de
4/2.0	6.00	bcd	3/0.5	9.47	de
2/0.5	7.50	de	2/2.5	9.73	de

Sac = sacarosa BAP = Bencil aminopurina 10^{-5} M
Las letras diferentes indican diferencias significativas

Con base en estos resultados, se aplicó un análisis de rango múltiple (prueba de Tukey) para poder dilucidar qué combinación de sacarosa y BAP, proporcionó la mejor opción para la micropropagación de *O. robusta* var. *larreyi*. En la tabla 2, se puede observar que en el caso del número de brotes generados, la combinación de 2% de sacarosa y 0.5×10^{-5} M de BAP fue la que promovió el mayor porcentaje de brotes (7.50 brotes por explante), y de acuerdo a la prueba de Tukey es diferente al resto de los tratamientos.

Para el caso de la altura alcanzada por los brotes, la prueba de Tukey no pudo establecer diferencias entre tres tratamientos (2/0.5, 3/0.5 y 2/2.5), aunque éstos sí son diferentes al resto de los tratamientos. Las alturas promedio alcanzadas por los brotes de los tres tratamientos fueron: 9.33, 9.47 y 9.73 cm respectivamente (tabla 2).

A pesar de que la altura alcanzada por los brotes de la primera combinación es menor, se consideró que es la que ofrece la mejor opción de cultivo para la micropropagación de *O. robusta*, debido a que si se complementa con los resultados de los brotes promedio generados por explante, se puede determinar que sobrepasa considerablemente a los demás medios de cultivo empleados con una altura promedio que es muy cercana a la más alta.

Otro punto a considerar fue la cantidad de callo que se formó. En la combinación que se propone como el mejor medio de cultivo no ocurrió la formación de callo, a diferencia de los otros tratamientos en los que se observó que conforme se incrementó la concentración de sacarosa y BAP, la presencia de callo fue mayor, además hubo hiperhidratación (desarrollo desmedido debido a la gran cantidad de agua intracelular) en las concentraciones altas de sacarosa (3 y 4%), fenómeno contrario al que se esperaba, ya que se ha reportado (Escobar *et al.* 1986) que al ir incrementando la concentración de sacarosa en los medios de cultivo para *Opuntia*, los brotes presentan un incremento en el peso seco, es decir, los brotes poseen menor cantidad de agua celular.

Por lo tanto al conjuntar el número de brotes por explante y la altura alcanzada por los mismos el tratamiento con sacarosa 2% y BAP 0.5×10^{-5} M se tomó como el medio óptimo para la micropropagación de *O. robusta*. Lo anterior indica que los

tejidos del nopal sólo necesitaron bajas concentraciones de citocinina exógena en el medio de cultivo, para que las estructuras meristemáticas mostraron su potencial regenerativo bajo las condiciones de cultivo empleadas.

En estudios con *O. amyclaea* se encontró que la micropropagación se obtuvo con la misma combinación de reguladores de crecimiento pero en diferentes concentraciones (Escobar *et al.*, 1987). En una revisión hecha por Hubstenberger *et al.* (1992) sobre la micropropagación de cactáceas, se reporta que las especies *O. basiliis* y *O. polyacantha* fueron exitosamente micropropagadas, también indican que *O. arenaria* y *O. basilaris* se micropropagaron con AIA $2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ y K $4 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, *O. erinacea* se micropropagó con $5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de N-6 dimetil alil aminopurina (2-IP) y sin auxina. Se ha encontrado que para la proliferación de brotes axilares de una gran cantidad de cactus, se emplean bajos o nulos niveles de auxinas en combinación con altos niveles de citocininas (Hubstenberger *et al.*, 1992). Mauseth (1979) resalta que el aspecto más importante de los medios es la concentración de citocininas. El ha usado concentraciones de BAP de 0.0, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 50.0 y $100.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, encontrando que los más efectivos son 1.0 y $10.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Rubluo *et al.* (1993) reportan el empleo de medio MS + BAP para la obtención de brotación múltiple de *Mammillaria haageana*, *M. huitzilopochtli* y *M. san-angelensis* (1.0, 1.0 y $0.1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ respectivamente). Se ha encontrado que $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de BAP y 5% de sacarosa promueven en *O. polyacantha* un gran incremento en el tamaño de los brotes (Mauseth, 1976).

Lo anterior concuerda con lo obtenido en *O. robusta*, la cual presenta el desarrollo esperado, al combinar el medio MS modificado, con la citocinina BAP. Se produjo una respuesta morfogénica buena sin formación de callo. Sin embargo, la mejor respuesta se presentó en una concentración relativamente baja de sacarosa (2%), en tanto que la mayoría de los trabajos en cactáceas reportaron porcentajes de 3 a 5% de sacarosa (Hubstenberger *et al.*, 1992).

En los medios de cultivo con mayor concentración de sacarosa (5 y 7%), independientemente de la concentración de BAP, se originó callo, pero en general se formaron pocos brotes, éstos presentaron un tamaño menor y cualitativamente eran más compactos. Este tipo de brotes posiblemente serían de utilidad para los objetivos

de un estudio de criopreservación, ya que se prefieren explantes que no contengan mucha agua intracelular, para esperar una recuperación favorable cuando se les apliquen los métodos criobiológicos, debido a que el agua forma parte crucial en dichos métodos. Escobar *et al.* (1986), reportaron que al incrementar gradualmente la concentración de sacarosa en *Opuntia amygdala*, ésta presentó un incremento en el peso seco de los brotes, es decir, los brotes poseían menor cantidad de agua celular y un menor desarrollo. A diferencia en *O. polyacantha* que con 5% de sacarosa se obtuvo el mayor desarrollo de los brotes (Mauseth, 1979).

Por otro lado, se pudo observar que en ausencia de BAP el desarrollo de brotes fue nulo a excepción del tratamiento con sacarosa al 2%, en donde se formaron 4.73 brotes por explante con altura promedio de 8.10 cm. También se encontró que al incrementar la concentración de BAP de 2.5 a 5.0×10^{-5} M, el promedio de brotes formados por explante se redujo en general de manera notable, al combinarse estas concentraciones de BAP con concentraciones altas de sacarosa (5 y 7%). La reducción en la formación de brotes y su altura alcanzada se reduce considerablemente.

Un punto importante de cualquier sistema de micropropagación es proporcionar material que fácilmente pueda ser establecido en condiciones de suelo. En la presente investigación, este punto se completó, ya que se trasplantaron a suelo 20 brotes de 2 a 3 cm de altura, y a 20 días del trasplante la sobrevivencia fue del 100%, con lo que se puede decir que el material que fue micropropagado es lo suficientemente fuerte y fisiológicamente normal para soportar su cambio directo a suelo, es decir, sin que éstos pasaran por medios de cultivo para su enraizamiento *in vitro* Hubstenberger *et al.*, (1992) mencionan que existen especies micropropagadas *in vitro* fácilmente adaptables como las del género *Opuntia* que toleran una amplia variedad de condiciones para su restablecimiento en el suelo.

Se ha reportado que frecuentemente se tienen que utilizar medios con concentraciones variables de auxinas que frecuentemente oscilan entre 1 a $10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, principalmente de ANA y ácido indol butírico (IBA) solos o combinados, para inducir la formación de raíces (Hubstenberger *et al.*, 1992). En este estudio no se necesitó el uso

de auxinas, las raíces se desarrollaron de manera espontánea al envejecer los medios de cultivo, casos similares se han presentado en *Ferocactus acanthodes* (Blackmon, 1987 citado Hubstenberger *et al.*, 1992) y *O. amyclaea* (Escobar *et al.*, 1986).

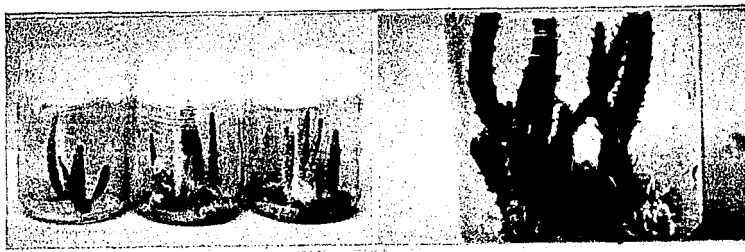


Lámina A.- Brotes de *Opuntia robusta* generados *in vitro* por organogénesis directa a partir de secciones transversales de cladodio. El medio de cultivo empleado fue MS adicionado con 2% de sacarosa y 0.5×10^{-5} M de Bencilaminopurina.

Citotoxicidad de las soluciones crioprotectoras

En la tabla 3, se presentan los efectos citotóxicos de los agentes crioprotectores sobre los brotes de *O. robusta*. Tales efectos pueden abarcar desde modificaciones en la respuesta morfológica de las células hasta la muerte de los brotes (Finkle, *et al.*, 1985).

El efecto del DMSO sobre los brotes fue severo ya que en las tres concentraciones utilizadas se presentaron altos porcentajes de deformaciones o muerte de los explantes, llegando inclusive a ser 100% letal a una concentración de 15%. Por lo anterior se podría afirmar que el DMSO a las concentraciones y tiempo empleados provoca efectos negativos sobre esta especie. Finkle *et al.* (1985) señalan que los meristemas de especies vegetales que son expuestos aún a bajas concentraciones de crioprotectores pero por largos periodos pueden mostrar daños citotóxicos.

Debido a lo anterior, no se puede considerar al DMSO un agente crioprotector para esta especie pues si pudiera ejercer un efecto positivo en el momento de la congelación y se lograra la recuperación de los explantes, el material que se obtendría posiblemente no alcanzaría un desarrollo normal.

El DMSO es el agente que más se ha utilizado para la crioconservación de especies vegetales. López (1988) logró la crioconservación de ápices con placa basal de *Allium sativum* (ajo) utilizando 30% de DMSO sin que éstos mostraran algún efecto citotóxico. Aunque se ha encontrado que a concentraciones mayores a 10%, el material biológico ya sea sin congelar, congelando o después de un período de crecimiento en un medio conteniendo el agente crioprotector, llega a presentar efectos tóxicos (Finkle *et al.*, 1985).

Para la sacarosa se observó también que existió un efecto negativo en el desarrollo de los explantes debido a que en todos los casos se presentó un porcentaje muy alto de malformaciones, contrario a lo que se esperaba; debido a que la sacarosa al ser un compuesto que la planta utiliza y almacena no se esperaba que

ejerciera tal efecto. Se esperaba que se presentara un fenómeno de estrés osmótico y con ello se ocasionaría únicamente un desarrollo más lento de los brotes y un incremento en su peso seco.

Meryman (1971) afirma que un gradiente excesivamente osmótico produce la remoción de agentes intracelulares que puede provocar daños severos para las células. El efecto negativo que presentaron el DMSO y la sacarosa se puede deber a este gradiente osmótico que provoca efectos irreversibles en la solubilidad de lípidos de la membrana y la desnaturalización de proteínas.

Los efectos tóxicos de las soluciones tienen que ver directamente con los fenómenos osmóticos que causan las soluciones sobre las células, ya que por ejemplo si se coloca una célula o explante en una solución hipertónica, como es el caso de los agentes crioprotectores utilizados en este estudio, las células sufren deshidratación o plasmólisis (separación de la membrana plasmática de la pared celular) 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 eliminados, las partículas o las superficies con carga se aproximan entre sí y no sólo se concentran las soluciones, sino que las superficies coloidales respectivas se aproximan unas a otras hasta que se unen y se desnaturalizan (Bidwell, 1979). Aunque la deshidratación o plasmólisis no siempre causa efectos negativos permanentes, si la célula se coloca en una solución isotónica o hipotónica el agua perdida se recuperará rápidamente volviendo a la turgencia normal. Este fenómeno se esperaría encontrar en las concentraciones bajas de DMSO y sacarosa, pero el tiempo de exposición es un factor importante para el desarrollo normal de las células. En estos casos en particular se tendrían que manejar tiempos de exposición más cortos, aunque esto signifique menor protección intracelular durante los ensayos de crioconservación.

Existen reportes que sugieren que el empleo de un solo crioprotector puede ser más tóxico que en mezclas. Kartha (1985) presenta un listado de efectos tóxicos de un solo crioprotector sobre diferentes especies, por ejemplo, la casava muestra efectos tóxicos con 7% de DMSO o con glicerol mayor al 15%, 100% de toxicidad con etilen glicol a concentraciones superiores al 15%; el garbanzo presenta severos daños con 5% de DMSO o glicerol al 10%, DMSO 10% resultó tóxico al chícharo y al camote; en tanto que el jitomate muestra toxicidad con DMSO y etilen glicol al 5%.

A pesar de que el DMSO y la sacarosa generaron efectos citotóxicos en los explantes de *O. robusta*, cuando fueron mezclados junto con el glicerol, este efecto disminuyó considerablemente en las nueve diferentes combinaciones de los tres compuestos (tabla 3), los porcentajes de malformaciones fueron muy bajos. El dato más alto se presentó en la combinación No. 8 (DMSO-sacarosa-glicerol de 10-10-15%), con 33.3%, que en comparación con los arriba mencionados se podría considerar bajo.

En la mezcla 2 no se presentó ningún efecto evidente de citotoxicidad; en algunas otras (mezclas 1, 3 y 4) no se presentaron explantes con malformaciones, pero si se presentó un porcentaje bajo de muerte de los explantes, pero la muerte de los explantes se ha presentado aún en subcultivos rutinarios, por lo que se tendría que tomar con mucho cuidado ya que no podría ser un efecto citotóxico del crioprotector.

El efecto tóxico de mezclas de crioprotectores se ha visto en especies como el ajo, en donde la combinación de DMSO y glicerol en diferentes combinaciones provoca cierto daño de los explantes cultivados *in vitro*. Esta toxicidad se ve incrementada cuando el DMSO y glicerol se encuentran en porcentajes de 20% o mayores (Mata, 1992).

Finkle y colaboradores (1985) señalan que las ventajas de usar mezclas crioprotectoras son:

1) pueden tener mayores efectos en mantener la viabilidad postcongelamiento que un solo compuesto (comparada con base en la molaridad combinada total presente en la solución crioprotectora).

2) la proporción de los componentes son importantes para que puedan ser mezclados y proporcionar una adecuada crioprotección.

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

Para el caso particular de las mezclas empleadas (DMSO-sacarosa-glicerol) con las que no se generaron efectos tóxicos, esto se debió posiblemente al efecto combinado de los tres compuestos. Se cataloga al DMSO como un agente crioprotector penetrante, debido a que su molécula pequeña penetra rápidamente a la célula y la deshidrata parcialmente; al glicerol se le cataloga como un crioprotector no penetrante por poseer una molécula de mayor tamaño ocasionando un gradiente osmótico negativo para las células con lo que la deshidratación es más severa; la sacarosa es un compuesto penetrante que las células utilizan para regular interiormente los gradientes osmóticos, además evita la plasmólisis y también puede ejercer cierta deshidratación celular. El efecto de la solución hipertónica es menos severo permitiendo a las células regresar a su estado turgente normal cuando se les coloca nuevamente en el medio de cultivo.

Tabla 3.- Efecto citotóxico de los agentes crioprotectores sobre los brotes de 0.5-1.0 cm de *Opuntia robusta*

Crioprotector	Normal %	Deformes %	Muertas %
DMSO 5%	25.0	75.0	0.0
DMSO 10%	28.6	57.1	14.3
DMSO 15%	0.0	100.0	0.0
SACAROSA 0%	33.3	66.7	0.0
SACAROSA 15%	16.7	83.3	0.0
SACAROSA 20%	28.6	71.4	0.0
MEZCLAS (DMSO-SAC-GLI)			
1 (5-3-10)	87.5	0.0	12.5
2 (10-3-15)	100.0	0.0	0.0
3 (15-3-20)	91.7	0.0	8.3
4 (5-5-10)	75.0	0.0	25.0
5 (10-5-15)	71.4	14.3	14.3
6 (15-5-20)	71.4	14.3	14.3
7 (5-10-10)	85.7	14.3	0.0
8 (10-10-15)	66.7	33.3	0.0
9 (15-10-20)	85.7	14.3	0.0

Comportamiento de las soluciones crioprotectoras al enfriarlas

En las figuras 1 a 10 se puede observar que las soluciones se comportaron como la curva típica de enfriamiento para soluciones acuosas (Franks, 1985), en donde la temperatura de la solución desciende con respecto al tiempo hasta llegar a su punto de congelación, en la cual cambia del estado líquido al sólido, generando calor (calor latente de fusión), con lo que la temperatura de la solución se incrementa unos cuantos grados centígrados, para congelarse completamente y continuar sobrefusionándose.

Al analizar las curvas de las diferentes concentraciones de DMSO (figura 1) se puede observar que conforme ésta aumenta se abate el punto de congelación, pero a la T_{ext.} a la que se colocó, la tasa de enfriamiento para el DMSO al 10 y 15% entran en el rango de tasas de enfriamiento lentas (tabla 4), pero al congelarse tan rápido posiblemente no permita que se den los cambios físicos y fisicoquímicos necesarios para una exitosa crioconservación de material biológico.

Las soluciones con sacarosa (figura 2), mostraron un comportamiento similar al DMSO, es decir, las soluciones alcanzaron más rápidamente su punto de congelación (tabla 4), las tasas de enfriamiento para las concentraciones de 20 y 30% son consideradas lentas, pero el aspecto negativo es el pobre abatimiento del punto de congelación que ofrecen, lo que puede provocar complicaciones cuando sean utilizadas para congelar material biológico

Para las mezclas de DMSO-sacarosa-glicerol, (figuras 3 a 10), se puede observar que a diferencia del DMSO y sacarosa, sus puntos de congelación se abatieron aún más, en tanto que sus tasas de enfriamiento fueron más lentas (tabla 4). El punto de congelación se va abatiendo conforme se concentran los crioprotectores (sobretudo del DMSO y glicerol) en las soluciones. Esto se debe a que al incrementar la concentración de solutos en la solución no sólo abate su punto de congelación sino que reduce la cantidad de agua disponible que es capaz de congelarse (Franks, 1985).

Los dos puntos anteriores son benéficos para dar protección cuando las células se congelan. Resultados similares se reportaron cuando se utilizó la mezcla crioprotectora de DMSO-glicerol (Mata, 1992)

Las tasas de enfriamiento de las mezclas están dentro del rango que se consideran lentas (-0.2 a $-2.0^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$). Esto debido a que las mezclas abaten el punto de congelación muy por abajo de cero grados centígrados, en las mezclas 8 y 9 (tabla 4) donde la concentración de los componentes fue muy alta, el punto de congelación no se pudo determinar, debido a que éste se debe encontrar por abajo de los -70°C en el caso de la mezcla 8 (figura 10) y la mezcla 9 lo debe abatir aún

más (motivo por el cual no se presenta su gráfica), por lo que estas mezclas se podrían utilizar con el método de congelamiento rápido o el de vitrificación.

Cabe señalar que las tasas de enfriamiento reportadas en este trabajo son el resultado del promedio de pequeños cambios de temperatura generados a lo largo del proceso de enfriamiento en el sistema de enfriamiento empleado, ya que en ningún momento la temperatura descendió de manera lineal como lo haría en un sistema sofisticado que tiene gran capacidad de control y exactitud.

Tabla 4.- Tasas de enfriamiento y puntos de congeación alcanzados por las soluciones crioprotectoras al exponerlas a una temperatura externa de $-25 \pm 2^\circ\text{C}$ dentro del termo.

Soluciones crioprotectoras	Punto de congelación $^\circ\text{C}$	Tasa de enfriamiento $^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$
DMSO 5%	- 6.10	-2.10
DMSO 10%	- 8.10	-1.63
DMSO 15%	- 9.22	-1.72
SACAROSA 10%	- 3.00	-2.28
SACAROSA 20%	- 5.80	-1.53
SACAROSA 30%	- 5.60	-1.47
MEZCLAS No. (%)		
DMSO-Sac-Gli		
1 (5- 3-10)	-12.0	-0.62
2 (10- 3-15)	-20.2	-1.10
3 (15- 3-20)	-23.2	-1.44
4 (5- 5-10)	-12.2	-1.63
5 (10- 5-15)	-13.4	-0.86
6 (15- 5-20)	-23.8	-1.47
7 (5-10-10)	-10.7	-1.32
8 (10-10-15)	**	**
9 (15-10-20)	**	**

** No se pudo determinar su punto de congelación por estar por debajo de -40°C

Figura 1 Curvas de enfriamiento del crioprotector DMSO

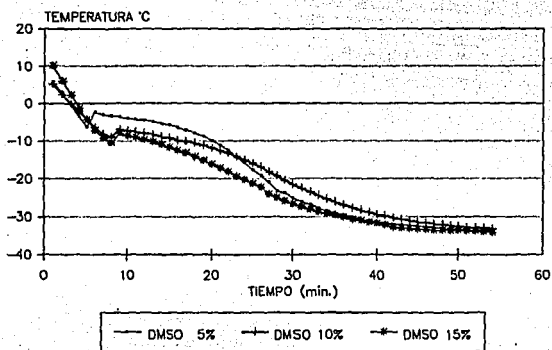


Figura 2 Curvas de enfriamiento del crioprotector sacarosa

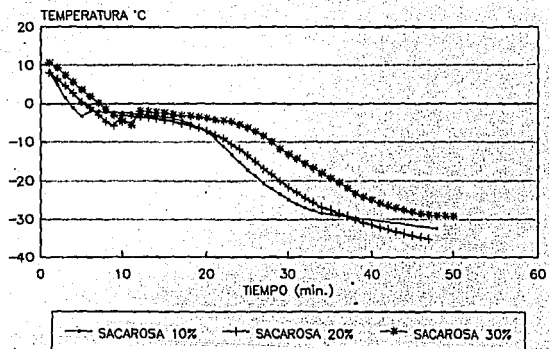


Figura 3 Curva de enfriamiento de la Mezcla crioprotectora 1
(DMSO 5% Sacarosa 3% Glicerol 10%)

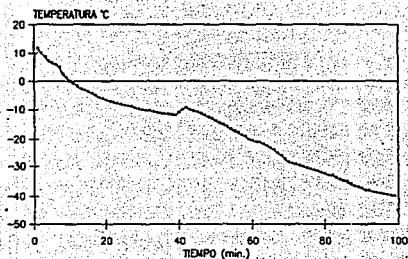


Figura 4 Curva de enfriamiento de la Mezcla crioprotectora 2
(DMSO 10% Sacarosa 3% Glicerol 15%)

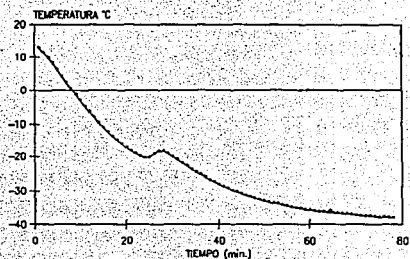


Figura 5 Curva de enfriamiento de la Mezcla Crioprotectora 3
(DMSO 15% Sacarosa 3% Glicerol 20%)

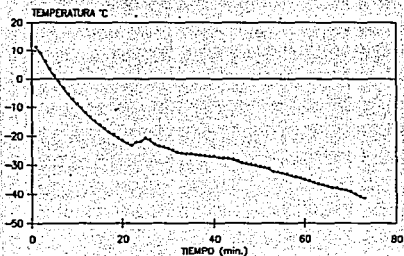


Figura 6 Curva de enfriamiento de la mezcla crioprotectora 4
(DMSO 5% Sacarosa 5% Glicerol 10%)

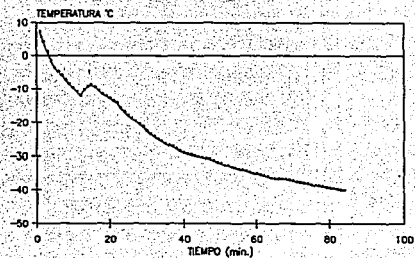


Figura 7 Curva de enfriamiento de la mezcla crioprotectora 5
(DMSO 10% Sacarosa 5% Glicerol 15%)

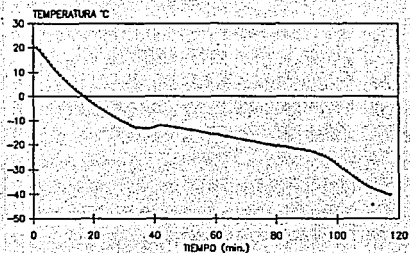


Figura 8 Curva de enfriamiento de la mezcla crioprotectora 6
(DMSO 15% Sacarosa 5% Glicerol 20%)

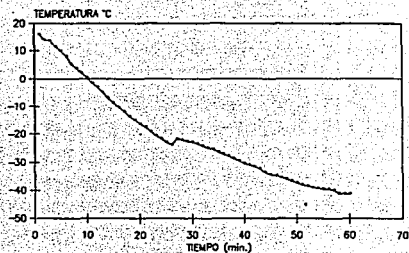


Figura 9 Curva de enfriamiento de la mezcla crioprotectora 7
(DMSO 5% Sacarosa 10% Glicerol 10%)

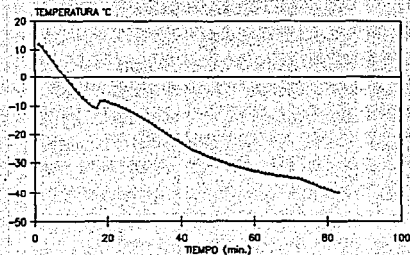
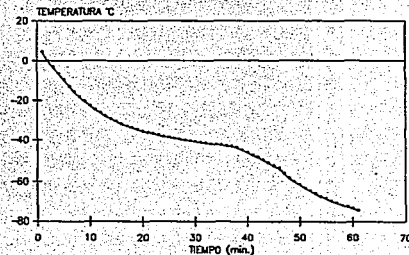


Figura 10 Curva de enfriamiento de la mezcla crioprotectora 8
(DMSO 10% Sacarosa 10% Glicerol 15%)



Crioconservación de brotes de *O. robusta*

Se utilizó el DMSO con un tiempo de exposición de 30 min, con el fin de evitar el efecto citotóxico severo que presentó a 60 min de exposición. Además, como es el crioprotector que más se ha utilizado, se decidió observar su efecto, también se utilizaron las 9 diferentes mezclas de agentes crioprotectores (DMSO-sacarosa-glicerol) (tabla 4), debido a que se ha reportado que con su uso se logra un efecto sinérgico (Finkle *et al.*, 1985).

De entre las mejores mezclas que se han reportado para la crioconservación de especies vegetales se encuentra la misma que se utilizó en este trabajo (DMSO-sacarosa-glicerol) (Withers, 1985; Kartha, 1987). Las soluciones de sacarosa no se emplearon debido a que presentaron los porcentajes de citotoxicidad más altos, además abaten el punto de congelación muy poco (el más bajo fue de $-5.8\text{ }^{\circ}\text{C}$), puntos contrarios a los indicados para tener éxito en la crioconservación de germoplasma.

Las tasas de enfriamiento y los puntos de congelación se muestran en la tabla 5. Se puede observar que las mezclas son las que ofrecen puntos de congelación más bajos. Estos puntos disminuyen conforme se concentra la totalidad de los solutos en el solvente, el DMSO también abate el punto de congelación conforme se concentra, sin que éste sea muy por debajo de 0°C . Las tasas de enfriamiento que se alcanzaron, se encuentran entre los rangos reportados para la metodología de enfriamiento lento (-0.2 a $-2.0\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$).

Los viales que contenía los explantes y las soluciones crioprotectoras fueron colocados a una T.ext. de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y se prosiguió con la metodología de crioconservación. Ocho explantes se sembraron en el medio de cultivo óptimo utilizado en la micropropagación y se incubaron a $-26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 1200 lux de intensidad luminosa y un fotoperíodo de 16 hrs luz.

Tabla 5 Tasas de enfriamiento y puntos de congelación alcanzados por las soluciones crioprotectoras al congelar brotes de *O. robusta* y al exponerlas a una temperatura externa de $-25 \pm 2^\circ\text{C}$ dentro del termo.

Soluciones crioprotectoras	Punto de congelación $^\circ\text{C}$	Tasa de enfriamiento $^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$
DMSO 5%	-6.10	-2.10
DMSO 10%	-8.10	-1.63
DMSO 15%	-9.22	-1.72
SACAROSA 10%	-3.00	-2.28
SACAROSA 20%	-5.80	-1.53
SACAROSA 30%	-5.60	-1.47
MEZCLAS		
No. (%)		
DMSO-Sac-Glj		
1 (5-3-10)	-12.0	-0.62
2 (10-3-15)	-20.2	-1.10
3 (15-3-20)	-23.2	-1.44
4 (5-5-10)	-12.2	-1.63
5 (10-5-15)	-13.4	-0.86
6 (15-5-20)	-23.8	-1.47
7 (5-10-10)	-10.7	-1.32
8 (10-10-15)	**	**
9 (15-10-20)	**	**

** No se pudo determinar su punto de congelación por estar por debajo de -40°C

Viabilidad de brotes de *O. robusta*

Los siete explantes restantes de los 15 que fueron congelados se sometieron a una solución de CTT y Tween 80 (en proporción 1:1), para comprobar si el proceso de criopreservación aplicado permitió recuperar explantes vivos (sobrevivientes), esta prueba bioquímica completó la del cultivo en medio de micropropagación de los otros 8 explantes de los que se esperaban respuestas morfogénicas.

La tabla 6 muestra los porcentajes de metabolismo celular (medidos como respiración de los explantes congelados) con respecto a un control, la máxima absorbancia se registró a 480 nm de longitud de onda.

Al analizar la tabla 6 se puede observar que la mezcla 2 (DMSO 10%, sacarosa 3% y glicerol 15%) fue la que presentó un mayor porcentaje de respuesta 55.22%, seguido por las mezclas 3, 4, 6 y 5, que están en un rango de 47 a 42%, solamente las mezclas 1 y 7 presentaron rangos inferiores. Las mezclas 8 y 9 tuvieron muy baja actividad por lo que no se incluyen en la tabla 7.

Tabla 6 Porcentaje de respuesta a la degradación del cloruro de 2,3,5 trifenil tetrazolio (CTT), por parte de los explantes congelados de *O. robusta*.

Mezclas (DMSO-Sac-gli)	Porcentaje (%)
1 (5-3-10)	31.04
2 (10-3-15)	55.22
3 (15-3-20)	47.07
4 (5-5-10)	45.56
5 (10-5-15)	42.11
6 (15-5-20)	43.76
7 (5-10-10)	28.64

Con base al análisis de la degradación del CTT, se esperaba que la mezcla 2 de los crioprotectores podría proporcionar una protección favorable a los explantes congelados debido a la alta tasa metabólica que presentaron con respecto al control. Sin embargo, a los 16 días de su subcultivo, muchos de ellos mostraron un aspecto blanco, por lo cual se consideró que estaban muertos, ya que generalmente ese mismo aspecto se presentó en los brotes que demostraron una actividad metabólica muy baja y en los cultivos que murieron sin aplicarles ningún tratamiento, solamente los brotes que se sembraron en las mezclas 2, 3, 4 y 6 presentaron un color verde de aspecto húmedo y vítreo, por lo que se consideró que podrían continuar vivos. Sólo un explante que se expuso a la protección de la mezcla de crioprotectores del tratamiento 2 (DMSO 10%, Sacarosa 3% y glicerol 15%) formó un nuevo brote con el mismo color verde que se presentó en los otros cultivos, por lo que se pensó que se recuperaría y formaría un brote similar a los obtenidos en los ensayos de micropropagación. Sin embargo el explante se mantuvo en las mismas condiciones (urgente y de color verde) por 30 días más, posteriormente comenzó a perder el color hasta volverse blanco, tampoco se observó que el explante hubiera incrementado su biomasa en ese lapso. Withers y Street (1977) observaron que una porción considerable o algunas veces todas las células recuperadas de la congelación de *Daucus carota* y *Acer pseudoplatanus*, perdieron la viabilidad durante el estado temprano de cultivo. Estos datos enfatizan que los valores de viabilidad obtenidos por pruebas cuantitativas después del descongelamiento no necesariamente dan una idea real del porcentaje de células que pueden reanudar el crecimiento y la división celular después del tratamiento de congelación (Sala *et al.*, 1979). También se establece que la falta de desarrollo de los brotes de *O. robusta* después de su congelamiento no se debe en principio a que todo el explante haya muerto en dicho proceso, pues existen poblaciones celulares que resistieron la crioconservación pero sin embargo no sobrevivieron al estar inmersos en un tejido sin vida.

Existe un fenómeno llamado "crioshock" que es producido por los efectos de la congelación que las células tienen que superar para reanudar su desarrollo, este retraso puede ir de tres días a más de seis meses (Jørgensen, 1989). Este efecto se

presentó en un explante después de 7 meses de cultivo, donde un explante regeneró un pequeño brote deforme, dicho explante se sometió a criopreservación con la mezcla 2, su aspecto blanco turgente y sin cambio en su biomasa antes de comenzar a crecer en un nuevo brote era similar al resto de los explantes criopreservados. El nuevo brote era de forma redonda similar a un callo de color pardo y su crecimiento fue muy distinto a los brotes que se generaron en los cultivos *in vitro*. Solamente dos explantes de un total de quince (13.3%) lo cual es sumamente pobre y poco representativo, además de que no se logró la regeneración de una planta normal.

Los factores que intervienen para una exitosa criopreservación son muy variados. Estos van desde la especie utilizada, el explante, el estado fisiológico del material vegetal, el mecanismo de acción de los crioprotectores, la tasa de enfriamiento aplicada, la temperatura previa a la inmersión en NL y las condiciones de cultivo postcongelamiento (Kartha, 1985; Dereuddre *et al.*, 1988).

A pesar de que las tasas de enfriamiento que se utilizaron se consideran dentro de las reportadas como lentas (Kartha, 1985), se comprobó que para el caso del nopal, esta tiene que ser muy específica, ya que las únicas respuestas se presentaron con una tasa de enfriamiento de $-1.1\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ aunque la respuesta fue pobre puede dar una idea de en donde es posible encontrar la tasa óptima para esta especie, cabe recordar que las tasas de enfriamiento reportadas no fueron constantes a lo largo del enfriamiento sino que fueron el resultado del promedio de ellas ya que éstas no se mantienen de manera constante a lo largo de la curva de enfriamiento, por lo que sería interesante realizar este experimento en un equipo que efectivamente pueda controlar tasas constantes de enfriamiento con lo que posiblemente la sobrevivencia se incremente.

Otro punto importante de este experimento es que las mezclas empleadas sólo en una se dio la sobrevivencia de 2 explantes con lo que se proporciona un precedente de qué tipo de mezcla de soluciones crioprotectoras y en que concentraciones se pueden utilizar para la exitosa criopreservación del nopal *O. robusta* y que se podría extrapolar a otras especies de la familia de las cactáceas.

Inducción de estrés osmótico

Dentro de los daños causados por el congelamiento, el agua intracelular juega un papel muy importante, ya que proporciona estructura a los componentes celulares, y al ser extraída bruscamente de la célula puede ocasionar su plasmólisis, por otro lado, si no es suficiente el agua que se extrae, puede en el momento de congelarse formar cristales de hielo y causar daños mecánicos a los organelos de la célula, por lo que el control del agua durante los ensayos de crioconservación debe de ser muy exacto. Para el caso particular del nopal que posee alrededor de 90% de agua, se intentó extraer cierto porcentaje de esta agua mediante la aplicación de un agente que provoca estrés osmótico (manitol) en el medio de cultivo, para así evitar principalmente el daño mecánico. Whither y Street emplearon 1.1 y 3.3% p/v de manitol durante el cultivo de células de sicomoro y chile con el fin de reducir el contenido de agua e incrementar la resistencia de las células a la congelación.

Cultivos en suspensión de sicomoro cultivados con 6% de manitol mostraron que una porción de células presentaban encogimiento y alteraciones estructurales, incluyendo un incremento en el número de vacuolas y principalmente un decremento en el volumen celular vacuolar. Esto dio como resultado un 55% de sobrevivencia celular al congelamiento, a diferencia de las células control sin manitol que presentaron una sobrevivencia menor al 1% (Finkle *et al.*, 1985).

La crioconservación de brotes de *O. robusta* inicialmente cultivados en medio MS adicionado con manitol se realizó en dos ocasiones diferentes (tabla 7). Después de ocho meses de cultivo posteriores a la congelación, los explantes continuaron con un color totalmente blanco, sin observar aumento de su biomasa a excepción de un brote que se generó después de dicho tiempo, el nuevo brote era de aspecto similar al descrito arriba, es decir, de forma redonda y con aspecto de callo, también provino del tratamiento con la solución crioprotectora 2 (10% de DMSO, 3% de sacarosa y 15% de glicerol), el brote tampoco se desarrolló en un brote normal, ni continuó con su crecimiento.

El posible efecto que pudo haber tenido el manitol sobre la cantidad de agua intracelular no favoreció la criopreservación y recuperación del nopal. Aunque este sólo fue un factor que se manejó, hay que tener en mente que los factores que intervienen para lograr una exitosa criopreservación son muy variados, entre ellos se encuentra principalmente el modo de acción de los crioprotectores que tienen que ver en gran medida con la recuperación de los explantes (Dereuddre *et al.*, 1988).

El empleo de agentes penetrantes como el DMSO que evita la cristalización del hielo intracelular y no penetrantes como el glicerol que únicamente protege a la membrana de manera extracelular, aunado a la sacarosa que tiene un papel en evitar la plasmólisis celular por deshidratación (Finkle *et al.* 1985), podrían proporcionar una adecuada protección, y éstos al no ser tóxicos sobre el nopal, parecerían ser adecuados para su criopreservación. Partiendo de estos puntos se abre una perspectiva para tratar de criopreservar explantes de *O. robusta* modificando por ejemplo las condiciones postcongelamiento, ya que se ha visto que en varias especies de papa al modificar las condiciones hormonales o físicas de los cultivos se han logrado incrementos considerables en su sobrevivencia (Grout y Henshaw, 1978; Henshaw *et al.*, 1980). Debido a que en esta parte del trabajo se confirmó que la solución crioprotectora número 2 (DMSO 10%, sacarosa 3% y glicerol 15%) (tabla 7) con una tasa de enfriamiento de $-1.05^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, pudo originar un brote a partir del explante congelado, estos resultados son similares a los obtenidos en el primer experimento de criopreservación realizado donde se logró que dos explantes enfriados y congelados a una tasa de $-1.1^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ (tabla 5) generaran un nuevo brote cada uno, además de que en ambos ensayos se presentó el efecto de crioshock, con lo que se puede confirmar que dicha solución crioprotectora y las tasas obtenidas ofrecen una base para continuar los estudios de criopreservación en esta especie.

Tabla 7 Tasas de enfriamiento y puntos de congelación alcanzados por las soluciones crioprotectoras con explantes de *O. robusta* pretratados en medios de cultivos adicionados con manitol 5% al exponerlas a una temperatura externa de -21 °C dentro del termo.

Tratamiento	Puntos de congelación °C (± 0.9)	Tasa de enfriamiento °C·min ⁻¹	
		Ensayo 1	2
DMSO 5%	-5.9	1.89	2.03
DMSO 10%	-8.5	1.87	1.14
DMSO 15%	-9.6	1.72	1.46
Mezclas			
No. (%)			
DMSO-Sac-Gl			
1 (5-3-10)	-12.3	0.96	1.88
2 (10-3-15)	-20.5	0.93	1.05
3 (15-3-20)	-23.2	1.12	0.89
4 (5-5-10)	-12.0	1.36	1.12
5 (10-5-15)	-13.6	0.82	1.86
6 (15-5-20)	-23.4	1.62	1.23
7 (5-10-10)	-10.3	1.45	1.04
8 (10-10-15)	**	**	**
9 (15-10-20)	**	**	**

** No se pudo determinar su punto de congelación por estar por debajo de -40°C

Variación de tasas de enfriamiento utilizando la mezcla crioprotectora 2 (DMSO 10%, sacarosa 3% y glicerol 15%)

La solución crioprotectora 2 es la única que dio indicios de conferir cierta protección celular a los brotes de *O. robusta*, por lo se decidió trabajar únicamente con ella en los ensayos de criopreservación, variando solamente la tasa de enfriamiento, a pesar de que se encontró que tasas de enfriamiento alrededor de -1.05 a $-1.1.0^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, son las que proporcionaron los únicos resultados positivos.

Aunque las tasas de enfriamiento obtenidas (tabla 7) entran en el rango que se consideran lentas (-0.2 a $-2.0^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$), se ha observado que este rango no siempre puede ser tan amplio para que aún permita la sobrevivencia del material congelado. En células animales frecuentemente se presenta una tasa de congelamiento específica aparentemente limitada por un lado por la sobredeshidratación, y por el otro por la formación intracelular de hielo, esto mismo puede ser aplicado a muchos sistemas vegetales (IBPGR, 1980).

Para tratar de encontrar una tasa de enfriamiento que pudiera favorecer la recuperación de los explantes congelados, se realizaron 6 diferentes ensayos con 25 explantes distribuidos en 5 viales en cada uno, la metodología fue igual a la empleada para esta especie, las tasas de enfriamiento que se obtuvieron fueron muy diferentes (tabla 8). Se esperaba que al emplear la mezcla crioprotectora 2 y diferentes tasas de enfriamiento, fuera posible incrementar el porcentaje de sobrevivencia obtenido, pero la respuesta fue nula; ningún explante sobrevivió y generó nuevos brotes.

Un punto que es necesario resaltar sobre las tasas de enfriamiento obtenidas en esta parte experimental, es que ninguna se acercó a las tasas en donde se logró la sobrevivencia de los explantes en los ensayos previos, lo que muestra que el sistema de enfriamiento utilizado presenta la desventaja de no poder controlar la velocidad del descenso de temperatura de una manera constante que permita la reproducibilidad y control de un ensayo a otro, con lo que no sería útil en especies con una tasa de enfriamiento específica, como al parecer es el caso de *O. robusta*.

Hasta la fecha no existe ningún reporte de crioconservación de la familia Cactaceae, con lo que los resultados presentados en este trabajo son la base para continuar su estudio.

Tabla 8 .- Tasas de enfriamiento obtenidas al congelar brotes de 0.5 a 1.0 cm de *O. robusta*, con la mezcla crioprotectora 2 (10% DMSO, 3% sacarosa y 15% glicerol)

Ensayo No.	°C·min ⁻¹
1	-0.36
2	-0.49
3	-0.18
4	-1.33
5	-0.37
6	-0.71

Análisis ultraestructural mediante microscopía electrónica de células de *O. robusta* sometidas a congelación

Se ha demostrado que pueden existir cambios en la ultraestructura celular, 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). Por este motivo se investigó en el nopal *O. robusta* cuál fue el daño causado por la metodología empleada en su congelación, se realizó estudios con ayuda de la microscopía electrónica de transmisión.

Las células de los explantes control (Lámina B 1, 3 y 5) fijadas, cortadas y contrastadas al mismo tiempo que los explantes congelados, mostraron células

completamente normales, es decir, se pudo observar el citoplasma en perfecto estado en contacto con la pared celular y conteniendo organelos como ribosomas, cloroplastos, mitocondrias, núcleo cromocéntrico, nucléolo y una gran vacuola que ocupa la mayoría de la célula; a la mayoría de éstos organelos se les pudo observar su doble membrana en perfecto estado.

Las micrografías obtenidas de los explantes sometidos a los ensayos de congelación (Lámina B 2, 4 y 6) muestran un daño ultraestructural muy severo en todas las células. Lo primero que se puede observar es la plasmólisis (separación de la membrana citoplasmática de la pared celular) que sufrieron las células ya que los restos de citoplasma, así como de los organelos, se encuentran concentrados al centro del espacio celular, al analizarlo con más detalle (Lámina B, 4) se pudo observar que existe rompimiento de membranas citoplasmáticas y de los diferentes organelos como cloroplastos e incluso del núcleo, el cual se considera el organelo más resistente de la célula, también presentan hinchamiento de las lamelas del cloroplastos; no fue posible distinguir estructuras como mitocondrias o ribosomas. Muchas células parecían estar "lavadas", únicamente mostraban la pared celular y restos de su contenido celular.

Una de las causas que puede provocar la desorganización celular (efecto citotóxico) es la aplicación de las soluciones crioprotectoras aunque esta desorganización no siempre da por resultado la muerte de la célula. A pesar de estos efectos los crioprotectores son necesarias cuando se congelan células a -196°C , se descongelan y finalmente se intenta su recuperación. Sin crioprotector frecuentemente no conservan características estructurales reconocibles. Los crioprotectores efectivamente preservan algo de la integridad estructural, pero quizá la organización celular sea fuertemente trastornada (Finkle *et al*, 1985).

Para el caso particular del nopal la protección que dio la mezcla crioprotectora fue casi nula porque el daño que se observa es tan severo que difícilmente se pueden reconocer algunas de las estructuras. Teóricamente un crioprotector puede brindar protección extracelular contra el daño a la membrana, intracelularmente puede

estabilizar los arreglos intra e intermoleculares de los componentes estructurales y finalmente puede asociarse al agua de la membrana (Chen *et al.* 1984).

No se puede atribuir únicamente a la mezcla de crioprotectores utilizada, el daño producido a las células. Existen otros factores que se han mencionado anteriormente que afectan la viabilidad del material congelado, uno muy importante es la tasa de enfriamiento aplicada, para este caso se obtuvo una tasa de enfriamiento de $-1.5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, ya que como se ha explicado en el sistema de enfriamiento empleado, las tasas de enfriamiento no se pueden controlar y no se pudo repetir la tasa de $-1.1^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ con la que se obtuvo la relativa sobrevivencia, por lo que sería interesante poder realizar este tipo de estudios aplicando ésta última tasa de enfriamiento, en un sistema automatizado de crioconservación.

Casos similares se han observado con otras especies, por ejemplo, en estudios con meristemos de chícharo congelados a tasas lentas con 5% de DMSO mostraron una gran proporción de células que no sobrevivieron, al observarlas al microscopio electrónico mostraban la falla o ruptura de las membranas así como de organelos en general (Haskins y Kartha, 1980). Se reporta que observaciones histológicas de cultivos en suspensión de *Musa* que fueron crioconservados, revelaron que sólo las células más embriogénicas sobrevivieron a la congelación. Las células que perdieron su viabilidad exhibieron citoplasma granular con rompimiento de vacuolas, también su núcleo se mostró muy granular, irregular y contraído, probablemente debido a la excesiva deshidratación de sus células (Panis *et al.*, 1992).

La bibliografía menciona que la membrana es el primer sitio de daño en las células vegetales al congelarlas y descongelarlas. Se han realizado muchas observaciones de ruptura de la membrana en células después que se les ha expuesto a estrés por congelación letal o subletal. El concepto de pérdida de la membrana por la célula durante la contracción celular ha sido propuesta como el resultado de la plasmólisis y daño por congelamiento extracelular. La intensidad del daño por congelación en las células depende fuertemente del nivel y profundidad de deterioro en la estructura y función de la membrana, el cual es regulado por la bicapa de lípidos y proteínas del citoesqueleto. También existen observaciones que incluyen

plasmólisis de la célula o protoplasto, pérdida de electrólitos y otros constituyentes celulares y rompimiento de la estructura fina. Además durante la congelación se puede presentar congelamiento intracelular después de la ruptura de la membrana citoplasmática causada por el estrés osmótico, lo cual está relacionado con el flujo de agua a través de la membrana y al incremento de la susceptibilidad de ésta a dañarse a temperaturas más bajas. Análisis del flujo de agua a través de la membrana, muestra que el congelamiento intracelular que puede ocurrir durante el enfriamiento, puede evitarse mediante el uso de altas concentraciones de solutos permeables en el equilibrio osmótico parcial o total por el uso de combinación de solutos permeables y no permeables. (Singh y Miller, 1985; Locksley y Muldrew 1991; Belous y Matthes, 1991).

Observaciones en la ultraestructura del centeno y trigo durante la congelación a temperatura letal, indican que ocurre una alteración en la membrana, pero también esas alteraciones son frecuentemente acompañadas por la pérdida en la estructura de la bicapa planar de la membrana celular y la aparición de cuerpos osmofílicos (Singh y Miller, 1985). Este fenómeno puede ser la causa del estado de las células de nopal congeladas, ya que el crioprotector utilizado (DMSO 10%, sacarosa 3% y glicerol 15%), puede causar deshidratación excesiva cuando la fracción acuosa comienza a congelarse fuera de la célula y al romperse la membrana, existe el daño por la penetración de hielo al interior de la célula, ocasionando los daños descritos.

Dentro del congelamiento lento existe un paso entre excesiva e insuficiente deshidratación, en el cual el daño puede ser minimizado. Algunos de los factores que influyen en la sobrevivencia durante el congelamiento lento son la tasa de enfriamiento, concentración del crioprotector, medio de cultivo conteniendo al crioprotector antes de la congelación, temperatura terminal de congelamiento y el tiempo a la temperatura de congelamiento terminal antes de la inmersión en el NL (McAdams *et al.*, 1991).

Otro punto que se tendría que tomar en cuenta, es que las soluciones crioprotectoras no cumplieron su acción coligativa, es decir, reducir la cantidad de hielo formado a temperaturas subcero, por lo tanto reducir la concentración de otros

solutos y permitir a las células tolerar la exposición del ambiente, ocasionando que el crecimiento de los cristales de hielo dentro de la célula causara daños irreversibles a sus componentes celulares.

Debido a que no es posible mediante las micrografías detectar donde pudo haber sido el primer sitio de daño, éste no necesariamente se pudo originar en la membrana. Existen estudios que señalaron que en cereales que se enfriaron a 0°C por 12 horas, los plástidos fueron los organelos más sensibles; otros organelos menos alterados fueron: mitocondrias hinchadas, los dictiosomas desaparecieron y hubo un incremento aparente en la asociación ribosoma-retículo endoplásmico rugoso y algunas veces las mitocondrias mostraron ruptura de las crestas. Los crioprotectores pueden causar los mismos efectos en la ultraestructura, estos cambios ocurren después de una hora de adicionado el crioprotector (Finkle *et al.*, 1985), aunque éstos causan una desorganización celular que no siempre resulta en la muerte celular, pero su uso es indispensable para su criopreservación. El uso de la combinación de polietilenglicol, glucosa y DMSO en cultivo en suspensión de caña de azúcar durante la congelación presentaron la mejor preservación de la membrana celular que cuando se usaron solos. Whithers y Davey en 1978 (citados por Finkle *et al.*, 1985), estudiaron células de sicomoro pretratadas con DMSO, que mostraron una ultraestructura altamente dañada (Finkle, Zavaia y Ulrich, 1985). Por otro lado células de *Triticum aestivum* y caña de azúcar, después de ser congeladas con crioprotectores, mostraron algunas alteraciones que se pueden atribuir a los crioprotectores como: el retículo endoplasmático llegó a ser altamente vesiculado, las mitocondrias generalmente se rompieron e hipertrofiaron, los plástidos se fragmentaron y el núcleo se mostró más invaginado (Finkle *et al.*, 1985).

Lámina B. Estudio ultraestructural de *Opuntia robusta* var. *larreyi*, control y congelado

1. Aspecto general de la célula de *O. robusta* proveniente de un brote cultivado *in vitro* (control) donde se puede observar la pared celular (P), una gran vacuola que ocupa la mayor parte de la célula (V), el citoplasma (C) y diversos organelos como el núcleo (N), nucleólo (n), cloroplastos (Cl) y mitocondrias (M).

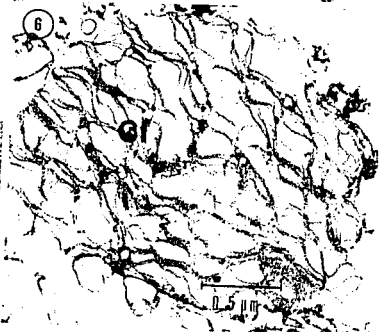
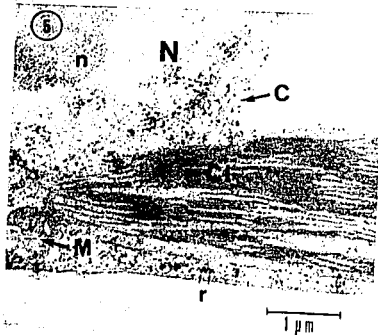
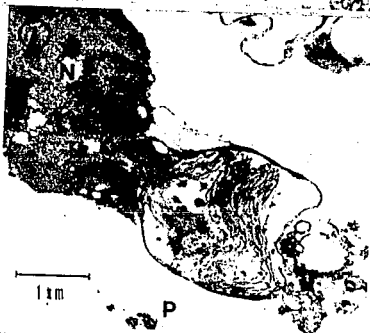
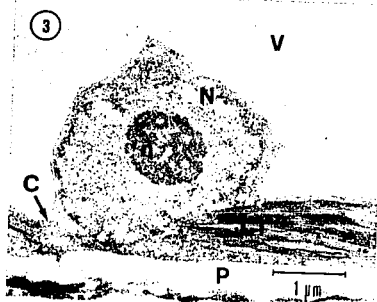
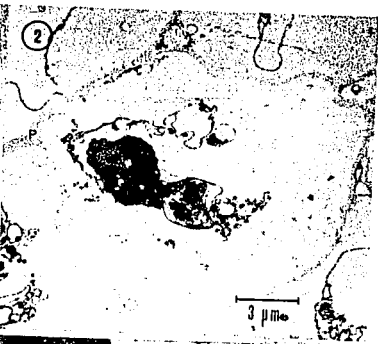
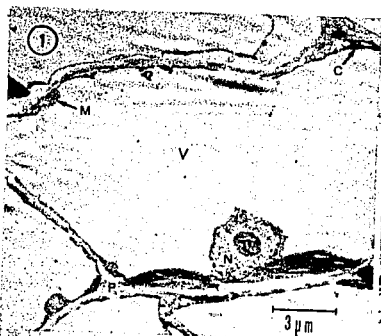
2. Aspecto general de una célula de *O. robusta* congelada con la mezcla crioprotectora 2 (DMSO 10%, sacarosa 3% y glicerol 15%), donde se puede observar una plasmólisis de sus componentes celulares que se concentran al centro del espacio celular, únicamente se pueden observar la pared celular (P), los restos del núcleo (N) y del cloroplasto (Cl).

3. Mayor aumento que muestra la conservación de la célula control donde se puede observar la doble membrana del núcleo (N) y del citoplasma (C), además de diversos organelos.

4. Aumento de la célula congelada donde se puede observar que estructuras finas como membranas del núcleo (N) y del cloroplasto (Cl) no se conservaron y el resto de los componentes celulares no se pueden distinguir.

5. Mayor aumento que muestra la estructura del cloroplasto en células no congeladas (Cl). Se observan ribosomas (r) y mitocondrias (M)

6. Cloroplasto (Cl) de una célula dañada durante la crioconservación, se observa completamente desorganizado, las lamelas se han hinchado y están desorganizadas.



Estudio electroforético para la determinación de proteínas totales en *O. robusta*.

Al realizar el análisis de los datos obtenidos por la electrofóresis se pudo observar que existen diferencias entre las tres muestras (tabla 9, Lámina C), es decir, las muestras del nopal control presenta 11 bandas, las de *in vitro* presentan 10 y los brotes de nopal congelado 7. De estas bandas existen 5 que aparecen en las tres condiciones experimentales, por lo que se pueden considerar como las proteínas marcadoras para esta especie en particular.

La diferencia existente entre el nopal control e *in vitro* es de 3 bandas dispuestas en diferente posición (tabla 9), posiblemente se deba a que el nopal control al estar expuesto a condiciones físicas cambiantes como: diferencias en temperatura, humedad y nutrientes, pueda sintetizar algunas proteínas distintas, entre las cuales se pueden considerar las proteínas de estrés. Estas generalmente son de pesos grandes, aunque también las hay de un rango de peso molecular pequeño, las que coinciden con las dos más altas que presenta el muestra control. Li y Patta (1979) reportaron que la papa al exponerla a un temperatura estresante cercana a 0°C incrementa el peso molecular de sus proteínas solubles.

Pueden existir cambios en la síntesis de proteínas que reflejan las diferentes tasas de crecimiento que presentan las plantas. Lo anterior se puede aplicar a los explantes control que fueron tomados directamente de una planta adulta y no pasaron por cultivo *in vitro*, lo que le confiere un estado fisiológico distinto a los brotes generados *in vitro* los cuales al provenir de un tejido más joven y bajo condiciones físicas diferentes y constantes como temperatura, luz humedad y con nutrientes suficientes, tendrían un estado fisiológico distinto y por lo tanto también una tasa de crecimiento distinta de ahí que no presentaron las mismas proteínas que el control.

Al analizar las bandas de las muestras de brotes congelado y las de *in vitro*, se esperaría que si la metodología de crioconservación no fue negativa se encontrarían las mismas bandas, pero de las 10 que presenta el nopal *in vitro*, sólo se presentan 7 en los brotes de nopal congelado (tabla 9); ante estos resultados se puede argumentar que la metodología utilizada sí produce daños que llevan a la pérdida de proteínas,

posiblemente por una desnaturalización de ellas. Además al observar el microgel (lámina C), se encuentra cierta precipitación de proteínas.

Efectos similares se han encontrado en semillas donde algunas proteínas se precipitaron por el efecto de la congelación y algunas enzimas pueden inactivarse, por ejemplo la enzima deshidrogenasa málica es inestable cuando se congela y la pectina esterasa del frijol se desnaturalizó cuando se congeló y descongeló (Levitt, 1980).

La congelación no produce por sí misma la desnaturalización de las proteínas, ya que el fenómeno puede ser reversible en cierto punto cuando se regresa a la temperatura e hidratación inicial. El daño se puede ocasionar por la agregación, es decir, las moléculas desnaturalizadas al encontrarse concentradas por la pérdida de agua de las células debido al congelamiento extracelular, pueden interaccionar con otras moléculas adyacentes, permitiendo que sus grupos químicos previamente protegidos unos de otros dentro de sus moléculas plegadas formen uniones entre ellas, el fenómeno se puede resumir como sigue (Levitt, 1980):

1) Las bajas temperaturas desnaturalizan las proteínas reversiblemente, desenmascarando los grupos SH.

2) La remoción del agua celular por la congelación-deshidratación produce la contracción celular que produce estrés sobre las proteínas protoplasmáticas, activando sus uniones SS, con lo que se disminuye la distancia entre las moléculas de las proteínas desnaturalizadas.

3) Formación de uniones intermoleculares debido a la oxidación de los grupos SH o intercambio de $SH \rightleftharpoons SS$ o $SS \rightleftharpoons SS$, agregando a las proteínas irreversiblemente con lo que la célula muere.

No solamente se le puede atribuir a la agregación de las proteínas la muerte de los explantes del nopal y la pérdida de las mismas, también hay que recordar que

puede existir un daño físico a la células causado por el congelamiento intracelular del agua que puede llegar a romper sus estructuras celulares, muchas de las cuales tienen componentes proteicos estructurales como las membranas y el citoplasma, éstas al ser dañadas no permiten que las proteínas se reintegren después de la descongelación quedando posiblemente como solutos y en el proceso de lavado de los agentes crioprotectores también salen o pero aún los agregados moleculares que se pudieran formar también pueden salir de las células ocasionando la falta de proteínas observada en el presente estudio electroforético (tabla 7, lámina C).

La falta de proteínas se puede deber también a su precipitación. Levitt (1980) menciona que existe precipitación de proteínas protoplasmáticas debido al incremento en la concentración celular de sales durante la congelación y si ocurre un rompimiento del sistema de membranas, ocasiona que la precipitación se de más fácilmente.

Los agentes crioprotectores tienen la función de evitar todos los daños antes mencionados y deben proteger externamente la integridad de la membrana citoplasmática; internamente proteger el sistema de membranas; evitar la plasmólisis celular y aislar a las proteínas mediante la formación de puentes de hidrógeno de los grupos -OH de azúcares (sacarosa) con los grupos polares de las proteínas para que éstas no se precipiten o se agreguen entre sí. Evidentemente la metodología aplicada a los explantes del nopal no permitió que se dieran todos estos fenómenos para poder conservar la integridad celular con lo que posiblemente se lograría la recuperación de los brotes.

Tabla 9.- PESOS MOLECULARES DE PROTEINAS DE NOPAL *Opuntia robusta* SDS GRADIENTE 10-15

Control	<i>in vitro</i>	congelada
71,500	**	**
65,500	**	**
58,000	58,000	57,500
**	56,000	53,500
50,000	**	**
39,500	41,000	41,500
37,500	**	**
27,000	28,500	**
**	25,500	26,500
23,000	23,000	23,000
20,500	20,500	20,000
15,000	15,000	**
14,000	14,000	14,000

** No se observaron
 $Y = (-3.94041 * X) + 10.721277$
 $r^2 = 0.9931598$

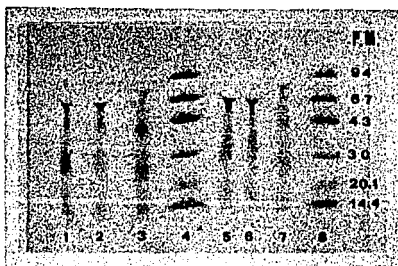


Lámina C.- Electroforesis en microgeles de SDS-Poliacrilamida con gradiente 10-15%, para la determinación del peso molecular de las proteínas de *Opuntia robusta*. Los carriles 4 y 8 son los patrones; el 1 y 5 son el nopal congelado; 2 y 6 nopal de los cultivos *in vitro*; 3 y 7 nopal control.

Cuantificación espectrofotométrica de proteínas

La determinación espectrofotométrica de proteínas mediante la metodología del ácido biciconínico (BCA), mostró que el nopal control presentó una concentración de proteínas de $60 \text{ mg} \cdot 100 \text{ ml}^{-1}$, el nopal *in vitro* $29 \text{ mg} \cdot 100 \text{ ml}^{-1}$ y el nopal congelado $13 \text{ mg} \cdot 100 \text{ ml}^{-1}$. Al existir daño muy severo en la ultraestructura de las células de nopal se puede ocasionar la pérdida de ciertas proteínas, sobre todo las constituyentes de las membranas, así también las que conforman el citoesqueleto y las nucleoproteínas, por lo que los resultados obtenidos ayudan a confirmar el bajo contenido de proteínas presentes en los extractos del nopal congelado, así como la falta de algunas bandas detectadas por electroforesis.

La muerte de las células fue debido a la combinación de diferentes formas de daño por congelación, algunos directamente letales y algunos subletales. Estos pueden incluir formación intracelular de hielo, ruptura y pérdida de componentes de la membrana, deshidratación de la membrana, desnaturalización y precipitación de proteínas críticas (tanto en membrana como en el citoesqueleto), perforación de la membrana, daño a los lisosomas. El uso de crioprotectores adecuados debe de mantener la integridad celular, amortiguando los cambios osmóticos y conservando la integridad de los componentes estructurales de las células (Kruuv, 1989), lo que en el caso particular del nopal no ocurrió y el daño ocasionado fue tan severo que se reflejó en los resultados obtenidos.

Crioconservación de ápices de fresa, chicharo y papa

Con base en los resultados positivos tan escasos y azarosos que se obtuvieron para *O. robusta*, se decidió intentar la crioconservación de otras especies con las que se ha tenido éxito es sistemas computarizados de congelación como la fresa, el chicharo y la papa, con el fin de poder evaluar hasta que punto el sistema sencillo de

enfriamiento que se utilizó fue el causante de los resultados obtenidos y también establecer si la especie es intrínsecamente difícil de crioconservar.

Congelación de *Fragaria* sp.

Con el primer ensayo que se realizó con ápices de fresa pretratados con la mezcla de soluciones crioprotectora (DMSO 10%, Sacarosa 3% y Glicerol 15%), se obtuvo una tasa de enfriamiento de $-0.85\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, con un punto de congelación de $-19.8\text{ }^{\circ}\text{C}$ (tabla 10). Para el segundo ensayo con pretratamiento de DMSO al 5% se obtuvo una tasa promedio de $-0.92\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ y un punto de congelación de -5.2°C (tabla 10).

Calkins y Swanson (1990) reportan que macroscópicamente se puede observar que existe daño por congelación cuando el tejido presenta una apariencia suave, acuosa, se decolora, no presenta capacidad de crecimiento y puede ser atacado por hongos saprofitos. Lo anterior se pudo observar en los explantes de fresa, en los que después de varios meses el único cambio que presentaron fue el paso de color blanco a negro y perdieron la consistencia que mostraban antes de la congelación. En tanto que el control se tornó verde a los 10 días y continuó su crecimiento y desarrollo.

Kartha (1985) realizó una revisión de crioconservación de meristemas e indica que la fresa enriada a $-0.84^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ hasta los -40°C y almacenada en NL, permite una respuesta de 95% de regeneración de plantas que forman múltiples brotes, también resalta que al aumentar o disminuir la tasa de enfriamiento la respuesta se ve disminuida, indicando que para la variedad de fresa empleada en ese experimento tiene una tasa de enfriamiento que fue óptima. También reporta que logró de un 60 a 80% de regeneración en meristemas pretratados con una combinación de 3% de sacarosa y 10-16% de DMSO, precongelados a -20 y -30°C antes de su almacenamiento en NL.

En el experimento realizado en este trabajo, las tasas de enfriamiento no fueron constantes y ésta es una diferencia fundamental con los sistemas automatizados; es

por ello que las tasas que se reportan en este trabajo son el promedio de varias tasas que se dan hasta llegar a -40°C . A pesar de que la tasa obtenidas en el primer ensayo (tabla 10) se acerca mucho a la tasa óptima reportada, los resultados no fueron similares, esto se puede atribuir a la falta de precisión del sistema empleado, al poco control que se tiene sobre las tasas de enfriamiento los cuales se ven reflejados en la nula sobrevivencia de los explantes.

Otro factor que pudiera estar relacionado es la variedad empleada, ya que se ha demostrado que se obtienen resultados diferentes en la recuperación al emplear diferentes variedades de una misma especie cuando se les sometió al mismo proceso de congelación, manteniendo constantes la concentración y tipo de crioprotector, tasa de enfriamiento y almacenamiento (Niino *et al.*, 1992).

Otro factor que juega un factor importante es el estado fisiológico de la planta (Dereuddre *et al.*, 1988) ya que un explante se puede recuperar más fácilmente cuando presenta una actividad metabólica alta, como la que existe cuando hay una elevada división celular, que cuando el explante está en un estado de latencia como en la época invernal, esto debió influir pues en el caso del material utilizado ya que se colectó a principios del año, época en la que comienza a salir del estado de relativa latencia.

Tabla 10.- Puntos de congelación y tasas de enfriamiento alcanzados durante el enfriamiento y congelación de ápices de fresa (*Fragaria* sp)

Tratamiento	Punto de congelación $^{\circ}\text{C}$	Tasa de enfriamiento $(^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1})$
DMSO-Sac-GII (10-3-15)	-19.8	-0.85
DMSO 5%	-5.2	-0.92

Congelación de *Pisum sativum*

El primer ensayo que se realizó, fue precultivando 20 meristemos de chícharo por tres días en medio B5 con 5% de DMSO, y congelados a una tasa de enfriamiento de $-0.86\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, hasta llegar a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ (tabla 11), para ser almacenados en NL por 30 minutos.

Después de 15 días de cultivo, tres explantes se tornaron verdes y comenzaron a crecer, dos meses después alcanzaron un estado de plántulas comparables en el desarrollo a las del control.

En los cuatro ensayos variando los tiempos de precultivos, los ápices no presentaron ningún desarrollo después de 8 meses. Existen diferencias en sus tasas de enfriamiento (tabla 11), aspecto muy importante debido a que se ha reportado que variaciones pequeñas en esta misma especie se reflejan en la disminución del porcentaje de sobrevivencia, es decir, cuando congelaron meristemos a una tasa de enfriamiento de $-0.6\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ proporcionó un 60% de sobrevivencia. En otro reporte al variar la tasa a $-0.5\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ lograron un 100% de sobrevivencia (Kantha, 1985).

McAdams *et al.* (1991) han observado que los días de precultivo previos a la congelación así como la temperatura final previa a la inmersión en NL tienen efecto sobre el porcentaje de sobrevivencia de los explantes, obtuvieron porcentajes desde 0% hasta 32%. En la mayoría de los casos dos días de cultivo resultaron benéficos para la crioconservación y particularmente temperatura previa de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, la tasa de enfriamiento utilizada fue de $-1.3\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. Kantha (1985a) encontró mayor sobrevivencia con tasa de enfriamiento de $-0.6\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ y ésta decrece tanto a -0.5 como a $-0.7\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$.

En la crioconservación de ápices de chícharo realizado por Haskins y Kantha (1980), observaron que la respuesta después de la congelación se inició en los primordios foliares y en los brotes axilares, en el domo se pudo observar el mayor daño a las células, únicamente en la base no existió daño y también de esa área se reasumió el crecimiento. Lo anterior indica que el chícharo puede tolerar cierto

porcentaje de daño por congelación y puede continuar su crecimiento. Cuando no hay ningún tipo de respuesta como en la mayoría de los ensayos practicados en este trabajo, el daño celular debió de ser muy severo y generalizado a todas las células del explante.

Tabla 11.- Datos obtenidos de la congelación de meristemas de Chícharo (*Pisum sativum*) con DMSO 5% como agente crioprotector

Punto de congelación (°C)	Tasa de enfriamiento (°C·min ⁻¹)
-4.8	-0.86
-4.5	-0.52
-4.2	-0.46
-4.6	-0.43
-4.5	-0.82

Congelación de *Solanum tuberosum*

En la congelación de cuatro variedades de papa (*Solanum tuberosum*), Tollocan, Alpha, Mexiquense y Alzimba se obtuvieron tasas de enfriamiento diferentes: -0.92, -0.65, -0.82 y -1.12°C·min⁻¹ respectivamente, y al sembrar los ápices en dos diferentes medios de recuperación no se obtuvieron resultados favorables (sobrevivencia) en ninguna de las variedades, los explantes perdieron su color verde y se tornaron a un blanco cremoso. Esta respuesta ocurrió aún variando el tiempo de

precultivo en MSL, el tiempo de exposición al agente crioprotector y la tasa de enfriamiento.

Debido a que la variedad es muy importante, en estudios similares con papa, se ha logrado el 50% de sobrevivencia con la variedad Golden Wonder y 2% con la variedad Desiree (Braun, 1988). Towill (1983), encontró distintos porcentajes de sobrevivencia para los cultivares de papa Norlan y Red Pontiac al enfriarlos de -0.2 (54, 92, 33 y 25%), variando la temperatura previa a la inmersión de los meristemas en el NL a -30 , -35 , -40 y -45°C respectivamente; en un segundo ensayo enfriados a una tasa de $-0.3^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, encontró porcentajes de 88, 71 y 46 a -30 , -35 y -40°C respectivamente. Esto mismo ocurre en otras especies como el betabel, en donde se reportó que existen diferentes porcentajes de sobrevivencia entre distintas variedades y que su respuesta en una variedad, con una tasa de enfriamiento de $-0.8^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ con DMSO 10% y sorbitol 0.75 M tuvo un 2.3 % de recuperación; otra variedad de betabel bajo las mismas condiciones sobrevivió en un 58.4% (Braun 1988).

Lo anterior indica que la variedad, así como las condiciones previas a las cuales se congela el material siguen siendo factores importantes que no permiten la estandarización de la metodología. A pesar de que en este trabajo se emplearon diferentes variedades, tasas de enfriamiento y medios de cultivo, la respuesta fue nula, el factor de mayor variación sigue siendo la tasa de enfriamiento, ya que como se ha mencionado, no es solamente una tasa de enfriamiento única la que se aplicó, sino que fue el promedio de varias, las cuales se dieron a lo largo del enfriamiento hasta llegar a la temperatura previa a la introducción de las muestra al NL.

Discusión general

Los datos obtenidos, en conjunto con los resultados anteriores del nopal, fresa y chícharo, indican que el sistema sencillo de enfriamiento utilizado para intentar su criopreservación, no controló específicamente las tasas de enfriamiento como en los sistemas automatizados y no resulta factible ni segura su utilización para la conservación a largo plazo de material vegetal mediante la técnica lenta de

enfriamiento. Para la mayoría de las especies, los reportes en la bibliografía especializada mencionan tasas muy específicas de congelación, al incrementar o disminuir dicha tasa la sobrevivencia de los explantes se ve disminuida o nulificada.

Al aplicar la técnica de enfriamiento rápido en ápices de papa y después de varios meses de cultivo no se tuvo ninguna respuesta favorable de los explantes, perdieron el color y no mostraron ningún tipo de desarrollo. Se esperaba algún tipo de respuesta debido a que la misma metodología había sido empleada por Henshaw *et al.* (1980) los cuales reportaron para *S. goniocalyx*, *S. tuberosum* ssp. *andigena* y varios cultivos de *S. tuberosum*, porcentajes de sobrevivencia de 54, 36 y desde 5 a 40% respectivamente. Estos resultados demuestran que el empleo de una especie o variedad tiene mucho que ver con el porcentaje de éxito que se logre, es decir, la variabilidad genética influye en gran medida, por ejemplo los mismos autores trabajaron con meristemas de clavel que fueron congelados de manera similar y no se logró sobrevivencia (Henshaw, *et al.*, 1980).

Integrando los resultados obtenidos de las observaciones realizadas con la ayuda de la microscopía electrónica y con los de la determinación y cuantificación de proteínas, se puede argumentar que el proceso llevado a cabo para la crioconservación del nopal no resultó el más adecuado, ya que contiene una gran cantidad de agua (90%) que fue muy difícil de deshidratar ocasionando que el daño fuera tan severo, debido a que los agentes crioprotectores utilizados (mezclas de DMSO, glicerol y sacarosa) no confirieron la protección necesaria en el momento de la congelación, presumiblemente permitieron el crecimiento de cristales de hielo dentro de las células y plasmólisis celular en el momento de su congelación por la excesiva concentración de solutos extracelulares.

El sistema propuesto para la crioconservación de germoplasma vegetal, a pesar de haber tenido algunos éxitos relativos (nopal y chícharo), no resulta adecuado para la congelación mediante la técnica de descenso lento de la temperatura con las especies experimentadas (nopal, fresa, chícharo, papa).

IV.- CONCLUSIONES

1) Se determinó el medio de cultivo y las condiciones físicas para el establecimiento de cultivos *in vitro* y la micropropagación de *Opuntia robusta*, el cual consiste en Medio MS basal adicionado de con tiamina $0.4 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, sacarosa $20 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, BAP $0.5 \times 10^{-5} \text{ M}$, agar 0.6% y pH 5.6.

2) Se logró el establecimiento de los brotes de *O. robusta* en suelo sin la intervención previa de medios de cultivo para inducir el enraizamiento.

3) Los agentes crioprotectores presentaron el comportamiento típico de las soluciones al enfriarse y abaten su punto de congelación conforme aumenta la cantidad de solutos disueltos en ellos. Las mezclas de DMSO-sacarosa-glicerol abaten mucho más el punto de congelación que el DMSO o sacarosa utilizados en forma individual, a la vez que las tasas de enfriamiento obtenidas con las mezclas son más lentas.

4) El DMSO y la sacarosa provocaron una citotoxicidad muy severa sobre los explantes de *O. robusta*, a diferencia de las mezclas (DMSO-Sacarosa-Glicerol) en donde la citotoxicidad fue menor y en algunos casos nula.

5) Los porcentajes de sobrevivencia poco representativos de *O. robusta* no permite que su crioconservación se pueda aplicar de manera rutinaria, pero representan una buena base para futuros trabajos con el grupo de las cactáceas, ya que no existía ningún reporte de criogénia sobre este grupo.

6) La mezcla crioprotectora 2 (DMSO 10%, sacarosa 3% y glicerol 15%) brindó una relativa protección a los explantes de *O. robusta* ya que permitió la sobrevivencia

de tres explantes. A la vez se determinó que esta especie puede tener una tasa de enfriamiento específica (alrededor de $-1.1^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$).

7) Se pudo establecer mediante el uso de microscopia electrónica que el proceso de congelación causó daños irreversibles en las células meristemáticas de *O. robusta*, los cuales pudieron ser ocasionados por la poca protección ofrecida por los crioprotectores o por la deshidratación excesiva causada por los mismos, aunada a la posible congelación extracelular.

8) Se pudieron establecer ciertos patrones electroforéticos para *O. robusta* de pesos moleculares de 58, 41, 23, 20.5 y 14 Kda.

9) Existe pérdida de proteínas, sobre todo en los explantes congelados, esta pérdida es causada por los daños tan severos durante su congelación, lo que provocó la precipitación y desnaturalización de varias proteínas que pueden ser críticas para la recuperación de las células.

10) Mediante el uso del sistema sencillo de enfriamiento se congelaron ápices de tallo de chícharo, fresa y papa, obteniendo nulos porcentajes de sobrevivencia a excepción del chícharo, que tuvo en un solo ensayo 15% de sobrevivencia, el cual es muy inferior a los porcentajes de sobrevivencia reportados para estas especies, en equipos automatizados de enfriamiento.

11) El principal problema detectado en el sistema de enfriamiento utilizado es la dificultad para controlar las tasas de enfriamiento de manera constante y repetitiva, lo que hace que su aplicación no sea práctica, pero existe la posibilidad de emplearlo para la técnica de vitrificación que actualmente ha reportado grandes logros.

V.- BIBLIOGRAFIA CITADA

- Bass, L. N. (1984) Germplasm Preservation. pp. 55-67. En: Conservation of Crop Germplasm. An International Perspective. CSSA, special publication No. 8.
- Benson, E.E. (1989). Variation in recovery of cryopreserved shoot-tips of *Solanum tuberosum* exposed to different pre-and-post-freeze light regimes. *Cryo-Letters* 10:323-344
- Bidwell, R.G.S., (1979). Fisiología Vegetal. AGT. Editor, S.A. México, D.F. 784 p.
- Braun, A. (1988). Cryopreservation of sugarbeet germplasm. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 14:161-168.
- Brian, W.W. 1990. Genetic Preservation *In vitro*. pp. 13-22. En: (Nijkamp, H.J.J., Van der Plas, L.H. y Van Aartrijk (eds.)), *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology*. Kluwer Academic Publishers, Holanda.
- Belous A.M. y Matthes, (1991). *Cryobiology of Cell Membranes*. *Cryobiology*, pp. 595.
- Calkins, J. B. and B.T. Swanson. (1990). The distinction between living and dead plant tissue-viability cold hardiness research. *Cryobiology* 27:194-211.
- 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.

- Dirzo, R. (1993). El papel de la investigación Ecológica en la Problemática Ambiental. p. 3. En: Oikos, Centro de Ecología, UNAM. México, D.F.
- 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.
- Escobar, A.H., V.M. Villalobos and A. Villegas (1986). Opuntia micropropagation by axillary proliferation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 7:269-277.
- Finkle, B.J., M.A. Zavala y J.M. Ulrich (1985). Cryoprotective Compounds in the Viable Freezing of Plant Tissues. pp. 75-114. En: K.K. Kartha (ed.), Cryopreservation of Plant Cells, and Organs, CRC, Press, Boca Ratón, Florida.
- Ford-Lloyd, B., and M., Jackson (1986). Conservation. pp. 50-68. En: E. Arnold Ltd (ed.). Plant Genetic Resources an Introduction to Their Conservation and Use. London.
- Franks, F. (1985). Biophysics and Biochemistry at Low Temperatures. Cambridge, University Press.
- Gamburg, O.L., R.A. Miller and K. Ojima (1968). Nutrient requirements os suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res., 50:151-158.
- Grout, B.W.W. and G.G. Henshaw (1978). Freeze-preservation of potato shoot tip cultures. Ann. Bot. 42:1227-1229.
- Henshaw, G.G. (1979). Tissue cultures and germplasm storage. IAPTC Newsletter, 28:2-7.
- Haskins, R.H. y and K.K. Kartha (1980). Freeze preservation of pea meristem: cell survival. Canadian Journal of Botany, 58, 8:833-840.

- Henshaw, G.G., J.F. O'hara and R.J. Westcott (1980). Tissue culture methods for the storage and utilization of potato germplasm. pp. 71-76 En: Ingram D.S. y Helgeson J.P. (eds.), Tissue Culture Methods for Plant Pathologists.
- Heywood, V. H. (1992) Efforts to conserve tropical plants - A global Perspective. pp. 1-14. En: R.P. Adams y J.E. Adams (eds.), Conservation of Plant Genes, DNA Banking and *in vitro* Biotechnology, Academic Press, Inc. San Diego, California.
- Hubstenberger J.F., P.W. Clayton and G.C. Phillips (1992). Micropropagation of Cacti (*Cactaceae*). pp. 49-68. En: Y.P.S. Bajaj (ed.), Biotechnology in Agriculture an Forestry. Vol. 20, Berlin.
- IBPGR (1986). Design, Planning and Operation of *in vitro* gene banks. Rome.
- Jörgensen, J (1989) Conservation of Valuable Gene Resources by Cryopreservation in some Forest Tree Species. J. Plant Physiol. 136:373-376.
- Kartha, K.K. (1985). Meristem Culture and Germplasm Preservation. pp. 115-134. En: K.K. Kartha (ed.), Cryopreservation of Plant Cells, and Organs, CRC, Press, Boca Raton, Florida.
- Kartha, K.K. (1985a). Cryopreservation of Plant Cells and Organs. 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.
- Kruuv, J. (1989). Interactions of Cryosensitizing and Cryoprotective Agents. Cryobiology 26:535.

- Levitt, J. (1980). Responses of Plants to Environmental Stresses, Vol. 1. Academic Press, Inc. U.S.A. 497 p.
- Li, P.H. and J.P. Patta (1979). Frost hardening and freezing stress in tuber-bearing solanum species. pp. 49-71 En: P.H. Li. and A. Sakai (eds.), Plant Cold Hardiness and Freezing Stress, Mechanisms and Crop Implications. Academic Press, Inc, U.S.A.
- Locksley E.,M. and K.B. Muldrew (1991) Intracellular Freezing: A Theoretical Study. Cryobiology, pp. 586.
- López, E.A.L. (1988). Acción del DMSO en ápices de *Allium sativum in vitro* sometidos a Nitrógeno Líquido. Tesis Profesional, Fac. Ciencias, UNAM, México. 112 p.
- Mata R.M. (1992). Efecto de la mezcla de crioprotectores (DMSO-glicerol) sobre ápices con placa basal de *Allium sativum in vitro*, congelados a -196°C. Tesis profesional, Fac. Ciencias, UNAM, México, 102. p.
- Mauseth, J.D. (1976). Cytokinin and Gibberellic Acid Induced on the Structure and Metabolism of Shoot Apical Meristems in *Opuntia polyacantha* (Cactaceae). Amer. J. Bot. 63 (10):1295-1301.
- Mauseth, J.D. (1979). A new method of the propagation of cacti: sterile culture of axillary buds. Cactus and Succulent Journal (U.S.A.), 51:186-187.
- McAdams, S., D. Rainasabapathi y R.A. Smith (1991). Influence of Days of Culture on Cryoprotectant-Supplemented Medium and of Terminal Freezing Temperature on the Survival of Cryopreserved Pea Shoot Tips. Cryobiology 28:288-293.
- Meryman, T.H. (1971). Cryoprotective agents. Cryobiology 8:173-183.

- Meryman, T.H. and R.J. Williams (1985). Basic Principles of freezing injury to plant cells: natural tolerance and approaches to cryopreservation. pp. 13-47. En: K.K. Kartha (ed.), Cryopreservation of Plant Cells, and Organs, CRC, Press, Boca Ratón, Florida.
- Murashige, T. and F. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant.*, 15:473-494
- Neuhoff, V., R. Stamm and H. Eibl (1985). Clear background and highly sensitive protein staining with coomassie blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic analysis. *Electrophoresis* 6:427-448.
- Nilno, T., A. Sakai, H. Yakuwa and K. Nojiri. (1992). Cryopreservation of *in vitro*-growing shoot tips of apple and pear by vitrification. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 28:261-266.
- Panis, B., D. Dheda and R. Swennen (1992). Freeze-Preservation of Embryogenic *Musa* Suspension Cultures. pp. 183-196. En: R.P. Adams and J.E. Adams (eds.), Conservation of Plant Genes, DNA Banking and *in vitro* Biotechnology. Academic Press, Inc. San Diego, California.
- Plucknett, D.L., N.J.H. Smith, J.T. Williams and N.M., Anishetty (1987). Gene Banks: A Global Resource. pp. 3-18. En: Gene Banks and the World's Food. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- Programa Regional Cooperativo de Papa (PRECODEPA), (1988). López D.H. y Q.T. Zavala (ed.), "1 Curso de Multiplicación Acelerada de Papa *in vitro* e Invernadero" México., 21 p.

– Rubluo, A. V. Chávez, A.P. Martínez y O. Martínez-Vázquez (1993). Strategies for the Recovery of Endangered Orchids and Cacti Through *in vitro* Culture. *Biological Conservation*, 63:163-169.

– Sakai, A. (1993). Cryogenic Strategies for Survival of Plant Cultured Cells and Meristems Cooled to -196°C. Reprint for JICA GRP REF No.6 21 p.

– Sala, F., R. Cella y F. Rollo (1979). Freezen-preservation of rice cells grow in suspension culture. *Physiol. Plant.* 45:170.

– Singh, J. and R.W. Miller (1985). Biophysical and Ultrastructural Studies of Membrane Alterations in Plant Cells During Extracellular Freezing: Molecular Mechanisms of Membrane Injury. pp. 49-60. En: K.K. Kartha (ed.), *Cryopreservation of Plant Cells, and Organs*, CRC, Press, Boca Ratón, Florida.

-- Smith, P.K., R.I. Krohu, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Garther, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson and D.C. Klenk (1985) Measure of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 150:76-85.

– Steponkus, P. (1971). Effect of freezing on Dehydrogenase Activity and reduction on Triphenyl Tetrazolium Chloride. *Cryobiology*, 8:570-573.

-- Towill, L.E. (1983). Improved Survival after Cryogenic Exposure of Shoot Tips Derived from *in vitro* Plantlet Cultures of Potato. *Cryobiology* 20:567-573.

-- Towill, L.E. and E.E. Roos (1989). Techniques for preserving of plant germplasm. pp 379-403. En: L. Knutson and A.K. Stoner (eds.), *Biotic diversity and germplasm preservation, global imperatives*.

-- Trevor, W.J. (1989). Plant germplasm preservation: a global perspective. pp 81-96. En: L. Knutson and A.K. Stoner (eds.), Biotic diversity and germplasm preservation, global imperatives.

-- Villalobos, V. M., Abdelnour (1992). Cryoconservation of *Musa* spp. and its potential for Long-Term Storage of Other Tropical Crops. pp. 1-14. En: R.P. Adams y J.E. Adams (eds.), Conservation of Plant Genes, DNA Banking and *in vitro* Biotechnology, Academic Press, Inc. San Diego, California.

-- Waldman, M. (1992). *In situ* Conservation of Plants with Potencial Economic Value. pp. 235-239. En: R.P. Adams y J.E. Adams (eds.), Conservation of Plant Genes, DNA Banking and *in vitro* Biotechnology.

-- Wilkes, G. (1989). Germplasm preservation: objectives and needs. pp 13-41. En: L. Knutson and A.K. Stoner (eds.), Biotic diversity and germplasm preservation, global imperatives.

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

-- Withers, L.A. and H.E. Street. (1977). The freeze-preservation of plant cell cultures. pp. 226-244. En: W. Barz, E. Reinhard and M.H. Zenk (eds.), Plant tissue and its biotechnological application. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

-- Withers, L.A. (1985). Cryopreservation of cultured plants cells and protoplasts. pp. 243-267. En: K.K. Kartha (ed.), Cryopreservation of Plant Cells, and Organs, CRC, Press, Boca Ratón, Florida.