

204
2ej.



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS

*"Respuesta in vitro de ápices de Allium sativum
sometidos a Nitrógeno Líquido en presencia
de glicerol".*

Tesis Profesional

Que para obtener el título de

B I O L O G O

p r e s e n t a

María de Lourdes Valenzuela Sánchez

México, D. F.

1988



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.

INDICE

	Pág.
RESUMEN	4
I. INTRODUCCION	6
II. ANTECEDENTES	
II.1. Teoría del congelamiento.	
II.1.1. Física del agua a temperaturas bajo cero.	9
II.1.2. Congelamiento de soluciones acuosas concentradas.	10
II.1.3. Congelamiento y descongelamiento de sistemas biológicos.	13
II.1.4. Obtención del perfil temperatura-tiempo y tasas de enfriamiento.	16
II.2. Criopreservación.	
II.2.1. Factores que intervienen en la criopreservación.	18
II.2.2. Explantes biológicos.	19
II.2.3. Precultivo.	19
II.2.4. Crioprotectores.	
II.2.4.1. Agentes Penetrantes.	21
II.2.4.2. Agentes no Penetrantes.	22
II.2.4.3. Toxicidad de los crioprotectores.	25
II.2.4.4. Adición y eliminación del crioprotector.	26
II.2.4.5. Generalidades sobre el Glicerol.	26
II.2.5. Métodos de enfriamiento y descongelamiento.	
II.2.5.1. Temperatura de almacenamiento.	29
II.2.5.2. Enfriamiento rápido.	30
II.2.5.3. Enfriamiento por pasos.	31
II.2.5.4. Enfriamiento por tasas.	31
II.2.5.5. Equipos de enfriamiento	33
II.2.5.6. Descongelamiento.	35
II.2.6. Pruebas de viabilidad y crecimiento.	35
II.3. <u>Allium sativum</u> L.	
II.3.1. Descripción botánica de <u>Allium sativum</u> L.	36
II.3.2. Clasificación.	37
II.3.3. Origen y distribución.	38
II.3.4. Composición química.	38
II.3.5. Usos y Propiedades medicinales.	38
II.3.6. Plagas y enfermedades.	39
II.3.7. Métodos de Propagación.	39
II.3.8. Producción.	40
II.3.9. Variabilidad genética	40
II.3.10. Almacenamiento de semilla agrícola.	41
II.3.11. Banco de Germoplasma.	41

III. OBJETIVOS	42
IV. MATERIALES Y METODOS	
IV.1. Descripción general.	43
IV.2. Sistema de enfriamiento.	
IV.2.1. Termo criogénico.	43
IV.2.2. Comportamiento de soluciones crioprotectoras.	46
IV.3. Pruebas de toxicidad al glicerol.	
IV.3.1. Cultivo in vitro.	48
IV.3.2. Respuesta al glicerol.	50
IV.4. Congelamiento de explantes de <u>Allium sativum</u> .	51
V. RESULTADOS Y DISCUSION	
V.1. Sistema de enfriamiento.	
V.1.1. Termo criogénico.	
V.1.1.1. Resultados.	53
V.1.1.2. Discusión.	57
V.1.2. Soluciones crioprotectoras.	
V.1.2.1. Resultados.	59
V.1.2.2. Discusión.	70
V.2. Pruebas de toxicidad al glicerol.	
V.2.1. Resultados.	75
V.2.2. Discusión.	81
V.3. Congelamiento de explantes.	
V.3.1. Resultados.	90
V.3.2. Discusión.	96
VI. CONCLUSIONES GENERALES	100
GLOSARIO	104
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	105

ABREVIATURAS

b	altura entre el termopar y la boca del termo
Cg	concentración porcentual de glicerol en MS líquido
DMSO	dimetilsulfóxido
h	altura entre el nivel de NL y el termopar
Δh	cambio en la altura h
HES	hidroxietyl almidón
MS	medio Murashige y Skoog (1962)
NL	Nitrógeno Líquido
n de NL	nivel de Nitrógeno Líquido
Pf	punto de fusión
Ps	punto de sobrefusión
PVP	polivinilpirrolidona
t	tiempo
ΔT	diferencia entre la Tf y la Text
Text	temperatura externa
$\Delta Text$	cambio en la Text
Tf	temperatura final
Tfu	temperatura en el punto de fusión
Thet	temperatura de nucleación heterogénea
$\Delta Tsol$	cambio en la temperatura de la solución

RESUMEN

Este trabajo está enfocado a la criopreservación in vitro de ápices con Placa basal de Allium sativum (ajo).

El establecimiento in vitro de este explante se logró utilizando MS sólido sin reguladores del crecimiento.

Como soluciones crioprotectoras se emplearon concentraciones al 0, 5, 10, 15 y 20% de glicerol en MS líquido.

Se analizó la permeabilidad de los explantes al glicerol, encontrándose que se requieren periodos prolongados de exposición para que logre penetrar a las células en cantidades suficientes para la crioprotección, sin embargo, cuando el tiempo de exposición es de 24 horas, las concentraciones mayores del 5% son tóxicas.

Los explantes fueron sometidos a una solución de glicerol al 20% en MS líquido durante una hora y llevados a temperaturas de -28 y -36°C con tasas lentas de enfriamiento. Después de permanecer en estas temperaturas por 20 o 40 minutos, fueron llevados rápidamente a Nitrógeno Líquido (NL), donde se les almacenó por una hora. Los explantes así tratados fueron descongelados a 40°C y sembrados en MS sólido.

Con este procedimiento no se obtuvo sobrevivencia. Pero se establecieron bases para efectuar una comparación entre la efectividad del DMSO y el glicerol en la criopreservación de ápices con placa basal de ajo, así como antecedentes importantes que deben tomarse en cuenta para futuras investigaciones en esta área.

Por otro lado, se desarrolló un método de enfriamiento por tasas lentas mediante el empleo de los vapores del NL almacenado en un termo criogénico, y se estudió el enfriamiento de las soluciones crioprotectoras de glicerol al ser colocadas en los vapores del NL, encontrándose relaciones que permiten predecir la tasa de enfriamiento.

El presente estudio es pionero en el área de la criopreservación in vitro de germoplasma vegetal valioso en México.

I. INTRODUCCION.

La variabilidad genética de la mayoría de las especies cultivadas y silvestres ha disminuido considerablemente. Esto se debe a dos causas fundamentales: la destrucción de los ecosistemas por sobreexplotación y contaminación y la introducción de variedades de alta productividad que han sustituido por completo las variedades tradicionales (Robert y Loyola, 1985).

Esta pérdida de información genética es particularmente grave, debido a que la obtención de variedades de alto rendimiento resistentes a patógenos, depredadores o condiciones ambientales adversas, se basa en el uso de genes del material biológico preexistente (Kantha, 1982; Blanco, 1985).

En México, país que es centro de origen de varias plantas cultivadas, los recursos genéticos han sufrido diversos grados de "erosión" desde que se instalaron los primeros pobladores, y en la actualidad existe una seria amenaza sobre la variabilidad que aún existe. Los conservadores más celosos del recurso genético han sido los campesinos y los grupos indígenas (Montes, 1978).

La creación de bancos de germoplasma representa una de las más importantes posibilidades para lograr la preservación de la riqueza genética en el mundo (Kantha, 1982; Blanco, 1985). Esta conservación tiene como primer objetivo la introducción de material genético a una determinada región; como segundo objetivo el de fitomejoramiento; y por último, la investigación en campos como taxonomía, evolución, citogenética, genética, fisiología, entre otros. La conservación que se realiza en México tiene como objetivo central el fitomejoramiento, y se

ha relegado lo referente a la introducción y la investigación sobre el almacenamiento (Montes, 1978).

En nuestro País no existe ningún Plan o Proyecto nacional de conservación del recurso genético vegetal y mucho menos una política definida al respecto. Lo poco que se ha realizado hasta la fecha ha sido producto del interés individual de algunos biólogos, agrónomos o de simples aficionados. La excepción está constituida por los trabajos de exploración, colecta y almacenamiento de maíz, realizada por técnicos nacionales y de la Fundación Rockefeller, y lo realizado en frijol por el Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA) (Montes, 1978).

Los métodos que se han empleado para la conservación de germoplasma varían según la naturaleza del material biológico, y así tenemos desde el tradicional banco de semillas hasta el mantenimiento de áreas de reserva, lo cual es costoso en comparación con almacenes y presenta un alto riesgo de pérdidas por manipulación o desastres naturales (Simmonds, 1981).

La preservación por la vía tradicional del almacenamiento de semillas, se vuelve inoperante en las especies con las siguientes características: 1) Reproducción vegetativa, 2) Producción de semillas no fértiles, que presentan un período corto de viabilidad, o bien, que se deterioran rápidamente por la presencia de patógenos (Kantha, 1982), y 3) Semillas recalcitrantes, característica que se encuentra en las plantas tropicales perennes, por lo que son de particular importancia para nuestro País (Montes, 1978).

En estos casos, una alternativa viable y más satisfactoria es el establecimiento de bancos de germoplasma mediante las técnicas del

Cultivo de Tejidos Vegetales in vitro, las cuales ofrecen las siguientes ventajas: 1) Se puede almacenar un número elevado de clones en un espacio reducido, 2) El Problema de Plantas infectadas es Prácticamente eliminado, y 3) Los costos se abaten una vez iniciado el sistema (Rubluo, 1985).

La Preservación in vitro se puede efectuar: 1) A corto-mediano Plazo, basada en la disminución de la tasa de crecimiento de las Plantas mediante el uso de temperaturas bajas cercanas a 0 °C), disminución de nutrientes, adición de inhibidores del crecimiento entre otros (Kantha, 1985); y 2) A largo Plazo, donde se minimiza el metabolismo celular con el empleo de temperaturas muy bajas de alrededor de -196°C, lo cual mantiene la integridad del material genético y permite su Preservación por tiempo indefinido (Kantha, 1985; Meryman y Williams, 1985; Finkle y col, 1985).

En los bancos de germoplasma in vitro, la Preservación a corto-mediano Plazo sirve como colección activa; y la criopreservación como colección base. Para montar estos sistemas de almacenamiento se requiere de investigación básica antes de alcanzar la etapa de aplicación deseable (Rubluo, 1985).

La criobiología es un área relativamente nueva que ofrece un gran potencial para la Preservación de germoplasma valioso (Kantha, 1982; Withers, 1980); sin embargo, no se ha podido establecer un protocolo general para preservar una estructura determinada, ya que los procesos involucrados son muy complejos y las respuestas de cada especie al congelamiento son múltiples. Es por esto que las experimentaciones basadas en el ensayo y error son parte importante en este campo.

II. ANTECEDENTES

II.1. TEORÍA DEL CONGELAMIENTO

II.1.1. FÍSICA DEL AGUA A TEMPERATURAS BAJO CERO

Los Procesos fisiológicos se hacen más lentos cuando se encuentran a temperaturas subóptimas; sin embargo, los mayores daños se presentan cuando el químico esencial de la vida, el agua, se congela.

El agua toma parte en la mayoría de las reacciones metabólicas o biosintéticas, ya sea como producto o como reactivo; está íntimamente ligada al mantenimiento de la estructura molecular; actúa como solvente de las sustancias químicas intra y extracelulares; es el medio de transporte de los nutrientes a través del organismo, y es también quien remueve los productos de desecho. (Franks, 1985).

Las propiedades físicas del agua son extremadamente sensibles a los cambios de temperatura y a los cambios en la concentración de los solutos. Esta sensibilidad se ve amplificada en la respuesta de las estructuras biológicas y los procesos de la vida, provocada por los cambios en los patrones de puentes de hidrógeno que existen en el agua. (Franks, 1985).

El punto de fusión (Pf) del agua corresponde a 0°C, sin embargo, para que el congelamiento tome lugar se requiere la presencia de "núcleos" o "semillas" de nucleación, alrededor de los cuales las moléculas de agua puedan agregarse y formar cristales. De esta forma, en ausencia de núcleos o cuando éstos son muy pequeños, podemos obtener agua en estado líquido por abajo del punto de fusión. A este estado se

le denomina "sobrefusión" (Franks, 1985).

La cristalización o congelamiento del agua se lleva a cabo por dos procesos: nucleación heterogénea y nucleación homogénea. Cuando los núcleos están formados por impurezas, partículas de polvo, microcristales, ocurre la cristalización por nucleación heterogénea. En ausencia de núcleos heterogéneos, el agua puede sobrefusionarse hasta aproximadamente -40°C , temperatura a la cual se forman agregaciones al azar de moléculas de agua, las cuales dan lugar a la nucleación homogénea. (Merzlyan y Williams, 1985).

Cuando el agua se transforma en hielo se libera energía, la cual es llamada calor latente de fusión. Cuando el agua en sobrefusión es "sembrada", el calor latente de fusión se propaga rápidamente y la temperatura se eleva hasta alcanzar el Pf normal, entonces ocurre el congelamiento (Merzlyan y Williams, 1985). Ver fig 1.

II.1.2. CONGELAMIENTO DE SOLUCIONES ACUOSAS CONCENTRADAS

La presencia de solutos en agua disminuye el Pf en una proporción aproximada a la concentración molal de la solución. Cuando el congelamiento toma lugar en una solución acuosa, a medida que el agua se va congelando, la solución se vuelve más concentrada y su Pf se reduce progresivamente.

La figura 2 muestra una curva típica de enfriamiento para una solución acuosa binaria simple, donde la línea continua es la temperatura observada y la porción remarcada corresponde al congelamiento, es decir, a la acumulación de hielo. Inicialmente el líquido se sobrefusiona (este grado de sobrefusión está gobernado por

la Probabilidad de nucleación). En A termina la sobrefusión, que es la temperatura de nucleación heterogénea (T_h). La liberación del calor latente de fusión hace que la temperatura se eleve hasta el punto de fusión (T_{fu}), donde es mantenida por un tiempo durante el cual se acumula el hielo y la solución residual se vuelve más concentrada, fenómeno denominado concentración por congelamiento. Esto último produce una baja local de T_{fu} que retarda una mayor cristalización. Eventualmente la disminución del agua, junto con la competencia por espacio, causa un retardo en el congelamiento, por lo que la temperatura vuelve a bajar en C. Cuando la temperatura alcanza D, el congelamiento es completo y la tasa de enfriamiento ahora depende de la conductividad térmica del hielo. (Luyet, 1966; Franks, 1985).

A tasas de enfriamiento muy rápidas, el calor latente es removido antes de que la temperatura pueda alcanzar T_{fu} . Entonces la cristalización es inhibida parcialmente (Franks, 1985).

La tasa de enfriamiento influye de manera crítica en la tasa de crecimiento de los cristales y en su morfología. (Franks, 1985). Cuando las tasas de enfriamiento son lentas, el crecimiento de los cristales progresa a partir de los centros de nucleación iniciales, por lo que su tamaño final es grande. Cuando las tasas de enfriamiento se incrementan, ocurre un mayor número de eventos de nucleación por lo que los cristales formados son más pequeños (Meryman y Williams, 1985).

En el laboratorio el grado de sobrefusión y congelamiento a temperaturas bajo cero puede ser controlado por las siguientes variables: temperatura, concentración y tasa de enfriamiento.

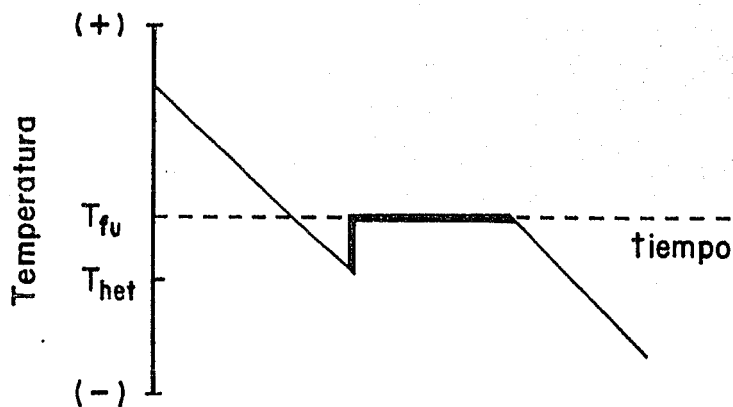


Fig 1. Gráfica del congelamiento de agua pura (línea remarcada). T_{fu} es la temperatura en el punto de fusión; T_{het} corresponde a la temperatura de nucleación heterogénea, la cual ocurre después de la sobrefusión. (Modificado de Meryman y Williams, 1985).

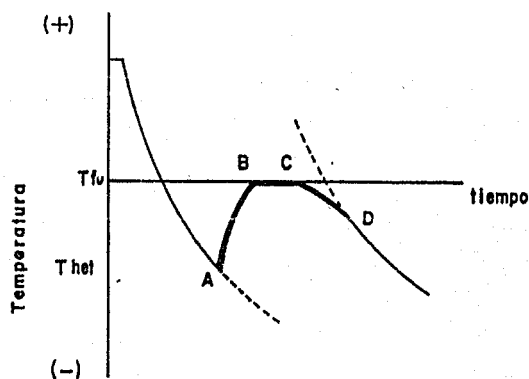


Fig 2. Curva típica de enfriamiento: A es la temperatura de nucleación; AB corresponde a la liberación del calor latente; C corresponde al principio del congelamiento que no está en equilibrio; el congelamiento está completo en D. La línea remarcada corresponde al congelamiento. T_{fu} es la temperatura del punto de fusión y T_{het} corresponde a la temperatura de nucleación heterogénea. (Tomado de Franks, 1985).

11.1.3. CONGELAMIENTO Y DESCONGELAMIENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

Una vez que se inicia la formación de hielo, la tasa de cambio en la temperatura afecta a las células por lo menos en tres formas:

- 1) Determina el tiempo en el que las células permanecen arriba del punto eutéctico, y así, determina la duración de la exposición a los solutos concentrados;
- 2) Determina la probabilidad del congelamiento intracelular, y
- 3) Determina el tamaño y forma de los cristales.

Cuando un tejido o una suspensión de células comienza a congelarse, el hielo casi siempre se forma inicialmente entre las células, más que dentro de ellas. Dado que el hielo se compone sólo de agua, el proceso de congelamiento remueve agua de la solución y consecuentemente concentra los solutos que quedan en el líquido. La solución líquida extracelular debe concentrarse continuamente a medida que la temperatura disminuye.

Las mismas consideraciones se aplican dentro de las células, excepto por una diferencia importante. A temperaturas por arriba de aproximadamente -10°C , la membrana celular previene el paso de los cristales de hielo extracelulares al interior celular. Como resultado, el contenido celular tiende a sobrefusionarse, y dado que la membrana es permeable al agua y la concentración de solutos es mayor en el exterior, el agua en sobrefusión tenderá a fluir hacia afuera de la célula y se congelará externamente. Esta deshidratación concentra los solutos intracelulares.

Si una célula es muy permeable al agua, o si la velocidad de enfriamiento es muy baja, los contenidos celulares podrán deshidratarse

lo suficientemente rápido para mantener el equilibrio en la presión de vapor con el hielo externo. Estas células no se congelarán internamente. El daño causado por las velocidades muy lentas de enfriamiento, es debido a que producen una exposición prolongada a la deshidratación y a la concentración de solutos.

Por el otro lado, si una célula es relativamente permeable al agua, o si la velocidad de enfriamiento es muy alta, el agua celular no podrá salir lo suficientemente rápido al aumentar la concentración extracelular. Los contenidos celulares estarán cada vez en mayor sobrefusión, y si la temperatura pasa por abajo de -40°C la nucleación homogénea dará origen a la formación de hielo intracelular. Este hielo es letal por el daño mecánico que provoca en las estructuras intracelulares y en la membrana plasmática. (Mazur, 1966; Merz'yan y Williams, 1985)

Según Farrant y col (1977), la presencia de hielo intracelular no es necesariamente letal para las células, a menos que se permita la recristalización durante el calentamiento. Las tasas altas de enfriamiento tienden a producir cristales pequeños. Estos son relativamente inestables y dada una velocidad de calentamiento suficientemente lenta comenzarán a crecer por recristalización, dando lugar a cristales dañinos. Sin embargo, cuando el calentamiento se lleva a cabo rápidamente, estos cristales se funden antes de que tengan tiempo suficiente para formar cristales dañinos (Mazur, 1966; Farrant et al., 1977).

La cantidad de hielo intracelular afecta el movimiento osmótico del agua durante el descongelamiento. Cuando hay hielo interna y

externamente no se formarán gradientes osmóticos, Pero cuando no existe hielo intracelular, se originará un flujo de agua del exterior al interior, y ocurre la rehidratación o deplasmolisis. Entonces el daño causado también depende de la habilidad de los sistemas membranosos para sobrellevar un cambio osmótico durante el descongelamiento (Farrant et al., 1977).

Cuando se considera la viabilidad de las células a bajas temperaturas, podemos diferenciar entre los efectos producidos por mecanismos físicos y mecanismos fisicoquímicos (Altamirano, 1985):

a) Mecanismos fisicoquímicos o de concentración: son los daños producidos por la deshidratación generada durante el enfriamiento lento. Esta deshidratación causa reducción del volumen celular, aumento en la concentración de sales tóxicas y pérdida del agua que rodea a los componentes celulares, es decir, agua estructural. (Chen et al., 1984; Meryman y Williams, 1977).

b) Mecanismos físicos o mecánicos: son los daños causados por la formación de cristales intracelulares cuando la tasa de enfriamiento es rápida. (Meryman y Williams, 1985).

II.1.4.

OBTENCION DEL PERFIL TEMPERATURA-TIEMPO Y TASAS DE ENFRIAMIENTO

Debido a que las velocidades de enfriamiento y calentamiento pueden tener efectos nocivos en la sobrevivencia de las células y tejidos, es importante que estas velocidades sean medidas (Mazur, 1966).

El congelamiento consiste esencialmente en el Paso del agua del estado líquido al sólido. La tasa de congelamiento es, entonces, la rapidez a la cual este cambio ocurre. Ahora bien, si se relaciona la temperatura con el tiempo cuando disminuye la temperatura, se obtiene una curva típica de enfriamiento. Cuando ocurre el congelamiento, esta curva debe representar el enfriamiento antes, durante y después del congelamiento (ver figura 2). Si se relacionan las mismas variables cuando la temperatura aumenta, se obtiene una curva típica de calentamiento. Cuando ocurre el descongelamiento, esta curva debe mostrar el calentamiento antes, durante y después del descongelamiento. La curva de la figura 2 sirve para visualizar este proceso si se lee en sentido inverso y sin tomar en cuenta la sobrefusión, que en este caso nunca se presenta (Luyet, 1966).

Cuando se llevan a cabo procedimientos de criopreservación, la información más completa del congelamiento y enfriamiento subsecuente del material biológico estará dada por estas curvas de enfriamiento y calentamiento. Sin embargo, para poder hacer comparaciones de los resultados del congelamiento de este material con mayor facilidad, es

de ayuda tener una sola medida de la velocidad o tasa de enfriamiento, así como una medida Única de la tasa de calentamiento. (Nazur, 1966; Merzlyman, 1966b; Rinfret, 1966).

La tasa de enfriamiento antes del congelamiento no es relevante en el daño por congelamiento, aunque la posibilidad de que un choque térmico pueda causar daño independientemente, no debe ser ignorada (Merzlyman, 1966b).

En la figura 2, la región comprendida entre A y D corresponde a la meseta de cambio de fase. En esta región, la deshidratación celular no ha alcanzado las proporciones suficientes para ser dañina, por lo que puede también ignorarse (Merzlyman, 1966a).

Es en el intervalo que está justamente debajo del Pf hasta cerca de -50°C donde la mayoría de los efectos biológicos inmediatos ocurren, cuando los sistemas biológicos están todavía en estado líquido y está ocurriendo la remoción de calor del hielo externo. Los tejidos de vegetales, algas, bacterias, bacteriófagos, protozoarios, insectos, espermatozoides de bovino, están dentro de los sistemas que exhiben dicha sensibilidad (Rinfret, 1966).

La mejor medida de la tasa de enfriamiento es el tiempo requerido para que la temperatura disminuya desde alrededor de -5°C , en la cual el cambio de fase está casi completo, hasta abajo de -50°C o hasta dentro de los 5°C antes de la temperatura final (Tf) previa a la inmersión en NL.

De manera similar, la mejor medida de la tasa de calentamiento es el tiempo requerido para que la temperatura se eleve desde arriba de los -70°C , o desde arriba de la temperatura del baño de congelamiento;

hasta unos cuantos grados abajo del Pf de la suspensión o tejido. Dentro de este intervalo la temperatura es una función aproximadamente lineal con respecto al tiempo, por lo que una sola medida de la velocidad tiene significado.

Estas tasas son reportadas en términos de °C por minuto o por segundo, junto con el intervalo de donde fue tomada la medida y la localización del termopar en el sistema. (Meryman, 1966b; Mazur, 1966).

Para medir los cambios en temperatura durante el enfriamiento se utilizan termopares, de los cuales los más usados son los de cobre-constantan, puesto que son sensibles en el intervalo de +40 y -200°C. Estos termopares son conectados a un voltímetro, el cual detecta y amplifica las diferencias de potencial generadas entre la punta del termopar que mide la temperatura desconocida y la punta del termopar que se encuentra a 0°C como referencia (Jaodzinski, 1966).

II.2. CRIOPRESERVACION

II.2.1. FACTORES QUE INTERVIENEN EN LA CRIOPRESERVACION

Dentro del proceso de criopreservación podemos encontrar, entre otras, las siguientes variables (modificado de Henshaw *et al.*, 1985):

1. Explante:
 - tipo de explante
 - tamaño del explante
 - edad y fisiología de la Planta
 - condiciones de crecimiento de la Planta
 - Genotipo de la Planta
2. Cultivo antes del congelamiento:
 - componentes del medio de cultivo
 - condiciones de incubación
 - duración del periodo de cultivo
 - aclimatación al frío
3. Crioprotección:
 - tipo de crioprotector
 - mezcla de crioprotectores
 - concentración del crioprotector
 - duración del tratamiento
 - temperatura del tratamiento
 - toxicidad del crioprotector
4. Almacenamiento:
 - temperatura de almacenamiento
 - duración del almacenamiento
5. Método de Enfriamiento:
 - a) rápido:
 - temperatura de almacenamiento
 - duración en la temperatura de almacenamiento
 - b) Por Pasos:
 - número de Pasos
 - temperaturas en cada Paso
 - temperatura final antes de llegar a -196°C
 - duración del periodo a -196°C
 - c) Por tasas:
 - velocidad de enfriamiento
 - temperatura final antes de llegar a -196°C
 - duración del periodo a -196°C
6. Descongelamiento:
 - a) rápido:
 - temperatura final
 - b) lento:
 - velocidad de aumento de temperatura
 - temperatura final
7. Cultivo después del tratamiento
 - componentes del medio de cultivo
 - condiciones de incubación
8. Crecimiento:
 - duración de la fase "lag" antes del crecimiento
 - respuesta morfofisiológica

II.2.2. EXPLANTES BIOLÓGICOS

Se han empleado distintos tipos de explantes: meristemos, células en suspensión, embriones somáticos, protoplastos, embriones, endospermo, óvulos, anteras, semillas (Kantha, 1981).

Debido a que las células meristemáticas son menos diferenciadas y genéticamente más estables, el cultivo *in vitro* de meristemos, ha permitido el mantenimiento de la estabilidad genética de la progenie obtenida. Este atributo único hace de los meristemos los candidatos ideales para la preservación de germoplasma. El principal obstáculo para el uso de meristemos es su limitada capacidad de propagación masiva *in vitro*, por lo que antes de cualquier intento por criopreservarlos, se deben establecer métodos que aseguren una alta frecuencia de regeneración de plantas a partir de los explantes (Kantha, 1985; Harada *et al.*, 1985).

II.2.3. PRECULTIVO

El precultivo de los meristemos ya sea en medio nutritivo solo o en medio adicionado con niveles no tóxicos de crioprotector, ha demostrado ser un factor decisivo en el incremento de la supervivencia después del congelamiento. Sin embargo, los mecanismos que operan para lograr la protección del material congelado son desconocidos (Kantha, 1982; 1985).

Diversos azúcares (Butenko *et al.*, 1984), manitol (Withers y Street, 1977), sorbitol (Chen *et al.*, 1984b), han sido usados en cultivos como agentes osmóticos que decrecientan el tamaño celular e incrementan la sobrevivencia en el congelamiento. El dimetil sulfoxido (DMSO), otros compuestos crioprotectores o combinaciones de compuestos han sido

adicionados al medio de cultivo; generalmente en concentraciones bajas. Para dar mayor protección (Finkle et al, 1985; Kuo y Lineberger, 1985).

En ocasiones la aclimatación al frío, cuando se colocan los cultivos a 4 °C en la oscuridad, da mayores porcentajes de sobrevivencia. Se piensa que durante este tratamiento las células producen compuestos crioprotectores y a esto se le ha denominado "hardening", es decir, endurecimiento (Kuo y Lineberger, 1985).

II.2.4. CRIOPROTECTORES

La utilización de sustancias con propiedades crioprotectoras ha permitido mantener la viabilidad celular a bajas temperaturas, al minimizar los daños físicos y fisicoquímicos. Los agentes crioprotectores han sido tradicionalmente divididos en dos clases penetrantes y no penetrantes.

II.2.4.1. AGENTES PENETRANTES

Estos compuestos deben entrar a la célula y no deben ser tóxicos, ya que se les requiere en altas concentraciones para proteger a la célula del daño por congelamiento (Meryman, 1971).

A la protección que ejercen estos agentes, se le ha denominado coligativa. Estos crioprotectores disminuyen el punto de fusión del agua por lo que también se disminuye la tasa de formación de cristales. Esto da como resultado que exista agua no congelada que está actuando como agua estructural y como disolvente de las sustancias tóxicas que se encuentran tanto en el interior como en el exterior celular. Al encontrarse tanto intracelular como extracelularmente reducen la presión osmótica causada por la congelación extracelular (Williams,

1983; Finkle et al., 1985).

La sobrevivencia de las células protegidas de esta manera no depende de tasas específicas de congelamiento y descongelamiento, y pueden ser toleradas las tasas muy lentas (Williams, 1983). La temperatura previa a la inmersión en NL está en un intervalo entre -10 y -60°C (Mc Gann, 1978).

Entre los agentes penetrantes se han utilizado: etanol, metanol, diversos glicoles y DMSO.

El glicerol parece ser el más adecuado ya que para muchas especies no es tóxico en altas concentraciones, sin embargo, su permeabilidad es pobre y requiere de cuidados durante su introducción y eliminación para evitar choques osmóticos, así como tiempos largos de exposición y temperaturas de adición cercanas a 20°C . Esto se aplica a todos los compuestos que penetran lentamente. (Finkle et al., 1985).

II.2.4.2. AGENTES NO PENETRANTES

Por lo general son compuestos de alto peso molecular que no entran a la célula por lo que su acción protectora se da extracelularmente. Pueden proteger en concentraciones molares bajas y generalmente requieren de tasas más rápidas de enfriamiento y calentamiento para conferir protección (Meryman, 1971; Meryman et al., 1977).

Estos agentes "exprimen" osmóticamente el agua de las células durante las fases iniciales de congelamiento a temperaturas entre -10 y -20°C cuando estos aditivos se vuelven más concentrados en las regiones extracelulares (Mc Gann, 1978). Esto indica que el intervalo crucial sobre el cual la temperatura debe ser controlada puede estar entre -5 y -20°C , y la experiencia indica que un enfriamiento lento abajo de -20

°C puede contribuir solamente a un daño osmótico adicional a las células (Merzlyan et al., 1977; Mc Gann, 1978; Chen, 1984a).

Entre los crioprotectores que actúan extracelularmente se encuentran la sacarosa, glucosa, lactosa, manitol, sorbitol, Prolina y algunos Polímeros como el PVP (PolivinilPirrolidona), dextrán y HES (hidroxietil almidón) (Merzlyan, 1971; Chen, 1984a).

Cuando se habló de los crioprotectores Penetrantes se hizo mención del modo de Protección coligativa. Se ha detectado también un mecanismo de Protección por congelamiento cinético el cual aprovecha el modo de acción de los agentes Penetrantes y no Penetrantes.

Existen dos clases de daño por congelamiento: 1) Daño fisicoquímico o por concentración, y 2) Daño por congelamiento intracelular o mecánico; sin embargo, ambos son dependientes de un sólo Parámetro: la deshidratación.

Demasiada deshidratación, como resultado del congelamiento lento, daña la célula, Posiblemente por el aumento en la concentración de sales, Pérdida del agua estructural y una excesiva reducción del volumen celular. Poca deshidratación, resultado del congelamiento rápido, Produce la formación de hielo intracelular y daño causado por la distorsión de las estructuras intracelulares o por la ruptura física de la membrana celular como consecuencia de un 10% de incremento en el volumen del agua congelada. (Chen, 1984b).

Para escapar al daño, una célula no debe estar sujeta a demasiada deshidratación aunque los compuestos celulares deben estar lo suficientemente concentrados Para Prevenir el desarrollo de hielo a un

grado dañino, mediante la disminución del punto de fusión del agua.

1. Los crioprotectores que penetran reducen la deshidratación celular inducida por el aumento de la concentración de sales en el medio externo durante el congelamiento. Además de presentar efectos coligativos.

2. Los crioprotectores que no penetran reducen el agua intracelular, es decir, equilibran la acción de los crioprotectores que sí penetran. Además también presentan propiedades coligativas ya que reducen la tasa de cristalización extracelular, y por ende, reducen también la tasa de aumento en la concentración de sales.

Se obtiene así un sistema en el cual la deshidratación celular es suficiente para reducir el intervalo inicial de cristalización, pero no tan elevada como para desorganizar las estructuras celulares o como para no poder disolver las sustancias tóxicas. (Chen et al, 1984a).

La ventaja del congelamiento cinético comparado con el congelamiento coligativo, es únicamente la necesidad de una menor concentración de crioprotector.

El congelamiento coligativo tiene la ventaja de que las tasas de enfriamiento y descongelamiento son menos exigentes, el almacenamiento puede ser a temperaturas de -80°C o más altas, una falla en el proceso de congelamiento no causa catástrofes, y el porcentaje de sobrevivencia de las células es frecuentemente más alto. La desventaja es que se necesitan concentraciones altas de crioprotector. Esto limita a escoger solutos no tóxicos como el glicerol el cual, debido a su lenta difusión a través de la membrana, presenta mayores obstáculos prácticos. (Neryman y Williams, 1985).

II.2.4.3. TOXICIDAD DEL LOS CRIOPROTECTORES

Se ha reportado cierto grado de toxicidad por la simple adición y eliminación de los crioprotectores, aún sin someter los explantes al congelamiento, o bien después de un periodo de crecimiento en medio de cultivo adicionado con estos compuestos. (Finkle et al, 1985).

La toxicidad se manifiesta en varios grados, desde la muerte del explante hasta la modificación en la respuesta morfoogénica de las células en cultivo. Esto puede ser debido a varios factores, entre ellos: 1) Efectos osmóticos, 2) Efectos de solvente y 3) Efectos del compuesto específico. Debe tenerse especial cuidado para saber si los efectos observados son debidos al compuesto específico en sí, más que a las impurezas que contiene. (Finkle et al, 1985).

La citotoxicidad de los crioprotectores está es función de su naturaleza química, la concentración a la cual se encuentra, y el tiempo de exposición al cual se somete el explante (Kartha, 1985). La respuesta a estos factores dependerá del grado de sensibilidad de la especie en estudio así como del tipo de explante empleado.

Los efectos citotóxicos pueden presentarse aún a bajas concentraciones cuando los tiempos de exposición son prolongados. De acuerdo con esto, debe encontrarse la concentración y tiempo de exposición óptimos del crioprotector, así como el mejor método de aplicación y eliminación del mismo. (Kartha, 1985).

II.2.4.4. ADICION Y ELIMINACION DEL CRIOPROTECTOR.

La mayoría de las sustancias crioprotectoras efectivas, especialmente aquellas que penetran lentamente al interior celular, o no penetran, juegan un papel osmótico al atraer el agua hacia el exterior y provocar la plasmólisis. Esto ha llevado a tomar precauciones en la adición de los crioprotectores, cuya concentración es aumentada gradualmente para dar tiempo a que penetren al interior celular sin producir daño osmótico. (Finkle *et al.*, 1985).

Debido a los efectos tóxicos que los crioprotectores pueden tener sobre el crecimiento de los explantes, frecuentemente se les diluye o elimina después del descongelamiento (Kantha, 1985). Para evitar choques osmóticos se recomienda la dilución gradual con medio de cultivo líquido sin crioprotector (Kantha, 1981).

La temperatura de adición y eliminación de los crioprotectores puede también afectar la sobrevivencia y/o la estructura celular, por lo que debe ser evaluada empíricamente para cada especie (Finkle *et al.*, 1985). Por lo general el DMSO se adiciona a 0°C ya que penetra rápidamente y además es tóxico; y los crioprotectores que difunden lentamente como la glucosa y el glicerol, son adicionados a 20°C.

II.2.4.5. GENERALIDADES SOBRE EL GLICEROL

En 1949, Polge, Smith y Prakes (Maurer, 1978) emplearon por primera vez el glicerol para congelar espermatozoides de bovino, para obtener protección contra el daño causado por el proceso de congelación-descongelación.

El glicerol ($C_3H_8(OH)_3$) tiene un punto de ebullición de 290°C y es considerado un compuesto fuertemente electronegativo por presentar

grupos funcionales OH.

De todos los crioprotectores que se han propuesto, el glicerol es el más parecido al agua en su habilidad para mantener las fuerzas hidrofóbicas que son esenciales para la conformación terciaria y cuaternaria de las macromoléculas y la estabilidad de las bicapas de la membrana. La energía de superficie de soluciones de glicerol también es comparable con la del agua; esta propiedad es importante para la integridad de la membrana (Meryman y Williams, 1985).

Entre los varios compuestos que se pueden emplear en la crioprotección artificial, el glicerol parece ocupar una posición privilegiada debido a la ausencia de toxicidad en altas concentraciones en varias especies (Meryman y Williams, 1985).

La baja toxicidad del glicerol está basada en muchas observaciones de insectos que lo sintetizan en altas concentraciones como crioprotector natural. El ejemplo más sobresaliente es el reportado en un escarabajo de Alaska (Pterostichus brevicornis) que elabora glicerol a una concentración de todo el cuerpo cercana a 2.5 M y que no es dañado durante meses de congelamiento a -40°C , temperatura a la cual debe existir un exceso de concentración de 6 M (Meryman, 1971).

Dunaliella, un alga que crece en el Mar Muerto, puede sintetizar glicerol y alcanzar concentraciones del orden de 4 M como una defensa contra el medio salino. De esta forma el glicerol funciona como protector osmótico contra la deshidratación (Meryman y Williams, 1985).

A pesar de la tolerancia al glicerol que muestran algunos insectos y los glóbulos rojos de bovinos, la experiencia con otros tipos celulares ha mostrado que el glicerol sí es tóxico, por lo que hay que tomar en cuenta que no todas las especies responden igual a las mismas

condiciones, y efectuar Pruebas de toxicidad. Estos estudios de toxicidad deben incluir formas cuidadosas de adición y eliminación Para evitar el daño solo Por una causa osmótica (Meryman, 1971).

El Principal inconveniente del glicerol es su tasa lenta de difusión a través de la membrana celular. Si una célula es transferida abruptamente de un medio libre de glicerol en uno que contenga una concentración alta, el agua dejará rápidamente la célula en respuesta al gradiente osmótico antes que el glicerol pueda entrar. Puede ocurrir entonces un daño hiperosmótico. Durante la eliminación del glicerol el agua Penetra antes de que el crioprotector salga, se incrementa el volumen celular y ocurre daño por lisis hipotónica. Esto Último no se aplica a las células con pared celular ya que ésta Protege contra la lisis. (Meryman y Williams, 1985)

Mc. Gann (1978) indicó que la Permeabilidad de las células de animales al glicerol es muy baja a 0°C y alta a 20°C, por lo que se puede utilizar como agente Penetrante o no Penetrante respectivamente.

Hunter en 1970 describió en eritrocitos de Paloma, que el movimiento del glicerol a través de su membrana, es debido a un mecanismo de difusión facilitada y no de difusión simple, es decir, que existe un sistema acarreador en la membrana, lo cual explica su amplia variabilidad en la capacidad de Penetración, y la dependencia del flujo del glicerol con la temperatura (Meryman, 1971).

La mayoría de las células no poseen un mecanismo de transporte facilitado y la difusión transmembrana del glicerol es relativamente lenta con un tiempo medio del orden de 3 a 4 minutos o más.

Debido al cuidado que debe tenerse en la introducción y remoción del glicerol, los tiempos requeridos pueden ser del orden de 30 a 60

minutos, para alcanzar una concentración suficientemente alta para obtener un buen resultado contra el daño por congelamiento. (Meryman y Williams, 1985). Sin embargo se sabe que el glicerol penetra poco a las células de vegetales (Meryman y Williams, 1985), razón por la cual se puede recurrir a aumentar los tiempos de exposición al crioprotector (Kantha, 1980; Finkle *et al.*, 1985), o utilizarse como crioprotector externo.

II.2.5. METODOS DE ENFRIAMIENTO Y DESCONGELAMIENTO

II.2.5.1. TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO

Cuando la protección contra el congelamiento es coligativa, es decir, se emplean altas concentraciones del crioprotector para disminuir el Pf, los eritrocitos de humanos, por ejemplo, son estables durante años a -60°C cuando se les congela con una concentración inicial de 5.5 molal de glicerol.

La duración del almacenamiento sin que cause daño a los explantes cuando se emplean temperaturas intermedias, entre -60 y -110 aproximadamente, debe ser determinada empíricamente. Las reacciones metabólicas pueden todavía continuar a tasas muy lentas, y como las células están expuestas a una solución salina hiperosmótica, el influjo lento de solutos extracelulares puede causar que las células de animales sean osmóticamente inestables durante el descongelamiento.

El almacenamiento en NL (-196°C) o en la fase de vapor sobre el NL (cerca de -120°C), debe conferir esencialmente una estabilidad indefinida en la conservación.

Una suspensión celular congelada por el modo cinético será

metaestable y debe ser almacenada a una temperatura suficientemente baja para prevenir la redistribución del agua. Esto significa que para el almacenamiento prolongado las temperaturas deben estar abajo de -120°C . en NL o sus vapores (Merzman y Williams, 1985).

Al analizar los eventos fisicoquímicos que ocurren durante el congelamiento, podemos ver que uno de los puntos críticos para el mantenimiento de la viabilidad, es la forma en la cual se van enfriando las muestras biológicas. Existen varios métodos, los cuales se explican a continuación:

II.2.5.2. ENFRIAMIENTO RÁPIDO

Las tasas de enfriamiento impuestas durante el congelamiento rápido son del orden de varios grados por minuto y frecuentemente no existe control en la tasa a la cual las células son congeladas. Básicamente, los explantes son llevados directamente hasta la temperatura del NL.

Este método se basa en el mecanismo de Luxet que sugiere que la viabilidad puede ser mantenida al prevenir el crecimiento de cristales de hielo intracelular formados durante el enfriamiento rápido. Esto se logra cuando se pasa el tejido rápidamente a través de la zona de temperatura en la cual ocurre el crecimiento de cristales de hielo letales.

En la mayoría de los ejemplos de enfriamiento rápido, la viabilidad de los meristemas criopreservados no es muy alta y ha sido demostrado que una mejor sobrevivencia puede ser obtenida por congelamiento lento. (Kantha, 1985).

II.2.5.3. ENFRIAMIENTO POR PASOS

Farrat y col (1977) han reportado un procedimiento simple de dos pasos: el espécimen se sumerge en un baño a temperatura constante, generalmente a -30 o -40°C . y se le deja ahí por un periodo de tiempo encontrado empíricamente, por lo general de 10 o 15 minutos, después de lo cual se le transfiere a NL. (Ver fig 3).

La protección del congelamiento por dos pasos ha sido atribuida a la remoción osmótica de salida del agua de la célula durante el tiempo en el cual se mantiene constante, de manera que se minimice o evite el congelamiento intracelular durante un enfriamiento subsecuente a -196°C . La ocurrencia del congelamiento intracelular a la temperatura constante, define la temperatura más baja límite para el uso de esta técnica (Mc Gann, 1978).

Una curva típica de enfriamiento por dos pasos es la que se muestra en la figura 3.

Kartha (1982), reporta el uso de un número mayor de pasos: la muestra se va congelando por ciertos periodos a temperaturas determinadas. Una vez que el espécimen llega a los -30 o -40°C , se le transfiere a NL directamente.

II.2.5.4. ENFRIAMIENTO POR TASAS

Las células son enfriadas con tasas de enfriamiento óptimas hasta llegar a -30 o -40°C , en donde toda el agua congelable de la célula ha escapado para convertirse en hielo externo. De aquí las células son llevadas rápidamente a la temperatura del NL de -196°C , lo cual no causa efectos adversos. (Fig 4).

Si la tasa es demasiado lenta, las células, además de ser

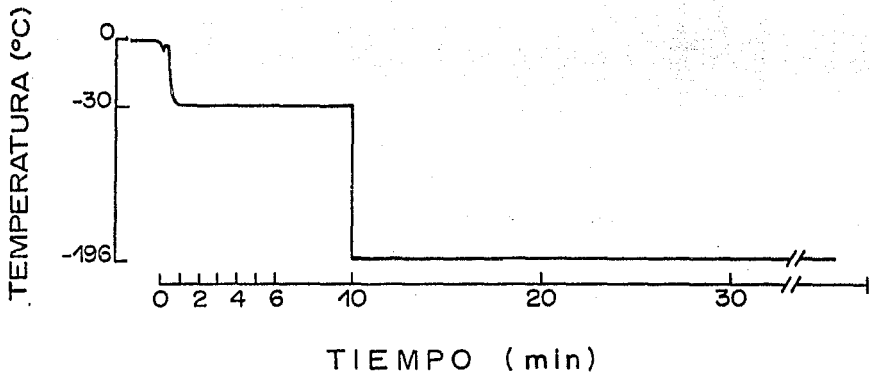


Fig 3. Variaciones de la temperatura en muestras enfriadas por un procedimiento de dos Pasos. (Modificado de Mc Gann, 1978).

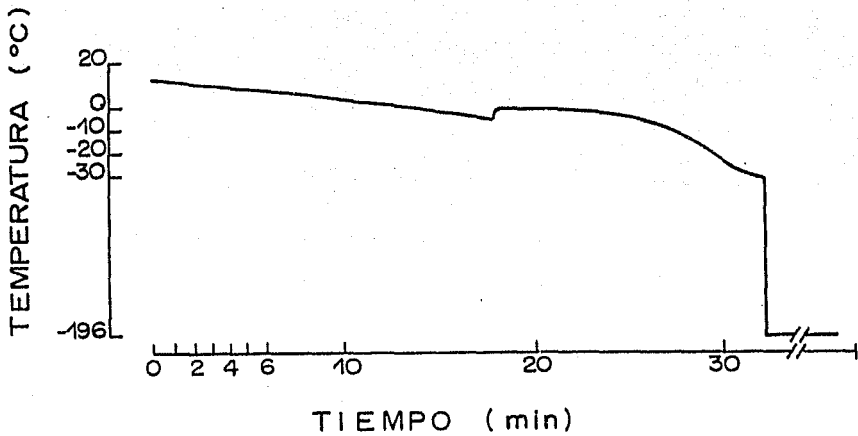


Fig 4. Variación de la temperatura en muestras con una velocidad de enfriamiento por tasas. (Modificado de Reinert y Baja, 1977).

sobredeshidratadas, estarán expuestas a los efectos dañinos del aumento en la concentración de electrolitos. Por el otro lado, si la tasa es más rápida que el óptimo, las células no serán lo suficientemente deshidratadas y ocurrirá la formación de hielo intracelular.

Las tasas de enfriamiento generalmente usadas para la criopreservación de células de plantas se encuentran en un espacio entre 0.5 y 2.0°C por minuto, y dan mucho mejores resultados que el enfriamiento rápido o por pasos. (Kantha, 1985; Mazur, 1966).

Para obtener mayor éxito, el congelamiento por tasas lentas se acompaña del uso de crioprotectores externos e internos y sus mezclas.

II.2.5.5. EQUIPOS DE ENFRIAMIENTO

Existen varios tipos de criostatos y unidades de congelamiento con los cuales se pueden obtener tasas de enfriamiento entre 0.1 y 10 °C/min, con ayuda de sistemas computarizados.

Existe en el mercado una unidad cuyo funcionamiento puede servir como base para desarrollar un equipo de enfriamiento de bajo costo en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales.

Esta unidad (fig 5 A,F) se opera manualmente, y los materiales biológicos pueden ser congelados a la tasa de enfriamiento deseada.

Esta tasa de enfriamiento está determinada por el número de tubos o ampollitas (fig 5E) y la distancia sobre el nivel del NL, que es determinada por la posición del anillo de goma del tapón BF-6 (fig 5F). Después del congelamiento controlado, las ampollitas son colocadas en contenedores (fig 5C) de la unidad de congelamiento. Con este aparato se pueden congelar 8 ampollitas al mismo tiempo.

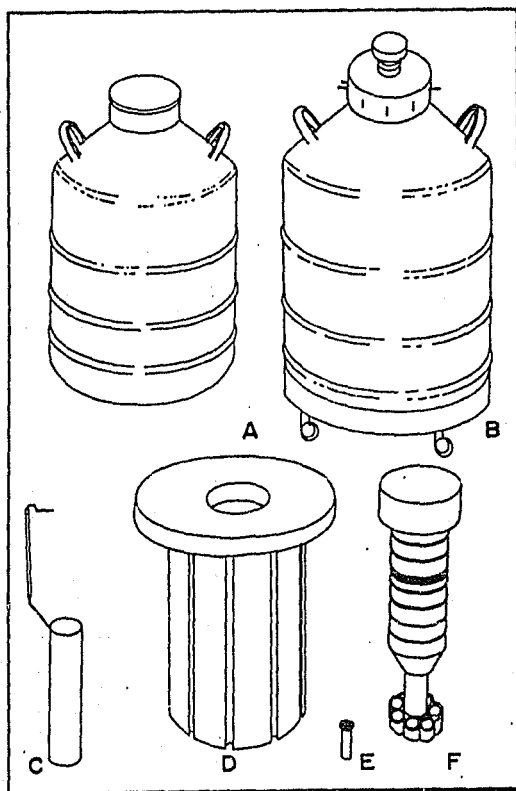


Fig 5A-F. Unidad de congelamiento LR-33 Biological Freezer-6 (Tomado de Reinert y Bajaj, 1977). (Para la descripción ver el texto).

II.2.5.6. DESCONGELAMIENTO

Existen dos formas de descongelamiento: a tasas lentas, cuando se deja que los explantes alcancen la temperatura ambiente; y a una tasa rápida, llevando los explantes a 40°C en un baño maría por 1 o 2 minutos (Kantha, 1982). El proceso rápido tiene como finalidad evitar la recristalización y por tanto, el daño mecánico. La experiencia muestra que este último método da mejores resultados.

La tasa de calentamiento varía si el baño se agita o no. Por ejemplo cuando una muestra es llevada desde la temperatura del NL hasta 37°C en un baño sin agitar la tasa es de 350 °C/min y en un baño vigorosamente agitado la tasa es de 640 °C/min (Mc Gann, 1978).

II.2.6. PRUEBAS DE VIABILIDAD Y CRECIMIENTO.

La siembra y recuperación del crecimiento es el mejor método para determinar la viabilidad de los explantes, ya que permite saber si hubo cambios genéticos o morfogenéticos en el material tratado, además de indicar si sobrevivieron al proceso de criopreservación.

II.3. Allium sativum L. (ajo)

II.3.1. DESCRIPCION BOTANICA DE Allium sativum L

El género Allium es muy extenso, consta aproximadamente de 500 especies distribuidas en el hemisferio norte, muchas nativas de norteamérica; con un fuerte olor característico, algunas se cultivan para aprovecharse como hortalizas o como ornamentales. Son plantas escamosas, la mayoría con hojas sub-basales o radicales únicamente, las cuales al igual que el escapo son fistulosas o huecas, con bulbos tunicados; flores pequeñas en umbelas terminales, pocas o numerosas, que emergen de caliptras escariosas que son de 1 a 3; foliosas, blancas, verdosas, amarillas, rosas o púrpuras, con 6 segmentos blanquecinos libres o connados en la base; 6 estambres unidos a la base del perianto; pistilo con un ovario súpero de tres cavidades; estilo delgado y entero o con un estigma trifido; el fruto es una pequeña cápsula loculada (Bailey, 1977).

La especie Allium sativum L. es una hierba erecta, de 30 a 60 cm de alto, con raíces adventicias superficiales. Los bulbos se componen de un tallo circular, escamas delgadas y secas las cuales son la base de las hojas del follaje, y pequeños bulbos o dientes formados a partir de brotes axilares de las hojas más jóvenes del follaje. Los dientes están rodeados por las escamas secas exteriores. Cada diente consiste en una vaina protectora cilíndrica, una vaina formada por una sola hoja de almacenamiento engrosada y un brote central pequeño. Si se plantan dientes muy pequeños o si son crecidos bajo condiciones no óptimas, se produce un único diente sólido conocido como redondo.

El limbo de la hoja es lineal, liso, sólido, de 2.5 cm o menos de ancho, se dobla longitudinalmente, con quilla en su superficie más baja.

Algunos dientes no producen inflorescencias, o éstas pueden ser parcialmente o no del todo proyectadas. Cuando se produce, es un escape liso, redondo, sólido, enrollado al principio; espata membranosa, picuda a lo largo, hendida sobre un lado, y que permanece unida a la umbela.

Se producen bulbillos pequeños en la inflorescencia; flores, variables en número y en ocasiones ausentes, raramente abren y pueden marchitarse en brote. Flores en pedicelos delgados; perianto de aproximadamente 4 mm de largo, rosáceo, anteras y estilo proyectados. Las semillas se presentan raramente, si es que alguna vez, son producidas. (Purseglove, 1975).

II.3.2. CLASIFICACION

Anteriormente se clasificaba a Allium sativum L. en la familia Amaryllidaceae (Hutchinson, 1959), pero Cronquist (1981) la clasifica en la familia Liliaceae, quedando su clasificación como sigue (Cronquist, 1981):

Reino	Vegetal
División	Magnoliophyta
Clase	Liliopsidae
Subclase	Liliidae
Orden	Liliales
Familia	Liliaceae
Género	<u>Allium</u>
Especie	<u>Allium sativum</u> L.

II.3.3. ORIGEN Y DISTRIBUCION

El ajo ha sido conocido solamente como una planta cultivada. Algunas autoridades consideran que Allium longicuspis Regel, que es endémico del Asia Central, es el ancestro silvestre. Se extendió en tiempos remotos hacia la región del Mediterráneo y fue llevado al hemisferio oeste por los Españoles, Portugueses y Franceses. (Purseglove, 1975).

II.3.4. COMPOSICION QUIMICA

Los dientes de ajo contienen aproximadamente: 63% de agua; 7% Proteína; 0.2% Grasa; 28% carbohidratos; 0.8% fibra; 1.0% cenizas.

El bulbo sin dañar contiene un aminoácido soluble en agua llamado alliin, incoloro e inodoro; cuando se tritura, la enzima alinasa descompone el alliin para producir alicina, cuyo principal ingrediente es el odorífero disulfuro de alilo.

II.3.5. USOS Y PROPIEDADES MEDICINALES

En el género Allium, el ajo es, después de la cebolla, el segundo más ampliamente usado. Es utilizado como condimento para dar sabor a otros alimentos. Es sembrado y empleado extensamente en países que bordean el Mediterráneo y en áreas que han sido pobladas por europeos sureños.

El ajo es colocado en trenzas en la India, y es muy usado por los Chinos. En las Filipinas, este de Asia, y parte del trópico, las puntas verdes se utilizan al igual que los bulbos.

El ajo deshidratado, en polvo o granulado, reemplaza los bulbos

frescos para el uso doméstico e industrial en los Estados Unidos y en algunos otros países.

Sus propiedades medicinales fueron reconocidas desde hace mucho tiempo, pero no están establecidas oficialmente en las farmacopeas del oeste moderno. Fue considerado como un poderoso antídoto contra venenos de todo tipo. La alicina del ajo tiene importantes propiedades bactericidas. (Purseglove, 1975).

Algunas de las enfermedades que se cree que combate son: bronquitis, inflamaciones del intestino, presión alta, diabetes. (Font Quer, 1988)

II.3.6. PLAGAS Y ENFERMEDADES

Por tratarse de una especie de multiplicación exclusivamente vegetativa, las plagas y enfermedades constituyen un serio problema dado que la diseminación de estos patógenos está asociada íntimamente a la propagación vegetativa (bulbos-dientes) (FAO, 1988).

Entre los insectos que atacan al ajo están el nemátodo del tallo y del bulbo, Ditylenchus dipsaci, los Thrips tabaci y el ácaro Aceria tulipae.

Las enfermedades provocadas por hongos y que causan mayores daños son la pudrición producida por Sclerotium sp.; la raíz rosada causada por Pyrenochaeta terrestris; la pudrición de Penicillium conyobiferum y la roya causada por Puccinia porri. (Cásseres, 1984).

II.3.7. METODOS DE PROPAGACION

El ajo es una especie apomíctica obligada, por tanto, no produce semilla, y su propagación es exclusivamente vegetativa (agámica). El

desarrollo de la sexualidad está impedido por fallas que pueden ocurrir durante la organogénesis, esporogénesis o gametogénesis. Ello impide cualquier avance genético del cultivo a través del mejoramiento por cruzamiento y selección sexual (FAO, 1983).

Algunos clones no producen escape floral. En los que lo hacen, el desarrollo de las flores puede ser incompleto y total o parcialmente substituido por la producción de bulbillos aéreos. Estos bulbillos representan una forma apomíctica de reproducción de esta especie. (FAO, 1983).

Las "semillas" agrícolas son los dientes, empleados en la propagación vegetativa. Los bulbillos que nacen en las umbelas pueden utilizarse para sembrar, pero si son pequeños tardarán 2 años, es decir, 2 ciclos, en producir plantas de tamaño comercial. (Cásseres, 1984).

II.3.8. PRODUCCION

España es el mayor productor de ajo con más de 100,000 toneladas por año. Otros productores importantes son Egipto, Francia, México y Brasil (Purseglove, 1975).

En México la superficie nacional cultivada de ajo se estima en 7000 hectáreas, y destacan, por su importancia en este cultivo, los estados de Guanajuato, Querétaro, Aguascalientes, Jalisco y Michoacán, en los cuales se localiza más del 50% del total de la superficie nacional dedicada al cultivo. (Díaz, 1978).

II.3.9. VARIABILIDAD GENETICA

Contrariamente a lo que podría suponerse, la especie es

extremadamente variable (FAO, 1988), ya que se encuentran clones con diferentes requerimientos de frío, fotoperiodo, precocidad, color de los bulbos y de las hojas envolventes, tamaño y número de los dientes, y otras características tales como rendimiento y calidad. (FAO, 1988).

II.3.10. ALMACENAMIENTO DE SEMILLA AGRICOLA

Los bulbos permanecen en estado de dormancia bajo buenas condiciones de almacenamiento. Las condiciones de temperatura son de 0 °C, la humedad relativa está entre el 70 y 75 % y la duración aproximada del periodo de almacenamiento es entre 6 y 8 meses. (Denisen, 1979).

II.3.11. BANCO DE GERMOPLASMA

Debido a sus características de propagación estrictamente vegetativa, el ajo para preservarse en bancos de germoplasma debe mantenerse en el campo y renovarse cada año, con los consecuentes peligros y limitaciones: pérdida de material por manipulación, enfermedades o desastres naturales y costos, entre otros.

El material que constituye un banco de germoplasma de ajo del INIA se encuentra en el Campo Experimental del Bajío.

Los diferentes materiales de ajo se mantienen por siembras en el campo año con año. En los lotes establecidos se efectúan inspecciones continuas para eliminar las posibles mezclas entre cultivares, y en el momento de la cosecha y del desgrane se hace una última selección, la cual depende de las características de cada material. (Díaz, 1978).

OBJETIVOS

En México existe un grave problema de almacenamiento de plantas cuyo germoplasma no puede ser guardado por las vías tradicionales ya que presentan reproducción vegetativa o bien sus semillas son recalcitrantes; muchas especies tropicales de gran interés económico caen en este grupo.

Una alternativa para solventar este problema es la creación de bancos de germoplasma in vitro, ofreciendo este método el almacenamiento a corto-mediano plazo y a largo plazo por criopreservación. Esta última es la instancia más adecuada para conservar la estabilidad genética de los materiales biológicos.

El Comité Internacional para los Recursos Genéticos de Plantas (IBPGR, 1983) ha señalado al género Allium como un grupo cuya preservación in vitro es prioritaria.

El objetivo general del presente trabajo es el análisis del proceso de criopreservación de A. sativum, empleando como crioprotector al glicerol. Se pretende utilizar un sistema de enfriamiento lento de bajo costo.

Los objetivos particulares son los siguientes:

1. Desarrollar un sistema que permita obtener distintas tasas de enfriamiento, al variar la concentración de la solución de crioprotector y la temperatura externa a la cual es sometido.
2. Encontrar el tiempo óptimo de exposición de los explantes a diferentes concentraciones de crioprotector, de manera que éste no resulte tóxico.
3. Realizar experimentos preliminares de congelamiento de explantes, mediante el empleo del sistema de enfriamiento desarrollado.

IV. MATERIALES Y METODOS.

IV.1. DESCRIPCION GENERAL

El Presente trabajo fue dividido en tres Partes: 1. Desarrollo de un sistema económico de enfriamiento a tasas lentas, que Permitiera llevar a cabo Procedimientos de criopreservación, 2. Estudio de la toxicidad del Glicerol sobre Ápices con Placa basal de Allium sativum, de manera que se le pueda emplear como crioprotector, y 3. Congelamiento y enfriamiento subsecuente hasta la inmersión en NL, de explantes de Allium sativum mediante el empleo del sistema de enfriamiento desarrollado; así como su recuperación in vitro.

La figura 6 muestra un diagrama general del trabajo efectuado. A continuación se explica cada una de sus Partes.

IV.2. SISTEMA DE ENFRIAMIENTO

Para desarrollar un sistema que Permitiera la obtención de distintas tasas de enfriamiento, basado en una idea similar a la del LR-33 Biological-Freezer-6" (Reinert y Bajaj, 1977), se llevaron a cabo las siguientes Pruebas:

IV.2.1. TERMO CRIOGENICO

Para obtener temperaturas entre 0 y -40°C se emplearon los vapores del NL almacenado en un termo criogénico con capacidad de 40 litros. Los vapores formaron un gradiente de temperatura desde la superficie del NL hasta la boca del termo. La temperatura de los vapores (Text) fue detectada con un termopar de cobre-constantan conectado por un lado a una referencia a 0°C lograda con cubos de hielo de agua destilada y

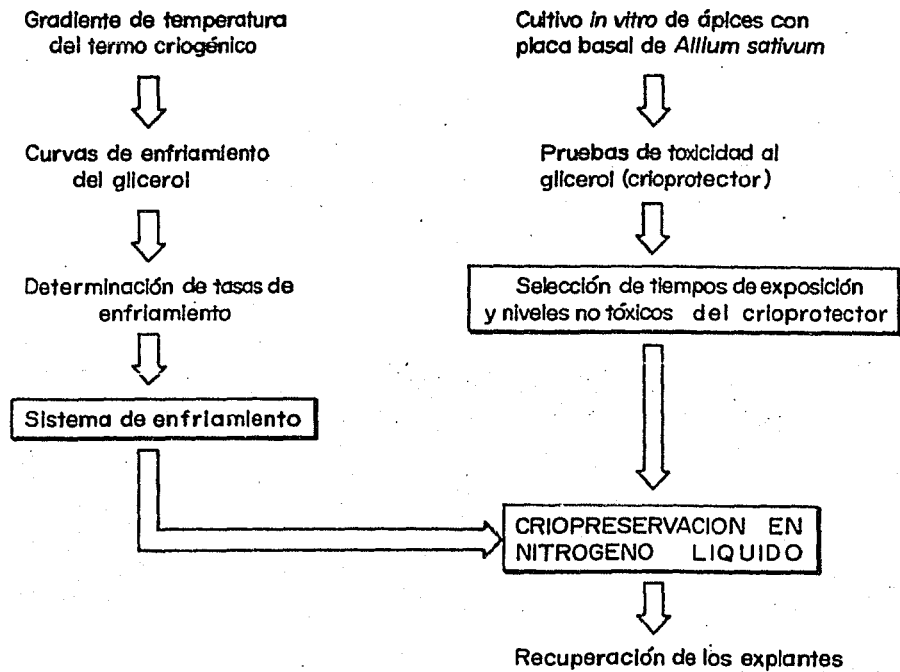


Fig 6. Esquema del método de trabajo, el cual fue dividido en tres partes: 1) Sistema de enfriamiento; 2) Toxicidad del crioprotector; y 3) Criopreservación en NL.

Por otro lado a un multímetro (fig 7).

El termopar fue colocado a distancias preestablecidas, medidas a partir de la boca del termo (b), y la Text a la que se encontraba fue obtenida transformando los milivolts a grados centígrados, mediante el empleo de tablas milivolts vs temperatura de calibración conocida (fig 7).

La medida de la distancia a partir de la boca del termo (b) es útil en la práctica, pero para elaborar un análisis del comportamiento de los vapores fue necesario hallar la distancia existente entre el nivel del NL (n de NL) y el termopar (h) con la siguiente fórmula:

$$h = 52.5 - n \text{ de NL} - b. \text{ (fig 7).}$$

Con los datos de Text y h, se elaboraron los perfiles de temperatura para distintas cantidades de NL. Cada perfil fue ajustado a una recta cuya pendiente nos indica el gradiente de temperatura que existe en el intervalo de altura trabajado (6 a 14 cm medidos a partir de la boca del termo).

De los resultados de los perfiles se escogió una temperatura de los vapores de -20°C para saber la relación entre h y el nivel de NL.

A la temperatura de los vapores (Text) se le llamó temperatura externa, y es la que se utilizó para lograr el descenso de temperatura de las soluciones crioprotectoras con o sin explantes biológicos.

La altura del nivel de NL contenido en el termo fue medida con ayuda de una regla, y resultó ser una medida más práctica que el volumen del mismo.

IV.2.2. COMPORTAMIENTO DE SOLUCIONES CRIOPROTECTORAS

Cuando se congelan soluciones concentradas se obtienen distintos comportamientos, que dependen de la concentración y la Text a la cual sean colocadas. Es necesario conocer por tanto este comportamiento para saber cual es la dinámica de congelamiento de los explantes.

Las soluciones crioprotectoras (v/v) fueron preparadas con distintas concentraciones de glicerol (Baker), en medio de cultivo líquido de Murashige y Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1961).

Se estudió el comportamiento de soluciones de glicerol al 0, 5, 10, 20 y 30 % expuestas a la misma Text, así como el enfriamiento de soluciones al 0, 5, 10, 15 y 20% expuestas a diferentes T externas de manera que alcanzaran -30 y -40°C de temperatura.

También se trabajó con soluciones de glicerol al 5%, colocadas a distintas T externas.

Se efectuó una prueba para comparar el enfriamiento de una y cuatro ampollitas de glicerol al 5%, al ser colocadas a la misma T ext.

Las soluciones fueron colocadas en ampollitas abiertas (AC/II, calibre 4 con capacidad de dos mililitros), de manera que pudiera entrar el termopar para quedar en contacto directo con la solución. El dispositivo quedó como lo muestra la figura 8.

Una vez montado el sistema, la ampollita fue sumergida en los vapores de NL a la altura correspondiente a la Text deseada.

La dinámica de enfriamiento fue detectada en el multímetro, tomándose lecturas durante un tiempo total de 40 minutos.

A partir de estos datos se graficó la temperatura de la solución contra el tiempo, es decir, se trazaron curvas de enfriamiento; y se hizo el análisis correspondiente para hallar la relación entre la Tf

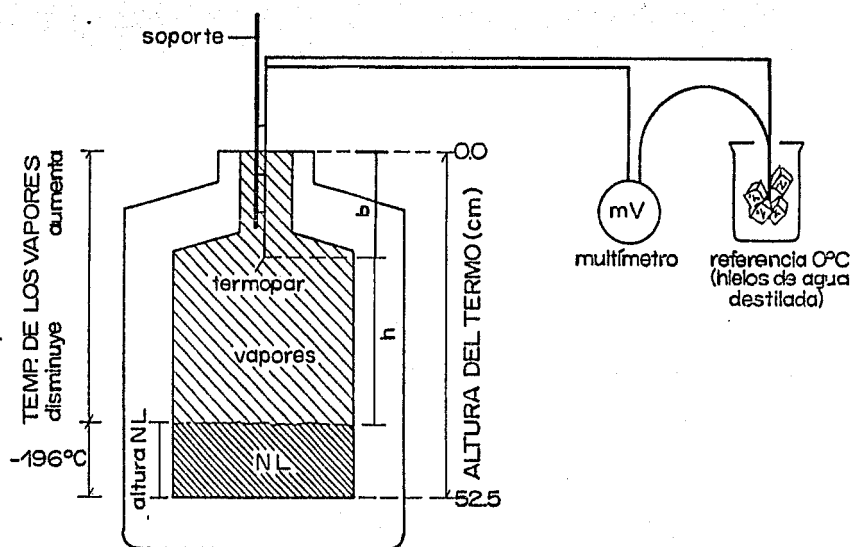


Fig 7. Esquema del termo criosénico y el termopar conectado al multímetro y a la referencia. La altura del termo corresponde a 52.5 cm; b es la altura entre la boca del termo y el termopar; h es la altura entre el termopar y el nivel de NL. La temperatura de los vapores disminuye al acercarse a la superficie del NL.

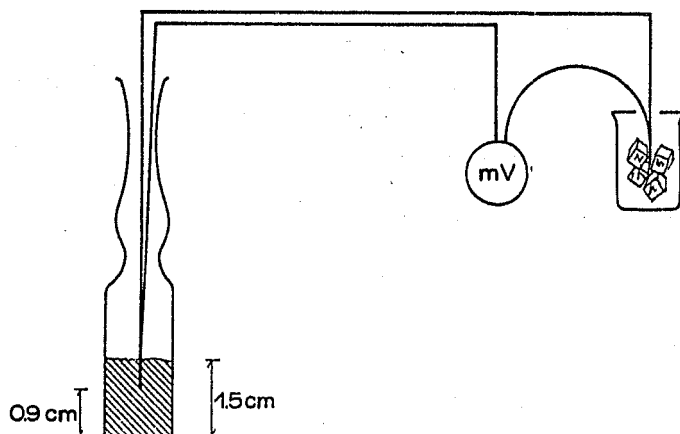


Fig 8. Ampolleta lista para el congelamiento. En todos los experimentos, el termopar se colocó a una altura sobre la base de la ampolleta de 0.9 cm y la altura de la solución fue de 1.5 cm. El termopar y la ampolleta se colocaron en un soporte que permite desplazarlos en el termo.

alcanzada por la solución y la Text a la que fue expuesta; la tasa de enfriamiento de la solución y la variación del Pf.

La tasa de enfriamiento fue medida en la sección de la curva que corresponde a una línea recta, después del periodo de congelamiento hasta -20°C aproximadamente. Para cada tasa de enfriamiento se indicó el intervalo de temperatura empleado.

IV.3. PRUEBAS DE TOXICIDAD AL GLICEROL.

IV.3.1. CULTIVO in vitro

En esta investigación se empleó la variedad Taiwan de la especie Allium sativum, la cual fue donada por el Centro de Investigaciones Agrícolas del Bajío, Roque, Carretera San Miguel Allende, Gto.

Los explantes utilizados fueron los ápices meristemáticos con su placa basal, obtenidos a partir de los "dientes" del ajo ("semilla" agronómica). A estos dientes se les eliminó su cubierta y se les lavó con agua corriente. Una vez limpios se les llevó a la campana de flujo laminar y se les sumergió en etanol al 96% durante un minuto.

El diente se dividió en dos partes, de forma transversal al eje de crecimiento, sobre una caja de Petri esteril; al fragmento que contiene el ápice con su placa basal se le quitó el tejido sobrante. Este material se colocó en una solución de etanol al 70% por dos minutos, e inmediatamente se pasó a una solución de hipoclorito de sodio al 33.3% durante diez minutos.

Se enjuagó tres veces con agua destilada estéril y se procedió a la disección del ápice con placa basal en un microscopio estereoscópico (fig 9).

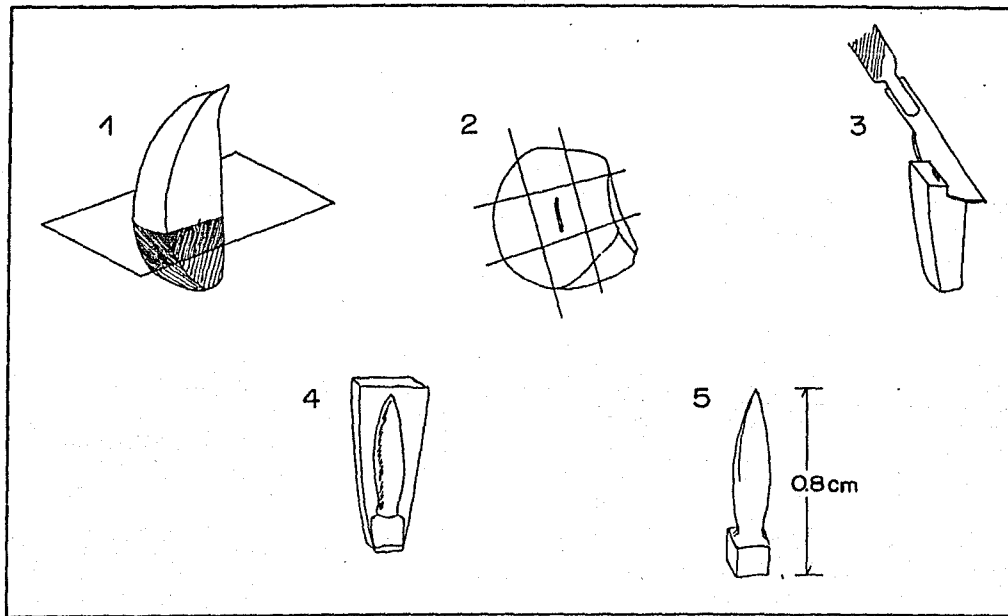


Fig 9. Secuencia de los cortes efectuados para la obtención del ápice con Placa basal. En 1 se muestra el corte inicial para eliminar la mitad superior del ajo; en 2 se señalan los cortes que deben realizarse para eliminar la hoja de almacenamiento; 3, 4 y 5 se realizan bajo el microscopio estereoscópico. El ápice con su Placa basal tiene una altura aproximada de 0.8 cm.

El medio de cultivo empleado fue el MS (Murashige y Skoog, 1961) sin reguladores del crecimiento, el cual, en experimentos previos, ha demostrado ser adecuado para la regeneración de plantas (Horne *et al.*, 1981). El pH se ajustó a 5.7 con NaOH o HCl (Kantha, 1982).

IV.3.2. RESPUESTA AL GLICEROL

Para encontrar el tiempo óptimo de exposición de los explantes a distintas concentraciones del crioprotector, estos fueron tratados con medio MS (Murashige y Skoog, 1961) adicionado con diversas concentraciones v/v de glicerol (0,5,10,15,20%) a distintos tiempos de exposición, y una temperatura de 20°C.

Un primer lote de explantes fue colocado en concentraciones de 0, 5, 10, 15 y 20 % de glicerol en MS líquido con agitación constante durante 24 horas. La cantidad de solución empleada fue de 20 ml.

Un segundo lote fue tratado con 0, 10, 15 y 20 % de glicerol en MS líquido durante una hora, en ampolletas de 1.2 ml. Las ampolletas fueron selladas con el mechero.

Una vez cumplido el tiempo de exposición, los explantes fueron lavados durante cinco minutos en 30 ml de MS líquido sin crioprotector.

Como puede notarse, la adición y eliminación del glicerol se llevó a cabo en un solo paso, sin diluir las soluciones.

Los explantes así tratados fueron sembrados asépticamente en MS basal sólido contenido en tubos de ensayo y colocados a 27 °C de temperatura con 16 horas de luz y 1000 lux de intensidad luminosa.

El número de explantes por prueba fue de diez aproximadamente y se tomaron como referencia experimentos previos, con resultados positivos.

Todos los procedimientos anteriores se llevaron a cabo en la

campana de flujo laminar; el material y las soluciones fueron esterilizadas previamente en autoclave.

Para saber el efecto del crioprotector, se hicieron mediciones de la longitud de las plantas a los 30 días de cultivo in vitro, así como observaciones de la respuesta morfofisiológica.

IV.4. CONGELAMIENTO DE EXPLANTES de A. sativum.

Los explantes fueron expuestos a una solución de glicerol al 20% durante una hora antes del congelamiento.

Cada lote de explantes fue distribuido en tres ampollitas y el crioprotector se adicionó en un solo paso, de la misma forma en la que se realizó el estudio de toxicidad para una hora de exposición. Las ampollitas fueron selladas y colocadas en la mesa de agitación orbital durante una hora a temperatura del laboratorio.

El llenado de las ampollitas y la colocación del termopar fue igual que para el estudio de las soluciones de glicerol (ver fig 8).

Estas tres ampollitas junto con una cuarta que contenía el termopar, fueron colocadas a la misma altura alrededor del soporte que permitió desplazarlas en el interior del termo.

Se empleó un método de enfriamiento por tasas lentas hasta llegar a una temperatura preestablecida. Esta temperatura se mantuvo constante por cierto tiempo antes de la inmersión en el NL.

El primer lote de explantes fue llevado a una temperatura de -28°C con una tasa máxima de enfriamiento de $-0.6^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Se dejó a -28°C durante 20 minutos antes de la inmersión en NL.

Un segundo lote fue tratado de la misma manera que el anterior pero

en esta ocasión el tiempo a temperatura constante antes de la inmersión fue de 40 minutos.

El último lote se llevó a -38°C con una tasa máxima de enfriamiento de $-1.0^{\circ}\text{C}/\text{min}$ y se mantuvo a dicha temperatura durante 20 minutos antes de la inmersión en NL.

Los explantes permanecieron una hora en NL, después de lo cual se procedió al descongelamiento en un baño a 40°C con agitación hasta alcanzar la temperatura ambiente en 2 minutos aproximadamente.

Inmediatamente se efectuó un lavado de 5 minutos en MS líquido y se sembró en MS sólido a 27°C y 1000 lux de intensidad luminosa.

Los testigos fueron tratados de la misma forma que los experimentales pero sin someterlos al congelamiento.

Las observaciones se efectuaron a los 30 días de cultivo in vitro.

Cuando se efectúan pruebas de congelamiento de explantes hasta su completa inmersión en NL, se evapora una cantidad considerable de líquido, por lo que, para mantener el nivel de NL lo más constante posible fue conveniente utilizar dos termos: un termo exclusivo para conseguir tasas lentas de enfriamiento hasta alcanzar la temperatura deseada, y otro para mantener las muestras inmersas en el NL.

V. RESULTADOS Y DISCUSION

V.1. SISTEMA DE ENFRIAMIENTO

V.1.1. TERMO CRIOGENICO

V.1.1.1. RESULTADOS

La figura 10 muestra las temperaturas obtenidas al colocar el termopar en los vapores del NL a distancias preestablecidas, medidas a partir de la boca del termo (b) con un nivel de NL de 13 cm. El termopar disminuye su temperatura rápidamente y alcanza a estabilizarse en 5 minutos aproximadamente.

En la figura 11 se observan los perfiles de temperatura (Text vs h) hallados para distintas cantidades de NL; y la tabla 1 contiene las pendientes obtenidas para cada perfil al variar la cantidad de NL, así como su promedio.

Estas pendientes indican qué tanto disminuye la temperatura con respecto a la altura, es decir, nos dan el gradiente de temperaturas del termo ($m = \Delta \text{Text} / \Delta h$). De los valores de las pendientes se obtuvo un promedio para el gradiente de temperaturas de $10.3^\circ\text{C}/\text{cm}$ con un error estándar de $0.3^\circ\text{C}/\text{cm}$.

La relación encontrada para h en función del nivel de NL a una Text de -20°C fue lineal y se puede representar por la siguiente fórmula: $h = -1.03 (n \text{ de NL}) + 43.0$. Esta ecuación es útil para un nivel de NL que varía entre 5.5 y 25.5 cm.

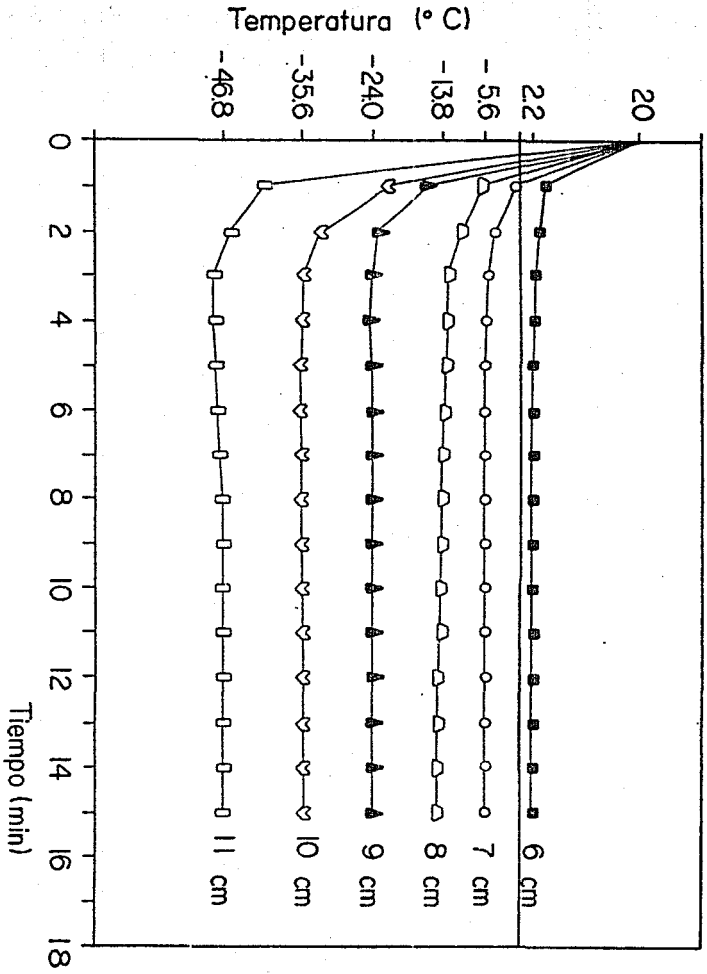


Fig 10. Temperatura de los vapores obtenidas al colocar el termopar a alturas preestablecidas medidas a partir de la boca del termno, con un nivel de NL de 13 cm. La temperatura se estabiliza a los 5 minutos aproximadamente.

Tabla 1. Pendientes (m_i) y ordenadas al origen (c_i) obtenidas al relacionar la T_{ext} con la altura h , para distintas cantidades de NL. Se incluye el promedio de las pendientes (\bar{m}) con su error y desviación estándar.

Nivel de NL (cms)	$T_{ext} = m_i (h) + c_i$		$\bar{m} \pm EE$ (°C/cm)	DE (°C/cm)
	m_i	c_i		
5.5	10.4	- 412.1	10.3 ± 0.3	0.8
9.0	9.0	- 324.4		
12.0	9.9	- 334.9		
13.0	10.2	- 336.2		
15.0	10.8	- 336.0		
25.5	11.4	- 212.6		

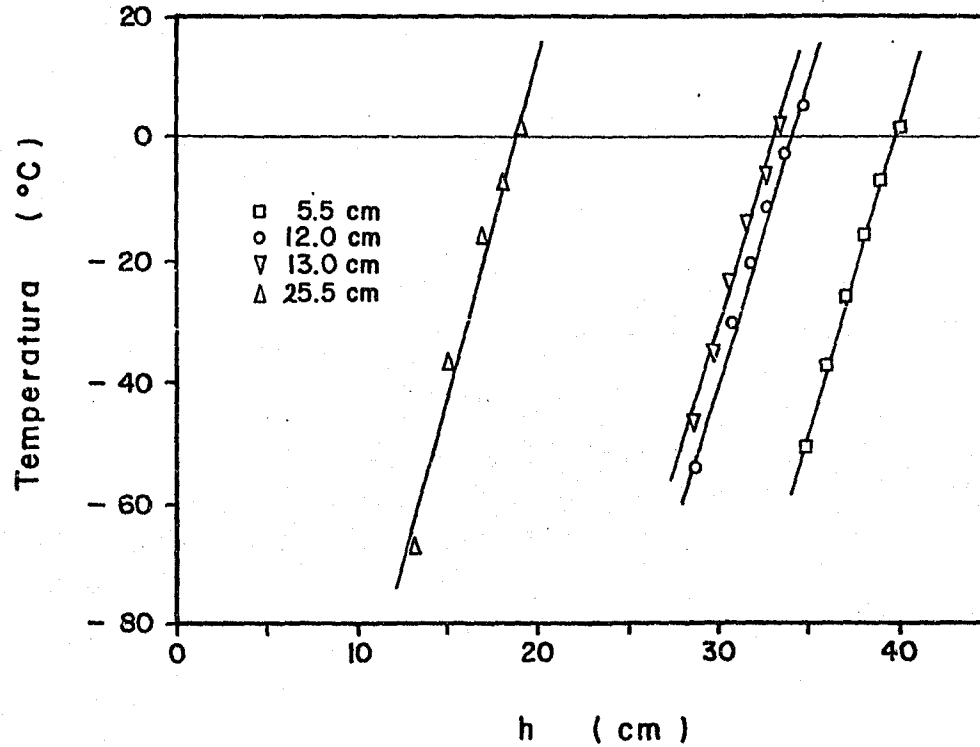


FIG 11. Perfiles de temperatura (Text vs h) del termo Para los cuatro niveles de NL indicados en la figura. Colocando h en función del nivel de NL a una temperatura determinada, se puede encontrar el valor de h Para cualquier cantidad de NL, en un intervalo de 5.5 a 25.5 cm. Con un punto y la pendiente Promedio se puede trazar el perfil de temperatura buscado.

V.1.1.2. DISCUSION

El NL se puede guardar en recipientes que utilizan el alto vacío como aislante, manteniéndose así una tasa de evaporación lo más baja posible (Heiras, 1984; 1986).

Si el termo no se llena a toda su capacidad, se forma una capa de vapores sobre la superficie del NL que se extiende hasta la boca del termo.

Los resultados muestran (fig 11) que estos vapores establecen un continuo de temperaturas desde 20°C (temperatura ambiente en la boca del termo) hasta -196°C (temperatura de ebullición del NL). La temperatura disminuye a razón de 10.3°C por centímetro (tabla 1). Por lo menos en un intervalo de temperaturas entre 5 y -50°C , independientemente de la cantidad de NL presente. Por debajo de -50°C el gradiente puede cambiar drásticamente del valor de $10.3^{\circ}\text{C}/\text{cm}$. De hecho se conoce que en la región cercana a la superficie del NL el gradiente de temperatura es muy grande; a distancias del orden de unos cuantos milímetros de la superficie del NL, los vapores se encuentran a una temperatura alrededor de -120°C (Meryman y Williams, 1985).

Reinert y Bajaj (1977) señalan que este continuo de temperaturas bajo cero se emplea en la unidad de congelamiento "LR-33 Biological Freezer-5", en la cual las muestras se colocan a distintas alturas sobre el nivel de NL para obtener distintas tasas de enfriamiento y temperaturas previas a la inmersión en NL. Este mecanismo también es empleado en el presente trabajo y los resultados concuerdan con lo señalado por estos autores.

Una vez que se sabe que el gradiente de temperatura no cambia, sólo precisa encontrar la altura h (o b) para alcanzar la *Text* deseada. Ya

que la curva Text contra h (Perfil de temperatura) se desplace de acuerdo a la cantidad de NL contenido en el termo (ver fig 11).

Con la ecuación encontrada para h en función del nivel de NL a una Text de -20°C ($h = -1.03 \ln \text{ de NL} + 43.8$) se pueden obtener puntos en la gráfica de los perfiles para una Text = -20°C . Con un punto y el valor promedio de la pendiente (10.3°C/cm) se extrapola el perfil deseado para determinada cantidad de NL.

Es más conveniente y sencillo medir distancias a partir de la boca del termo hasta la posición del termopar que desde el nivel de NL; por lo tanto para fines prácticos se puede utilizar la siguiente ecuación: $b = 52.5 - (\ln \text{ de NL}) - h$, que relaciona b con h.

La experiencia durante el desarrollo del presente estudio ha demostrado que es preferible utilizar una cantidad mayor de NL en el termo (25 cm) ya que se tiene así un sistema donde el equilibrio de los vapores es más estable, lo que produce una mayor reproducibilidad en los experimentos.

Los resultados son válidos exclusivamente para el termo empleado en este trabajo. Tomando en cuenta que existen comportamientos diferentes según la capacidad y eficiencia del termo, es importante mencionar que se puede emplear el método de trabajo aquí descrito para el estudio de otros tipos de termos.

V.1.2 SOLUCIONES CRIOPROTECTORAS

V.1.2.1. RESULTADOS

En la figura 12 y la tabla 2 se presenta una comparación de las curvas de enfriamiento obtenidas al congelar soluciones de glicerol al 0, 5, 10, 20 y 30 % expuestas a la misma Text (-14°C), de manera que alcanzaran entre -30 y -40°C de Tf.

Se puede observar en ellas los siguientes hechos:

1. Las curvas de enfriamiento siguen un comportamiento típico de enfriamiento de soluciones acuosas concentradas tal como el de la figura 2.

2. El grado de sobrefusión varía de acuerdo a la Probabilidad de nucleación.

3. El Pf disminuye a medida que aumenta la concentración de la solución, siguiendo una relación potencial. Gráficamente lo podemos ver en la curva de la figura 13.

4. La Tf que se alcanza es Proporcional a la concentración del crioprotector: entre mayor es la concentración más alta es la Tf alcanzada por la solución. Esto se debe a que entre mayor es la concentración, la solución tiene una capacidad calorífica mayor (Landau, 1983).

5. La tasa de enfriamiento, que corresponde al cambio en la temperatura de la solución (T_{sol}) entre el cambio en el tiempo (t), es más lenta entre mayor es la concentración, existiendo entre ellas una relación potencial como lo indica la figura 14.

Al congelarse soluciones de glicerol al 5% a distintas T externas se encontró lo siguiente (ver tabla 3):

1. El grado de sobrefusión varia, debido a que depende de la probabilidad de nucleación.

2. La T_f alcanzada sigue un comportamiento lineal en función a la T_{ext} . Con objeto de localizar la T_{ext} se le graficó en función de T_f (fig 15). La fórmula encontrada permite predecir la T_{ext} a la cual tiene que colocarse la solución para alcanzar la T_f deseada, en un intervalo entre $+10$ y -50°C , y no depende de la altura del NL en el termo como se espera.

3. La tasa de enfriamiento ($\Delta T_{sol}/\Delta t$) sigue un comportamiento lineal con respecto a la T_f alcanzada por la solución. Se graficó T_f en función de la tasa de enfriamiento (fig 16), y la ecuación encontrada permite conocer la T_f necesaria para obtener la tasa de enfriamiento buscada.

La tabla 4 muestra el análisis de las curvas de enfriamiento, hasta los 40 minutos, de las diferentes soluciones de glicerol expuestas a determinadas T externas, de manera que alcanzaran una T_f de -30 y -40°C . En todos los casos la temperatura tendió a estabilizarse a los 35 minutos.

La figura 17 presenta los resultados obtenidos al sujetar a enfriamiento una y cuatro ampollitas con glicerol al 5% colocadas a la misma T_{ext} (-48°C). Se observa que alcanzan aproximadamente la misma T_f , sin embargo, cuando se congelan cuatro ampollitas juntas la tasa de enfriamiento es más lenta y por ende el tiempo en alcanzar la T_f es mayor.

Tabla 2. Comportamiento de distintas soluciones de glicerol en MS líquido colocadas a una T_{ext} de -14°C . T_f corresponde a la temperatura final alcanzada por la solución a un tiempo (t) de 48 minutos; ΔT es la diferencia entre la T_f y la T_{ext} ; P_f corresponde a la temperatura en el punto de fusión; P_s es la temperatura final de sobrefusión. La tasa de enfriamiento de la solución ($\Delta T_{sol}/\Delta t$) fue tomada en el intervalo de temperatura indicado para cada caso y presenta un coeficiente de correlación cercano a 1.

[] glicerol (%)	T_f ($^{\circ}\text{C}$)	ΔT ($^{\circ}\text{C}$)	P_f ($^{\circ}\text{C}$)	P_s ($^{\circ}\text{C}$)	Tasa de enf. ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$)	intervalo ($^{\circ}\text{C}$)
0	-39.4	-25.4	- 0.2	- 4.5	-5.5	- 3 a -19
5	-38.6	-24.6	- 0.8	-10.5	-3.6	-4.5 a -22
10	-36.6	-22.6	- 2.2	—	-2.9	-5.5 a -19.5
20	-35.2	-21.2	- 6.0	- 7.0	-2.5	-8 a -20.5
30	-33.4	-19.4	-11.5	—	-1.7	-13 a -20

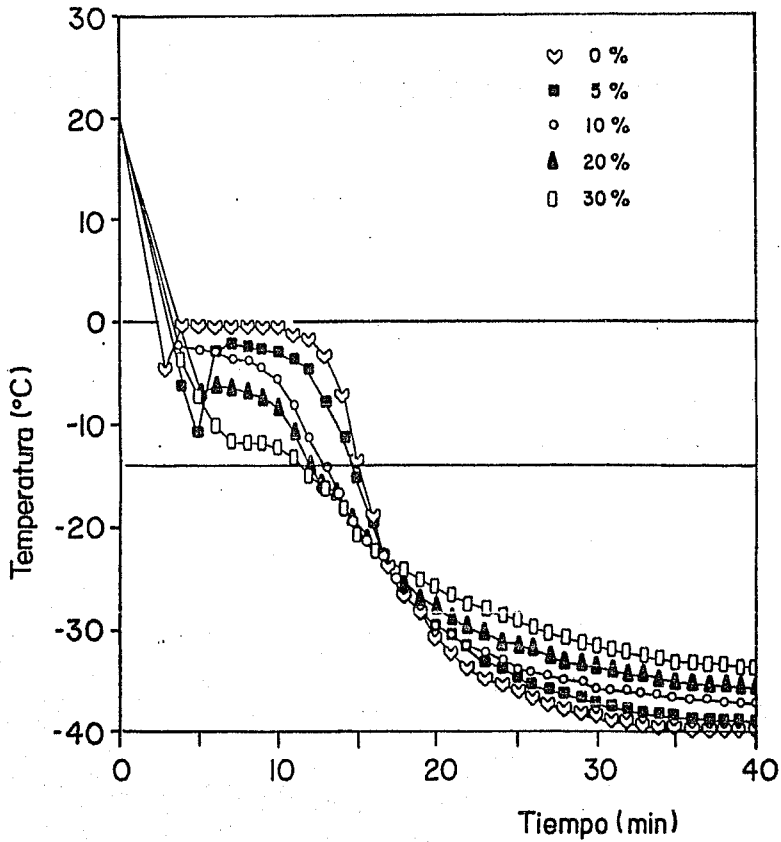


Fig 12. Curvas de enfriamiento de diferentes soluciones de glicerol en MS líquido colocadas a la misma Text (-14°C). Se observa el grado de sobrefusión, la meseta de cambio de fase y la Tf alcanzada.

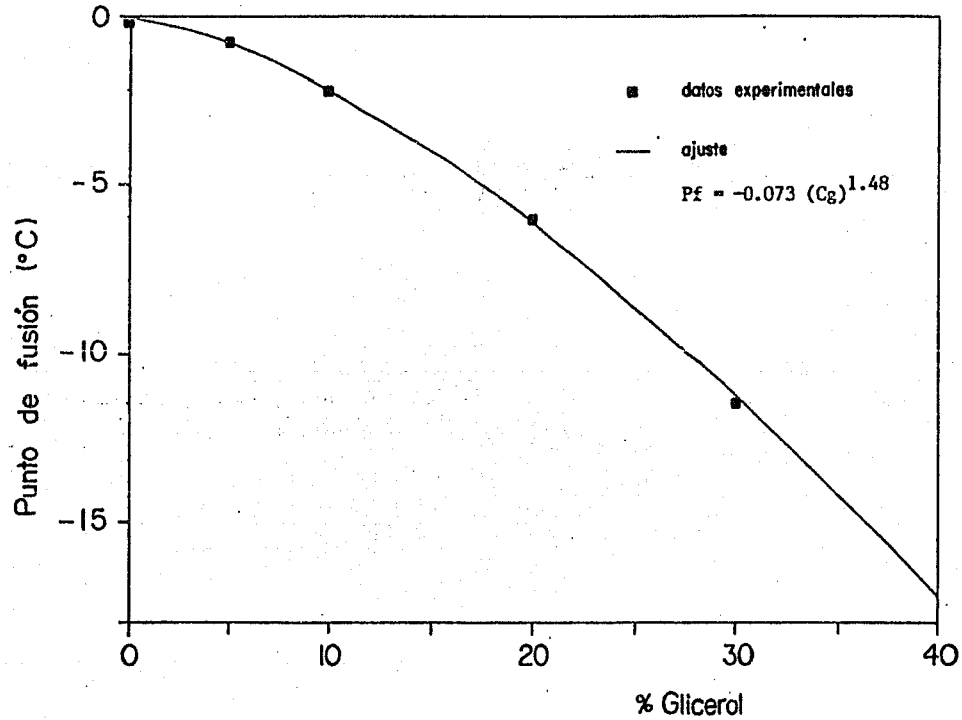


Fig 13. El Punto de fusión disminuye al aumentar la concentración de glicerol (C_g) en MS líquido cuando son colocadas a la misma Text (-14°C), siguiendo la relación Potencial mostrada en la figura.

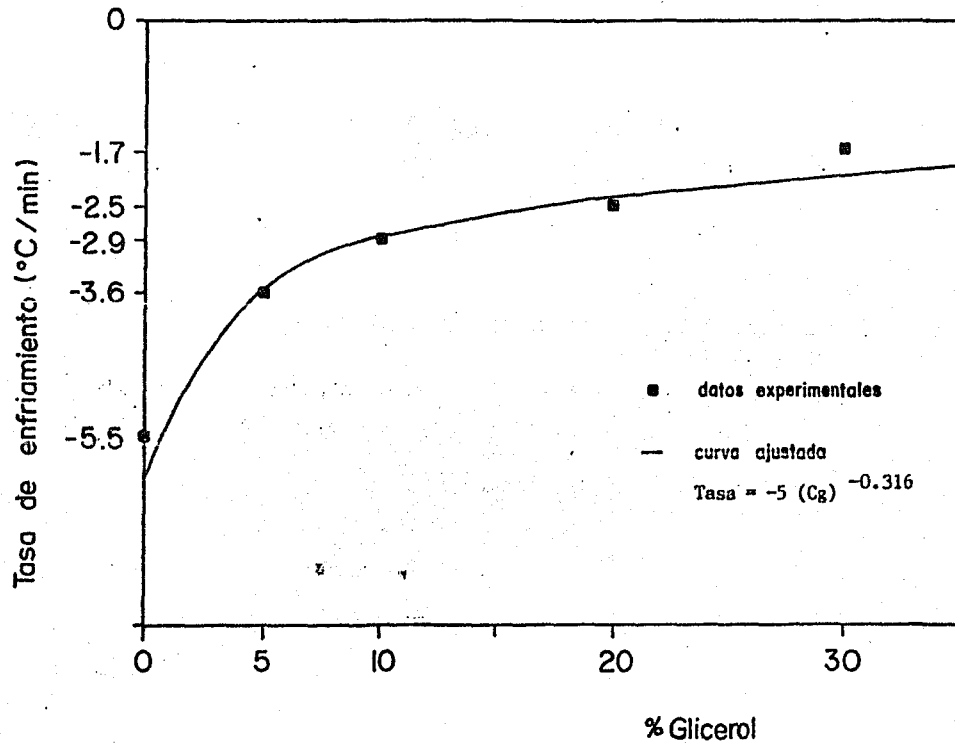


Fig 14. La tasa de enfriamiento disminuye al aumentar la concentración de glicerol en MS líquido desde $-5.5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ Para una concentración del 0% hasta $-1.7\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ Para una concentración del 30%. La Text corresponde a $-14\text{ }^{\circ}\text{C}$ y la ecuación encontrada es la función potencial mostrada en la figura, donde C_g es la concentración de glicerol.

Tabla 3. Comportamiento de una solución de glicerol al 5% en MS líquido colocadas a diferentes T externas. Ver tabla 2 Para la explicación de las abreviaturas.

T ext (°C)	T final (°C)	ΔT (°C)	pf (°C)	Ps (°C)	Tasa de enf. (°C/min)	intervalo (°C)
- 0.3	-19.5	-19.2	-1.2	—	- 1.3	-38 a -14
- 4.0	-26.5	-22.2	0.0	- 7.5	- 1.8	- 2 a -20
- 8.0	-32.0	-24.0	-2.6	- 6.0	- 2.1	- 5.5 a -19.5
- 8.0	-32.0	-24.0	-0.2	- 5.5	- 2.9	- 3 a -20
-13.0	-40.0	-27.0	- 3.0	- 8.5	- 3.6	- 3.8 a -21
-14.0	-38.3	-24.3	-1.0	—	- 3.4	- 2.4 a -22.3
-14.0	-38.6	-24.6	-0.8	-10.5	- 3.6	- 4.5 a -22
-14.0	-43.0	-29.0	-0.8	- 1.0	- 4.5	- 3.3 a -21.5
-15.8	-41	-25.2	-2.0	- 4.5	- 4.0	- 4.5 a -20
-33.8	-70.3	-36.5	-3.5	—	- 7.7	- 3.8 a -19
-48.0	-92.0	-44.0	-3.3	- 3.5	-11.3	- 4.3 a -26.8

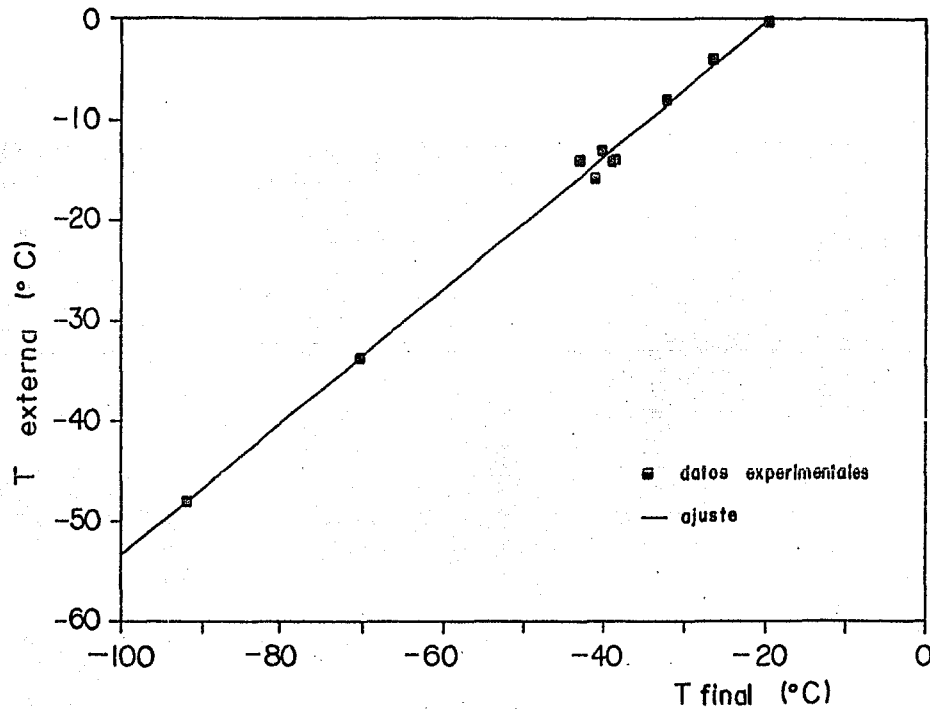


Fig 15. La relación entre la T_{externa} y la T_{final} sigue un comportamiento lineal, donde $T_{\text{externa}} = 0.66 T_{\text{final}} + 12.75$. Los resultados corresponden a una solución de glicerol al 5% (tabla 3).

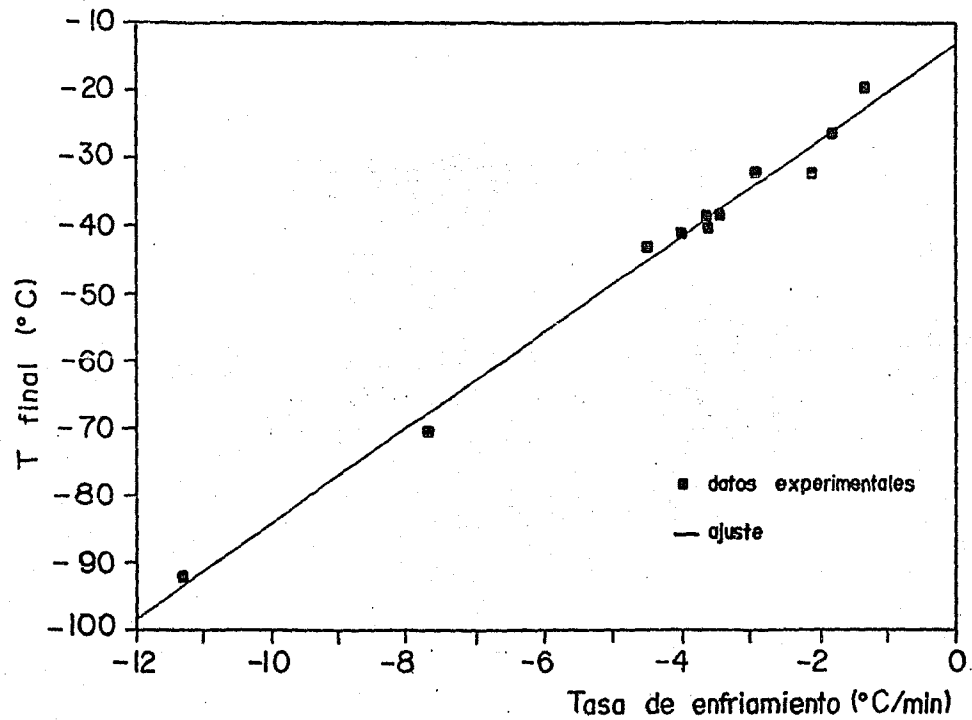


Fig 16. La T_f y la tasa de enfriamiento siguen una relación lineal, donde $T_f = 7.08 \text{ (Tasa)} - 13.24$. Los datos corresponden a una solución de glicerol al 5% (tabla 3). Conociendo T_f para una tasa de enfriamiento determinada, se puede saber la T_{ext} a la cual se debe colocar la solución utilizando la ecuación de la figura 15.

Tabla 4. Comportamiento de distintas soluciones de Glicerol en MS líquido llevadas a una temperaturas finales cercanas a -30 y -40°C. Ver la tabla 2 Para la explicación de las abreviaturas.

[] glicerol %	T ext (°C)	T final (°C)	Δt (°C)	Pf (°C)	Ps (°C)	Tasa de enf. (°C/min)	intervalo (°C)
0	- 7	-30.0	-23.0	+0.6	—	- 3.7	-2 a -20
	-13	-40.6	-27.6	0.0	- 3.5	- 6.7	-2 a -20
5	- 8	-32.0	-24.0	-0.2	- 5.5	- 2.9	-3 a -20
	-14	-43.0	-29.0	-0.8	- 1.0	- 4.5	-3.3 a -21.5
10	- 9	-31.0	-22.0	-2.0	- 3.0	- 2.4	-5 a -20
	-14	-40.5	-26.5	-2.3	—	- 3.4	-6 a -19.3
15	-10	-31.8	-21.8	-3.5	- 4.0	- 1.9	-6.5 a -19.5
	-15	-41.5	-26.5	-4.0	—	- 3.1	-7.5 a -19.5
20	-10	-29.8	-19.8	-5.0	- 5.3	- 1.6	-9.8 a -20.8
	-15	-40.8	-25.8	-5.8	- 6.4	- 2.5	-7.4 a -20

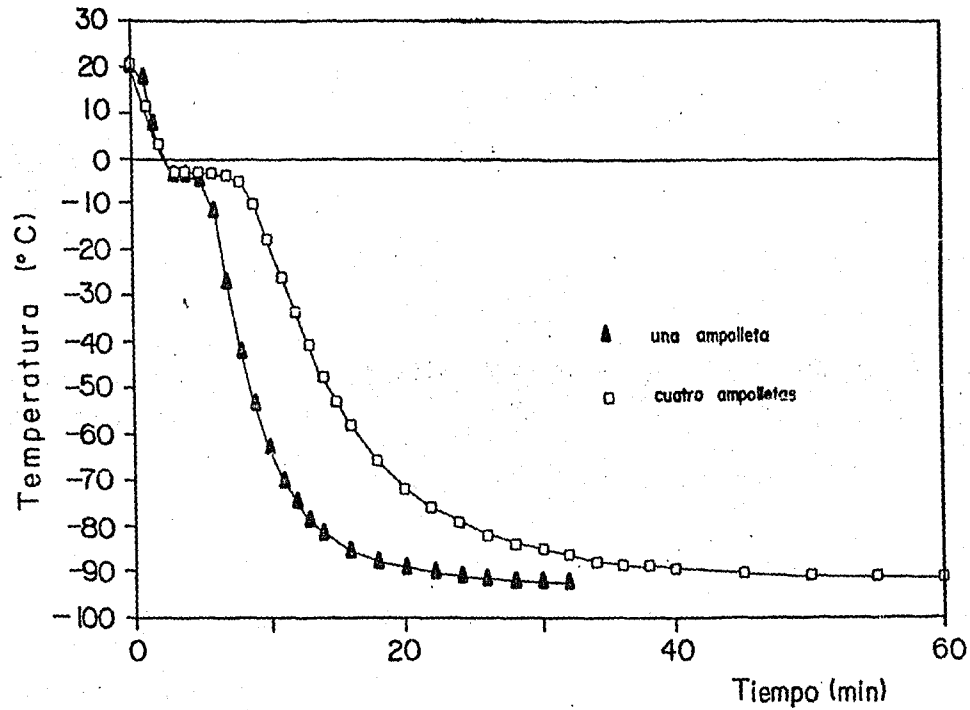


Fig 17. Curvas de enfriamiento de una y cuatro ampolletas con glicerol al 5% a una Text de -48°C . La Tf alcanzada es la misma, Pero la tasa de enfriamiento es mayor Para una que Para cuatro ampolletas (-11.3 y $-7.1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ respectivamente).

V.1.2.2 DISCUSION

En experimentos de criopreservación los explantes no son expuestos directamente en los vapores del NL, son colocados en un sistema acuoso concentrado dentro de un vial de vidrio (ampolleta). Este sistema responde a los vapores del NL de manera distinta a como lo hace el termopar, por lo que se le ha estudiado aparte para conocer su dinámica de enfriamiento y por tanto, de los explantes que serán congelados en este sistema acuoso (soluciones de glicerol en MS).

Se observó un comportamiento típico de enfriamiento (fig 2) en todas las soluciones de glicerol, por lo que se les puede estudiar de acuerdo a la física de las soluciones acuosas concentradas (Franks, 1985) y, por ende, a las propiedades coligativas dependientes de la concentración.

La T_f alcanzada por las soluciones no corresponde a la temperatura de los vapores (Text) a la cual fueron expuestas. El sistema alcanza un equilibrio termodinámico donde la T_f es más baja que la Text. Es posible que esto sea debido a la evaporación continua del NL, sin embargo no se ha encontrado una explicación completa para este fenómeno.

La solución se enfría al ponerla en contacto con los vapores del NL a una tasa de enfriamiento determinada por la conductividad térmica y la capacidad calorífica del sistema (solución + ampolleta). Esta tasa de enfriamiento es inversamente proporcional a la concentración (ver fig 14).

Después de alcanzados los -23°C aproximadamente, la velocidad de enfriamiento empieza a disminuir notablemente hasta ser cero (fig 12). En este punto se alcanza la T_f y se hace evidente la diferencia entre

la capacidad calorífica de una y otra concentración. Entre mayor es la concentración, la T_f alcanzada es más alta, indicando que su capacidad calorífica es mayor.

El grado de sobrefusión de las soluciones varía, ya que está gobernado por la probabilidad de formación de núcleos, es decir, depende de la agregación azarosa de las moléculas de agua, o de factores externos a la solución como el movimiento o la luz (Franks, 1985).

En algunas pruebas de enfriamiento (tablas 2,3 y 4) la sobrefusión está ausente, esto puede ser debido a la formación de núcleos que comienzan el proceso de cristalización e impiden la sobrefusión de la solución, o bien a que los aparatos de medición empleados no son capaces de detectarla, ya sea por la rapidez con la que se presenta o porque es tan pequeña que la resolución del multímetro utilizado no la detecta.

El P_f depende de la concentración de la solución: aumentando la concentración de la solución, disminuye el P_f , siendo la solución saturada la que presenta el P_f más bajo (Landau, 1983; Giese, 1984). Los datos obtenidos en este trabajo concuerdan con esta teoría, ya que el P_f se abate al aumentar la concentración de la solución siguiendo una relación potencial (ver fig 13).

La existencia del soluto dificulta la cristalización, por lo que se presenta una baja en el P_f . Por otro lado, hasta ciertos límites de concentración, la disminución del P_f de la solución no depende en nada de las propiedades del soluto y se determina solamente por la cantidad de sus moléculas (Landau, 1983).

En conclusión se podrá esperar que al utilizar altas concentraciones durante el congelamiento y enfriamiento subsecuente de explantes se Presenten los siguientes resultados:

1. Una menor diferencia entre el Pf y el Ps. Este grado de sobrefusión parece no afectar la sobrevivencia aunque no se ha demostrado convincentemente (Meryman, 1966a).

2. Una disminución coligativa del Pf, aumentando la Probabilidad de encontrar agua no congelada, que al momento de trabajar con explantes servirá como agua estructural y como solvente de sustancias tóxicas, lo cual es altamente deseable (Williams, 1963; Finkle y col, 1985).

3. Una tasa de enfriamiento más lenta que aquella conseguida con bajas concentraciones, la cual permitirá la deshidratación celular evitando la formación de cristales letales intracelulares (Mazur, 1966; Meryman y Williams, 1985).

Si el glicerol actúa como crioprotector intracelular (agente penetrante), será óptimo emplear altas concentraciones de éste Para congelar los explantes (Meryman, 1971).

Si el glicerol no Penetra entonces tendrá que recurrirse a concentraciones bajas y tasas más rápidas de enfriamiento (Meryman, 1971; Meryman et al, 1977).

El estudio del congelamiento y enfriamiento subsecuente de soluciones de glicerol al 5% colocadas a distintas T externas (tabla 3) permitió encontrar la relación existente entre la Text y la Tf alcanzada, siendo ésta una función lineal (fig 15). El coeficiente de correlación encontrado ($r=0.9974$) es muy alto lo cual indica que en el

intervalo estudiado la T_f sólo depende de la T_{ext} .

A pesar de que el número de puntos experimentales es bajo, la ecuación hallada ha sido corroborada experimentalmente ya que permitió predecir con bastante exactitud puntos experimentales (tabla 3).

La T_f y la tasa de enfriamiento también presentan un alto grado de correlación, permitiendo predecir la tasa de enfriamiento si se conoce la T_f que alcanzará la solución (fig 16).

En ambos casos será necesario realizar un mayor número de pruebas para encontrar el intervalo de confianza de las extrapolaciones. Para la T_f parece ser que el intervalo es de ± 1.0 °C y para la tasa de enfriamiento de ± 0.5 °C/min. Este último intervalo si bien es amplio, es bastante aceptable si se toman en cuenta las condiciones del sistema.

Por otro lado, a medida que la T_{ext} es más baja, el ΔT entre la T_{ext} y la T_f alcanzada va aumentando (tabla 3). Esto indica que la capacidad calorífica de la solución va disminuyendo a medida que la T_{ext} es más baja. Iguales conclusiones han sido señaladas por Landau (1983).

Este estudio de una solución al 5% de glicerol puede servir como punto de partida para el análisis de soluciones más concentradas. Como datos adicionales que pueden ser útiles a este fin se presentan los resultados del comportamiento de distintas concentraciones de glicerol llevadas a una T_f de -30 y -40 °C (tabla 4).

El número de ampollitas que se colocan en el termo influye determinantemente en la tasa de enfriamiento de las soluciones, por lo que habrá que efectuar un estudio como el anterior pero utilizando 2 y

4 ampollitas en lugar de una Para Poder Predecir la Tf y la tasa de enfriamiento.

Como una guía se Pueden emplear los resultados mostrados en la figura 17, donde se observa que la Tf tiende a ser la misma Para 1 y 4 ampollitas, sin embargo, el tiempo que tardan en alcanzarla no es igual.

Esto se explica Porque cuando se tiene un mayor número de ampollitas, la cantidad de materia es mayor, tomándole mayor tiempo a los vapores el extraer calor de 4 ampollitas que de una sola.

V.2. PRUEBAS DE TOXICIDAD AL GLICEROL

V.2.1. RESULTADOS

La respuesta morfológica a los 30 días de cultivo in vitro de los explantes sujetos a las distintas concentraciones de glicerol en MS líquido durante un periodo de 24 horas de exposición se muestra en la tabla 5.

La expresión gráfica de estos datos se muestra en la figura 18 A y B, que permiten visualizar mejor el efecto tóxico que produce el crioprotector. La apariencia general de las plántulas obtenidas se puede observar en la figura 19.

Los resultados indican que a medida que aumenta la concentración del glicerol, la respuesta morfológica se aleja cada vez más de una planta normal.

A esta respuesta se le ha llamado "maiformación" y se presenta como un enroscamiento de las hojas sobre sí mismas, ensanchamiento y adquisición de un aspecto rugoso en su superficie, que semeja a simple vista un "callo".

En concentraciones del 15 y 20 % la hoja externa toma un color blanco y no se desarrolla; es una hoja muerta. En estos casos la hoja u hojas internas son las que crecen enroscadas y rugosas, alcanzando una altura no mayor de los 2 centímetros.

En los explantes tratados con glicerol al 10 % se presentan varias respuestas. En algunos casos las plantas forman hojas anchas, enroscadas y rugosas con un crecimiento mayor que en 15 y 20 % (fig 19). En otras es la hoja externa la que toma este aspecto y las hojas

internas logran desarrollarse normalmente; a esta respuesta también se le consideró como malformación. Sólo un número reducido de explantes logra formar Plantas normales.

Las Plantas Provenientes de un tratamiento con 5% de Glicerol no Presentan malformaciones, lo que sí se observa es una ligera disminución en la talla. Es Probable que esta disminución del crecimiento sea resultado del tiempo que le toma a la Planta el recuperarse de la acción causada Por el crioprotector.

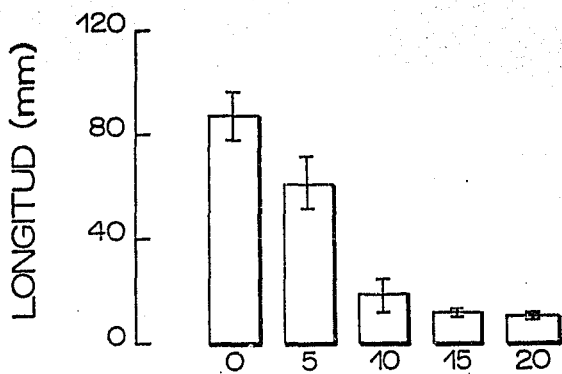
Debido a la toxicidad del crioprotector a concentraciones del 10, 15 y 20 % en tiempos Prolongados de exposición, se efectuó una Prueba sujetando los explantes una hora al crioprotector.

Los resultados de esta Prueba se muestran en la tabla 5 y la figura 20. En este caso no se Presentan malformaciones y el tamaño de las Plántulas tratadas es semejante al testigo.

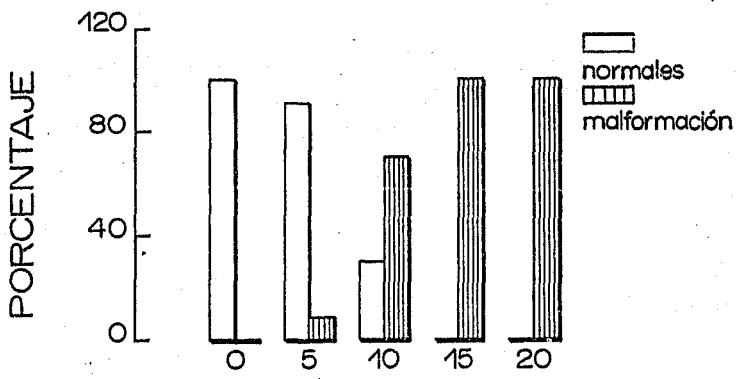
La adición y eliminación del glicerol se llevó a cabo rápidamente, contrario a lo que se recomienda en la literatura. Sin embargo, estos resultados indican que más que la forma de adición-eliminación del crioprotector, es el tiempo de exposición lo que está afectando a los explantes.

Tabla 5. Longitud y grado de malformación de explantes de B. sativum expuestos a distintas concentraciones de glicerol en MS líquido durante una y 24 horas expresados en Promedios y Porcentajes. Los explantes tienen 30 días de cultivo in vitro en medio MS sin crioprotector.

Tiempo expos.	[]	x longitud (mm)	(n-1)	talla X	Plantas normales	X	Malformación	X
1 hora	0	92	15	100	12/12	100	0/12	0
	10	111	24	120	3/3	100	0/3	0
	15	98	26	107	4/4	100	0/4	0
	20	98	10	107	22/22	100	0/22	0
24 horas	0	87	9	100	7/7	100	0/7	0
	5	61	10	76	10/11	91	1/11	9
	10	18	6	21	3/10	30	7/10	70
	15	11	1	13	0/10	0	10/10	100
	20	10	1	12	0/9	0	9/9	100



A. [] GLICEROL (%)



B. [] GLICEROL (%)

Fig 18A-B. Efecto del tratamiento de *Spices* con Placa basal de *H. sativum* con distintas soluciones de glicerol en MS líquido durante 24 horas, sobre la longitud (18A) y morfofisiología de las plantas (18B) a los 30 días de cultivo *in vitro*.

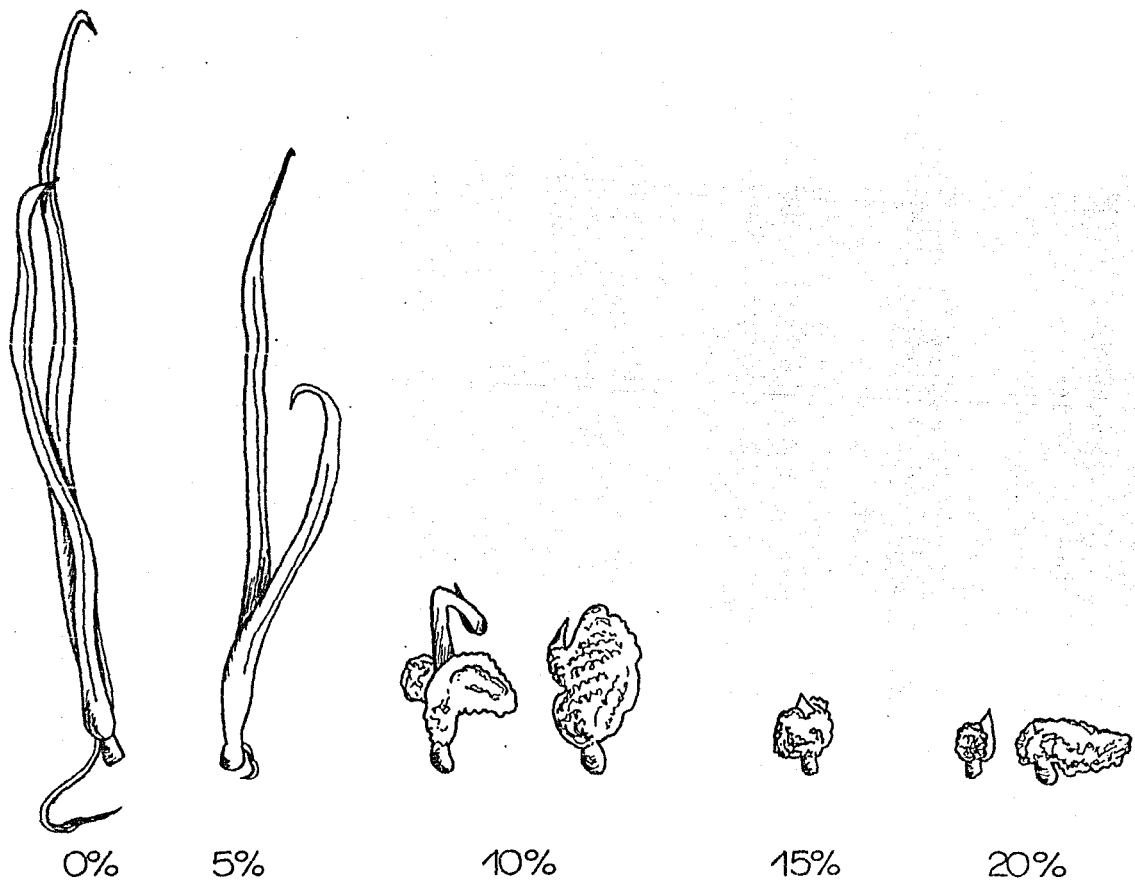


Fig.19. Aspecto general a los 30 días de cultivo in vitro de las plantas obtenidas después del tratamiento con las distintas concentraciones de glicerol por un periodo de 24 horas. Solo los ápices tratados con glicerol al 5% se logran recuperar por completo.

ESTM TROP NO PROP
SALUD DE LA AMÉRICA
MEXICANA

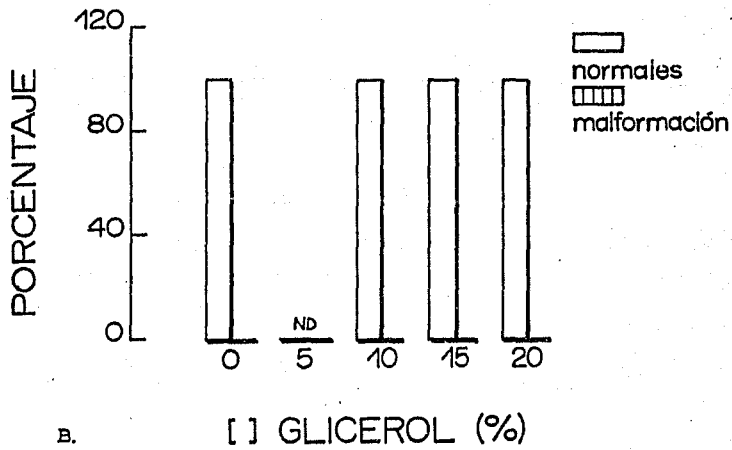
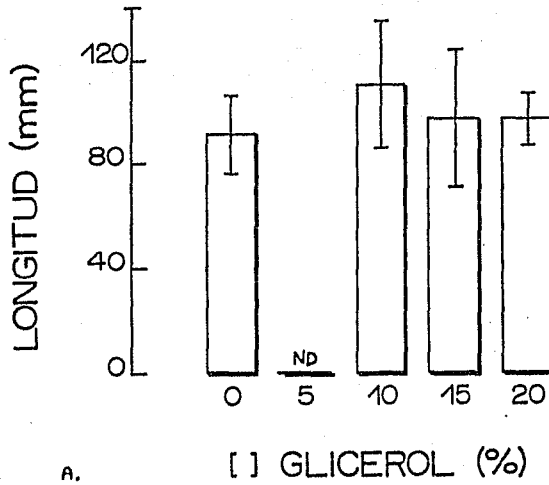


Fig 20A-B. Efecto del tratamiento de ápices con Placa basal de *B. sativum* con distintas soluciones de glicerol en MS líquido durante una hora, sobre la longitud (20A) y morfofisiología de las Plantas (20B) a los 30 días de cultivo *in vitro*. Nd significa no determinado.

V.2.2 DISCUSION

Aunque el glicerol ha demostrado no ser tóxico en altas concentraciones en ciertos tipos celulares, existen otras especies en las cuales el efecto tóxico sí se presenta (Meryman, 1971).

La toxicidad que puede provocar el crioprotector es función de la naturaleza química del mismo, la concentración a la cual se encuentra, el tiempo de exposición al cual se somete el explante, el grado de sensibilidad de la especie en estudio y el tipo de explante empleado (Kantha, 1985).

Cuando los ápices con placa basal de Allium sativum son expuestos durante 24 horas a concentraciones de glicerol del 10, 15 y 20%, se manifiestan efectos tóxicos como disminución de la talla y malformación. Este efecto tóxico puede ser debido, en parte, al choque osmótico prolongado causado por la lenta difusión del glicerol al interior celular (Meryman y Williams, 1985); y por otro lado, a la concentración de glicerol que logra penetrar al interior celular, la cual sobrepasa los límites tolerables provocando daños sobre el metabolismo.

Cuando el explante es colocado en soluciones hipertónicas, las células sufren deshidratación o plasmólisis y el protoplasto de cada célula se retrae alrededor de su o sus vacuolas. Al mismo tiempo se produce un intercambio de moléculas de agua y moléculas de soluto a través de la membrana plasmática entre el interior y el exterior celular. A medida que entran moléculas de soluto en las células, el agua, a su vez, entra hasta que se restituye el volumen celular normal.

Si el soluto entrara rápidamente esta rehidratación o deplasmólisis se produciría con rapidez (Giese, 1984).

Las consecuencias de la deshidratación son complejas para el protoplasma vivo. La primera consecuencia directa consiste probablemente en la pérdida de moléculas de agua que actúan como capas protectoras alrededor de las micelas coloidales, sobre las membranas y sobre la estructura terciaria de las proteínas (Bidwell, 1979).

Las moléculas de agua actúan no sólo como un solvente para sustancias químicas sino como espaciadores que ayudan a mantener los fluidos complejos en una configuración estable. Cuando son eliminadas, las partículas o superficies con carga se aproximan entre sí. No sólo se concentran las soluciones sino que las superficies coloidales reactivas se aproximan unas a otras hasta que se unen y éstas se desnaturalizan (Bidwell, 1979).

El desbalance de los procesos bioquímicos causado por las concentraciones de metabolitos anormalmente altas, pueden contribuir a la desorganización molecular. Los iones en solución forman una esfera de moléculas de agua alrededor de ellos por atracciones dipolo, y una alta concentración de sales puede dar como resultado que el agua libre se asocie a las mismas, haciéndola no disponible para la estabilización de las macromoléculas celulares, y provocando la precipitación de proteínas (Connor y Ashwood-Smith, 1973). El mismo resultado puede ser por los cambios de pH celular causados por la concentración de solutos ionizados ácidos o básicos. (Bidwell, 1979).

La plasmólisis no necesariamente daña en forma permanente a las células. Si éstas se colocan de nuevo en una solución hipotónica,

recuperan rápidamente el agua perdida y su turgencia mediante ósmosis. Si el periodo y la severidad de la plasmólisis no son demasiado grandes, las células probablemente no se dañarán. (Sidwell, 1979).

En el caso del glicerol, los resultados (tabla 5) indican que su penetración es muy lenta, lo que trae como consecuencia una deshidratación prolongada donde la deplasmólisis ocurre lentamente. A medida que aumenta la concentración de la solución en la cual son colocados los explantes, el grado de deshidratación celular es mayor.

Cuando el tiempo de exposición a estas condiciones es corto (una hora), el daño causado por deshidratación es aún reversible; así mismo, la entrada de moléculas de glicerol es limitada, debido a su lenta difusión. Es por esto que no se presentan efectos tóxicos (tabla 5, fig 20).

Cuando el tiempo de exposición es de 24 horas, a concentraciones mayores del 5% se manifiesta daño por deshidratación prolongada. Así mismo, el tiempo es suficiente para que penetre una mayor cantidad de moléculas de glicerol al interior celular. A concentraciones mayores en la solución, existirá un mayor influjo de glicerol. Posiblemente, con glicerol al 5% la concentración interna alcanzada no sea tóxica, mientras que al 10, 15 y 20% la concentración interna sea lo suficientemente alta como para actuar negativamente en el metabolismo celular.

Después de transcurrido el tratamiento (1 y 24 horas), se efectuó un lavado rápido de 5 minutos. Este lavado sólo elimina el glicerol externamente.

Cuando el tiempo de exposición es de 1 hora, el glicerol se encuentra en cantidades no tóxicas en el interior celular. Este lavado

es suficiente para eliminar el glicerol externo. Los explantes se siembran y su desarrollo es normal.

Cuando el tiempo de exposición es de 24 horas, la concentración interna de glicerol es mayor, y su eliminación no es posible con un lavado de 5 minutos por su lenta difusión (Meryman y Williams, 1985). Por tanto, aunque se elimine el glicerol externo, los explantes son sembrados con concentraciones tóxicas en su interior. Al paso del tiempo se observa que los explantes colocados al 5% son los únicos que se recuperan del daño por deshidratación y toxicidad; mientras que los explantes sujetos a concentraciones mayores sufren daños irreversibles.

En ambos casos el daño por lisis hipotónica durante el lavado es evitado por la presencia de la pared celular, la cual limita el volumen e impide que entre un exceso de agua (Giese, 1984; Meryman y Williams, 1985).

Si lo que está afectando a los explantes es el tiempo prolongado de exposición en altas concentraciones, se puede eliminar la posibilidad de que el efecto tóxico sea provocado por la forma de adición y eliminación del crioprotector. Esto se ve reforzado al observar los resultados para un tiempo de exposición de una hora, donde no hay daño incluso al 20% (tabla 5, fig 20). Se puede decir que las células toleran la deshidratación rápida causada por la adición directa de las distintas concentraciones, así como la rehidratación rápida causada al colocar los explantes en medio sin crioprotector.

La adición y eliminación por pasos sería útil si el glicerol penetrara y saliera rápidamente de las células, tal como ocurre en algunas células animales. En este caso, donde el glicerol difunde

lentamente, el Proceso de adición y eliminación por Pasos se Prolongaría demasiado, llevándose varias horas, lo cual resulta Poco Práctico.

El Glicerol ha sido ampliamente reportado como un agente crioprotector Penetrante en células de animales (Hunter, 1978; Meryman, 1971; Mc Gann, 1978; Altamirano, 1985). No obstante, en células de vegetales el Glicerol Penetra Pobremente, por lo que se requieren tiempos Prolongados de exposición para alcanzar una concentración interna lo suficientemente alta para Proteger contra el daño por congelamiento (Kantha, 1980; Meryman y Williams, 1985).

Se ha encontrado que en células de animales la Permeabilidad al Glicerol es alta a 20°C (Mc Gann, 1978). Sin embargo, existen otras variables que determinan la tasa de difusión de los compuestos tales como la electronegatividad y el tamaño molecular.

Las sustancias no electrolíticas tienden a difundir a través de membranas a una tasa más o menos Proporcional a su solubilidad en agua, e inversamente Proporcional a su tamaño molecular (Bidwell, 1979; Giese, 1984).

Si la molécula que entra en una membrana celular es muy soluble en agua, deben romperse sus Poderosos enlaces de hidrógeno con el agua en la que se encuentra disuelta fuera de la célula antes que pueda entrar en la membrana lipídica, por eso es que para las moléculas hidrosolubles el Paso hacia la membrana celular y a través de la misma es difícil y requiere gasto de energía (Giese, 1984). El Glicerol Presenta tres Grupos OH siendo altamente Polar; es completamente miscible en agua y forma con ésta seis Puentes de hidrógeno (Giese,

1984). Dadas estas características es de esperar una tasa de difusión lenta a través de la membrana.

A medida que las moléculas Presentan un diámetro más Grande, tienen menores Posibilidades de entrar Por la membrana Plasmática. Una molécula de agua tiene un diámetro de 0.3 nm, una molécula de urea 0.36 nm, una molécula de glicerol 0.62 nm y una molécula de glucosa 0.86 nm. La Permeabilidad de estas moléculas disminuye al aumentar el diámetro.

Giese (1984) hace referencia a un estudio efectuado Para determinar las constantes de Permeabilidad Para 16 especies de células vegetales respecto a la entrada de diversas sustancias, entre ellas etilenglicol, urea y glicerol, se encontró que aunque la constante de Permeabilidad no es la misma Para especies diferentes, las células de cada una de estas especies suelen tener el mismo orden relativo de Permeabilidad Para las distintas sustancias, siendo el etilenglicol el más Permeable, seguido de la urea, glicerol y eritritol. La constante de Permeabilidad (K ; $K = \text{moles de sustancia que entran Por micra cuadrada Por segundo} / \text{moles de diferencia de concentración de la sustancia } S \text{ entre el exterior y el interior}$) encontrada Para el glicerol cae en un intervalo entre 10^{-2} y 10^{-5} (Giese, 1984). Desafortunadamente el intervalo es muy amplio como Para dar una idea de la Permeabilidad del glicerol en el ajo mediante extrapolación, y no existe un método hasta ahora Para Predecir qué volumen de glicerol Puede entrar (Giese, 1984). Para conocer la Permeabilidad del ajo al glicerol, se Puede efectuar una Prueba que indique el tiempo en el cual se deplasmolizan células sujetas a distintas concentraciones del mismo, es decir, el ritmo de entrada del soluto (Giese, 1984).

El éxito obtenido cuando se utiliza glicerol como crioprotector en eritrocitos, a pesar de su tasa de difusión relativamente lenta, puede ser atribuido al hecho de que las células rojas poseen un mecanismo de transporte facilitado para el glicerol con un tiempo medio de penetración a 37°C de 15 segundos aproximadamente; aún así, la tasa de difusión del agua es varias veces más rápida que la del glicerol, creándose gradientes osmóticos dañinos durante su introducción y eliminación (Meryman y Williams, 1985).

La mayoría de las células no poseen un mecanismo de transporte facilitado y la difusión transmembrana del glicerol es relativamente lenta con un tiempo medio de 3 a 4 minutos o más. Particularmente el glicerol penetra pobremente a las células vegetales. (Meryman y Williams, 1985).

Aunado a esto, la existencia de pared celular está retardando, aunque en mucho menor grado, el paso del glicerol. Holtzman y Novikoff (1986), mencionan que la matriz de la pared celular es rica en polisacáridos, principalmente hemicelulosas y pectinas altamente hidrofílicas. Esta red de polisacáridos capta y fija agua, formando un gel, cuya densidad y consistencia afecta la capacidad de las moléculas para atravesar la membrana plasmática de la célula. Antes de llegar a la membrana plasmática, el glicerol tiene que atravesar este gel de polisacáridos lo cual retarda aún más su penetración al interior celular.

Comparada con el plasmalema, la estructura entrecruzada de la pared celular impide sólo ligeramente la difusión de pequeñas moléculas como el agua y el azúcar. Por ejemplo, en una célula con una pared de 15 nm de ancho, el 10% de la resistencia al flujo del agua entre el

citoplasma y el medio externo está dado por la Pared; y el restante 90% es debido a la membrana Plasmática (Alberts, 1983). Como el Glicerol es una molécula más grande que el agua, Podría esperarse una resistencia un poco mayor por parte de la Pared celular, aunque el Porcentaje más alto podría aportarlo el Plasmalema.

La morfología y la química de la membrana y Pared celulares varía considerablemente según las especies y los tejidos (Holtzman y Novikoff, 1986); es por eso que se tiene una amplia gama de Permeabilidad al Glicerol, y, en general, a todos los compuestos.

Para establecer un método Práctico de criopreservación, el uso de material altamente organizado y estructurado, por ejemplo brotes apicales en lugar de células en suspensión, es considerado como más deseable para lograr una rápida regeneración de las plantas sin cambios en la citología cromosómica y el potencial morfogénico (Harada *et al.*, 1985).

Los Problemas en la Permeabilidad se amplifican cuando uno progresa de una simple suspensión celular hasta tejidos u órganos, donde los agentes deben alcanzar células distantes por difusión a través de las membranas mediadoras (Meryman, 1971). La Penetración del Glicerol es muy lenta en material vegetal estructurado y organizado (Harada *et al.*, 1985).

En los experimentos efectuados en este trabajo, el ápice con su placa basal es bañado en toda su superficie por la solución de crioprotector, por lo que las células expuestas directamente se deshidratan y crean un gradiente osmótico el cual provoca que las células más internas se deshidraten y así sucesivamente. Al mismo

tiempo el glicerol comienza a penetrar pero es fuertemente impedido por la matriz de la pared celular y el plasmalema. Su difusión hacia el interior celular y al interior del tejido es lenta y sólo con tiempos muy prolongados se puede esperar que difunda por todo el tejido. Mientras tanto, la deshidratación del tejido y el tiempo de exposición a la misma, pueden ser lo suficientemente severos como para causar daños irreversibles.

V.3. CONGELAMIENTO DE EXPLANTES

V.3.1. RESULTADOS

Las figuras 21, 22 y 23 muestran las curvas de enfriamiento de los explantes tratados con glicerol al 20% durante una hora. La tabla 6 resume estas curvas.

En el primer caso los explantes fueron llevados a una T_f de -28°C , dejándose a esa temperatura por 20 minutos antes de la inmersión en NL. La tasa de enfriamiento fue de $-0.6^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

El segundo congelamiento fue igual al anterior pero los explantes permanecieron a -28°C durante 40 minutos antes de sumergirlos en NL.

En la tercera prueba los explantes se llevaron hasta -38°C y se mantuvieron a esa temperatura por 20 minutos antes de llevarlos a NL. La tasa de enfriamiento en esta ocasión fue de $-1.0^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

Las tasas obtenidas en estos experimentos fueron menores a la esperadas para el enfriamiento de una sola ampollita, ya que se congelaron cuatro ampollitas juntas.

En ninguno de los tres casos se obtuvo sobrevivencia como se indica en la tabla 7.

Tabla 6. Comportamiento de las soluciones de glicerol al 20% en MS líquido, en las cuales fueron congelados los explantes (4 ampollitas). Para las abreviaturas ver tabla 2.

No Exp	Duración de la T constante	T ext	Tf	Δt	Pf	Ps	Tasa	intervalo
1	20 min	-12.0	-27.8	-15.8	-2.6	—	-0.6	-5.8 a -20.3
2	40 min	-12.3	-27.5	-15.2	-4.5	-4.8	-0.6	-7.1 a -20.3
3	20 min	-16.5	-37.8	-21.3	-6.0	-7.3	-1.0	-10.3 a -20.5

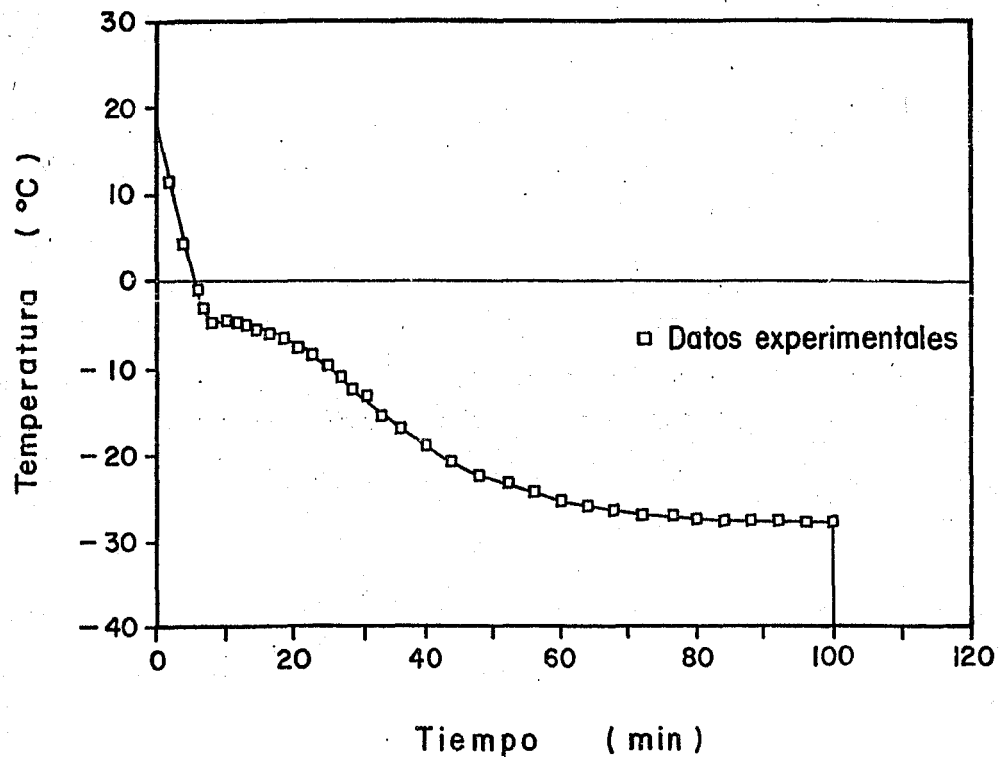


Fig 21. Enfriamiento de explantes llevados a -28°C con una tasa de enfriamiento de $-0.6^{\circ}\text{C}/\text{min}$ y un periodo a temperatura constante de 20 minutos antes de la inmersión en NL.

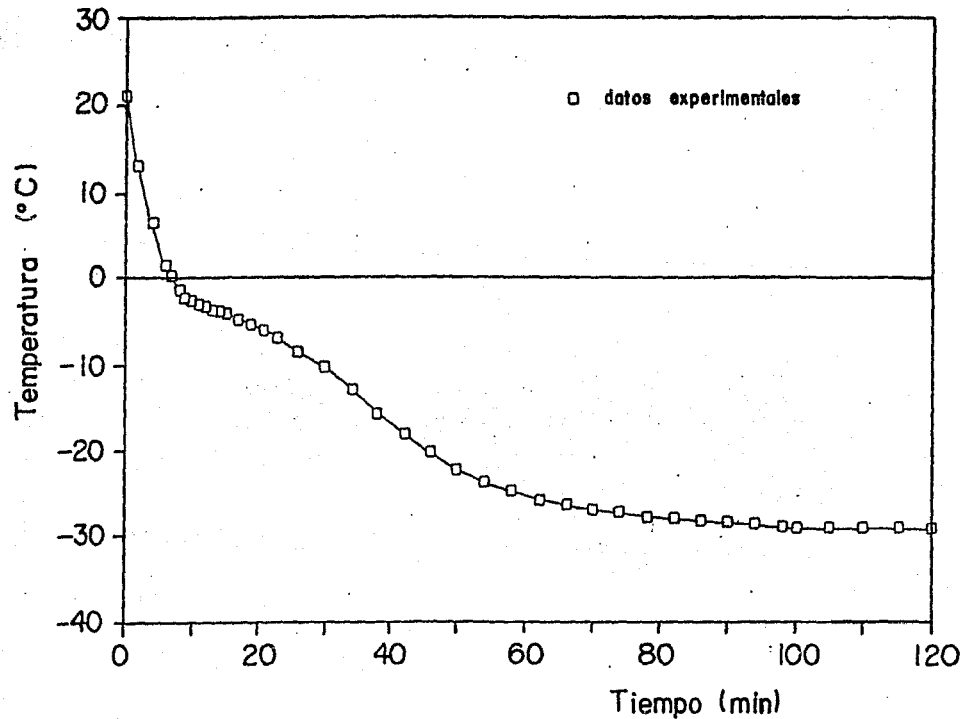


Fig 22. Enfriamiento de explantes llevados a -28°C con una tasa de enfriamiento de $-0.6^{\circ}\text{C}/\text{min}$ y un periodo a temperatura constante (-28°C) de 40 minutos antes de la inmersión en NL.

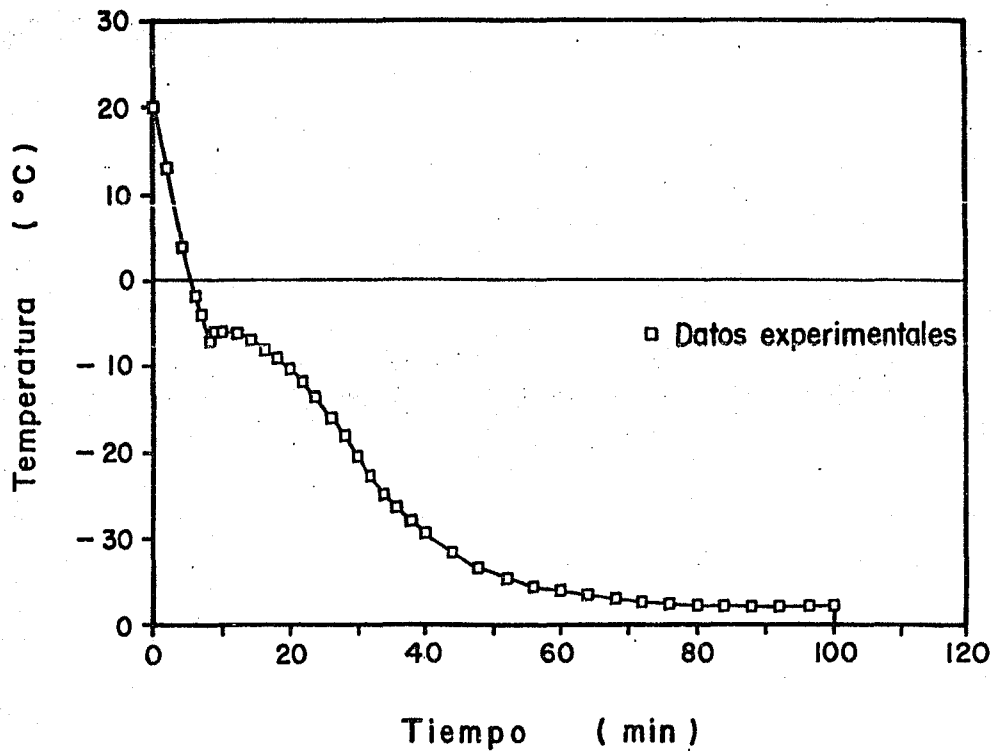


Fig 23. Enfriamiento de explantes llevados a -38°C con una tasa de enfriamiento de $-1.0^{\circ}\text{C}/\text{min}$ y un periodo a temperatura constante (-38°C) de 20 minutos antes de la inmersión en NL.

Tabla 7. Porcentaje de sobrevivencia de explantes tratados con una solución de glicerol al 20% en MS líquido durante una hora; llevados a una temperatura constante (Tcte) previa a la inmersión en NL de -28 y -38°C y un tiempo de almacenamiento en NL de una hora.

T final (C°)	Duración de la exposición a Tcte	Sobrevivencia testigos (30 días)	‡	Sobrevivencia experimental (30 días)	‡
- 28	20 min	5/5	100	0/16	0
- 28	40 min	5/5	100	0/15	0
- 38	20 min	7/7	100	0/20	0

V.3.2. DISCUSION

Al utilizar una concentración de glicerol al 20% durante una hora de exposición, una tasa lenta de enfriamiento y una temperatura previa a la inmersión en NL de -30 y -40 °C no se obtuvo sobrevivencia en los explantes (tabla 7).

Cuando se trabaja con DMSO (agente penetrante) en condiciones similares la respuesta de los explantes es positiva, incluso manteniéndolos hasta por una hora a temperatura constante antes de la inmersión en NL (López, 1988). Estos resultados indican que el DMSO penetra a las células, evitando un choque osmótico y brindando una protección coligativa eficiente.

Los resultados obtenidos con el glicerol refuerzan la idea de que su penetración es muy lenta. Con una hora de exposición la cantidad de moléculas de glicerol que ha logrado penetrar es insuficiente para conferir protección coligativa intracelular.

La acción protectora del DMSO parece estar ligada a sus propiedades coligativas, debido a que reduce la cantidad de hielo formado a cualquier temperatura durante el enfriamiento, y por tanto, pospone un incremento en las condiciones de fuerza iónica a temperaturas más bajas, donde el daño a la célula es retardado. Como la célula es permeable al DMSO, éste no contribuye al gradiente osmótico a través de la membrana celular, por lo que no existe daño por choque osmótico (Mc Gann, 1978; López, 1988).

Como el glicerol difunde lentamente a través de las membranas, puede estar actuando de manera similar a los polímeros como el hidroxietil almidón (HES) (Mc Gann, 1978). El HES no penetra a la

célula por lo que cuando el agua es removida de la solución en forma de hielo, se va concentrando solamente en las regiones extracelulares, mientras que otros solutos se vuelven más concentrados dentro y fuera de la célula. El HES por sí mismo es el responsable de un choque osmótico sobre la célula, que resulta en la pérdida de agua celular a temperaturas bajo cero. La protección contra un mayor enfriamiento es obtenida por una disminución del volumen celular o contracción osmótica debido al aumento en concentración del HES en la región extracelular. Sin embargo, si la concentración de HES en el medio extracelular es alta, puede provocarse un encogimiento celular excesivo (Mc Gann, 1978).

El glicerol aumenta su concentración a medida que la solución se congela, llegando hasta un 50% más a una temperatura de -40°C (Meryman, 1971). Si el glicerol actúa como el HES, este aumento en la concentración puede traer consigo un fuerte choque osmótico sobre los explantes, los cuales se deshidratan más allá de un grado tolerable y pierden su viabilidad.

El intervalo crucial sobre el cual la temperatura debe ser controlada para los agentes no penetrantes como el HES puede encontrarse entre -5 y -20°C , y un enfriamiento lento abajo de -20°C sólo puede contribuir a un daño adicional a las células (Mc Gann, 1978).

Los explantes fueron llevados hasta temperaturas de -30 y -40°C a tasas lentas de enfriamiento, incluso fueron mantenidos a esas temperaturas por 20 y 40 minutos. Si el glicerol se encontró en altas concentraciones en el medio extracelular, este procedimiento de enfriamiento contribuyó a una excesiva deshidratación tanto por las

tasas lentas, las temperaturas previas a la inmersión en NL por abajo de -20°C , como por el tiempo de exposición a dichas temperaturas.

Una deshidratación severa puede provocar la remoción del agua que es necesaria para mantener la estructura macromolecular de proteínas y membranas, proceso que puede ser amplificado por la presencia de iones en la solución (Connor y Ashwood-Smith, 1973).

Por otro lado, cuando la plasmólisis, resultado de la deshidratación, excede un límite crítico, ocurre una pérdida de material de membrana que ya no puede ser recapturado. Esta existencia de un volumen crítico asociado con el daño a la membrana en células de vegetales está bien fundamentado (Meryman *et al*, 1977).

La permeabilidad al glicerol ha sido examinada por Mc Gann (1978) en células de animales (glóbulos rojos de bovinos) y las conclusiones generales parecen ser que el glicerol no necesita penetrar a la célula para ofrecer protección. La penetración de un aditivo a las células no es un prerrequisito para la acción protectora.

Kartha (1980) obtuvo sobrevivencia de meristemas de fresa utilizando un precultivo de 3 días en medio adicionado con glicerol al 5% y una velocidad de enfriamiento de $-0.94^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta -40°C antes de la inmersión en NL. Un incremento en la concentración de glicerol en el precultivo o después, en la solución para congelar, sólo resultó en una pérdida de viabilidad.

Sus resultados indican que se requiere un tiempo prolongado de exposición por la reducida permeabilidad de los explantes al glicerol, y una concentración baja del mismo para conferir protección contra el congelamiento.

El glicerol actúa como crioprotector no penetrante en ápices con

Placa basal de Allium sativum con una hora de exposición. Por tanto, existe una mayor Probabilidad de sobrevivencia si se toman en cuenta las siguientes consideraciones:

1. Debe trabajarse en bajas concentraciones (5%), y tiempos cortos de exposición.

2. La tasa de enfriamiento debe ser más rápida. Pudiéndose encontrar desde $-1.0^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

3. La temperatura Previa a la inmersión deberá estar en un intervalo entre -10 y -20°C .

4. Deberá eliminarse el Periodo de exposición a temperatura constante antes de la inmersión en NL.

De esta forma se deshidratarán los explantes hasta un grado que sea tolerable y que impida la formación de hielo intracelular.

El tipo de explante utilizado en el presente estudio es problemático debido a la existencia de varias capas celulares, lo cual impide que todas las células estén en contacto con la solución crioprotectora, como en el caso de células en suspensión.

No obstante, existen menos riesgos de dañar la información genética, y se pueden obtener plantas completas relativamente fácil y rápido comparado con callos y células en suspensión.

Si se quiere lograr la criopreservación de material vegetal organizado de ajo, el glicerol no es recomendable si se le emplea solo, por su lenta tasa de difusión.

El candidato más deseable es el DMSO (López, 1988), aunque se ha reportado que la mezcla de crioprotectores externos e internos puede traer consigo aumento en la viabilidad. El uso del glicerol no debe

descartarse, ya que puede ser efectivo en dichas mezclas.

VI. CONCLUSIONES GENERALES

El sistema de enfriamiento desarrollado permite lograr tasas lentas de enfriamiento, con un control entre -0.5 °C/min y -10 °C/min, no obstante que el equipo es poco refinado.

Así mismo, el costo del sistema es bajo y por lo tanto el método es factible de ser utilizado casi en cualquier laboratorio.

El termo empleado en este estudio es de importación, pero en México se están fabricando termos similares. Sería muy provechoso aplicar el mismo estudio realizado en el presente trabajo a un termo nacional, pues su uso abarata los costos y al mismo tiempo se impulsa el empleo de tecnología mexicana.

En general, si se requieren tasas lentas de enfriamiento deberá utilizarse una concentración alta de crioprotector, una temperatura externa alta, y/o un mayor número de ampollitas.

Si se requieren tasas rápidas deberá emplearse una concentración baja de crioprotector, una temperatura externa baja, y/o un número menor de ampollitas.

El método usado para estudiar una solución de glicerol al 5% deberá

ser aplicado a las distintas concentraciones Para Poder Predecir la Tf y la Tasa de enfriamiento.

El mismo Procedimiento Puede ser utilizado Para conocer el comportamiento de otros tipos de crioprotector.

El número de ampollitas que se colocan en el termo influye determinantemente en la tasa de enfriamiento de la solución, por lo que habrá que efectuar un estudio como el presente utilizando 2 y 4 ampollitas en lugar de una para poder predecir la Tf y la Tasa de enfriamiento.

Es importante mantener un registro del enfriamiento de las soluciones para conocer la dinámica de enfriamiento de los explantes. Esto se ha logrado colocando un termopar en una de las ampollitas que se someten al congelamiento. Sin embargo, se requiere la presencia del experimentador para obtener las lecturas del multímetro y su transformación a grados centígrados. Esta parte del trabajo puede ser realizada por una computadora conectada al sistema de enfriamiento. Los costos aumentan pero el trabajo se acelera.

Otra opción consiste en tener bien definido el comportamiento de las distintas soluciones de acuerdo a la altura sobre el nivel de NL y el número de ampollitas, de manera que al colocar los explantes bajo las mismas condiciones se pueda saber su dinámica de enfriamiento remitiéndose a estas curvas patrón. Aquí sí es imprescindible mantener la cantidad de NL constante para que el perfil de temperatura no cambie. Este parece ser el mecanismo bajo el cual funciona el "LR-33 Biological Freezer-6" (Reinert y Bajaj, 1977).

Independientemente de lo anterior, tendrá que idearse un mecanismo similar al del "LR-33 Biological Freezer-6" que permita colocar las ampollitas y el termopar a la altura deseada con exactitud. De esta manera se asegurará una buena reproducibilidad en los experimentos.

Al estudiar la toxicidad del glicerol sobre los explantes y efectuar las pruebas de congelamiento se llegó a las siguientes conclusiones.

Por ser un compuesto altamente polar y de diámetro relativamente grande, el glicerol difunde lentamente a través del Plasmalema de las células vegetales. Aunado a esto, no existe un mecanismo de difusión facilitada que lo transporte al interior celular y la matriz gelatinosa de la pared celular forma una barrera extra para la penetración del mismo.

Para lograr la difusión del glicerol en ápices con placa basal de Allium sativum se requieren tiempos de exposición prolongados, sin embargo, resulta ser tóxico a concentraciones mayores del 5%.

Puede emplearse como crioprotector extracelular, aún en altas concentraciones, si el tiempo de exposición es corto.

Si se le desea emplear como agente no penetrante se sugiere el uso de bajas concentraciones y tiempos cortos de exposición; así como tasas de enfriamiento más rápidas y temperaturas previas a la inmersión en NL entre -10 y -20°C .

Estudios posteriores tratando al glicerol de esta manera, pueden ayudar a definir si la teoría para los aditivos extracelulares es correcta y aplicable al glicerol cuando se adiciona sobre ápices con

Placa basal de Allium sativum en Periodos cortos de exposición.

El empleo del glicerol puede ser benéfico cuando se manejan células en suspensión, Protoplastos o células animales, Pero es muy limitado en el caso de material organizado de origen vegetal. Por esta razón se sufiere trabajar la zona meristemática, cuyo tamaño es del orden de unos milímetros Permitiendo mayor contacto con la solución crioprotectora. Para esto será necesario contar previamente con un medio de cultivo adicionado con reguladores del crecimiento, que permita la regeneración masiva de plantas.

A pesar de las desventajas encontradas al utilizar el glicerol como único crioprotector, éste puede ser muy útil si se le combina con un agente penetrante como el DMSO para llevar a cabo el congelamiento cinético.

Aunque los estudios iniciales pueden efectuarse con tiempos cortos de exposición en NL, deben realizarse pruebas de viabilidad con tiempos prolongados para asegurar, con bases experimentales, la efectividad del almacenamiento en NL.

El presente estudio puede tener importancia y proyección en el área del almacenamiento de material biológico cuyo germoplasma no es factible de ser guardado por los métodos tradicionales, ya que presenta un procedimiento de criopreservación confiable, de bajo costo y factible de ser llevado a cabo en casi cualquier laboratorio.

GLOSARIO

Capacidad calorífica: Cantidad de calor necesaria para elevar la temperatura en 1°C. La capacidad calorífica disminuye al aumentar la temperatura (Landau, 1983).

Conductividad térmica: Propagación del calor de un objeto a otro, o a través del mismo objeto, de la zona más caliente a la menos caliente. Los mejores conductores son los metales. Son malos conductores el vidrio y los líquidos. Los gases son los peores conductores de calor. (Landau, 1983).

Metaestable: Dado que el hielo es la fase estable del agua abajo de la temperatura del punto de fusión, un sistema no congelado, ya sea líquido o sólido, es muy inestable (sobrefusión y sobresaturación). Su tiempo de vida depende solamente de la probabilidad de nucleación la cual, a su vez, está en función de las tasas de difusión de los componentes. (Franks, 1985).

Punto eutéctico para un sistema binario: Condiciones de temperatura, presión y concentración, a las cuales los cristales de agua y de soluto coexisten en equilibrio con el líquido. Abajo de la temperatura eutéctica el sistema consiste de una mezcla de los dos tipos de cristales (Franks, 1985).

Propiedad coligativa: Las propiedades coligativas de una solución son presión osmótica, depresión del punto de fusión, elevación del punto de ebullición y presión de vapor. Estas propiedades están en función del número de moléculas activas por unidad de volumen de solución, y no de la clase de partículas (Giese, 1984).

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts y J. Watson. (1983). *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing, INC. New York y London 1146 pp.
- Altamirano, D. (1985). Ensayo sobre congelación y descongelación rápida de embriones de rata. Tesis Profesional Biología, Fac. de Ciencias UNAM.
- Bailey, L.H. (1977). *Manual of Cultivated Plants*. Mac Millan. Onceava impresión. Toronto, Ontario.
- Baust, J. y L.K. Miller (1970). Variations in glycerol content and its influence on cold hardiness in the Alaskan carabid beetle, *Pterostichus brevicornis*. *J. Insect Physiol.*, 16. 970.
- Bidwell, R.G.S., (1979). *Fisiología Vegetal*. AGT Editor, S.A. México, D.F. Primera edición en español. 784 pp.
- Blanco, A. (1985). El Problema del Germoplasma en el mundo, en M. L. Robert y V. M. Loyola (eds.), *El Cultivo de Tejidos Vegetales en México*. CONACYT.
- Butenko, P.G., A.S. Popov, L.A. Volkova, N.D. Chernyak y A.M. Nosov, (1984). Recovery of cell cultures and their biosynthetic capacity after storage of *Uiscorea deltoidea* and *Panax ginseng* cells in liquid nitrogen. *Plant Sci. Lett.* 33. 285-292.
- Casseres, E. (1984). *Producción de Hortalizas*. Centro Interamericano de Documentación e Información Agrícola -CIDIA- del Instituto Interamericano de Cooperación Para la Agricultura -IICA-. San José, Costa Rica.
- Connor, W. y J. Ashwood-Smith (1973). Cryoprotection of mammalian cells in tissue culture with polymers, Possible mechanisms. *Cryobiology* 1, 488-496.
- Cronquist, A. (1981). *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*. Columbia Univ. Press. New York.
- Chen, T.H., K.K. Kartha, F. Constabel, y L.V. Gusta. (1984) a. Freezing characteristics 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., K.K. Kartha, N.L. Leung, W.G. Kurz, K.B. Chatson y F. Constabel, (1984) b. Cryopreservation of alkaloid-producing cell cultures of Periwinkle (*Catharanthus roseus*). *Plant Physiol.* 75. 726-731.
- Denisen, E.L. (1979). *Principles of Horticulture*. Segunda edición. Macmillan Publishing Co., Inc. USA.

- Diaz A. (1978). Ajo. en Cervantes Santana (ed.), Recursos Genéticos Disponibles a México. SOMEFI. Chapingo, México.
- Farrant, J., C.A. Walter, Heater Lee y L.E. Mc Gann (1977). Use of two-step cooling procedures to examine factors influencing cell survival following freezing and thawing. *Cryobiology*, 14, 273-286
- FAO. (1988). Manual de intercambio y manejo de GermoPlasma in vitro de ajo (Allium sativum L.). Red de Cooperación Técnica en Producción de Cultivos Alimenticios de la Oficina Regional de la FAO Para América Latina y el Caribe en cooperación con el INIA Estación Experimental La Platina. Chile.
- Finkle, B.J., M.E. Zavala y J.M. Ulrich (1985). Cryoprotective compounds in the viable freezing of Plant tissues, en K.K. Kartha (ed.), Cryopreservation of Plant Cell and Organs . Academic Press.
- Font Quer, P. (1980). Plantas Medicinales. Ed. Labor. Sexta edición. Barcelona: 890-892.
- Franks, F. (1985). Biophysics and Biochemistry at Low Temperatures. University Press, Cambridge.
- Giese, A.C., (1984). Fisiología Celular y General. Ed. Interamericana. México, D.F., quinta edición. 726 pp.
- Harada, T., A. Inaba, T. Yakuma y T. Tamura (1985). Freeze-Preservation of apices isolated from small heads of brussels sprouts. *Hort Science* 20. 678-680.
- Heiras, J. (1984). Informe Técnico Criobiostatos. Dpto. de Estado Sólido y Criogenia. Instituto de Investigaciones en Materiales. UNAM.
- Heiras, J. (1986). Apuntes sobre Criogenia. Dpto. de Estado Sólido y Criogenia. Instituto de Investigaciones en Materiales. UNAM.
- Henshaw, G.G., J.T. O'Hara y J.A. Stamp (1985). Cryopreservation of potato meristems, en K.K. Kartha (Ed.), Cryopreservation of Plant Cells and Organs. Academic Press.
- Holtzman E. y A.B. Novikoff, (1986). Estructura y Dinámica Celular. Ed. Interamericana. México, D.F. Tercera edición.
- Hunter, F.R. (1970). Facilitated diffusion in Pigeon erythrocytes. *Am. J. Physiol.* 218. (6):1765-1772.
- Hutchinson, J. (1959). Families of Flowering Plants Monocotyledons. Ed. Oxford University Press, Amen House, London. 4: 639-640.
- IBFOR. Recommendations (1983).
- JaGodzinski, R.V. (1966). Obtaining the time-temperature profile. *Cryobiology* 2, 193.

- Kartha, K.K. (1980). CryoPreservation of strawberry meristems and mass Propagation of Plantlets. J. Ame. Soc. Hort. Sci. 105(4): 481-484.
- Kartha, K.K. (1981). Meristem culture and cryoPreservation methods and applications in agriculture. en T.A. Thorpe (ed.), Plant Tissue Culture Methods and Applications in Agriculture. Academic Press.
- Kartha, K.K. (1982). CryoPreservation of GermPlasm, en D.T. Thomas (ed.), Application of Plant Cell and Tissue Culture to Agriculture and Industry. University of Guelph, Canada.
- Kartha, K.K. (1985). Meristem culture and GermPlasm Preservation. en K.K. Kartha (ed.), CryoPreservation of Plant Cells and Organs. Academic Press.
- Kuo Chiung-Chi y R.D. Lineberger (1985). "Survival of in vitro cultured tissue of Jonathan apples exposed to -196 C, Hort Science 20(4), 764-767.
- Landau, L. (1983). Moléculas. Ed. Mir Moscú. 255 pp.
- Lopez, A.L. (1988). Acción del DMSO en ápices de Allium sativum in vitro sometidos a Nitrógeno Líquido. Tesis Profesional, Fac. Ciencias UNAM.
- Luyet B.J. (1966). An attempt at a systematic analysis of the notion of freezing rates and at an evaluation of the main contributory factors. Cryobiology 2, 198- .
- Maurer R. (1978). Freezing mammalian embryos: Review of techniques. Theriogenology. 2: 45-68.
- Mc Gann L.E. (1978). Differing actions of Penetrating and nonPenetrating cryoprotective agents. Cryobiology 15, 382-390.
- Mazur, P. (1966). Theoretical and experimental effects of cooling and warming velocity on the survival of frozen and thawed cells. Cryobiology, 2, 181.
- Meryman T.H. (1966)a. The interpretation of freezing rates in biological materials. Cryobiology 2, 165.
- Meryman T.H. (1966)b. Summary of the Panel discussions, Symposium on freezing rates. Cryobiology 2, 210.
- Meryman T.H. (1971). Cryoprotective agents. Cryobiology 8, 173-183.
- Meryman T.H., R.J. Williams and M. St. J. Douglas (1977). Freezing Injury from "solution effects" and its Prevention by natural or artificial cryoprotection. Cryobiology 14, 287-302
- Meryman, T.H. y R.J. Williams (1985). Basic Principles of freezing injury to Plant cells; natural tolerance and approaches to cryoPreservation, en K.K. Kartha (ed.), CryoPreservation of Plant Cells and Organs. Academic Press.

- Montes J. (1978). Estrategia para la conservación de los recursos genéticos, en: Cervantes Santana T. (ed), Recursos Genéticos Disponibles a México. Sociedad Mexicana de Fitogenética A.C. Chapingo, México.
- Murashige, T. y F. Skoog (1961). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant* 15:473-494.
- Nome S.F., A. Abril y R. Racca (1981). Obtención de Plantas de ajo (*Allium sativum* L.) libres de virus mediante el cultivo de meristemas apicales. *Phyton* 41: 139-151.
- Purseglove J. W. (1975). Tropical Crops Monocotyledons. Segunda impresión. Longman, London: 37-56
- Reinert y Bajaj (1977). Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Springer-Verlag, Berlin.
- Rinfret A.P. (1966). Concluding notes on the symposium on freezing rates. *Cryobiology* 2, 206.
- Robert, M.L. y V.M. Loyola (1985). El cultivo de tejidos vegetales en México, en M.L. Robert y V.M. Loyola (eds.), El Cultivo de Tejidos Vegetales en México. CONACYT.
- Rubio, A. (1985). Estrategias para la preservación del Sermoplasma vegetal *in vitro*, en M.L. Robert y V.M. Loyola (eds.), El Cultivo de Tejidos Vegetales en México. CONACYT.
- Simmonds, N.W. (1981). Genetic conservation: the context of the workshop, en L.A. Withers y J.T. Williams (Eds.), Crop Genetic Resources the Conservation of Difficult Material. IUBS serie B42, University of Reading, Reading.
- Williams R.J. (1983) The surface activity of PVP and other polymers and their antihemolytic capacity. *Cryobiology* 20, 521-526.
- Withers, L.A. y H.E. Street (1977). Freeze Preservation of cultured Plant cells. III. The Presgrowth Phase. *Plant Physiol.*, 39, 171.
- Withers, L.A. (1980). Tissue Culture for Storage and Genetic Conservation. IBFOR Secretarial Rome.