

102
lej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Ciencias

ACCION DEL DMSO EN APICES DE Allium sativum
in vitro SOMETIDOS A NITROGENO LIQUIDO

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
ANA LAURA LOPEZ ESCAMILLA



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

RESUMEN	4
INTRODUCCION	7
I. ANTECEDENTES	15
I.1.1 Género <u>Allium</u>	15
I.1.2 Enfermedades del género <u>Allium</u>	16
I.1.3 Características biológicas de <u>Allium sativum</u>	17
I.1.4 Clasificación botánica	20
I.1.5 Origen y propiedades medicinales	21
I.1.6 Componentes del ajo	22
I.1.7 Propagación del ajo	22
I.1.8 Conservación del ajo	23
I.1.9 Producción de ajo	24
II. Preservación <u>in vitro</u>	25
II.1.1 Criopreservación	28
II.1.2 Precultivo de explantes	30
II.1.3 Tratamiento con agentes crioprotectores	31
II.1.4 Toxicidad de los crioprotectores	34
II.1.5 Características del dimetilsulfóxido	35
III. Congelación	41
III.1.1 Congelación de soluciones acuosas	47
III.1.2 Almacenamiento en nitrógeno líquido	50
III.1.3 Descongelación	51
III.1.4 Eliminación de crioprotectores	52
III.1.5 Evaluación de la respuesta	53
IV. Desarrollo Experimental	
Objetivos	54
Materiales y métodos	55
IV.1.1 Determinación del perfil de temperatura del termo	58
IV.1.2 Comportamiento de las diferentes concentraciones de DMSO	60
IV.1.3 Cultivo <u>in vitro</u> de explantes de <u>Allium sativum</u>	61
IV.1.4 Aplicación del DMSO a explantes de <u>A. sativum</u>	64
IV.1.5 Congelamiento de explantes de <u>A. sativum</u>	65

V.	Resultados y discusión	67
V.1	Perfil de temperatura y calibración del termo	67
V.2	Comportamiento de las soluciones de DMSO	71
V.3	Toxicidad del DMSO	79
V.4	Método de congelación	89
V.5	Almacenamiento	98
V.6	Descongelamiento	99
V.7	Sobrevivencia	99
	Conclusiones	104
	Bibliografía	107

ABREVIATURAS

AIA	Acido 3-indolacético
ANA	Acido α - naftalenacético
BAP	6- Bencilaminopurina
DMSO	Dimetilsulfóxido
IBPGR	Buro Internacional Para los Recursos Genéticos Vegetales
INIFAP	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias
NL	Nitrógeno líquido

RESUMEN

De la gran cantidad de especies que habitan en nuestro país, existen aquellas que no se pueden almacenar por las vías tradicionales, ya que se reproducen vegetativamente o no producen semillas, estas especies son almacenadas en su forma vegetativa (bulbos, tubérculos, raíces), existen también aquellas que producen semillas "recalcitrantes", que se caracterizan por su poca viabilidad al perder su contenido de humedad. Para enfrentar estos problemas, se propone como alternativa la formación de bancos de germoplasma in vitro, por cualquiera de sus dos vías: la primera es a corto-mediano plazo, la cual utiliza retardadores del crecimiento y medicis mínimos entre otros, para mantener almacenado el germoplasma por lo menos un año sin realizar subcultivos.

La segunda vía es la preservación del material a largo plazo, esto se realiza por medio de la congelación de las muestras a temperaturas super-bajas, y almacenadas por períodos prolongados en nitrógeno líquido (NL), a este proceso se le llama criopreservación.

La presente investigación tiene como objetivo, el desarrollar un método adecuado para congelar y almacenar muestras biológicas con ayuda de un termo criogénico. Para su realización primeramente se determinó el gradiente de temperatura dentro del termo, que es generado por los vapores del NL, y se estableció la relación distancia-temperatura.

Se observó el comportamiento de diferentes concentraciones de DMSO, al ser expuestas a los vapores del NL, y determinar sus tasas de enfriamiento.

Por otra parte, los explantes que se utilizaron fueron ápices con placa basal de Allium sativum (ajo) a los cuales se les añadió DMSO, por considerarse este compuesto el mejor agente crioprotector por sus propiedades coligativas.

Los explantes fueron enfriados lentamente con los vapores del NL; hasta alcanzar la solución una temperatura final entre -25°C y -32°C , para ser sumergidos posteriormente en NL (-196°C), permanecieron ahí por espacio de 60 minutos como máximo. Seguido se descongelaron rápidamente en un baño de agua a 40°C .

Los explantes fueron sembrados en medio Murashige y Skoog (MS) completo, sin hormonas e incubados en la cámara de cultivo. La sobrevivencia de los explantes fue

evaluada con la reanudación de su crecimiento.

Como resultado de la investigación, se logró la sobrevivencia de los explantes que fueron tratados con altas concentraciones de DMSO y congelados por el método lento.

INTRODUCCION

Las expediciones realizadas por Vavilov durante 1924 a 1940 (Montes, 1978, Wilkins, 1983) mostraron que los recursos genéticos y en particular los cultivares primitivos y especies afines a las cultivadas, están concentradas en áreas definidas. Dichas áreas se conocen como "centros de origen" o "áreas de diversidad genética", se localizan generalmente en países subdesarrollados en regiones autóctonas donde la agricultura es primitiva y conservadora; por desgracia son instituciones foráneas las que se preocupan de su preservación y uso.

Los recursos genéticos que han sido definidos como la suma total de la diversidad genética de cada cultivo y las especies silvestres emparentadas con él, así como todas las especies silvestres del planeta (Hawkes, comunicación personal), deben recibir atención en su conservación, mejoramiento y uso, esto implica la formación de centros de manejo de recursos genéticos, cuyas funciones principales son la conservación, explotación, documentación e intercambio; a estos centros se les ha denominado "bancos de germoplasma".

Los métodos tradicionales para conservar germoplasma

mediante el almacenamiento de semillas, han resultado ser los más baratos y los que mejor garantizan la preservación de la variabilidad e identidad genética natural. Aunque no siempre es factible ya que hay que considerar otros aspectos cuando se almacenan semillas, como son:

- 1) La viabilidad de la semilla
- 2) La heterogeneidad de las semillas, que ocasiona problemas al querer recuperar características específicas deseables.
- 3) Que estén las semillas infestadas de virus (Kantha, 1981, Rúbluo, 1985).

También existen dentro de la gran variedad de plantas de nuestro país, tanto introducidas como nativas, aquellas que presentan el problema de almacenamiento de germoplasma, ya que se propagan vegetativamente o no producen semillas, en estos casos se almacenan en su forma vegetativa (bulbos, tubérculos, raíces), los que se muestran en la Tabla I son algunos ejemplos. (Guillaumin, 1970).

GENERO O ESPECIE	NOMBRE COMUN
<u>Asparagus officinalis</u>	Esparrago
<u>Allium cepa</u>	Cebolla
<u>Allium graveolens</u>	Apio
<u>Allium sativum</u>	Ajo
<u>Cynaria scolymus</u>	Alcachofa
<u>Daucus carota</u>	Zanahoria
<u>Ipomea batatas</u>	Camote
<u>Manihot esculenta</u>	Yuca
<u>Solanum tuberosum</u>	Papa

Tabla I. Plantas que se reproducen vegetativamente

Tomado de Guillaumin (1970)

El hecho de multiplicarse vegetativamente resulta riesgoso, debido a que los cultivares están expuestos a diversos factores adversos como son los cambios climáticos de la región, el ataque por pestes o patógenos así como en la manipulación humana.

Hay otro grupo de plantas que producen semillas, y que presentan también problemas de almacenamiento de germoplasma, ya que disminuye su viabilidad al perder su contenido de humedad, este tipo de semillas fueron denominadas por Roberts en 1973 como semillas "recalcitrantes" (Roberts, 1984). En las áreas tropicales es un problema común, algunos ejemplos se muestran en la Tabla II. (Kantha 1985a).

Con base en lo anterior, es evidente la necesidad de proponer nuevos y eficientes métodos para la preservación de germoplasma, una alternativa es utilizar las técnicas de cultivo in vitro.

La preservación de germoplasma in vitro, se puede realizar por dos vías: (Kantha, 1981)

- A corto-mediano plazo
- A largo plazo

Estas vías fueron denominadas por el Buro Internacional para los Recursos Genéticos Vegetales (IBPGR) en 1986 como colección activa y colección base respectivamente.

FAMILIA	GENERO O ESPECIE	NOMBRE COMUN
Anacardiaceae	<u>Mangifera indica</u>	Mango
Erythroxylaceae	<u>Erythroxylum coca</u>	Cocaina
Euphorbiaceae	<u>Hevea brasiliensis</u>	Caucho
Fagaceae	<u>Castanea</u> spp	Castana
Fagaceae	<u>Quercus</u> spp	Roble
Gramineae	<u>Zizania aquatica</u>	Arroz
Juglandaceae	<u>Juglan</u> spp	Nogal
Laureaceae	<u>Cinnamorum</u> spp	Canela
Laureaceae	<u>Persea americana</u>	Aguacate
Meliaceae	<u>Swietenis</u> sp	Caoba
Palmaceae	<u>Cocos nucifera</u>	Coco
Rubiceae	<u>Coffea arabiga</u>	Cafe
Rutaceae	<u>Citrus</u> spp	Naranja
Sterculiaceae	<u>Theobroma cacao</u>	Cacao
Theaceae	<u>Thea sinensis</u>	Te

Tabla II. Plantas económicamente importantes con semillas recalcitrantes.

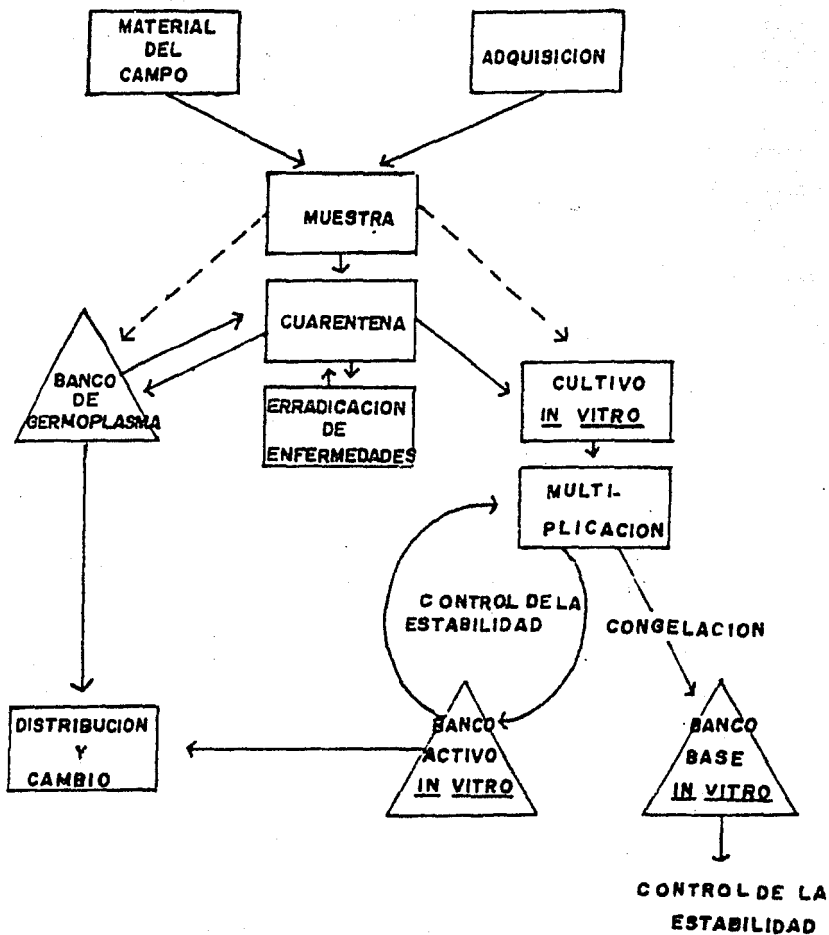
Tomado de Kartha (1985a)

La primera vía sólo satisface necesidades inmediatas, debido a que pueden surgir problemas como la contaminación microbiana, la pérdida de plantas vigorosas, el agotamiento de los nutrientes del medio y la posibilidad de cambios progresivos en el genoma. La colección activa fluye a través de un proceso cíclico donde se multiplica y controla su estabilidad genética, de ese modo, las colecciones activas pueden mantener el material por períodos largos bajo condiciones sub-óptimas. Los riesgos de variación somaclonal pueden ser disminuidos por la cuidadosa selección del explante y el sistema de multiplicación.

La segunda vía consiste en preservar el material por medio de la congelación, de este modo las muestras permanecen en una condición estática por largos períodos, ésta constituye la colección base, la cual permitirá el abastecimiento de las colecciones activas cuando sea necesario o regenerar las reservas de la colección base por si misma.

En el Esquema I se observa la posición y flujo del material de las colecciones activas y la colección base.

La formación de una colección base nos ofrece las siguientes ventajas y usos: (Henshaw, 1975, Bajaj, 1979, Rúbluo, 1985)



ESQUEMA 1.- LOCALIZACION DE LAS COLECCIONES BASE Y ACTIVA
IN VITRO (BANCOS BASE Y ACTIVO RESPECTIVAMENTE)
 TOMADO DE IBPGR (1986)

- 1) Brinda la posibilidad de mantener tejidos somáticos por largos períodos sin problemas de contaminación, cambios ambientales o genéticos.
- 2) Se podrían escoger líneas celulares o variaciones genéticas obtenidas, las cuales se almacenarían y emplearían según las necesidades de la investigación.
- 3) El almacenamiento en frío puede inhibir la división celular, de ese modo se evitaría la necesidad de subcultivar.
- 4) Se almacenarían una gran cantidad de clones en un espacio reducido.
- 5) A bajas temperaturas, las células están en un estado metabólico bajo, por lo que el potencial morfogenético de los cultivos se conserva.
- 6) Las reservas libres de patógenos son congelados y se podrían realizar intercambios de germoplasma valioso a nivel internacional.

I ANTECEDENTES

I.1.1 GENERO ALLIUM

Los Allium son monocotiledóneas con hojas alargadas, tallo reducido a un rizoma o más amenudo a un "disco" cónico en la base de las plantas en un estado vegetativo. Todas estas plantas son especies de climas templados, su mejor crecimiento se efectúa alrededor de los 18°C para la cebolla (Allium cepa) y chalote (Allium escalonicum) y entre los 12°C a 18°C para el ajo (Allium sativum) y poro (Allium porrum). Se cultivan en riego durante la estación seca a condición de que las noches no sobrepasen los 22°C (cebolla) o 17° a 18°C (ajo), las especies que producen bulbos necesitan días más largos y climas templados a temperaturas superiores a los 20° C para formar bulbos.

La propagación del género parece ser menos rápida en climas tropicales que en regiones mediterráneas y se realiza vegetativamente, el germoplasma se almacena en su forma vegetativa y las semillas que producen son estériles

I.1.2 ENFERMEDADES DEL GENERO Allium

Los hongos y bacterias causan graves enfermedades en este género, a continuación se enlistan algunas (García, 1979, Miranda, 1985).

- Fyrenochaeta terrestris, hongo del suelo que es capaz de atacar las raíces dándole una coloración rosa.
- Alternaria porri, enfermedad que se inicia con la formación de pequeñas lesiones hundidas con el centro de color oscuro, el cual se extiende tomando un color púrpura
- Fusarium oxysporum, hongo el cual produce la pudrición del bulbo y raíces
- Perenospora destructor hongo que ocasiona una enfermedad conocida con el nombre de MILDIU, es caracterizada por presentar una ligera vellocidad blanca en las hojas

La pudrición bacteriana, es producida por Pseudomonas, ya que atacan las capas exteriores de los bulbos de cebolla a la base de los bulbos del ajo. Así como la bacteria Erwina carotovora, la cual penetra en las raíces y bulbos a través de heridas ocasionadas por insectos o la labranza y provoca la pudrición del bulbo.

Las enfermedades ocasionadas por los insectos son menos importantes debido a las sustancias propias de la planta, entre estas enfermedades mencionaremos:

- Hylemya antiqua, cuyas larvas destruyen las capas de los bulbos al abrir galerías que facilitan su infección y pudrición por la entrada de microorganismos

- Micromyzus formosanus o pulgón y Thrips tabari o trips de la cebolla, que chupan el jugo de las hojas.

1.1.3 CARACTERISTICAS BIOLÓGICAS DE Allium sativum

Es una planta bianual con raíces numerosas, poco profundas de color blanco, el bulbo esta constituido por un tallo corto y carnoso en forma de disco, denominado platillo o placa basal, tiene escamas bulbares las cuales morfológicamente son las bases continuas y envolventes de las hojas, éstas son lineares ligeramente acanaladas y no huecas, como se ilustra en el Esquema 2 fig A y B.

La mayor parte del bulbo esta formado por las escamas bulbares; unas externas y otras centrales, las exteriores son carnosas y contienen material nutritivo de reserva; las del centro funcionan en menor grado como

órganos de almacenamiento y son más semejantes a hojas. En las axilas de las escamas se desarrollan meristemos que producen bulbos en miniatura, denominados bulbillos o dientes. (Hartmann, 1981) Cada bulbillo consiste en una vaina protectora cilíndrica, una sola hoja gruesa de almacenaje de nutrientes y un pequeño brote central, el cual está ilustrado en el Esquema 2 fib C y D.

Algunos clones no producen inflorescencia, pero cuando se forma, da un escapo liso esférico sólido, replegado en un principio, para posteriormente desplegarse en forma de umbela (lat. umbella), de flores poco numerosas con seis pétalos, seis estambres y un ovario plurilocular. Las semillas rara vez se producen, por lo que se multiplica vegetativamente. (Furseglove, 1972, Messiaen, 1979, Maroto, 1983)

La IBPGR menciona al género Allium de alta prioridad para la preservación de germoplasma y a la especie sativum (ajo), al presentar métodos de propagación estrictamente vegetativos sería un candidato obligado para su almacenamiento in vitro (IBPGR, 1986a, 1986b)



ESQUEMA 2.- *Allium sativum* (AJO). A. PLANTA DE AJO; B. BULBO Y
DIENTE DE AJO, C. CORTE LONGITUDINAL DE BULBO
D. CORTE LONGITUDINAL DE UN DIENTE

I.1.4 CLASIFICACION BOTANICA

Hutchinson (1959) clasificó al género Allium dentro de la familia de las Amaryllidaceae debido a su inflorescencia de umbela, ya que esta es una característica básica del orden de las Amaryllidales, por lo tanto se transfirió al género Allium de las Liliaceae y Liliales a las Amaryllidaceae y Amaryllidales.

Cronquist (1981) reclasifica el género Allium quedando de la siguiente manera: (Swift, 1974)

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

I.1.5. ORIGEN Y PROPIEDADES MEDICINALES

Se cree que el ajo proviene del sur o centro de Asia (FontQuer, 1980, Maroto, 1983), y se considera a Allium longicupis su antecesor silvestre, esta especie es endémica de Asia central. (Purseglove, 1972). De Asia se difundió a través de Asia menor y Egipto a toda Europa.

Los Egipcios lo consideraban una deidad, ya que lo empleaban como amuleto, para auventar los malos espíritus.

Los Romanos lo distribuían a los soldados y trabajadores creyendo que al consumirlo los haría más fuertes. Desde la antigüedad, esta planta se ha empleado como mágica por sus propiedades curativas.

Se consume macerado, en jugo de ajo, como infusión de los dientes o en trozos crudos, tragados o masticados. (Morell, 1973). Algunas de las enfermedades que se cree combate son: Bronquitis, inflamaciones del intestino, presión de sangre y Diabetes, entre otras. (Morell, 1973, FontQuer, 1980).

El ajo se utiliza como condimento, su sabor en crudo se debe a un compuesto antibiótico poderoso, denominado alicina, que es fungicida y bactericida. El ajo al cocerse transforma la alicina en sulfuro de alilo. (Eskin, 1979)

I.1.6 COMPONENTES DEL AJO

En diversos estudios se ha determinado que el ajo por cada 100 gr de porción comestible contiene:

Agua	81 gr	Niacina	0.7 mg
Prótidos	4 gr	Vitamina C	9 a 10 mg
Lípidos	.5 gr	Calcio	10 a 24 mg
Glúcidos	20 gr	Fósforo	40 a 125 mg
Tiamina	.20 mg	Hierro	1.7 a 2.3 mg
Rivoflavina	.11 mg	Potasio	540 mg
Carbono	15 mg	Magnesio	32 mg
Sodio	10 mg		

(Moretsen, 1971, Hernández, 1974, Maroto, 1983)

1.1.7 PROPAGACION DEL AJO

El ajo es cultivado en ambientes templados y frescos, como ya se mencionó es sexualmente estéril y por lo tanto se propaga vegetativamente, para ello se utilizan los dientes o bulbillos externos y voluminosos, estos constituyen la "semilla" agronómica.

Se entierran a unos 3 cm de profundidad con la

punta delgada al ras de la tierra para facilitar el desarrollo, y separados entre si 10 cm, en hileras tan próximas como se quiera. (Seymour, 1978). Antes de cesar la actividad vegetativa se procede a retorcer el cuello por encima de los bulbos, o se pasa una tabla por arriba de los plantíos, de manera que queden dobladas todas las hojas; ambas operaciones son con la finalidad de que se engruesen más los bulbos; cuando el tallo palidece y las hojas se marchitan y secan se puede realizar la recolección.

I.1.8 CONSERVACION DEL AJO

Para obtener cabezas de buena conservación, la recolección debe practicarse en días secos y calurosos, una vez arrancados se dejan sobre el terreno, después son transportados a lugares secos y ventilados, donde terminan de secarse para después ser trenzados, se enlazan las hojas de una y otra planta para formar manojos que constan de 25 cabezas, ristras de 50, o mancuernas formadas por dos ristras.

I.1.9 PRODUCCION DE AJO

En nuestro país el ajo se cultiva en los estados de Querétaro, Aguascalientes, Jalisco y Michoacán. El banco de germoplasma de ajo en México, se localiza en el campo agrícola experimental "el Roque", en Guanajuato, perteneciente al INIFAP, en el que se encuentran 14 cultivares (Montes, 1978). Este banco de germoplasma se mantiene a campo abierto, donde se realizan resiembras año con año, esto desde luego implica un considerable gasto económico y así mismo el riesgo de perder la cosecha, ya que los cultivares están expuestos a factores adversos como los cambios climáticos de la región, ataques por patógenos y pestes o error en la manipulación humana (Whiters, 1980).

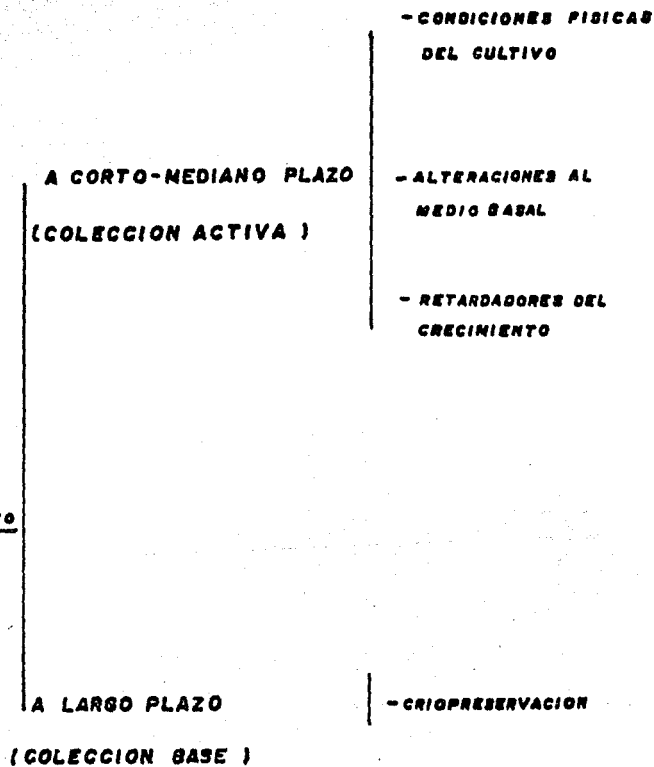
II PRESERVACION in vitro

Como ya se mencionó y se puede observar en el Esquema 3, la preservación de germoplasma in vitro se divide en dos grupos: a corto-mediano plazo que constituyen las colecciones activas, y a largo plazo o criopreservación que forman las colecciones base de un banco de germoplasma.

El primer grupo hace referencia al almacenamiento de germoplasma de por lo menos un año sin realizar subcultivos, este material debe fluir a través de un proceso cíclico, donde los componentes se multipliquen y se controle su estabilidad genética; la colección activa se mantiene por medio de subcultivos, que renuevan el material conservado. Estas colecciones pueden mantenerse por períodos largos si se emplean los siguientes métodos: (Wilkins y Dods, 1983)

1.- Alteración de las condiciones físicas del cultivo. En este método se pueden incluir, la reducción de la temperatura como una forma de almacenaje o la modificación de las condiciones gaseosas dentro del cultivo. Muchas especies pueden conservarse por este

PRESERVACION DE
GERMOPLASMA in vitro



ESQUEMA 3.- METODOS EMPLEADOS PARA LA PRESERVACION
DE GERMOPLASMA IN VITRO

método, como las que se muestran en la Tabla III. En todos los casos, el almacenamiento utilizando el control de la temperatura depende particularmente de la especie, siendo en algunos casos el método mas satisfactorio, por ejemplo; los meristemas derivados de plantas de fresa, pueden almacenarse por períodos mayores de 6 años (Mullin, 1976).

2.- Alteraciones del medio basal. Este método consiste en la modificación de la cantidad de nutrientes, omitiendo o reduciendo algún elemento, el cual es generalmente esencial para un crecimiento normal. En este caso, se utilizan inductores de la tensión osmótica, para reducir la tasa de crecimiento. Por ejemplo: Hensaw et al. (1980) elevaron el nivel de sacarosa del 3 al 8% e incrementaron el volumen del cultivo de 35 a 60 ml, de este modo se mejoró la sobrevivencia de los cultivos mantenidos a 10°C, durante un año.

3.- Retardadores del crecimiento. En este método se adiciona al medio retardadores del crecimiento, los componentes más empleados son el ácido abscísico (ABA) o compuestos con efectos osmóticos como sacarosa, manitol y sorbitol.

Para obtener mejores resultados, se pueden realizar

combinaciones de estos tres métodos, para la preservación de germoplasma in vitro en las colecciones activas. (Nitzsche, 1984)

Es evidente que el cultivo in vitro a corto-mediano plazo, es un recurso muy útil para obtener tasas de multiplicación altas, de especies que se deseen; pero no es un mecanismo deseable para preservar germoplasma por tiempo indefinido, ya que se requiere de frecuente atención y constante mantenimiento.

El segundo grupo consiste en la utilización de temperaturas super-bajas para almacenar las muestras por tiempos prolongados en NL (-196°C), este constituiría las colecciones base de un banco de germoplasma, capaz de renovar las existencias de las colecciones activas así como las propias.

La serie de pasos que se siguen para congelar el material, se denomina criopreservación.

II.1.1 CRIOPRESERVACION

La criopreservación consiste en detener prácticamente toda actividad metabólica, incluyendo la división celular y se usa la temperatura del NL. La criopreservación en células animales ha tenido grandes

avances, son ejemplos significativos el almacenamiento de esperma en NL y su subsecuente uso en la inseminación artificial, de tal modo que los bancos de esperma han desempeñado un papel importante en programas de mejoramiento de especies. En el campo de la investigación clínica tiene varias aplicaciones como son los cromicrotomos, criomicroscopios, criobagujas, que han sido empleados en la cirugía y trasplantes de órganos.

Si comparamos la criobiología animal y la vegetal, vemos que la primera ha tenido un rápido progreso con respecto a la segunda, ya que esta última ha recibido poca atención (Bajaj, 1979), de hecho el interés se limitaba a conservar almacenados vegetales y frutas, para su consumo inmediato.

La preservación por medio del frío, de células y tejidos ha tenido un reciente desarrollo (Bajaj y Reinert, 1977), y no sólo se limita a almacenarlas y regenerarlas después de congeladas, sino como una herramienta tecnológica capaz de preservar germoplasma vegetal de importancia económica y ecológica.

Los pasos experimentales de este proceso pueden ser enumerados de la siguiente manera: (Kantha, 1981 y Seitz, 1987)

a) Precultivo

- b) Tratamiento con agentes crioprotectores
- c) Congelación
- d) Almacenamiento en NL
- e) Descongelación
- f) Eliminación de los agentes crioprotectores
- g) Pruebas de viabilidad o recultivo de los explantes

II.1.2 PRECULTIVO DE EXPLANTES

El precultivo de los explantes es muy importante, ya que las células en una fase temprana del crecimiento tienen una proporción relativamente alta de citoplasma y vacuolas, siendo más tolerables a la congelación. En la mayoría de los casos, se ha observado ventajas al ser cultivados en medios modificados o adicionados con algún crioprotector. Los cambios que ocurren en este período pueden ser varios (Seitz, 1986). El tamaño de las células y vacuolas, la flexibilidad y grosor de las paredes celulares así como las actividades metabólicas, pueden favorecer la tolerancia al frío, sin embargo los mecanismos que se dan para la protección del material congelado son desconocidos (Kantha, 1982). El tiempo de precultivo variará con cada especie y será determinada experimentalmente.

Un aspecto que se debe contemplar, son los explantes seleccionados. Los primeros trabajos se realizaron en callos o células en suspensión, pero debido a su propensión a la inestabilidad genética, estos materiales no resultaron ser buenos candidatos. Por otro lado, el cultivo de meristemas ha sido usado extensamente, no solo en la propagación clonal, sino en la producción de plantas libres de enfermedades, especialmente aquellas infectadas de virus. Los constituyentes celulares de los brotes meristemáticos son menos diferenciados y genéticamente más estables, por lo tanto estos materiales han demostrado tener más resistencia al daño por congelamiento (Kantha, 1981, 1985a).

II.1.3 TRATAMIENTO CON AGENTES CRIOPROTECTORES

Al exponer los explantes a temperaturas bajas, es necesario tomar en cuenta los daños que provoca la congelación por sí misma. Estos pueden englobarse en dos tipos: (Altamirano y Torres, 1985)

- Físicos, como es la formación de hielo, debido a que el agua al pasar de líquido a sólido, cambia su configuración espacial, lo que provoca la ruptura de estructuras celulares.
- Físico-Químicos, en los que se contempla la desnaturalización de diversos compuestos celulares, la suspensión de reacciones catalizadas por enzimas, cambios en el pH y la deshidratación para precipitar las proteínas en solución.

Los primeros estudios sobre el daño por congelación, demostraron que el daño físico es producido por la formación de los cristales de hielo. Lovelock fue el primero que asoció el daño no sólo a la formación de cristales de hielo, sino a una clara correlación entre la concentración extracelular de solutos y la muerte celular (Finkle, 1985). Manzur (1970) formuló la hipótesis del doble factor y explica que las células son sujetas a una serie de eventos físico-químicos, asociados con la pérdida de agua y su conversión a hielo; cuando la temperatura desciende, la cantidad de agua celular decrece y los solutos extra e intracelulares se concentran provocando cambios en el pH además las células se colapsan por la diferencia de presión osmótica.

Para tratar de minimizar estos daños, se requiere utilizar algún compuesto capaz de detener la destrucción celular, facilite el arreglo de la estructura molecular de los cristales de hielo y disminuya la tasa de formación de cristales (congelación). De este modo existe agua no congelada que actúa como agua estructural y solvente de las sustancias que se encuentran en el interior de la célula, que al descender la temperatura se vuelven más concentradas.

Uno de los primeros en identificar estas sustancias fue Maximow, (Finkle, 1985) quien reportó los efectos crioprotectores a -196°C en células de sangre de oveja, tratadas con glucosa, en concentraciones del 5 al 8%.

En 1949, Polge et al. (Finkle, 1985) informaron el efecto crioprotector en espermatozoides de bovino. Lovelock y Bishop, 10 años después introdujeron el dimetilsulfóxido (DMSO), el cual es considerado el más efectivo de los agentes crioprotectores tanto para células vegetales como animales; este crioprotector es muy utilizado como vehículo por su capacidad de penetración. Los crioprotectores dependiendo de su capacidad de entrar o no a la célula, se clasifican en penetrantes y no penetrantes (Meryman, 1971, McGann, 1978). Los crioprotectores penetrantes en

concentraciones altas protegen contra daño por congelamiento lento, ya que reducen la deshidratación celular inducida por el aumento de la concentración de las sales en el medio externo durante el congelamiento. Los no penetrantes en concentraciones bajas, requieren de tasas de congelamiento rápidas.

Se ha considerado que un agente crioprotector debe caracterizarse por evitar la formación de cristales de hielo, reducir la deshidratación celular por choque osmótico, tener un punto de ebullición alto y no ser tóxico. McGann, (1987) comenta que la solubilidad de la sustancia debe ser también considerada.

II.1.4 TOXICIDAD DE LOS CRIOPROTECTORES

La toxicidad se puede manifestar en varios grados, desde la muerte del explante hasta la modificación en la respuesta morfológica de las células en cultivo (Finkle, 1985). Los efectos citotóxicos están en función de su naturaleza química, concentración y tiempo de exposición el cual se somete el explante (Kantha, 1985) y pueden presentarse aún en bajas concentraciones, con tiempos de exposición prolongados.

II.1.5 CARACTERISTICAS DEL DIMETILSULFOXIDO

El dimetilsulfóxido es un compuesto orgánico altamente polar, miscible en agua y en algunos solventes orgánicos como el alcohol, éter y solventes clorados aromáticos. Se obtiene por oxidación en el aire del dimetil sulfuro en presencia de óxidos nitrogenados, comercialmente es extraído del petróleo y es un subproducto de la pulpa en la manufactura del papel e industrias relacionadas. Su molécula esta compuesta por una átomo de azufre central, unido por medio de una doble ligadura a un átomo de oxígeno que presenta una marcada electronegatividad, lo cual le confiere la propiedad de ser aceptor de hidrógenos, las valencias restantes son ocupadas por dos grupos metilo; tiene un punto de fusión de 18.5°C y un punto de ebullición de 189°C. (Fernández, 1976).

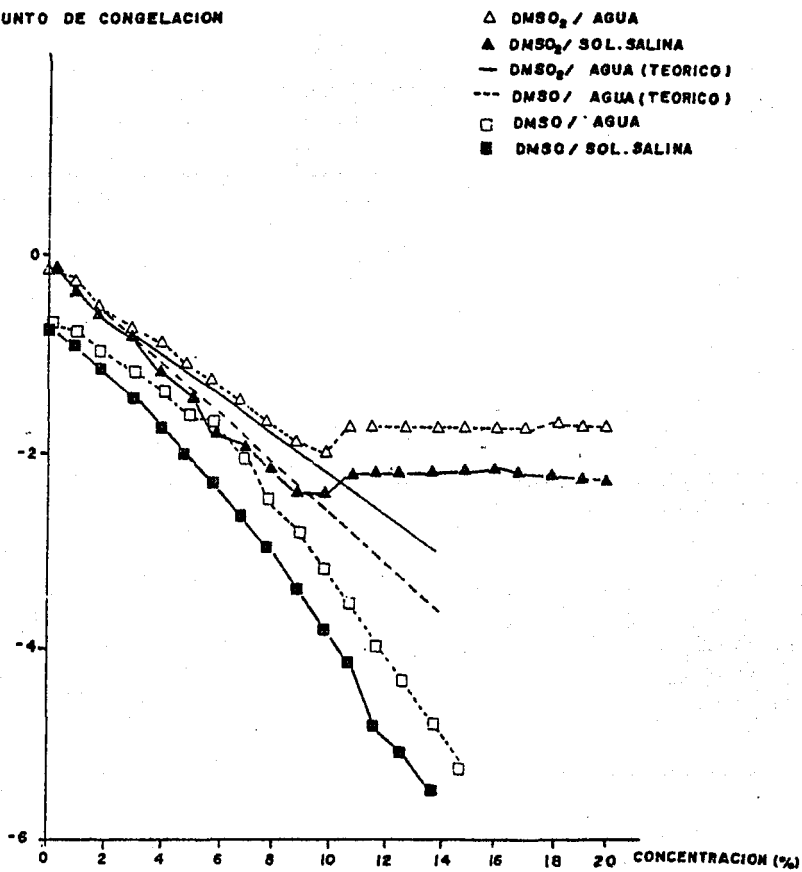
Una cualidad de este agente es su penetración universal, el DMSO actúa en forma similiar al glicerol gracias a sus propiedades coligativas, evitan en cierta forma que las moléculas de agua celular modifique su configuración espacial y se produzca un aumento del volumen al disminuir la temperatura a valores por debajo de 0°C, minimizan así los daños que se producen al ser congelados y causan la poca viabilidad de las muestras.

En un estudio comparativo del Dimetilsulfóxido (DMSO) y el Dimetilsulfona (DMSO_2), (McGann, 1987) muestra las ventajas de utilizar el DMSO. El autor señala que los puntos de congelación del DMSO_2 , son cercanas al soluto ideal (donde el punto de congelación en una solución 1 Molal es de 1.858°C), para concentraciones arriba del 10 %, mientras que el DMSO a concentraciones del 3% diverge de la curva ideal, dando un incremento en el coeficiente osmótico. El punto de congelación del DMSO esta limitado a -1.6°C para concentraciones del 11 al 20%, como se observa en el Esquema 4; así mismo se detecta que los puntos de congelación disminuyen al aumentar la concentración de la solución.

La eficacia de estas soluciones contra la congelación se observó con la recuperación de linfocitos humanos que fueron congelados por dos métodos: el primero consistió en sumergirlos directamente en NL, almacenarlos por más de una hora y descongelarlos en agua a 37°C ; el segundo fue llevar las muestras a temperaturas predeterminadas a una tasa de $1^\circ\text{C}/\text{min}$ y descongelados de la misma forma que el primero, los resultados se observan en el Esquema 5.

La acción coligativa del DMSO, al reducir la

PUNTO DE CONGELACION



ESQUEMA 4.- PUNTOS DE CONGELACION DE SOLUCIONES DE DMSO Y DMSO₂,
DISUELTOS EN AGUA O SOLUCION SALINA

RECUPERACION (%)

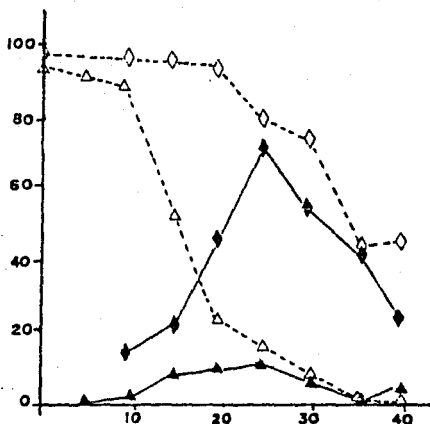


FIG.-A

◇ 5% DMSO-DESCONGELADO
 ◆ 5% DMSO-NL
 △ 5% DMSO₂-DESCONGELADO
 ▲ 5% DMSO₂-NL

TEMPERATURA (°C)

RECUPERACION (%)

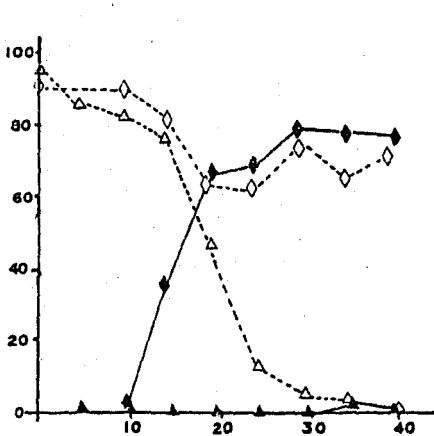


FIG.-B

◇ 20% DMSO-DESCONGELADO
 ◆ 20% DMSO-NL
 △ 20% DMSO₂-DESCONGELADO
 ▲ 20% DMSO₂-NL

TEMPERATURA (°C)

ESQUEMA 3.-RECUPERACION DE LINFOCITOS HUMANOS CONGELADOS POR DOS METODOS: RAPIDAMENTE EN NL Y POR PASOS A TEMPERATURAS PREDETERMINADAS A UNA TASA DE 1°C/min
 FIG.A.-CON 5% DE DMSO O DMSO₂
 FIG.B.-CON 20% DE DMSO O DMSO₂

cantidad de hielo formado a cualquier temperatura sub-cero, da una gran recuperación de las células descongeladas, de manera que las células toleran el congelamiento lento a bajas temperaturas en presencia de concentraciones altas de DMSO.

En cambio el DMSO_2 muestra una escasa crioprotección, para células congeladas rápidamente a -196°C , la recuperación decrece al incrementar la concentración.

A concentraciones inferiores al 10%, el punto de congelación del DMSO y DMSO_2 son similares y cercanos al soluto ideal. Los autores proponen que la razón está relacionada a la solubilidad del DMSO_2 en agua y que este aspecto debería ser considerado como un criterio más para elegir un crioprotector.

Es importante señalar que el tipo de crioprotector, su concentración, la temperatura de adición y eliminación pueden afectar la sobrevivencia y/o ultraestructura celular, todos estos factores se evalúan experimentalmente, dependiendo del explante y especie a trabajar. (Kantha, 1985a, 1985b)

Por otro lado, se ha señalado que la combinación de diferentes crioprotectores, incrementa la eficiencia de la criopreservación. Ulrich et al. (1979) mostraron el

incremento de la sobrevivencia de células de caña de azúcar congeladas, las células fueron tratadas con una mezcla de polietilen glicol, glucosa y DMSO al 10, 8 y 10% respectivamente, dando una combinación de crioprotectores más eficiente que uno sólo. (Chen' et al. 1984, Kartha, 1985b).

La penetrabilidad del DMSO a nivel de membrana es por difusión simple, este mecanismo se define como el desplazamiento de moléculas desde la región donde se encuentra más concentrada, hasta aquella en que la concentración es menor, como resultado del movimiento al azar y de acuerdo a la segunda ley de la termodinámica (Neame, 1976).

III CONGELACION

Como se ha mencionado, la congelación produce daños físico-químicos en las muestras, siendo importante el método de congelación que se utilice. Debido a que cada especie y explante responde diferente, no se puede establecer un procedimiento general. (Tabla IV)

El tamaño y cantidad de cristales que se forman al congelar depende principalmente de la velocidad con que se extrae calor.

Los métodos de congelación se dividen en:

1.- CONGELACION LENTA

Es el método más común y consiste en bajar la temperatura gradualmente (Esquema 6), esto provoca un flujo de agua intracelular hacia el exterior, donde se congela y forma un pequeño número de cristales de hielo grandes. Este método ha sido efectivo para meristemas, cultivos en suspensión y protoplastos de algunas especies. De manera general las tasas de enfriamiento que se manejan son entre 0.5 y 0.2°C/min, sin embargo se han reportado tasas del orden de 0.1 a 10°C/min.

2.- CONGELACION RAPIDA

Consiste en la inmersión directa de las muestras en

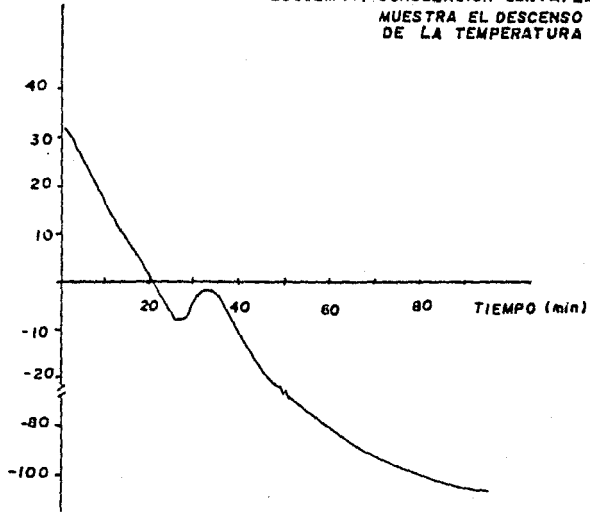
ESPECIE	CRIDROTECTOR	METODO	RESULTADO
Manzana	DMSO 10%	Lento hasta -30°C	100%
Clavel	DMSO 10% + Glucosa 5%	Lento hasta -15°C	100%
Garbanzo	Precultivo 24 hrs, DMSO 4%	Tasas de 0.6°C/min	40%
Zanahoria	DMSO 10% o Glicerol 5% + DMSO 5%	Tasas de 2 a 4°C/min hasta -37°C	65%
Papa	Glicerol 5%	Inmersión a NL	18%
Fresa	Meristemo <u>in vitro</u> precul- tivados en DMSO 5%	Tasa de .84°C/min hasta -40°C	95%

TABLA IV. - Diferentes métodos de congelación y tipo de crioprotector

Tomado de Kartha (1985)

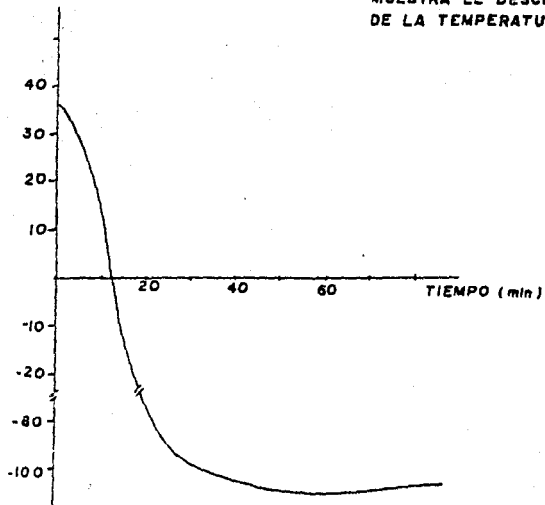
TEMPERATURA (°C)

ESQUEMA 6.- CONGELACION LENTA. LA GRAFICA MUESTRA EL DESCENSO GRADUAL DE LA TEMPERATURA



TEMPERATURA (°C)

ESQUEMA 7.- CONGELACION RAPIDA. LA GRAFICA MUESTRA EL DESCENSO RÁPIDO DE LA TEMPERATURA.



NL (Esquema 7), este método provoca la formación de un gran número de cristales de hielo, distribuidos en los tejidos con uniformidad. El intervalo de las tasas de enfriamiento es muy elevado, de 50°C/min hasta mayores de 1100°C/min. Este método se recomienda para semillas, polen y meristemas de ciertas especies; se ha utilizado con éxito en papa y clavel. (Kantha, 1981)

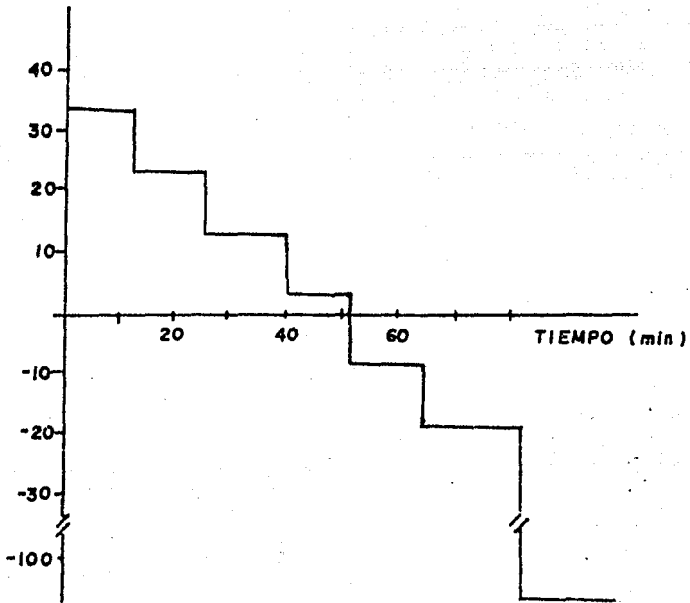
3.- CONGELACION POR PASOS

Este método consiste en congelar la muestra en etapas y temperaturas predeterminadas, (Esquema 8). Cuando la muestra alcanza entre -35 o -40 °C y el agua congelable de la célula ha salido para convertirse en hielo externo, se pasa directamente al NL sin que se provoque mayor daño en sus estructuras; este método es utilizado generalmente en cultivos en suspensión.

Los recipientes donde se llevan a cabo los diferentes métodos de congelación se conocen como Dewars o termos criogénicos; los hay de vidrio y de acero inoxidable. Estos recipientes utilizan el alto vacío como aislante y además están forrados con multicapas, pueden almacenar NL por horas, según su tamaño.

Dentro del termo existe un gradiente de temperatura, que es generado por los vapores del NL; para conocer este gradiente y calibrar el termo, se

TEMPERATURA (°C)



ESQUEMA.- B CONGELACION POR PASOS. DESCENSO POR ETAPAS DE LA TEMPERATURA

requiere de sensores de temperatura con propiedades eléctricas (Jagodzinski, 1966). Estos sensores son conocidos como termopares, que están formados por dos alambres de materiales distintos unidos en un extremo, de tal modo que una diferencia de temperatura entre los extremos provoca una diferencia de voltaje entre las puntas libres. Los cambios de voltaje son registrados por un multímetro; las lecturas obtenidas en milivolt (mV), se traducen a temperatura ($^{\circ}\text{C}$) con ayuda de una tabla de calibración específica para cada termopar. El tipo de termopar mas común es el de cobre-constantan, el cual es de los más baratos, estables y con un amplio intervalo de sensibilidad de $+40^{\circ}\text{C}$ a -200°C (Jagodzinski, 1966).

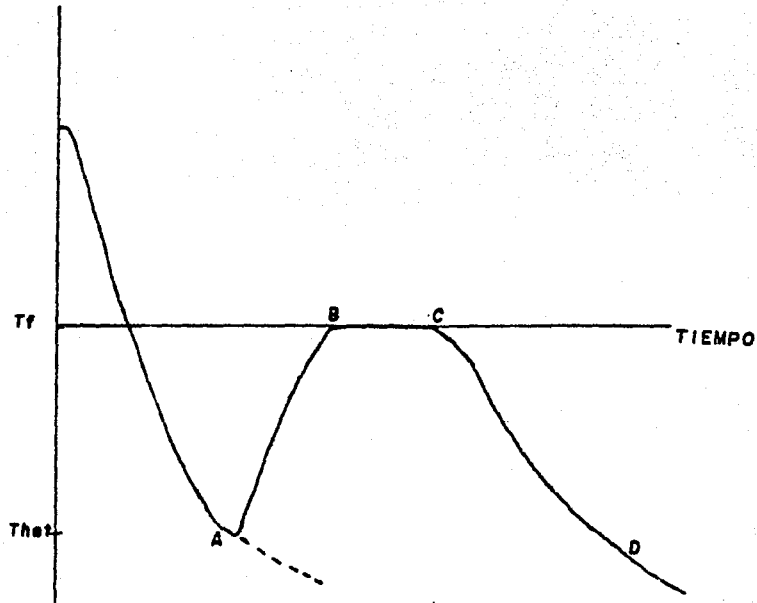
Para realizar estos experimentos existen unidades refrigeradoras manufacturadas por diferentes compañías como Player Products Ltd. (Windmill Road, Sunbury-on-Thames, England), éstas máquinas dan tasas de enfriamiento controladas y requieren de un mínimo cuidado cuando están operando. Su calidad dependerá de la versatilidad en el mecanismo de programación, consumo de NL, etc. (Whiters, 1980).

III.1.1 CONGELACION DE SOLUCIONES ACUOSAS

Para comprender algunos de los fenómenos que se suscitan durante la congelación, explicaremos primeramente como se realiza la cristalización de un líquido. La cristalización requiere la generación de núcleos en el cual las moléculas puedan condensarse; éstos consisten en grupos de moléculas que sean reconocidas por otras. La probabilidad de que estos grupos puedan servir como núcleos efectivos, depende de su tamaño y tiempo de vida, ambos están en función de la temperatura, a ésta se le conoce como temperatura de nucleación homogénea (T_h) (Franks, 1985). Por otra parte, muchos líquidos contienen impurezas, como partículas de polvo o microcristales que son capaces de facilitar la formación de núcleos, a este proceso se le conoce como nucleación heterogénea y se da por la temperatura de nucleación heterogénea (T_{het}) (Franks, 1985, Meryman, 1985).

Cuando se quita calor a una solución binaria, como se observa en el Esquema 9, la temperatura de la solución desciende progresivamente, hasta su punto de equilibrio a presión atmosférica. Este punto de

TEMPERATURA



ESQUEMAS.-CURVA TIPICA DE CONGELACION

- A.- TEMPERATURA DE NUCLEACION
- AB.- CALOR LATENTE
- BC.- ACUMULACION DE HIELO
- C.- DESCENSO DE LA TEMPERATURA
- D.- CONGELAMIENTO TOTAL

TOMADO DE FRANKS (1985)

equilibrio es la coexistencia del agua en tres fases (sólido, líquido y gaseoso), posteriormente el líquido se subcongela. El grado de subcongelación es gobernado por la probabilidad de nucleación, en circunstancias normales la nucleación será causada por partículas de materia.

El subcongelamiento termina en A, que es la temperatura de nucleación; la formación de cristales ocasiona la liberación de calor latente y provoca que la temperatura suba al punto de congelación (T_f), donde se mantiene un tiempo (B-C), el hielo se acumula y la solución residual congelada se concentra, el agua se agotará y el otro componente competirá por el espacio, lo que causa retraso en el congelamiento, la temperatura una vez más comenzará a caer hasta C y al llegar a D, el congelamiento será total; la tasa de enfriamiento posterior a ese punto dependerá de la conductividad térmica del hielo, suponiendo una extracción constante de calor. La presencia de solutos disueltos en el agua, disminuye el punto de fusión; de tal modo que a medida que el agua se congela, la solución se vuelve más concentrada y su punto de fusión se reduce progresivamente. (Luyet, 1966, Franks, 1985)

III.1.2 ALMACENAMIENTO EN NITROGENO LIQUIDO

Los explantes congelados son almacenados en NL, los daños que se producen en esta fase pueden ser provocados por la inadecuada temperatura de almacenamiento, el NL proporciona temperatura cerca de los -200°C , dando así un margen sustancial de seguridad.

Los cambios que los especímenes presenten, pueden ser motivados por diversos factores en cualquier etapa del proceso de criopreservación, como serían:

- 1.- La edad y estado fisiológico de la planta
- 2.- El tamaño del explante
- 3.- Los componentes del medio de cultivo después de extraer el explante y sembrarlo, así como al ser descongelado y resembrado.
- 4.- La duración y las condiciones de incubación antes y después de congelar
- 5.- El tipo de crioprotector, su toxicidad o el empleo de diferentes crioprotectores, concentración empleada, tiempo de exposición y temperatura de aplicación.
- 6.- Método de congelación, lenta, rápida o por pasos, la velocidad de enfriamiento, el número

de pasos y temperaturas utilizadas en cada paso.

7.- El descongelamiento, si es rápido o lento.

(Henshaw, 1980, 1985)

III.1.3 DESCONGELACION

La descongelación se puede efectuar al sumergir la muestra en un baño de agua, a una temperatura de 37° C durante uno o dos minutos, o a una temperatura de 40° C por espacio de 90 segundos. (Kantha, 1982)

Estudios realizados en sangre de humano y congelada rápidamente sin glicerol, han mostrado la importancia del proceso de descongelación. Estas células fueron congeladas a una tasa constante y descongeladas en agua a 20°C, se observó un 100% de hemólisis, pero cuando se descongelaron en agua a 45°C, la hemólisis se redujo alrededor de un 30% (Meryman, 1962).

De ese modo, la acción durante el descongelamiento puede ser de un efecto significativo en los resultados de sobrevivencia.

III.1.4 ELIMINACION DE CRIOPROTECTORES

La temperatura de adición y eliminación del crioprotector puede afectar la sobrevivencia y/o ultraestructura celular, dichas temperaturas óptimas pueden ser evaluadas empíricamente y dependen también del explante y especie a trabajar. Debido a que los efectos tóxicos de los crioprotectores se manifiestan en el crecimiento de las plantas, es importante diluir o eliminar el crioprotector después de que las células se congelaron y descongelaron. Algunos experimentos indican que la temperatura de la solución de lavado es un aspecto crítico en la sobrevivencia. El lavado o eliminación de los crioprotectores se puede realizar de las siguientes formas: (Finkle, 1985)

1. Una vez que se han descongelado las células, se colocan en medio nutritivo líquido, se hacen varios lavados hasta eliminar el crioprotector.

2. Se colocan las células descongeladas sin lavar, directamente en medio de cultivo sólido, en

IV DESARROLLO EXPERIMENTAL

OBJETIVOS

Existen en nuestro país plantas con problemas de almacenamiento por las vías tradicionales, debido a que presentan semillas recalcitrantes o se reproducen vegetativamente, el hecho de mantener los cultivares expuestos a los factores climáticos, pestes o inadecuada manipulación conlleva el riesgo de perder el material. Una alternativa es el establecer bancos de germoplasma in vitro por sus dos vías: a corto-mediano plazo (colección activa) y a largo plazo (colección base), esta última es considerada la más adecuada pues conserva la estabilidad genética de los materiales que son congelados a temperatura de nitrógeno líquido (-196°C).

El Buro Internacional para los Recursos Genéticos Vegetales (IBPGR) menciona al género Allium de alta prioridad para la preservación de germoplasma y la especie sativum sería un candidato para su preservación in vitro.

El objetivo general de la investigación es el desarrollo de métodos adecuados para la criopreservación in vitro de Allium sativum. Se empleó el DMSO como

donde el agar servirá para eliminar el crioprotector por difusión.

III.1.5 EVALUACION DE LA RESPUESTA

Aunque existan pruebas colorométricas y métodos químicos para determinar la viabilidad del material biológico congelado, la reanudación del crecimiento de los explantes tratados es la prueba más contundente de la sobrevivencia. (Wilkins y Dodds, 1983, Kartha, 1981).

En algunos casos, después de terminar los procesos de congelación y descongelación de las muestras, las células se encuentran en un estado de "criochoque" y no muestran ningún signo de vida, sino hasta después de un período largo de cultivo, en que reasumen su crecimiento (Bajaj, 1985). Desde el punto de vista práctico los datos de sobrevivencia se pueden basar en:

1. el incremento del tamaño del explante
2. el mostrar una coloración verde
3. formar raíces y plantas.

crioprotector y un sistema de enfriamiento de bajo costo que sea capaz de proporcionar tasas lentas de enfriamiento.

Los objetivos particulares comprenden:

Determinar el método adecuado para la aplicación y eliminación del DMSO, en este tipo de explantes y especie.

Desarrollar un sistema de enfriamiento que proporcione tasas de enfriamiento lentas

Evaluar el efecto que sufren los explantes de Allium sativum var. Taiwan, al ser expuestos a temperaturas bajas (-196°C) en las condiciones experimentales.

MATERIALES Y METODOS

Para comprender mejor el desarrollo experimental de la presente investigación, la dividiremos en tres fases:

La primer fase consistió en:

1.- La instalación del dispositivo, para realizar las pruebas de congelación.

2.- La determinación del perfil de temperatura, que generan los vapores del NL.

3.- La observación de la dinámica de enfriamiento de las diferentes concentraciones de DMSO y la determinación de sus tasas.

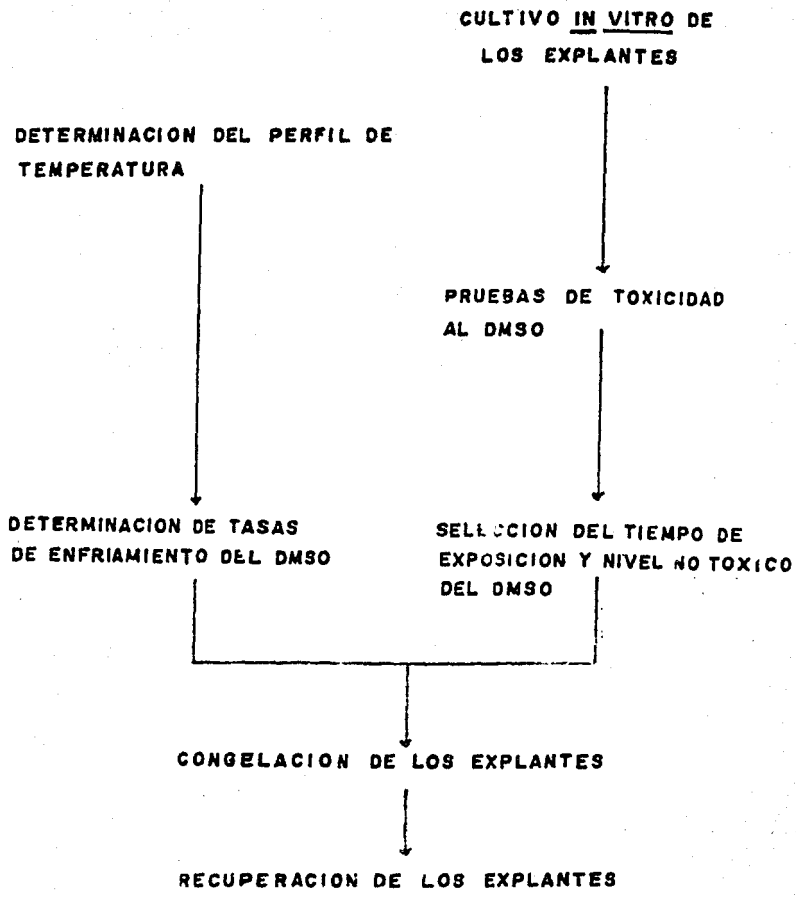
La segunda fase comprendió:

1.- El cultivo in vitro de los explantes

2.- La determinación del método adecuado para la aplicación y eliminación del DMSO.

3.- La evaluación de la toxicidad del DMSO a los explantes.

La tercera fase fue la congelación de los explantes, con base a los resultados obtenidos en las fases anteriores. Posteriormente los explantes se almacenaron en NL durante 60 min como máximo, se descongelaron y resembraron en medio fresco para ser incubados en la cámara de cultivo. El Esquema 10, nos da una semblanza de lo mencionado en el párrafo anterior.

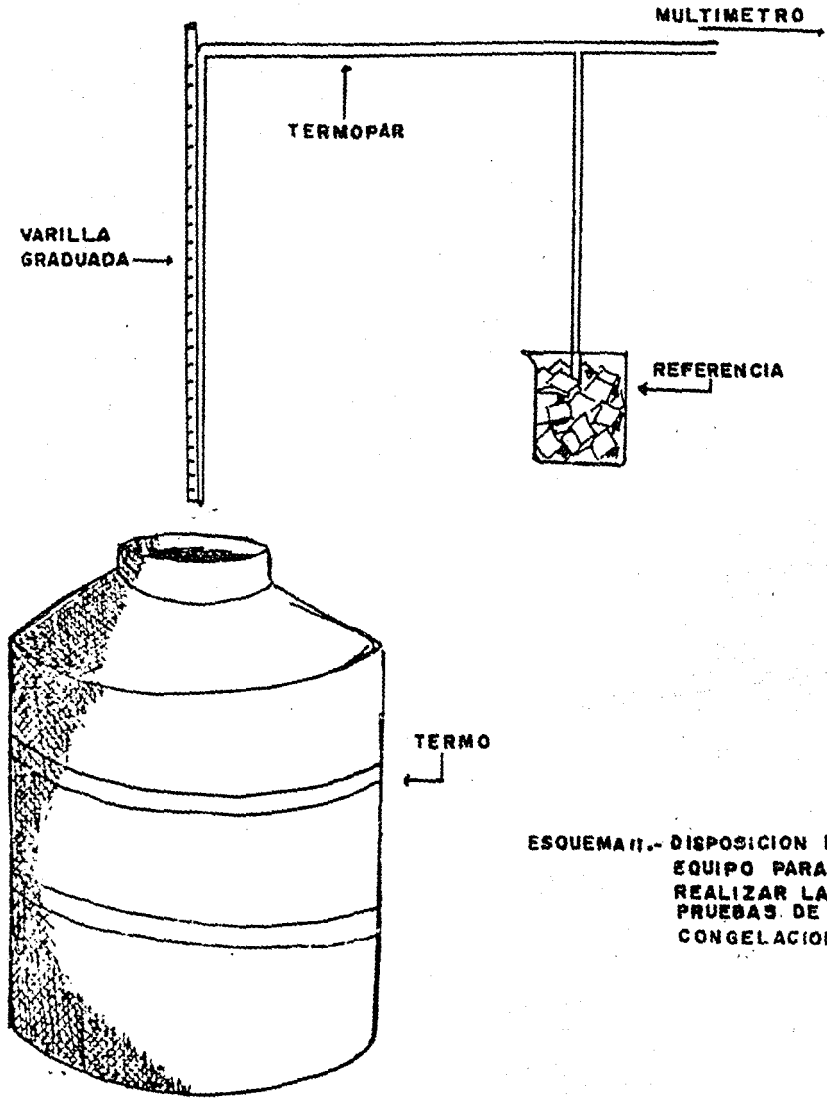


ESQUEMA 10.- DESARROLLO EXPERIMENTAL DE LA INVESTIGACION

IV.1.1 DETERMINACION DEL PERFIL DE TEMPERATURA DEL TERMO

Para detectar las diferentes temperaturas dentro del termo, que son generadas por los vapores del NL, se utilizó un termopar de cobre-constantan que fue colocado a lo largo de una varilla metálica previamente graduada en centímetros; el extremo unido del termopar quedó en un extremo de la varilla y las partes no unidas se conectaron a un multímetro digital, el cual nos proporcionó lecturas en milivoits. La varilla se colocó en un soporte universal con ayuda de unas pinzas de tres dedos; de este modo se desplazó la varilla y el termopar de manera ascendente y descendente dentro del termo. El termopar requiere de una temperatura de referencia ($^{\circ}\text{C}$), para ello, del mismo termopar sale otro extremo unido el cual se colocó en un vaso de precipitado con cubos de hielo de agua destilada. (Esquema 11). La diferencia entre los extremos unidos es detectado por el multímetro y nos indica la temperatura de los vapores del NL.

El termo, cuya capacidad es de 40 lts, se utilizó con 12 litros de NL; ya montado el equipo, se procedió a descender el termopar a distancias conocidas, se utilizó como referencia de 0 cm la boca del termo. Se registraron las lecturas del multímetro, cotejandolas



ESQUEMA II.- DISPOSICION DEL EQUIPO PARA REALIZAR LAS PRUEBAS DE CONGELACION

con las tablas específicas para el termopar y transfiriéndolas a grados centígrados.

A las distintas temperaturas de los vapores del NL, se le denominó temperatura externa (Text)

IV.1.2 COMPORTAMIENTO DE LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE DMSO

Como ya se mencionó anteriormente, las soluciones al ser enfriadas presentan diferentes comportamientos, que dependen de su concentración y temperatura a la cual se congele. De tal forma que su punto de fusión variará, así, como su tasa de enfriamiento; por ello es necesario conocer como se comportan las soluciones, al ser congeladas.

El DMSO se preparó a distintas concentraciones (v/v) con medio Murashige y Skoog (MS) completo, líquido; y fueron colocadas a dos temperaturas externas diferentes (-12°C y -51°C).

Las diferentes concentraciones de DMSO (5, 10, 15, 20 y 30%), se colocaron en ampollitas abiertas (AC/II; calibre 4, de Ampollitas de México S.A.) con capacidad de dos mililitros, en contacto con el termopar; la cantidad de la solución fue de 1 ml.

Las soluciones fueron sometidas a diversas temperaturas externas seleccionadas y se registraron las lecturas cada minuto. Los datos se graficaron, para obtener las curvas de enfriamiento de las soluciones, esta tasa se midió en la parte lineal de la curva, después de la fase de congelamiento.

IV.1.3 CULTIVO in vitro DE EXPLANTES DE Allium sativum

A) Material biológico: Se utilizaron bulbos de A. sativum var. Taiwam, los cuales se obtuvieron del Centro de Investigaciones Agrícolas del Bajío, el Roque. Carretera San Miguel Allende, Gto. (INIFAP).

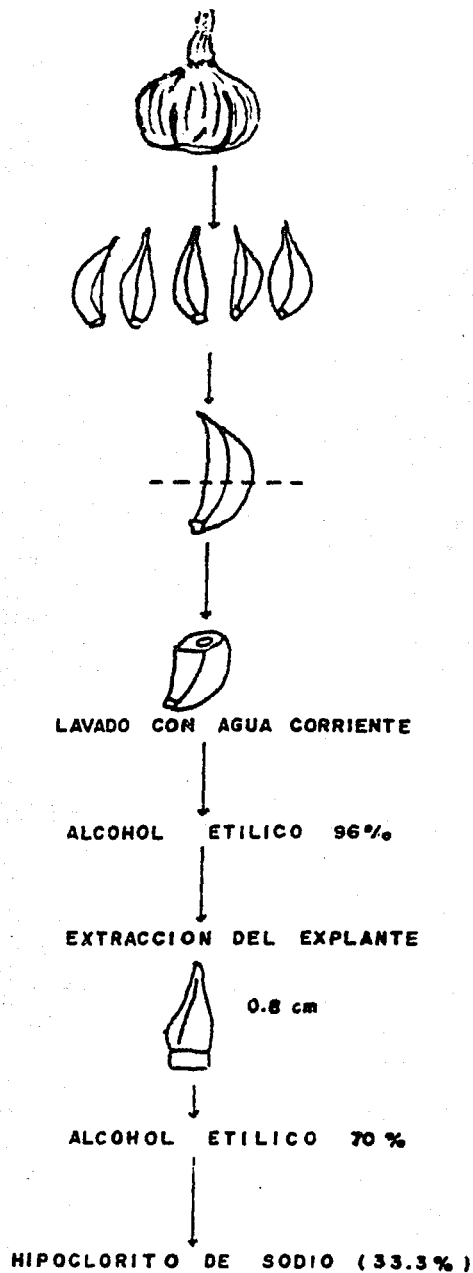
B) Esterilización y disección de los explantes:

Los bulbos fueron separados en sus unidades o bulbillos, se seccionaron a la mitad, se eliminó la parte superior, a la parte restante se le eliminó las hojas que le cubrían y se lavaron en agua corriente durante 10 min. Se introdujo el material para su esterilización, en una campana de flujo laminar (VACO), se realizó previamente una limpieza minuciosa del equipo y la campana con alcohol; cuando se secó se encendieron los mecheros. El material biológico se introdujo en alcohol etílico al 96% por espacio de 2

min; para extraer el ápice, se eliminó el exceso de tejido que lo rodeaba y conforme se obtuvieron se colocaron en una caja de petri con papel filtro con un poco de agua destilada estéril, para evitar así la desecación de los explantes.

Una vez obtenido el material se puso en alcohol etílico al 70% durante 1 min; seguido se transfirió el material a Hipoclorito de Sodio (33.3% v/v) durante 10 min. Finalmente se realizaron varios enjuagues con agua destilada estéril. La extracción de los ápices se realizó con navajas, agujas de disección y pinzas de relojero, con ayuda del microscopio estereoscópico (Esquema 12)

Posteriormente se sembraron en tubos de 150 x 25 mm con medio MS sin hormonas con pH de 5.7 y se colocaron en la cámara de cultivo en condiciones de temperatura de $26 \pm 2^{\circ} \text{C}$, un fotoperíodo de 16-8 horas y una intensidad luminosa de 1000 lux.



ESQUEMA 12.- ESTERILIZACION Y DISECCION DE EXPLANTES DE AJO (APICES CON PLAGA BASAL)

IV.1.4 APLICACION DEL DMSO A EXPLANTES DE A. sativum

A) Material biológico: Explantes estériles de A. sativum.

B) Aplicación del agente crioprotector: Se prepararon las siguientes soluciones: Medio MS completo sin hormonas para realizar lavados y eliminar el crioprotector. Medio MS líquido sin hormonas con DMSO al 10 y 30%; ambas soluciones se esterilizaron en la autoclave a 20 lb/pulg de presión y 126°C, durante 15 min. Ya estériles se introdujeron a la campana de flujo laminar donde se encontraba el material biológico listo. Los explantes se colocaron dentro de ampolletas estériles y con una pipeta Pauster estéril, se le añadió el medio con el crioprotector. Se sellaron las ampolletas con ayuda del mechero, y se les dejó a diferentes tiempos de exposición (15, 30, 45, 60 min) a temperatura ambiente con agitaciones esporádicas.

Al transcurrir el tiempo deseado, se abrió la ampolleta, se vació su contenido (explantes + crioprotector) en un frasco que contenía medio MS líquido, se dejaron en agitación constante en la mesa de agitación orbital, durante 30 min. para eliminar el crioprotector. Sequido

se realizaron 2 o 3 cambios. en la campana de flujo laminar.

Se sembraron en tubos de 150 x 25 mm con MS sin hormonas sólido, a su vez se sembraron testigos. Se colocaron en la cámara de cultivo en las condiciones mencionadas anteriormente. A las tres semanas de su siembra se realizaron observaciones y mediciones de las muestras.

IV.1.5 CONGELAMIENTO DE EXPLANTES DE A. sativum

Los explantes estériles y disectados de manera aséptica, se introdujeron en las ampollitas estériles. colocandose de 4 a 5 explantes por ampollita; posteriormente se les adicionó DMSO al 30%, 1 ml a diferentes tiempos de exposición (15, 30, 45, 60 min). Esto hace un total de 20 explantes y 10 explantes más como testigo del grupo.

Se eligió esta concentración debido a que nos proporciona tasas de enfriamiento lentas.

Selladas las ampollitas y ya por concluir el tiempo de exposición al DMSO, se localizó en el termo con ayuda del termopar la temperatura externa deseada, se señaló en el soporte, se midió la distancia del mismo.

Se colocó una ampollita abierta con la misma cantidad de DMSO, con el termopar dentro y así observar el comportamiento de la solución durante el proceso. Las ampollitas se aseguraron alrededor de la varilla con una cinta adhesiva, se colocaron a la temperatura externa elegida y se registraron las lecturas del multímetro cada minuto. Cuando la temperatura de la solución se estabilizó, es decir, se mantuvo constante por un tiempo prolongado, se sumergieron las muestras al NL, se dejaron ahí por espacio de 15 o 60 min. Se realizaron diferentes pruebas. Transcurrido el tiempo, se descongelaron en agua a 40°C con agitaciones suaves, este proceso tardó 1 min. Seguido se llevaron a la campana de flujo, se realizó el procedimiento para eliminar el crioprotector, se sembraron y cultivaron en las mismas condiciones anteriormente citadas.

RESULTADOS Y DISCUSION

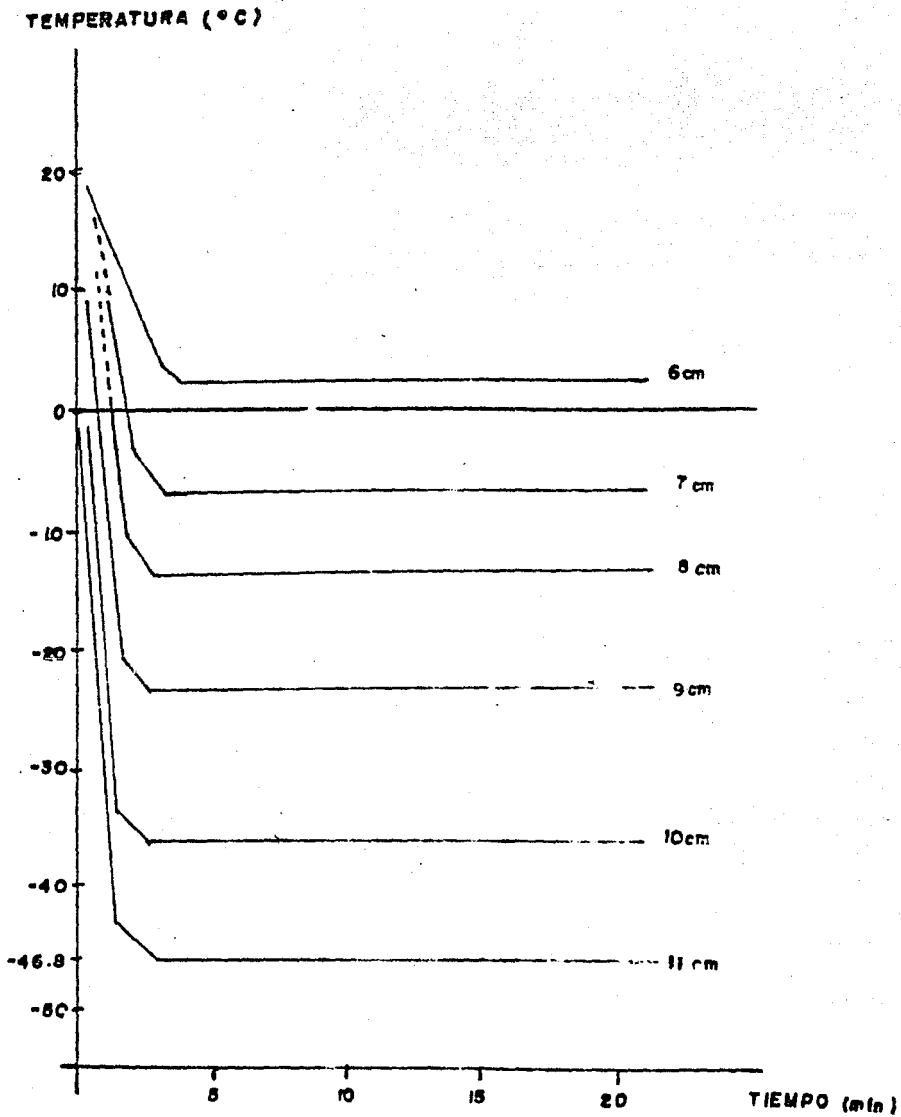
V.1.- PERFIL DE TEMPERATURA Y CALIBRACION DEL TERMO

Los resultados que se muestran en la Tabla V, son los datos que se obtuvieron al colocar el termopar a diferentes alturas, exponiendolo a los vapores del NL. Como se observa en la Gráfica 1, la temperatura disminuye conforme se modificó la altura y tiende a estabilizarse a partir de los 5 minutos. Es posible de este modo detectar el gradiente de temperatura que existe desde la boca del termo hacia el interior del termo, donde el gradiente se incrementa conforme el termopar se acerca al nivel del NL. Al construir la gráfica Text contra altura, obtenemos el perfil de temperatura, y podemos observar en la Gráfica 2 que al descender el termopar la temperatura se incrementa. De este modo, podemos elegir la Text con solo colocar el termopar a la distancia correcta.

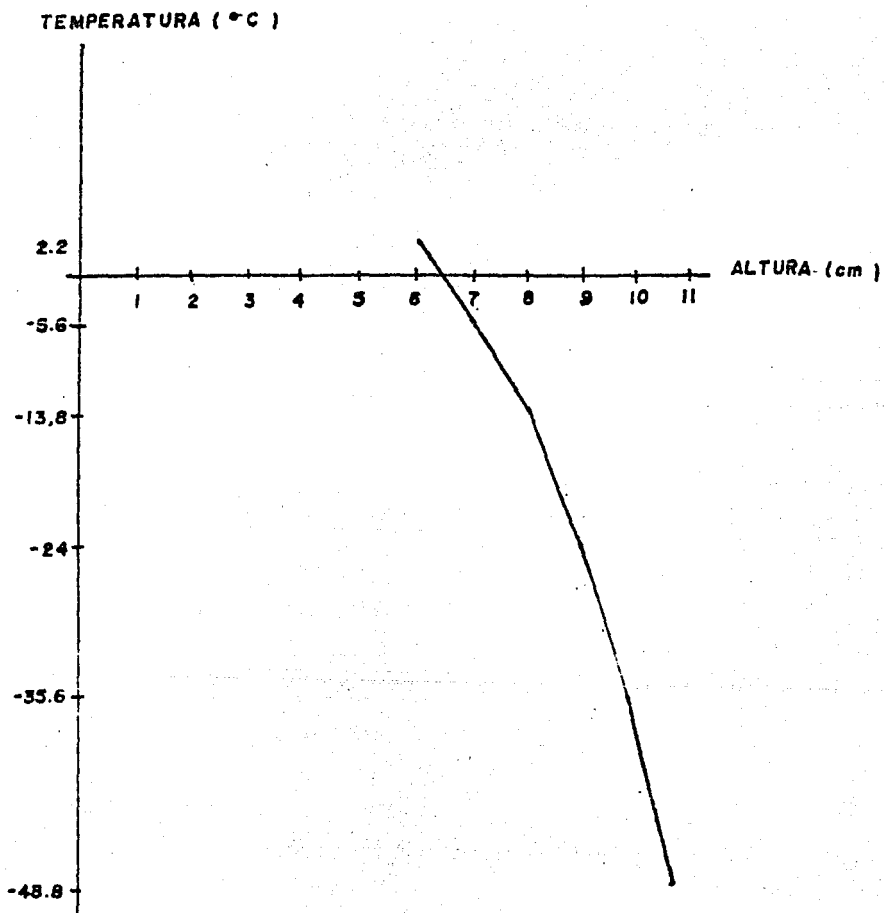
Es importante señalar, que el perfil obtenido en esta investigación fue con 12 litros de NL, contenidos en el termo, ya que el perfil se desplazara dependiendo de la cantidad de NL que contenga (Valenzuela, 1988). Debido a que cada termo contiene con mayor o menor eficacia el NL en función de sus propiedades aislantes.

ALTURA (cm)	VOLTAJE (mV)	TEMPERATURA (°C)
6	+ .07	+ 2.2
7	- .21	- 5.6
8	- .52	- 13.8
9	- .89	- 24
10	- 1.3	- 35.6
11	- 1.6	- 46.8

Tabla V.- Datos del perfil de temperaturas obtenido, al exponer el termopar en contacto con los vapores del NL a alturas conocidas. (la temperatura registrada, fue la que se estabilizó a los 10 minutos de haber colocado el termopar)



GRAFICA I.- RELACION ENTRE DISTANCIA Y TEMPERATURA DE LOS VAPORES DE NITROGENO LIQUIDO, DENTRO DE UN TERMO (Cap. 40 lts)



GRAFICA 2.- PERFIL DE TEMPERATURA

Una forma de medir el nivel de NL dentro del termo, es introducir una regla graduada hasta el fondo del termo, y corroborar la altura que deje la escarcha en la regla. La desventaja, es que en cada inmersión el NL desprende más vapores y se consume, lo mismo sucede cuando se introducen para su almacenamiento, las muestras biológicas. Por ello es conveniente tener dos termos; uno donde se enfríen las muestras y otro donde se almacenen.

Durante el desarrollo experimental de esta investigación, se pudo observar que los vapores del NL permanecen más estables si se utiliza una mayor cantidad de NL en el termo (25cm), se evapora con menor rapidez, que cuando contiene el termo menor cantidad de NL (10cm).

V.2.- COMPORTAMIENTO DE LAS SOLUCIONES DE DMSO

Determinada previamente la temperatura externa, se colocó una ampollita con DMSO y se introdujo el termopar, para observar y registrar el comportamiento de la solución, se expusieron concentraciones del 5, 10 y 30% de DMSO, a una temperatura externa de -12°C , que corresponde a una altura de 7.8 cm. Los datos obtenidos se muestran en las Tablas VI, VII, VII, se registró el

TIEMPO (min)	VOLTAJE (mV)	TEMPERATURA (°C)
1	+ .72	18.5
2	+ .71	18
3	+ .45	11.8
4	+ .19	5
5	- .19	- 5
6	- .03	- 1
7	- .04	- 1.2
8	- .05	- 1.4
9	- .06	- 1.6
10	- .08	- 2.5
11	- .11	- 3
12	- .18	- 4.5
13	- .34	- 9
14	- .49	- 13
15	- .65	- 17
16	- .77	- 20.5
17	- .89	- 24
18	- .98	- 26.5
19	-1.05	- 28
20	-1.10	- 29
21	-1.12	- 30
22	-1.16	- 31.5
23	-1.21	- 33
24	-1.24	- 33.5
25	-1.27	- 34.5
26	-1.29	- 35.5
27	-1.31	- 35.8
28	-1.32	- 36
29	-1.34	- 36.5
30	-1.35	- 37

TABLA VI.- Comportamiento de una solución de DMSO al 5%
colocada a una temperatura externa de -12°C

TIEMPO (min)	VOLTAJE (mV)	TEMPERATURA (°C)
1	+ .78	20
2	+ .71	18.5
3	+ .43	11.5
4	+ .19	5
5	+ .02	.5
6	- .06	- 1.5
7	- .06	- 1.5
8	- .07	- 2
9	- .09	- 2.5
10	- .11	- 3
11	- .14	- 3.5
12	- .19	- 5
13	- .26	- 7
14	- .36	- 9.5
15	- .47	- 12.5
16	- .56	- 15
17	- .65	- 17.5
18	- .74	- 19.5
19	- .81	- 21.5
20	- .87	- 23.5
21	- .93	- 25
22	- .98	- 26
23	-1.02	- 27.5
24	-1.06	- 28.5
25	-1.09	- 29
26	-1.12	- 30.5
27	-1.14	- 31
28	-1.16	- 31.5
29	-1.18	- 32
30	-1.20	- 32.5

TABLA VII.- Comportamiento de una solución de DMSO al 10% colocada a una temperatura externa de -12°C

TIEMPO (min)	VOLTAJE (mV)	TEMPERATURA (°C)
1	+ .75	19.5
2	+ .74	19
3	+ .44	11
4	+ .15	4
5	- .07	- 2
6	- .23	- 7
7	- .36	- 9
8	- .47	- 12
9	- .53	- 14
10	- .51	- 13
11	- .52	- 13.5
12	- .56	- 15
13	- .61	- 16
14	- .66	- 17.5
15	- .74	- 19.5
16	- .76	- 20.5
17	- .80	- 21.5
18	- .83	- 22.5
19	- .87	- 23.5
20	- .90	- 24
21	- .92	- 24.5
22	- .94	- 25
23	- .96	- 26
24	- .98	- 26.5
25	- .99	- 26.8
26	-1.00	- 27
27	-1.02	- 27.5
28	-1.02	- 27.5
29	-1.04	- 28
30	-1.04	- 28

TABLA VIII.- Comportamiento de una solución de DMSO al 30% congelada a una temperatura externa de -12°C

descenso de la temperatura cada minuto, con el multímetro; se construyeron las gráficas de temperatura contra altura de cada solución. Como se observa en la Gráfica 3, las soluciones presentan las siguientes características:

1.- Las soluciones se comportan igual a la curva típica de enfriamiento de una solución acuosa (Figura 9). Esta curva Luyet (1966) la clasificó del tipo de pseudo-congelamiento, definiéndola como el registro de la temperatura del espécimen durante el experimento. Tipifica la curva en tres partes:

a) Curva de enfriamiento del material no congelado
(C₁)

b) Porción congelada (F)

c) Curva de enfriamiento del material congelado
(C₂)

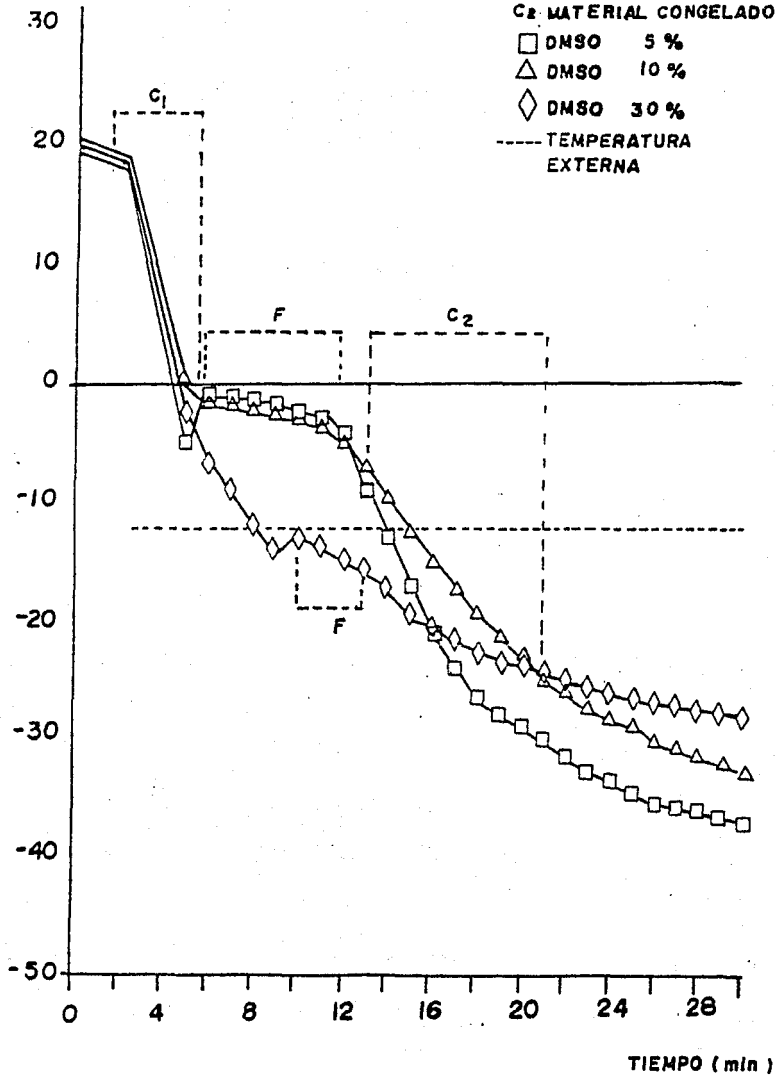
2.- El punto de congelación disminuye al aumentar la concentración de la solución.

3.- La temperatura final de la solución es menor, entre más alta sea la concentración.

4.- Así mismo la tasa de congelamiento es más lenta, entre más alta es la concentración.

Si observamos el comportamiento de la solución del DMSO al 5%, vemos que la porción congelada (F), que

TEMPERATURA (°C)



GRAFICA 3.- COMPORTAMIENTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE DMSO SOMETIDOS A LA MISMA TEMPERATURA EXTERNA (-12°C)

corresponde a la formación de hielo, la tasa es constante y no varía la temperatura, en cambio al aumentar la concentración de la solución a un 30%, la fase (F) se reduce. Esto se debe a dos factores:

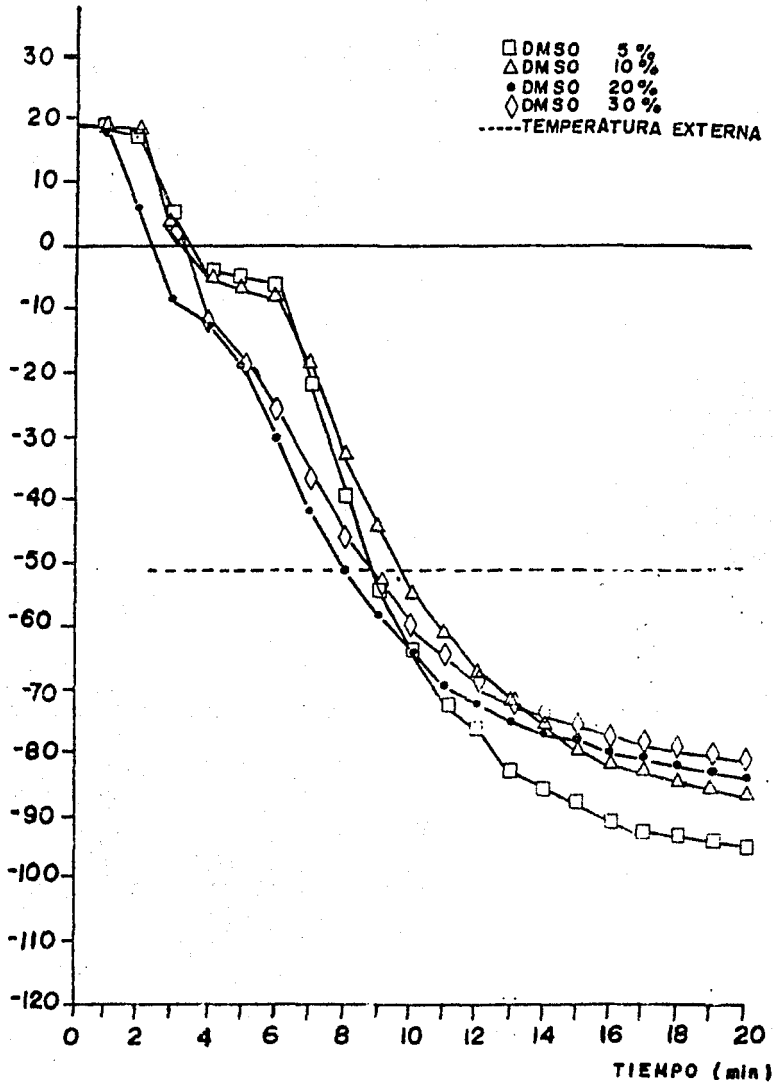
1.- Al congelarse una solución binaria, se agota gradualmente el agua disponible.

2.- La competencia con el otro componente ocasiona un retraso en el congelamiento. (Luyet, 1966, Franks, 1985).

En estas mismas curvas, observamos que el punto de congelación es menor al aumentar la concentración. Franks (1985), señala que el incremento en la concentración de solutos de bajo peso molecular no solo baja el punto de congelación, sino que reduce la cantidad de agua que es capaz de congelarse.

El grado de congelación puede ser controlado a través de la temperatura externa, concentración y tasa de enfriamiento. Nuestros resultados concuerdan con lo señalado por este autor, ya que al variar la temperatura externa de las muestras a -51°C , se observó un acortamiento de los periodos de formación de hielo y de las curvas de enfriamiento, las temperaturas finales alcanzadas de las soluciones, son mas bajas (Gráfica 4).

TEMPERATURA (°C)



GRÁFICA 4.- COMPORTAMIENTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE DMSO SOMETIDOS A LA MISMA TEMPERATURA EXTERNA (-51°C)

En ambos casos, las temperaturas finales alcanzadas son diferentes a la temperatura externa, a las cuales se colocaron. Esta diferencia probablemente sea ocasionada por la constante evaporación del NL, y de ese modo proporciona más frío a la solución.

La estabilidad de los vapores y las propiedades aislantes del termo, nos permiten tener un intervalo de confiabilidad alto, de tal modo que una solución con una concentración dada, colocada a la misma distancia (Text), se comportara de la misma manera.

V.3.- TOXICIDAD DEL DMSO

Las Tablas IX y X muestran la respuesta de los explantes, sometidos a diferentes concentraciones y tiempos de exposición en DMSO. Se utilizaron principalmente concentraciones del 10 y 30% de DMSO para tener un intervalo de comparación. A las tres semanas de su siembra se obtuvo la formación de plantulas, que mostraron diferencias con respecto al testigo.

La toxicidad de los explantes fue evaluada por el grado de malformaciones que manifiestan las plantulas. Se considero como malformación aquella plantula que; sus hojas se toranran deformes, esto es, rugosas contrahechas, aparentemente de aspecto calloso, y

TIEMPO DE EXPOSICION	NO. DE EXPLANTES QUE GENERARON		NO. DE EXPLANTES CON RAIZ		NO. DE EXPLANTES MALFORMADOS		ALTURA PROMEDIO		
	(min)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(mm)	E.E.	(%)
0	17/17	100	4/17	23	0/17	0	14.00±0.32		100
15	11/12	91.6	5/12	41	1/12	8.33	13.25±0.50		94.64
30	15/19	78.9	4/19	21	4/19	21	11.50±0.88		82.14

TABLA IX.-RESPUESTA DE APICES CON PLACA BASAL DE *Allium sativum* variedad Taiwan CULTIVADOS EN MEDIO MS SIN HORMONAS Y CON PRETRATAMIENTO DE DMSO 10% CON DIFERENTES TIEMPOS DE EXPOSICIÓN, INCUBADOS A $26 \pm 2^{\circ}$ C DE TEMPERATURA, 14 HORAS DE LUZ Y 1000 LUX DE INTENSIDAD LUMINOSA. (LECTURAS TOMADAS A LAS TRES SEMANAS)

TIEMPO DE EXPOSICION	NO. DE EXPLANTES QUE GENERARON PLANTULAS SANAS		NO. DE EXPLANTES CON RAIZ		NO DE EXPLANTES MALFORMADOS		ALTURA PROMEDIO		
	(min)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(mm)	E. E.	(%)
0	13/13	100	0/13	0	0/13	0	14.00 ± 0.32		100
15	7/9	77.77	0/9	0	2/9	22.22	10.35 ± 1.41		73.92
30	3/8	37.5	0/8	0	5/8	62.5	8.62 ± 2.31		61.57

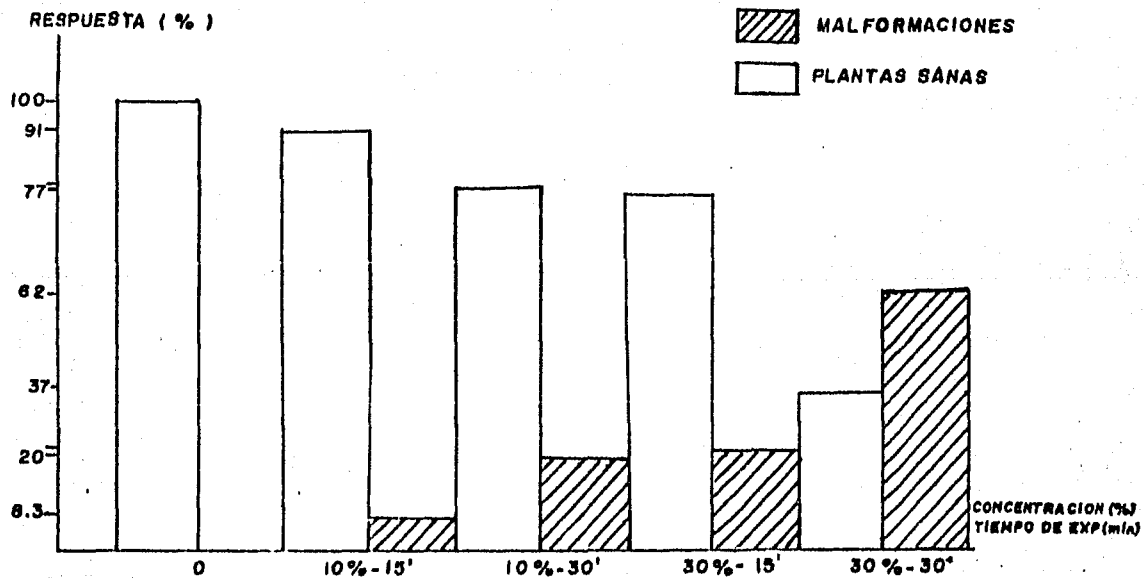
TABLA X.-RESPUESTA DE APICES CON PLACA BASAL DE *Allium sativum* variedad Taiwan CULTIVADOS EN MS SIN HORMONAS Y CON PRETRATAMIENTO DE DMSO 30% CON DIFERENTES TIEMPOS DE EXPOSICION INCUBADOS A 26±2°C DE TEMPERATURA, 16 DE LUZ Y 2000LUX DE INTENSIDAD LUMINOSA. (LECTURAS TOMADAS A LAS TRES SEMANAS)

aquellas cuyo aparente desarrollo normal muestre zonas rugosas. Comparado contra un testigo.

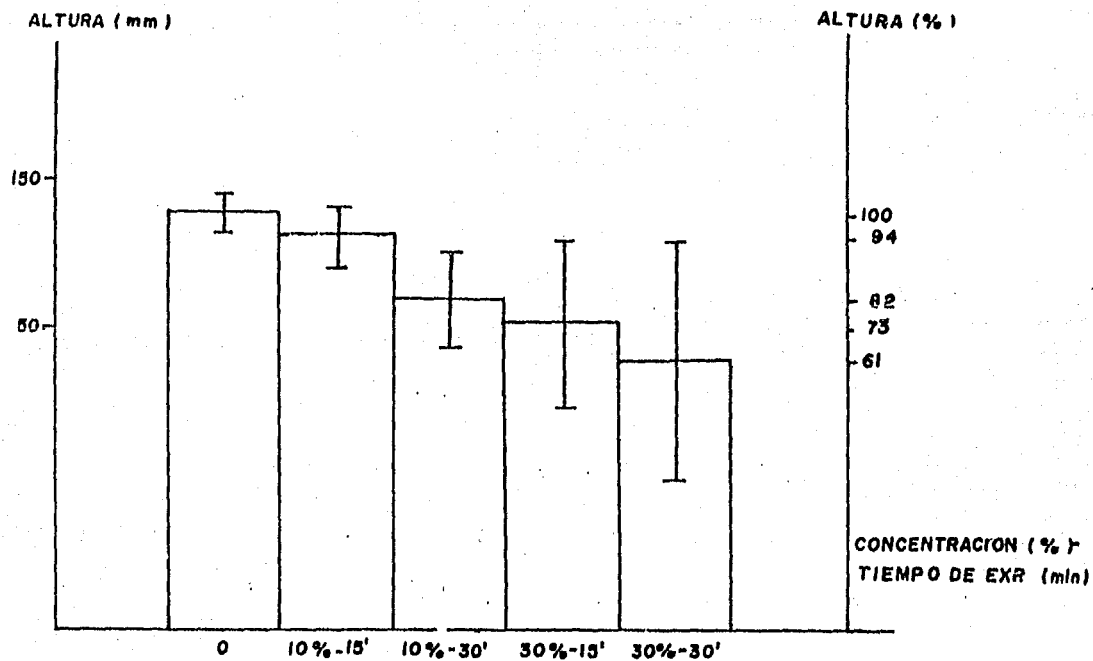
Se observó que en concentraciones del 10% con tiempos de exposición de 15 min, el grado de malformación no fue severo, (8.3%); las plántulas tenían un aspecto normal con pequeñas zonas rugosas y un tamaño en longitud (94%), similar al testigo (100%). Al aumentar el tiempo de exposición de ésta misma concentración a 30 min, el porcentaje de malformación se incrementó a un 21%. El aumento tanto de la concentración como del tiempo de exposición (30%-30 min), nos llevó a obtener porcentajes de malformación hasta de un 62.2% y con una reducción en la talla, de un 61.57%. Estos resultados se pueden apreciar en las Gráficas 5 y 6.

Los explantes que fueron expuestos a concentraciones altas, mostraron un ensanchamiento de las hojas, con un enroscamiento de las mismas sobre sí, dando un aspecto similar a un callo.

El primer fenómeno que hay que contemplar al exponer los explantes a las soluciones crioprotectoras, es el flujo de agua a través de la membrana celular. Si colocamos células animales en una solución hipotónica, estas aumentan de volumen, debido a que ingresa agua a



GRAFICA 5.- PORCENTAJE DE PLANTAS NORMALES Y CON MALFORMACION OBTENIDAS A PARTIR DE APICES CON PLACA BASAL TRATADOS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES Y TIEMPOS DE EXPOSICION AL DMSO



GRAFICA 8.- EFECTO DEL DMSO A DIFERENTES CONCENTRACIONES Y TIEMPOS DE EXPOSICION, SOBRE LA LONGITUD (% DEL TESTIGO) DE LAS PLANTULAS DE APICES CON PLACA BASAL DE AJO, CULTIVADAS IN VITRO

la célula, si este ingreso es muy acentuado, la membrana se rompe y se produce la lisis celular. Por el otro lado, si las células son colocadas en soluciones hipertónicas, estas disminuyen de volumen a causa de la salida de agua. El comportamiento osmótico de las células vegetales es comparable al de las células animales, excepto que las células vegetales poseen pared celular, compuesta ampliamente por fibrillas de celulosa. Esta pared, que rodea al plasmalema es selectivamente permeable. La pared celular, posee fuerza física y ofrece resistencia que impide un hinchamiento indefinido del citoplasma bajo condiciones hipotónicas. Cuando la célula vegetal, es colocada en agua destilada, el citoplasma aumenta su volumen hasta que presiona contra la pared celular, ésta es ligeramente elástica y principia a formar excrescencias, al mismo tiempo ejerce una presión en respuesta, que se opone al incremento de mayor entrada de agua. Eventualmente la presión de la pared es igual y opuesta a la presión osmótica y entonces el flujo neto de agua cesa. Cuando esto ocurre se dice que la célula está turgente y tiene una fuerza física. En cambio cuando están las células vegetales en una solución hipertónica sufre difusión de agua fuera de la célula y el citoplasma decrete en volumen, se contrae

eventualmente separándose de la pared celular. La célula en plasmólisis tiene menos fuerza mecánica y se dice que esta en un estado flácido (Edwards, 1976)

En los explantes que fueron tratados con diferentes concentraciones de DMSO, podemos decir que el agente penetra a la célula e incluso tiene efectos tóxicos a concentraciones altas y tiempos de exposición largos.

El DMSO se ha considerado un efectivo agente crioprotector, no sólo por los bajos puntos de congelación que brinda al aumentar su concentración. (Esquema 4), sino por su capacidad de captar moléculas de agua, aunque hay compuestos como el Acetato de Trimetil Amina (ATMA), que capta 30 moles de agua por mol de soluto, a una concentración de 1M, pero al aumentar la concentración a 3M, su capacidad disminuye y sólo es capaz de captar 9.5 moles de agua por mol de soluto. El DMSO puede captar 3 moles de agua por mol de soluto, y se mantiene constante al aumentar su concentración hasta cerca de 7 Molar (Meryman, 1971).

Otro aspecto del DMSO, se observa en un estudio realizado por Morain et al. (1966), observaron el efecto del DMSO sobre la permeabilidad y propiedades eléctricas de la piel de rana, encontraron que el agente causa un decremento en la diferencia de potencial eléctrico y un

ligero aumento en la conductividad eléctrica; además de un incremento de la permeabilidad de la piel al manitol, urea, Na^+ , K^+ , Cl^- , ocasionada por el DMSO. De este modo al poner en contacto el crioprotector con los explantes, se produce un cambio en la permeabilidad de la membrana, el DMSO penetra al interior de la célula y es probable que se una con moléculas de agua citoplasmática, de ésta forma evitará que la configuración espacial de las moléculas de agua cambien, al pasar del líquido a sólido y minimiza la formación de cristales de hielo. La facilidad de penetración del DMSO, contribuye a que los gradientes osmóticos crucen la membrana celular durante el congelamiento (McGann, 1978); y será una causa de que las células no sufran daño por choque osmótico; este choque osmótico es ocasionado generalmente con moléculas grandes, como el glicerol, debido a su poca capacidad de penetración a través de la membrana celular de algunas especies. El aumento en la concentración al congelarse la solución, puede traer un choque osmótico en las muestras, las que se deshidratan y mueren. (Valenzuela, 1988).

La velocidad de transporte de moléculas a través de una membrana puede ser modificada por numerosos factores: (Neame, 1976)

- 1.- Temperatura (que altera el movimiento al azar de las moléculas del soluto).
- 2.- Viscosidad o rozamiento entre soluto y disolvente en el que difunda
- 3.- Tamaño y forma de las moléculas del soluto y disolvente en el que difunde
- 4.- Cargas eléctricas
- 5.- Flujo del propio solvente a través de la membrana.
- 6.- Solubilidad relativa de las moléculas del soluto en los disolventes de cada lado de la membrana, y en la propia membrana.
- 7.- Superficie de la membrana expuesta al soluto.

Otro aspecto del DMSO, es su empleo a bajas concentraciones. En estudios realizados en espermatozoides humanos (Sherman, 1964) reportó que el DMSO a concentraciones altas y tiempos de exposición largos incrementa la toxicidad y como consecuencia la muerte de los espermatozoides. Por otro lado existen trabajos donde se ha empleado a altas concentraciones el DMSO. Whitters, (1979) utilizó células en suspensión, de zanahoria a concentraciones de 2.5 a 20%, se encontró que el material tolera la más alta concentración. Harada, (1985) utilizó ápices de

coles de Bruselas, en concentraciones de 6.3 y 18.9% de DMSO, obteniendo buenos resultados en su recuperación después de ser congelados; la recuperación se dió en un 14.3% para una concentración de 6.3% y en un 64% con una concentración del 18.9%.

Es importante señalar que la toxicidad y respuesta del organismo dependerá del tipo de explante que se utilice, la especie a estudiar, el tiempo de exposición a que se someta el explante, y la temperatura de aplicación, entre otros. La combinación de estos factores y el método de congelación que se utilicen son determinantes para la sobrevivencia del material.

V.4.- METODO DE CONGELACION

Considerando que altas concentraciones de DMSO nos proporcionan puntos de congelación bajos, reduce la cantidad de agua capaz de congelarse y le permiten a la células sobrevivir aún después de ser sometidas a bajas temperaturas, se realizaron las siguientes pruebas:

La primera prueba consistió en congelar los explantes con 30% de DMSO y un tiempo de exposición de 15 minutos, la temperatura alcanzada fue de -27°C , a

esta temperatura se dejaron por espacio de 40 min antes de sumergir las muestras en NL (Gráfica 7).

La segunda prueba fue con DMSO al 30% con tiempos de exposición de 15, 30, 45 y 60 min, la temperatura final alcanzada fue de -32°C , en esta temperatura se mantuvieron 15 min antes de sumergirlos en NL (Gráfica 8).

La tercera prueba fue con DMSO al 30% con tiempos de exposición iguales que en la prueba anterior, la temperatura final fue de -25°C y sostenida por 43 min, antes de pasar a NL (Gráfica 9).

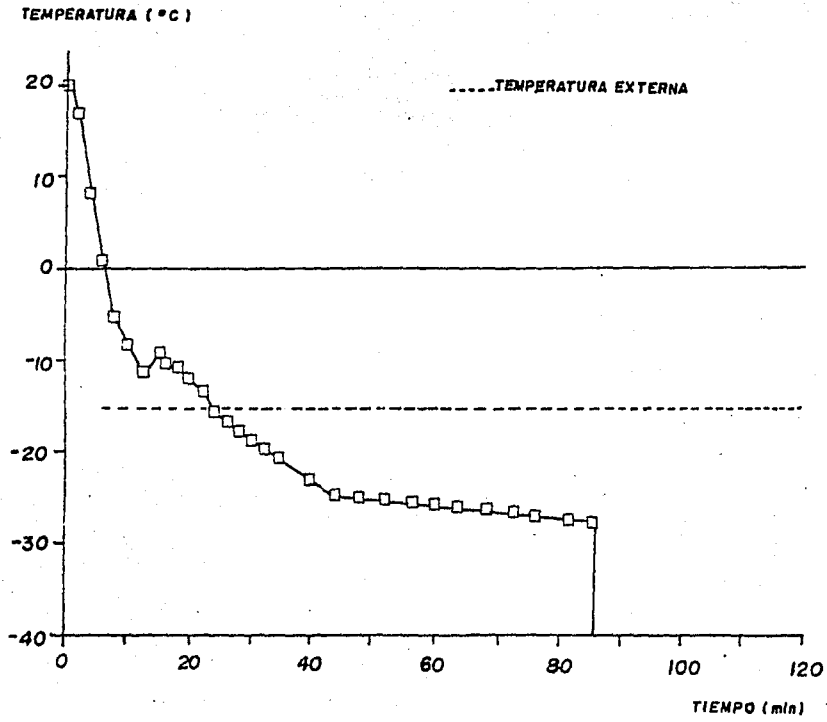
La última prueba se realizó con DMSO al 30% y tiempos de exposición de 30 y 60 min, alcanzaron una temperatura final de -27.9°C . En este caso se sumergieron las muestras en NL al alcanzar dicha temperatura (Gráfica 10).

Las tasas de enfriamiento de cada prueba se pueden observar en la Tabla XI.

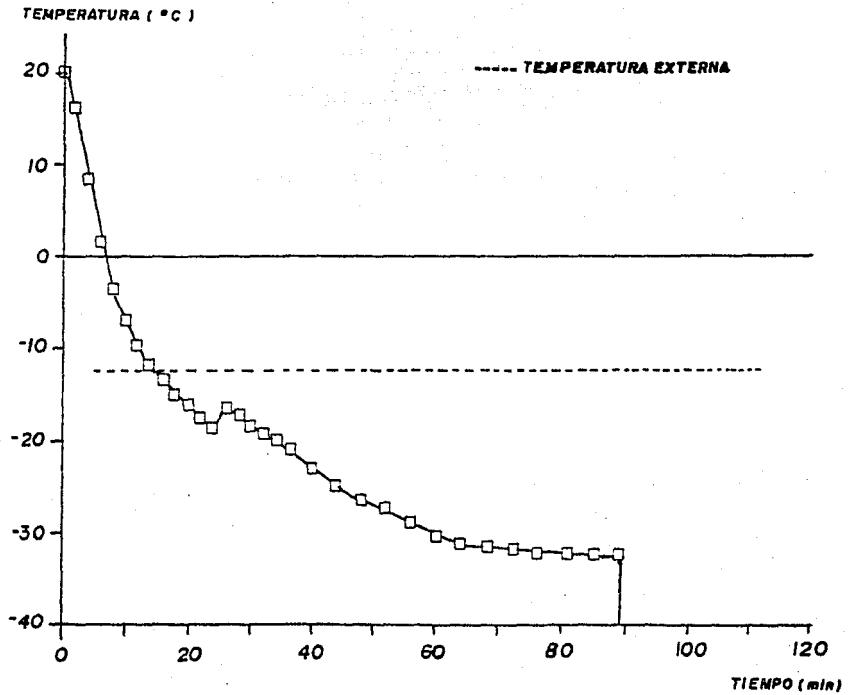
McGann (1978) señala que el daño por la temperatura sostenida, puede ser el resultado del efecto directo de las altas fuerzas iónicas en la célula, con la consecuente muerte celular. En la presente investigación, en las tres primeras pruebas se mantuvieron los explantes a una temperatura final, antes de ser

	PRUEBA I	PRUEBA II	PRUEBA III	PRUEBA IV
Tasa de enfriamiento	-0.23°C/min	-0.24°C/min	-0.16°C/min	-0.3°C/min
Temperatura final de enfriamiento	-27°C	-32°C	-25°C	-27°C
Tasa de descongelación	60.5°C/min	79.5°C/min	62.5°C/min	78°C/min
Temperatura final de descongelación	75°C	17°C	31°C	40°C

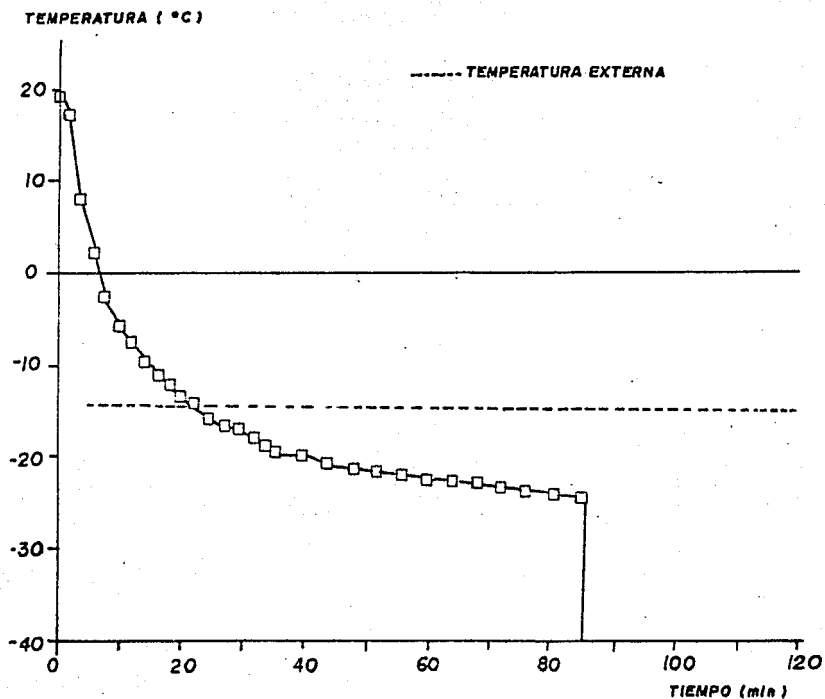
TABLA XI.- TASAS DE ENFRIAMIENTO Y DESCONGELAMIENTO, ASI COMO TEMPERATURAS FINALES OBTENIDAS DURANTE LOS PROCESOS REALIZADOS EN LAS DISTINTAS PRUEBAS.



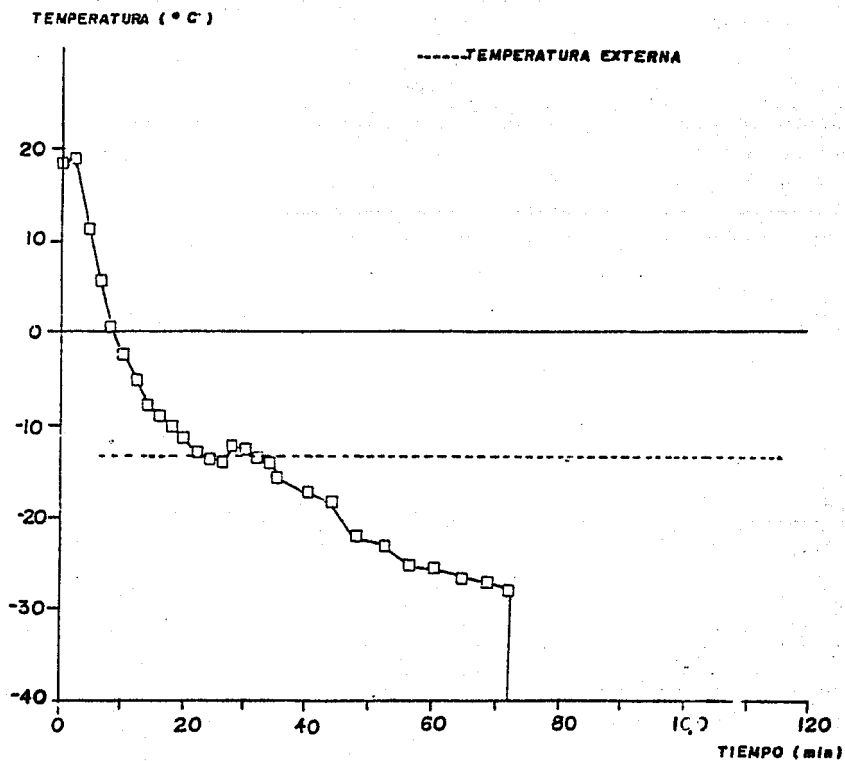
GRAFICA 7.- CURVA OBTENIDA DE LOS EXPLANTES LLEVADOS A -27°C CON UNA TASA DE -0.23 °C/min PRETRATADOS CON DMSO 30%-15 min Y ALMACENADOS 15 min EN NITROGENO LIQUIDO



GRAFICA 8.- CURVA OBTENIDA DE LOS EXPLANTES LLEVADOS A -32°C CON UNA TASA DE $-0.24^{\circ}\text{C}/\text{min}$ PRETRATADOS CON DMSO 30% -15,30,45 y 60 min Y ALMACENADOS 13 min EN NITROGENO LIQUIDO



GRAFICA 9.- CURVA OBTENIDA DE LOS EXPLANTES LLEVADOS A -25 °C CON UNA TASA DE -0.16 °C/min PRETRATADOS CON DMSO 30% - 15, 30, 45 y 60 min Y ALMACENADOS 60 min EN NITROGENO LIQUIDO



GRAFICA 10.- CURVA OBTENIDA DE LOS EXPLANTES LLEVADOS A -27.9°C CON UNA TASA DE $-0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ PRETRATADOS CON DMSO 30 % -30 y 60 min / ALMACENADOS 60 min EN NITROGENO LIQUIDO

sumergidos en el NL; obteniéndose respuestas positivas tanto al ser sostenida la temperatura antes de sumergirla en NL, como aquella prueba donde no se sostuvo la temperatura. Esto demuestra la efectividad del DMSO, como agente crioprotector.

La diferencia de temperaturas finales alcanzadas se debió a dos factores:

1.- Al ligero desplazamiento del perfil de temperatura, ocasionada por la inmersión entre prueba y prueba, lo que provoca el consumo de NL.

2.- El número de ampolletas que se colocaron no fue siempre la misma, esto modifica la dinámica de las curvas de enfriamiento (Valenzuela, 1988).

Nuestros datos son comparables a los obtenidos por Harada (1985), el utilizó ápices de coles de Bruselas con tasas de enfriamiento lentas y concentraciones altas de DMSO, las tasas que usó con estos explantes van entre $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ a $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ y los congeló por dos métodos: El primero fue con las tasas de enfriamiento señaladas hasta llegar a -30°C , manteniéndolas ahí por espacio de 15 minutos para ser descongelados posteriormente. El segundo método comprendió en sumergirlos directamente en NL durante 30 minutos, para ser luego descongelados. Ambos métodos dieron una sobrevivencia del 100% al

emplear DMSO al 18.9%. Otros experimentos realizados con meristemas de chícharo y fresa, muestran tasas de sobrevivencia altas al utilizar tasas de enfriamiento lentas. Kartha, (1985a) reporta que para meristemas de chícharo la mejor respuesta (78%) fue al someterlos a una tasa de $0.6^{\circ}\text{C}/\text{min}$, mientras que para meristemas de fresa, su mejor respuesta (98%), fue con una tasa de $0.84^{\circ}\text{C}/\text{min}$; en ambos casos se empleó DMSO al 5%, con un tiempo de exposición previo de 48 horas.

Estos datos son comparables a los obtenidos, con respecto a la metodología empleada, ya que al tomar en cuenta que el DMSO es un soluto hidrofílico de bajo peso molecular, puede ser utilizado a altas concentraciones molares y proteger a las células contra el daño por congelación. (Manzur, 1980, Meryman, 1971, McGann, 1978). Por otro lado, las soluciones con un incremento de solutos de bajo peso molecular, abaten el punto de congelación y la cantidad de agua que es capaz de congelarse (Franks, 1985), de ese modo el DMSO abate su punto de congelación al aumentar su concentración, y brinda mayor protección contra el daño por congelamiento lento. (Farrant, 1963, McGann, 1987).

V.5.- ALMACENAMIENTO

Las diferentes pruebas fueron almacenadas en NL por espacio de 15 y 60 minutos, como se observa en la Tabla XII. Ya habíamos señalado que la viabilidad de los explantes dependerá en mayor parte de todo el proceso que se lleva a cabo antes de almacenarse, como son: el tamaño, la edad y estado fisiológico de los explantes, condiciones de incubación antes y después de ser congelados, tipo de crioprotector, concentración, método de congelación y descongelación, entre otras. (Henshaw, 1980, 1985).

Kartha (1985a) señala que si los meristemas pueden permanecer a temperaturas de NL durante el almacenaje inicial por unos cuantos minutos, el almacenaje prolongado no debe ser una causa para la pérdida de la viabilidad.

Esto requiere la realización de numerosos trabajos, donde las muestras permanezcan almacenadas tiempos más prolongados.

V.6.- DESCONGELAMIENTO

La descongelación del material congelado, se efectuó por inmersión de las muestras en un baño de agua a una temperatura de 37 a 40°C.

Diversos autores han señalado este método como el más eficiente (Meryman, 1962, Bajaj, 1977, Kartha, 1982, Kartha, 1985b).

Las muestras que fueron sometidas al descongelamiento tuvieron diferentes temperaturas finales, como se puede observar en la Tabla XI; esto puede deberse también a que la dinámica de ganancia y pérdida de calor es diferente, según el número de ampollitas.

Como se puede observar en la Tabla XII, es muy probable que las diferencias en la temperatura final alcanzada y la tasa de descongelamiento, influyan en el porcentaje de sobrevivencia.

V.7.- SOBREVIVENCIA

Se consideró como criterio de sobrevivencia, cuando los explantes reanudaban su crecimiento normal, comparado contra un testigo. Esto no se aprecia de

inmediato, sino que se manifiesta después de tres o cuatro semanas de sembrarlas; esto es debido a que las células sufren un estado de "criochoque", y parecen estar muertas. (Bajaj, 1985). Los explantes de ajo, mostraron dicho fenómeno; al sembrarlos presentaron un color semicremoso. Primeramente la punta del ápice se torno verde pálido y conforme transcurrían los días, el resto del explante se volvió verde sin alargarse. Seguido las hojas iniciales, se separan a manera de concha y dan paso a la hoja interior, la cual crece de manera normal; las primeras hojas se secan y mueren.

Como se observa en la Tabla XII, en las cuatro pruebas hubo sobrevivencia, las más altas se presentaron en las pruebas II y III. Esto se pudo lograr gracias a todas ventajas que ofrece el DMSO, como son:

- 1.- El bajo punto de congelación a concentraciones altas, que protegen a las células contra el daño por congelamiento lento.

- 2.- La facilidad de penetración a la membrana celular, para evitar el choque osmótico.

- 3.- La capacidad de captar moles de agua a concentraciones altas

- 4.- Y al sistema de enfriamiento propuesto en la presente investigación, que nos facilitó la obtención de

CONDICIONES EXPERIMENTALES	EXPERIMENTO I	EXPERIMENTO II	EXPERIMENTO III	EXPERIMENTO IV
T externa de los vapores de NL (en el termo)	-15°C	-13.2°C	-14°C	-13.2°C
T alcanzada (en la capsula)	-27°C	-32°C	-25°C	-27.9°C
Distancia del termopar a la boca del termo	8 cms	8 cms	8 cms	8.2 cms
Altura del NL del termo	11.2 cms	11.8 cms	10.8 cms	11.1 cms
Tiempo de almacenaje en NL	15 min	15 min	60 min	60 min
Tratamiento DMSO 30%	15 min	15, 30, 45, 60 min	15, 30, 45, 60 min	30 y 60 min
Tiempo de lectura	4 semanas	4 semanas	4 semanas	2 semanas
Sobrevivencia	1/5 (20%)	15 min 1/5 (20%) 30 min 2/5 (40%) 45 min 0 -0- 60 min 4/5 (80%)	15 min 1/5 (20%) 30 min 1/5 (20%) 45 min 0 -0- 60 min 3/5 (60%)	60 min 3/10 (30%)

TABLA XII.- SOBREVIVENCIA DE APICES DE *Allium sativum* ALMACENADOS EN NITROGENO LIQUIDO CON DIFERENTES TIEMPOS Y CONDICIONES EXPERIMENTALES.

tasas lentas de enfriamiento.

Para obtener tasas de enfriamiento más controladas, se requiere realizar mayor número de pruebas, tanto como para las soluciones crioprotectoras, solas o mezcladas así como con los explantes que se deseen congelar.

Así mismo, el perfeccionamiento del sistema de enfriamiento propuesto, el cual podría ser acoplado a una computadora, para lograr el registro continuo del material enfriado.

Consideramos que para que sea más redituable el proceso de criopreservación, es necesario sembrar los explantes en medios de cultivos, con las condiciones hormonales adecuadas y lograr la brotación múltiple de la especie in vitro.

En el caso de esta investigación, para fines prácticos, se utilizó ápices con placa basal, por los siguientes motivos:

1.- Para el tipo de plantas, que presentan un tallo reducido es recomendable trabajar ápices con placa basal, ya que su respuesta es más favorable. (Miranda, comunicación personal).

2.- El objetivo de la investigación consistió en establecer un método adecuado para criopreservar material vegetal. El lograr su brotación múltiple

requiere de otro trabajo de investigación.

3.- Los ápices responden más rápidamente que los meristemas, (Hartmann, 1981) y el interés del trabajo radica en obtener resultados inmediatos al ser congeladas las muestras.

Como es posible comprender, el trabajo de investigación de cualquier índole es de carácter multidisciplinario. En el caso de la presente investigación se requieren trabajos posteriores que complementen y lo enriquezcan. Estos trabajos podrían ser en diversas áreas como: la citogenética, anatomía, bioquímica, agronomía entre otros.

CONCLUSIONES

Con el sistema de enfriamiento propuesto en el presente trabajo, es posible obtener tasas de enfriamiento lentas, de este modo se puede determinar el comportamiento de las soluciones crioprotectoras, solas o mezcladas, al someterlas a temperaturas bajo cero, y predecir su tasa de enfriamiento.

Podemos concluir en este aspecto, que concentraciones altas de DMSO nos brindan puntos de congelación bajos y períodos de formación de hielo cortos, se reduce la cantidad de agua congelable, que forma cristales de hielo causantes del daño físico.

Al congelar las muestras, es conveniente utilizar dos termos; uno de ellos servirá para enfriar las muestras a las tasas y temperaturas deseadas y el otro para almacenarlas, en caso contrario, será necesario realizar un perfil de temperaturas cada vez que se requiera, ya que si se almacenaron las muestras en el mismo termo, esto ocasiona el consumo del NL, y por consiguiente el desplazamiento del perfil. (Valenzuela, 1988.)

Es necesario también, determinar con precisión la dinámica de enfriamiento de las soluciones crioprotectoras, con que se desee trabajar y considerar

el número de ampolletas que se coloquen en la varilla, ya que esto influye fuertemente en las tasas de enfriamiento y la temperatura final alcanzada. (Valenzuela, 1988)

Por otro lado la técnica, para la aplicación y la eliminación del DMSO es adecuada para estos explantes y especie, ya que no se presentaron altos índices de contaminación por manipulación en esta etapa del experimento.

Los métodos de congelación lenta y descongelación rápida, para ápices con placa basal de ajo, así como las altas concentraciones de DMSO con tiempos prolongados de exposición, son favorables para obtener respuestas positivas de sobrevivencia; por supuesto será conveniente realizar: mayor número de pruebas para incrementar la sobrevivencia, pruebas con diferentes crioprotectores y la prolongación de los tiempos de almacenamiento para determinar si no existe decremento en la sobrevivencia.

Los explantes de A. sativum, con altas concentraciones de DMSO (30% v/v) y tiempos de exposición prolongados (60 min) sufren deformaciones, por ser este en estas condiciones altamente tóxico.

Por otro lado esta misma concentración y tiempo de

exposición resulta favorable al momento de ser congelados los explantes. Esto puede ser provocado por las propiedades coligativas del DMSO, la capacidad de captar moles de agua y la velocidad de penetración a través de la membrana. Esta velocidad puede ser favorecida al ser aplicado a temperatura ambiente, al facilitar su entrada capta las suficientes moles de agua y detiene o decrece su penetración al enfriarse la muestra, de este modo entra suficiente crioprotector para evitar el daño por congelamiento lento y no es tóxico a altas concentraciones.

BIBLIOGRAFIA

- Bajaj, Y. P. (1977). Cryobiology of Plant Cell Cultures and Establishment of Gene-Banks. en Bajaj y Reinert (eds) Plant Cell, Tissue and Organ Culture.
- _____ (1979). Technology and Prospects of Cryopreservation of Germplasm. en Euphytica. 28: 267-285.
- _____ (1985). Cryopreservation of embryos. (ed) K. K. Kartha. Cryopreservation of Plant Cells and Organs
- Chang, Ch. (1968). The effect of Dimethyl Sulfoxide (DMSO) on Cellular Systems. P S E B M Vol. 128: 60-66
- Cronquist, A. (1981). An Integrated System of Classification of Flowering Plants. Columbia Univ. Press. New York
- Edwards, A. (1976). Bioquímica y Fisiología Celulares. El Manual Moderno S. A. México
- Eskin, M. (1979). Plant Pigments, Flavors and Textures: The Chemistry and Biochemistry of Selected Compounds. Academic Press. U S A 45-58
- Farrant, J. (1965). Mechanism of Cell Damage During Freezing and Thawing and its Prevention. Nature, March 27. Vol 205: 1284-1287
- Fernandez, M. (1976). Acción del DMSO sobre leucocitos Humanos. Tesis Profesional. Esc. Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Puebla
- 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 Cells and Organs. Academic Press.

- Font Quer, P. (1980). Plantas Medicinales. Editorial Labor. Sexta edición. España
- Franks, F. (1985). Biophysics and Biochemistry at low temperatures Cambridge University Press, Great Britain
- García, A. (1979). Enfermedades de las plantas de la Republica Mexicana Ed. Limusa, México.
- Giese, A. (1983). Fisiología Celular y General. Ed. Interamericana. México.
- Guillaumin, A. (1970). La vida de las Plantas. Ed Labor, España.
- Harada, T., Inaba, T. Yakuma y Tamura (1985). Freezer-preservation of spices isolated from small heads of brussels sprouts. Hort Science 20. 670-680
- Hartmann, H. (1981). Propagación de Plantas. Principios y Practicas. Ed. C.E.C.S.A. , México.
- Henshaw, G. (1975). Technical aspects of tissue culture storage for genetic conservation. en Frankel y Hawken (eds) Crop Genetic Resources for Today and Tomorrow.
- _____ (1980). Tissue Culture Method for Storage and utilization of: Potato germplasm. en Ingram y Helgeson (eds) Tissue Culture Methods for Plant Pathologists
- _____ (1985). Cryopreservation of Potato Meristems. en K. K. Kartha (ed) Cryopreservation of Plant Cells and Organs. Academic Press.
- Hernandez, M. (1974). Valor Nutritivo de los Alimentos Mexicanos. Ed. Instituto Nacional de la Nutrición. México.
- Hutchinson, J. (1965). Families of flowering plants monocotyledons. Ed. Oxford University Press. Amen House, London 4: 639-640
- IBPGR. (1986a). Desing, Planning and Operation of in vitro genebanks. Rome.

- _____ (1986b). Advisory Commite on in vitro storage.
Repot of the Third Meeting. Rome
- Jagodzinski, R. (1966). Obtaining the time-temperature profile. Cryobiology. Vol.2, No. 4 193-197
- Kartha, 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.
- _____ (1982). Genepool Conservation through Tissue Culture. en. Proc. Cested and Anbs, Singapore. 213-218
- _____ (1984a). Frezee Preservation of Meristems. en Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Vol 1
- _____ (1984b). Tissue Techniques for Virus Elimination and Germplasm Preservation. en Janick J. (ed). Breeding Reviews. Vol 2
- _____ (1985a). Meristems Culture and Germplasm Preservation en K. K. Kartha Cryopreservation of Plant Cells and Organs
- _____ (1985b). Cryopreservation of Plant Cells and Organs. Newsletter. No. 45, Marzo 1
- Luyet, B. (1966). An attemp at systematic analysis of the notion of freezing rates and at an evaluation of the main contributory factors. Cryobiology. Vol 2 No. 4 198-205
- Manzur, P (1970). Cryobiology: The freezing of Biological Systems. Science. Vol 128: 60-66
- Maroto, E. (1983) Horticultura, Herbacea Especial. Mund-Prensa. Madrid.
- McGann, L. (1978). Differing actions of penetrating and nonpenetrating cryoprotective agents. Cryobiology Vol 15. 382-390
- _____ (1987). Cryoprotection by Dimethyl Sulfoxide and Dimethyl Sulfone. Cryobiology. Vol 24 11-16

- Meryman, H. (1962). Freezing of living cells: Biophysical considerations. en Sylverton Memorial Analitic Cell Culture. National Cancer Institute. Monograph No. 7. 7-15
- _____ (1971). Cryoprotective agents. Cryobiology Vol 8, 173- 183
- Meryman, T.H. y R. J. Williams (1985). Basic principles of freezing injury to plant cells: natural tolerance and approachs to cryopreservation, en K. K. Kartha (ed), Cryopreservation of plants cells and organs. Academic Press.
- Messiaen, C. (1979). Las Hortalizas, Técnicas Agrícolas y Producciones Tropicales. Ed. Blume, México.
- Meyer, B. (1976). Introducción a la Fisiología Vegetal. Ed. Buenos Aires, Argentina
- Miranda, L. (1985). Propagacion in vitro de dos cultivares de Allium cepa. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias U N A M
- Montes, J. (1978). Estrategia para la conservacion de los Recursos Genéticos. en Cervantes Santana (ed). Recursos Genéticos Disponibles en Mexico. Sociedad Mexicana de Fitogenética A. C. Chapingo, México.
- Morain, W. (1966). Effect of Dimethyl sulfoxide on permeability and electrical properties of frog skin. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. Vol 154. No. 2
- Morell, G. (1973). Hay dinero y salud en el ajo. Ed. Síntesis. Barcelona
- Morel, G. (1975). Meristem culture techniques for the long-term storage of cultivated plants. en Frankel y Hawkens (eds). Crop Genetic Resources for Today and Tomorrow.
- Moretsen, A. (1971). Horticultura Tropical y Subtropical. Ed. Blume, Madrid.

- Mullin, R. (1976). Cold storage maintenance of strawberry meristem plantlets. Hort Science. Vol 11 No. 2: 100- 101
- Neame, K. (1976). Cinética del transporte a través de membranas. Ed. Blume, Madrid
- Nitzsche, J. (1984). Germplasm Preservation. en Evans, Ammirato y Yamada (eds). Handbook of Plant Cell Culture. Vol 1
- Puresglove J. (1972). Tropical Crops Monocotyledons. segunda impresión. Longman, London
- Rubluo, A. (1985). Estrategias para la preservación de germoplasma vegetal in vitro. en Robert M y Loyola V. (eds). El cultivo de tejidos vegetales en México. CONACYT
- Roberts, E. (1984). Recalcitrant seeds: their recognition and storage. en Holden y Williams (eds). Crop Genetic Resources: conservation & evaluation. IBPGR, Rome.
- Seitz, U. (1987). Cryopreservation of Plant Cell Cultures. en Plant Medica IV: 311 - 314
- Seymour, J. (1978). El Horticultor Autosuficiente 2. Ed. Blume, España
- Sherman, J. (1964). Dimethyl sulfoxide as protective agent during freezing and thawing of Human spermatozoa. P S E B M Vol. 117. 216 - 264
- Swift, L. (1974). Botanical Classifications. Archon Books.
- Ulrich, J. (1979). Effect of a mixture of cryoprotectants in attaining liquid nitrogen survival of callus cultures of a tropical plant. Cryobiology 16, 550 - 536.
- Valenzuela, M.L. (1988). Respuesta in vitro de ápices de Allium sativum sometidos a Nitrogeno Líquido en presencia de glicerol. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias, U N A M

Withers, L. (1979). Cryobiology. University of Leicester,
England

_____ (1979). Freeze Preservation of Somatic
Embryos and Clonal Plantlets of Carrot (*Daucus
carota* L.) *Plant Physiol.* 63, 460-467

_____ (1980). Tissue Culture Storage for Genetic
Conservation. en IBPGR. Technical Report, Rome.

Wilkins y Dodds, (1983). The application of Tissue
Culture Techniques to Plant Genetic Conservation.
Sci.Frog. Oxof. 96. 259 - 284.