UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

CRIOPRESERVACION DE *Strombocactus disciformis* (De Candolle) Britton y Rose, COMO ALTERNATIVA DE CONSERVACION DE CACTACEAS AMENAZADAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

JOEL PEREZ CRISANTO

DIRECTOR DE TESIS: M. EN C.J. GERARDO ORTIZ MONTIEL

IZTACALA

LOS REYES IZTACALA, ENERO 2002

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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 esta 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.

U.N.A.M CAMPUS

CRIOPRESERVACIÓN DE *Strombocactus disciformis* (De Candolle) Britton y Rose, COMO ALTERNATIVA DE CONSERVACIÓN DE CACTÁCEAS AMENAZADAS.

DEDICADO A

A mis padres

A mis hermanos

A mis maestros

A mis amigos

A la vida...

AGRADECIMIENTOS

M. en C. Gerardo Ortiz Montiel por ser un amigo y maestro incomparable de quien he aprendido el conomiento mas importante dentro de la fisíologia vegetal y el cultivo de tejidos, especialmente de cactáceas; y por haber sido paciente y apoyar en todo momento mis inquietudes dentro de la investigación

M. en C. Ernesto Aguirre León por complementar gran parte de mi conocimiento dentro del cultivo de tejidos vegetales y apoyar mi desarrollo profesional

M. en C. Socorro Sánchez Correa por colaborar con su conocimiento en la elaboración de este trabajo con imporantes sugerencias

Biol. Manuel Mandujano Piña por su apoyo incondicional y profesional para la conclusión de este trabajo

Biol. Antonia Trujillo Hernández por su colaboración durante las pruebas de viabilidad de semillas y por sus valiosas aportaciones a este trabajo

M. en C. Ramón Victor Moreno Torres por su amistad y apoyo sincero en mi desarrollo académico

Biol. Rita Flores León por iniciarme e instruirme en la realización de proyectos de micropropagación con la familia Cactaceae

Biol. Jerónimo Reyes Santiago por apoyar y guiar mi inclinación sobre las cactáceas y plantas suculentas, y por confiar en mi para el desarrollo de proyectos de conservación en campo

Y de antemano a todos mis maestros y amigos quienes dentro de mi corta vida académica han compartido sus experiencias y conocimientos en laboratorio y campo, porque gracias ha ellos ha crecido día a día mi interés por las cactáceas

ÍNDICE

1. RESUMEN....2
1.1 Abreviaturas....3
2. INTRODUCCIÓN....4
2.1 Generalidades....4
2.2 Importancia Socio-económica de las Cactáceas....6
2.3 Consecuencias de la Sobre-explotación....7
2.4 Cultivo de Tejidos como Medio Alternativo en la Propagación de Cactáceas....8
2.5 Criopreservación como Medio de Conservación de Germoplasma para Cactáceas Amenazadas....9
3. ANTECEDENTES....11
4.DESCRIPCIÓN (*Strombocactus disciformis*)....12
5. OBJETIVOS....13
5.1 General....13
5.2 Particulares....13
6. MÉTODO DE CRIOPRESERVACIÓN DE *Strombocactus disciformis* (diágrama de flujo)....14
7. MATERIAL Y MÉTODOS....15
7.1 Medios de Cultivos Líquidos para Criopreservación....16
7.2 Crioprotectores....17
7.3 Criopreservación....17
7.3.1 Procedimiento 1....17
7.3.2 Procedimiento 2....20
7.3.3 Procedimiento 3....22
7.3.4 Prueba de TTC....23
8. RESULTADOS....24
8.1 Procedimiento 1....27
8.2 Procedimiento 2....31
8.3 Procedimiento 3....32
8.4 Prueba de TTC....36
9. DISCUSIÓN....37
10. CONCLUSIONES....44
11. LITERATURA CITADA....46
12. GLOSARIO....51

IZT.

1. RESUMEN

Las cactáceas constituyen una de las familias de plantas más diversas dentro del territorio mexicano y a la vez se encuentran seriamente amenazadas por diversos factores, tanto naturales como humanos. Los programas de conservación están dirigidos en su mayor parte a la reproducción de especies en riesgo de desaparecer. La propagación de cactáceas se ha realizado comúnmente mediante procedimientos tradicionales, como el cultivo de semillas, esquejes e injerto, sin embargo a ultimas décadas una de las herramientas más viables para disminuir las presiones de colecta y el saqueo inmoderado ha sido el cultivo de tejidos vegetales, logrando propagar *in vitro* muchas cactáceas en peligro de extinción. Existen métodos nuevos de conservación, mediante el almacenamiento de germoplasma a bajas temperaturas, los principales trabajos se han realizado en especies herbáceas, maderables y muchas de interés comercial, en cuanto a cactáceas se refiere la criopreservación aún es jóven y prácticamente no hay trabajos con miembros de esta familia. El presente trabajo tuvo como objetivo implementar un método adecuado de criopreservación de células, fracciones de plantas madre y semillas de *Strombocactus disciformis* (cactácea amenazada); que permita en un futuro aprovechar líneas de plantas selectas para la investigación y la conservación. Se logró propagar masivamente callos friables, fotosintéticos y con alta capacidad reproductiva a partir de la activación areolar. La base para criopreservar plantas han sido trabajos sobre herbáceas y de interés comercial, en contraste con la pobre labor realizada sobre la familia en estudio. Tomando como fundamento estos protocolos se han desarrollado en esta investigación tres procedimientos básicos para la criopreservación de *S. disciformis*. La criopreservación de callos ha dado buenos resultados estableciendo una fase de precultivo en medio MS adicionado con 400 mg/l manitol, el empleo de Dimetilsulfóxido 10 % + Manitol 1 M + Sacarosa 0.5 M como crioprotectores, más un proceso de enfriamiento lento y congelamiento en nitrógeno líquido a –196 °C por 15 días. El proceso de recuperación de explantes fue efectivo con agua corriente a 40 °C y con el empleo de medio MS adicionado con 0.5 mg/l 2,4-D, manteniendo callos estbales por 5 semanas. La criopreservación de semillas de *S. disciformis* manifiesta que el enfriamiento lento es de suma importancia y la adición de crioprotectores individuales, como Glicerol 10 % para inmersión a –40 °C y DMSO 10 % para inmersión a –196 °C favorecen la viabilidad del material durante el proceso de recuperación. Los resultados de este trabajo representan un primer paso para establecer un método viable de criopreservación de cactáceas, los ensayos con esta familia siguen siendo limitados; pero existen puntos importantes que son necesarios considerar, como la fase de precultivo, la combinación de crioprotectores, el enfriamiento lento e incluso uno o varios procesos de deshidratación celular, para lo cual es necesario dar continuidad a esta línea de investigación de gran importancia en la preservación de germoplasma de especies con riesgo de extinción como lo son las cactáceas.

1.1 Abreviaturas

AIA	Ácido indol acético
ANA	Ácido naftalen acético
BAP	Bencil-amino-purina
DMSO	Dimetil sulfóxido 10 %
GLI	Glicerol 10 %
KIN	Cinetina
MAN	Manitol 1 M
N.L.	Nitrógeno líquido
PVS2	Mezcla: 30% glicerol + 15% etilenglicol + 15% DMSO + 0.4 M sacarosa
SAC	Sacarosa 0.5 M
Solución de Vitaminas	Tiamina HCl 0.9 mg/l, piridoxina HCl 0.1 mg/l, ac. nicotínico 0.1 mg, glicina 0.65 mg/l
SOR	Sorbitol 1 M
rpm	Revoluciones por minuto
2ip	2-Isopentiladenina
2,4-D	2,4 diclorofexoniacético

2. INTRODUCCIÓN.

2.1 Generalidades

México comprende una de las riquezas biológicas más importantes a nivel mundial, está considerado entre los doce países denominados megadiversos, los cuales en conjunto albergan entre 60 y 70% de la diversidad biológica total del planeta. Nuestro territorio posee alrededor del 10% de la biodiversidad terrestre a nivel mundial (Mittermeier, *et al.* 1992), valor que sobresale incluso de países con límites territoriales similares (Dirzo, *et al.* 1994).

La superficie ocupada por México es particularmente importante ya que en ella se entrelazan dos de las principales regiones biogeográficas: la neártica y la neotropical, marcándose una gran zona de contacto que provoca una mezcla de elementos faunísticos y florísticos únicos (Rzedowski, 1978). Entre las principales causas que han originado esta biodiversidad se pueden resaltar la topografía accidentada del territorio, la variedad de climas y una compleja historia geológica y biológica, entre otras. La interacción de todos estos factores ha contribuido a formar un mosaico de condiciones ambientales y microambientales que promueven una gran variedad de hábitats y formas de vida.

México ostenta el privilegio de poseer en su territorio un universo vegetal de excepcional diversificación, variedad e importancia. De los grupos taxonómicos mejor representados sobresalen seis familias que en suma abarcan casi 40% del total de géneros y especies del país, y clasificadas de acuerdo al mayor número de especies encontramos a Compositae, Leguminosae, Graminae, Orchidaceae, Rubiaceae y Cactaceae (Rzedowski, 1991). Como punto de atracción principal y por representar una de las familias mejor diversificadas de nuestro país, las cactáceas se han convertido recientemente en objeto indiscutible de estudio, abarcando gran variedad de áreas científicas como la ecología, fisiología, evolución, etc.

Las cactáceas son un grupo botánico originario del continente americano con aproximadamente 2000 especies, esto las coloca como una de las familias de mayor diversidad de especies y la de mayor riqueza entre las

denominadas plantas suculentas, las cuales abarcan miembros de las familias Agavaceae, Aizoaceae, Azclepiadaceae, Bromeliaceae, Euphorbiaceae, Liliaceae, etc. (León de la L, *et al.*, 1994; Bravo, *et al.* 1995).

Las cactáceas se distribuyen desde la Patagonia en Argentina hasta el hemisferio norte en Canadá, incluyendo Islas Galápagos y Las Antillas en el Caribe, pasando por regiones montañosas, tropicales y subtropicales, hasta lugares áridos y semiáridos, y desde el nivel del mar hasta por encima de los 5,000 metros de altitud, habitando en diferentes tipos de vegetación específicos, como el matorral xerófilo, el bosque tropical caducifolio, dunas costeras e incluso zonas húmedas (Bravo *op. cit.*, Arias, 1997).

En México las cactáceas constituyen parte importante de la flora total del país con un total de 54 géneros y 850 especies (Arias, 1993). Son notables no sólo por la abundancia de especies, sino por presentar un índice de elevado endémismo. Del total de géneros existentes en el territorio mexicano, 15 de ellos (31.3%) están estrictamente restringidos a sus límites geográficos y 20 son endémicos (Hernández, *et al.* 1994); y de forma global según Rzedowski (1991) establece que el 95 % de las especies de cactáceas mexicanas están restringidas a Mega-México 1.

Las cactáceas en buena parte dominan en asociaciones vegetales y determinan el carácter de ecosistemas únicos, principalmente en regiones xerófitas. Nuestro país se muestra como un centro muy importante de diversificación debido a la variación de sus zonas áridas cuyas condiciones han favorecido la adaptación y desarrollo de esta familia, a pesar de parecer medios sumamente hostiles (Bravo, *et al.*, 1995).

Las zonas áridas donde se distribuyen las cactáceas de manera distintiva en México son: la zona árida de Tehuacán-Cuicatlán en los estados de Puebla y Oaxaca; la zona árida del Vizarrón en Querétaro; la zona árida de Meztitlán y la del Valle del Mezquital en Hidalgo; la zona árida del desierto Chihuahuense en la altiplanicie mexicana que comprende los estados de Aguascalientes, Coahuila, Chihuahua, Durango, Guanajuato, San Luis Potosí, Tamaulipas, Zacatecas, y la zona árida de la depresión del Balsas de Guerrero y Michoacán, la zona árida de Sonora y Baja California, así como la parte norte de la Península de Yucatán (Bravo-Hollis, 1978).

La mayoría de los escenarios en donde habitan las cactáceas destacan por ser de ámbito seco que evolutivamente representa el medio ideal de adaptación de esta familia. Las cactáceas manifiestan hábitos y estructuras anatómicas especializadas, lo que les confiere una apariencia muy singular, caracterizándose por la suculencia de sus tejidos almacenadores de agua, particularmente carnosos, con formas globosas, redondeadas, con simetría helicoidal casi perfecta, algunos aplanados, en forma de roseta, cilíndricos, columnares, coloniales e incluso epífitas, sólo por mencionar algunas de la basta diversidad morfológica.

Las formas peculiares de las cactáceas les permiten disminuir sustancialmente la superficie expuesta al ambiente inhóspito, aumentando el volumen interno y obteniendo una resistencia potencial a periodos prolongados de escasez de agua. Además las hojas ausentes, o bien, modificadas a manera de espinas a lo largo de toda su cutícula crasa contribuyen a preservar tejidos meristemáticos, condensar el agua de rocío por las mañanas y/o a la vez generar una micro-atmósfera aislante de las temperaturas extremas (Bravo *op. cit.*, Arreola, 1997) y sobre todo este tipo de plantas poseen un mecanismo fisiológico que favorece la incorporación de bióxido de carbono con una pérdida mínima de agua, es decir, el llamado metabolismo ácido de las crasuláceas (MAC), el cual permite fijar la luz solar durante el día en forma de uniones químicas de alta energía, pero intercambiando gases durante la noche, almacenando ácido málico como resultado de la fijación de bióxido de carbono (Ezcurra, 1997).

Las cactáceas han llegado a ser componentes dominantes en varios tipos de vegetación, sobre todo las de zonas áridas, jugando un papel ecológico importante en el equilibrio de estos ecosistemas, contribuyendo en gran parte con la sobrevivencia de muchas otras especies, desde aves y mamíferos, hasta insectos ofreciéndoles alojamiento, protección o alimento (León de la L. *et al.*, 1994, Valiente-Banuet, *et al.* 1997).

2.2 Importancia Socio-económica de las Cactáceas

Es por demás importante señalar que las cactáceas representan un gran potencial como fuente natural aprovechable, ya que se han convertido en un recurso explotado por más de tres siglos, encontrándose con frecuencia en múltiples productos populares que forman parte del desarrollo histórico-cultural de numerosas

comunidades indígenas y rurales de nuestro país, siendo en muchos casos herencia de nuestros antepasados, y perdurando hasta nuestros días en las prácticas cotidianas de la sociedad urbana.

De tal manera podemos encontrar diversos derivados comestibles de semillas (*Carnegia gigantea, Ferocactus spp, Pachycereus spp, Stenocereus spp,*), tallos (*Echinocactus spp, Echinocereus sp,p Ferocactus spp*), y frutos (*Hylocereus spp, Myrtillocactus geometrizans, Opuntia spp, Pereskiopsis aquosa, Selenicereus spp, Stenocereus spp*), así como un incontable de usos domésticos que comprenden desde vigas para construir habitaciones (*Pachycereus marginatus*), herramientas (*Opuntia spp., Pachycereus pecten-aboriginum*), forraje (*Opuntia spp*), textiles (*Cephalocereus spp, Coryphantha spp, Echinocactus platyacanthus*), colorantes (*Opuntia spp*), hasta los utilizados para realizar artesanías (*Cylindropuntia imbricata*), y uno de los más importantes, los de uso medicinal y religioso (*Ariocarpus fissuratus, A. retusus, Coryphantha compacta, Echinocereus triglochidiatus, Epithelantha micromeris, Lophophora williamsii, Mammillaria heyderi, Mammillopsis senilis, Opuntia spp y Pelecyphora aseliformes*) (Sánchez-Mejorada, 1982).

Como una de las prácticas más destacadas a causa de la remuneración económica, se encuentra el uso ornamental, que en cactáceas se debe a las extrañas y raras formas de sus tallos, junto con el colorido y la diversidad de sus flores. Esta utilidad se encuentra bien definida en géneros como *Ariocarpus, Astrophytum, Cephalocereus, Coryphantha, Echinocactus, Mammillaria, Strombocactus, Thelocactus, Turbinicarpus,* etc, sobre todo a nivel comercial a gran escala en mercados nacionales e internacionales.

2.3 Consecuencias de la Sobre-explotación.

El uso ornamental en cactáceas, se ha realizado tradicionalmente desde nuestros antepasados en culturas prehispánicas (Bravo, *et al.* 1995), sin embargo actualmente este uso ha estado ligado a la colecta inmoderada de ejemplares silvestres, realizado en forma masiva tanto por nacionales como por extranjeros, provocando que nuestro país se coloque como el de mayor número de especies de cactáceas amenazadas con un total de 35% del total representadas en México (Hernández, *et al.* 1994).

Gran parte de la amenaza de estas especies se debe a un agregado de problemas que involucran presiones de colecta, destrucción de hábitats naturales para el establecimiento de áreas agropecuarias y ganaderas, sobre-explotación de ejemplares adultos, juveniles e incluso semillas; todo esto aunado indudablemente al comercio ilegal y el saqueo irracional de especies endémicas y que en muchos casos están ligados a la ignorancia por parte del ser humano en cuanto a la importancia biológica de estas plantas, que día con día se aproximan más a la extinción (Hernández, *et al.* 1994, Clayton, *et al.* 1992, Rubluo, *et al.* 1993).

La familia Cactaceae representa uno de los grupos botánicos más vulnerables, con alrededor de 50 especies en el apéndice I de CITES (Convención Internacional sobre la Comercialización de especies de Flora y Fauna en Peligro de Extinción, siglas en inglés) y el resto de la familia en el apéndice II. Además de tener 581 (alrededor del 35 %) de las especies de cactáceas en la lista roja de UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza) (Anderson, 2000)

Afortunadamente en los últimos años se han logrado establecer procedimientos para la propagación de cactáceas amenazadas, en peligro de extinción y en buena parte las endémicas, a través de técnicas tradicionales a partir de semillas, esquejes, vástagos, injertos y en algunos casos la hidroponia. Sin embargo, estas técnicas no han sido satisfactorias, debido a que muchas de las especies presentan un crecimiento muy lento, algunos ejemplares presentan pocos o ningún brote, las semillas de algunas especies presentan dormancia o largos periodos de germinación; o bien algunas plántulas son susceptibles a fitopatógenos. Además, la mayoría de las especies son autoestériles y requieren de algunos años para alcanzar su madurez sexual (Johnson, *et al.* 1979, Mauseth, 1977, Clayton, *et al.* 1990, Pérez, *et al.*1998).

2.4 Cultivo de Tejidos Vegetales como Medio Alternativo en la Propagación de Cactáceas.

El cultivo de tejidos vegetales ofrece muchas ventajas, sobre todo al hablar de propagación masiva, ya que permite producir un número vasto de plantas a partir de pocos explantes, obteniendo material genéticamente uniforme y libre de patógenos. Además, los ciclos de cultivo se acortan considerablemente e incluso se pueden favorecer los periodos de floración. También se reduce la tasa de mortalidad en etapas tempranas de desarrollo y permite mantener una matriz de plantas para investigación. Como una estrategia real para la recuperación de especies amenazadas y en peligro de extinción, el cultivo de tejidos puede disminuir en gran

medida las presiones de colecta en este tipo de plantas e indirectamente ayudar a la preservación de especies, disminuyendo de manera gradual la demanda de plantas colectadas de campo, y fomentando el consumo de ejemplares propagados mediante este método (Johnson, *op. cit.* 1979, Mauseth, 1977, Pérez *et al.* 1998, Rubluo, 1993, Vystok, *et al.* 1984, Stuppy, *et al.* 1992).

No obstante, a pesar de ser este método de propagación una alternativa viable para la producción masiva de plantas, es necesario conocer a detalle el mecanismo por el cual una planta puede desarrollarse en un medio artificial. Como una herramienta más dentro del cultivo de tejidos vegetales, se encuentra el cultivo de células en suspensión, mediante el cual se pueden seleccionar células resistentes o adaptadas a factores físicos, químicos o biológicos. Se puede inducir el desarrollo de embriones somáticos, de suma importancia debido a que se pueden obtener estructuras morfológica y funcionalmente equivalentes a embriones verdaderos a partir de células somáticas y así lograr una producción exitosa de organismos en un tiempo considerablemente corto (Debergh, 1991). O bien pueden realizarse estudios sobre aspectos metabólicos como biosíntesis de alcaloides, flavonoides, extracción de pigmentos, nutrición, sustancias activas, parámetros fotosintéticos y respiratorios.

Establecer de manera adecuada y precisa las condiciones óptimas de desarrollo de individuos en un cultivo de células en suspensión así como su comportamiento en el mismo, ayudaría considerablemente a hacer más eficientes las técnicas de micropropagación y uso de células para la síntesis de metabolitos. Esto es importante ya que conociendo detalladamente el funcionamiento de un sistema de cultivo controlado, permitirá desarrollar una producción exitosa con un mínimo de problemas durante el proceso de cultivo, lo que se vería reflejado en términos de producción como una disminución considerable en el costo de inversión.

2.5 Criopreservación como Medio de Conservación de Germoplasma para Cactáceas Amenazadas.

La necesidad de fomentar medios alternativos para la conservación de germoplasma ha sido una tarea que continuamente se ha tratado de perfeccionar, una de las herramientas mas utilizadas para este fin es la criopreservación, empleada en especies vegetales desde hace más de tres décadas. La criopreservación es un medio práctico y eficiente de almacenamiento de material vegetal por largos períodos de tiempo con un

requerimiento mínimo de espacio, mantenimiento y costos (Lambardi, *et al.* 2000, Takagi, *et al.* 1997), además posee algunas ventajas importantes frente a los métodos tradicionales de almacenamiento, sobre todo de semillas, cuyo deterioro es muy frecuente (Thorpe, 1981).

La mayor parte de los trabajos de criopreservación se han realizado en especies herbáceas, forestales (*Pinus caribaea*, *Picea abies*, etc.), tropicales (*Cocos nucifera*, *Elaeis guineensis*, etc.) y/o de interés comercial (*Malus* spp, *Citrus* spp, *Vitis* spp, etc.) (Dodds, 1991); siendo que esta técnica puede ayudar a la conservación de germoplasma, apoyando la conservación de la biodiversidad y evitando la erosión genética de muchas otras especies que se encuentran en riesgo de extinción.

La protección de material vegetal de cactáceas por criopreservación, apoyaría el desarrollo de una amplia variedad de trabajos de investigación y preservación, desde propagación masiva *in vitro* de ejemplares, hasta experimentos a nivel molecular o fisiológico sin necesidad de destruir plantas madre para cada uno de estos trabajos. Además de disminuir potencialmente la cantidad de cambios genéticos que pueden ocurrir debido a frecuentes subcultivos de estructuras como callos (De Verno, *et al.* 1999).

Los procesos de criopreservación se han aplicado principalmente en meristemos, ya que en algunos casos tienen la ventaja de evitar variantes comúnmente asociadas a regeneración de brotes a partir de callos (Pennycooke *et al.* 2000), sin embargo en cactáceas se ha observado que la regeneración vía callo no afecta el desarrollo de individuos, aun en callos mantenidos por mas de un año en subcultivos. Se ha comprobado que dentro de las diferentes técnicas de criopreservación, la vitrificación ha simplificado el manejo de explantes y asegurado la sobrevivencia de brotes obtenidos a través de explantes recuperados, ya que esto evita el congelamiento intracelular, lo cual no se había conseguido con otras técnicas de criopreservación (Takagi, *et al.*, 1997, Pennycooke, *op. cit.* 2000, Wowk, 2000).

A partir de estos fundamentos, la finalidad del presente trabajo fue implementar un proceso efectivo de criopreservación de *Strombocactus disciformis,* a través del cual fuera posible conservar el germoplasma de esta especie que se encuentra seriamente amenazada, como una alternativa para proteger y garantizar la sobrevivencia la misma.

3. ANTECEDENTES.

Como se ha mencionado anteriormente la mayor parte de los trabajos relacionados con criopreservación están dirigidos a especies herbáceas, forestales o de interés comercial, sobre todo en plantas en donde la biotecnología juega un papel importante en la mejora de especies, y aún más en aquellas que de alguna forma son parte fundamental del desarrollo económico-agricola. El empleo de la criopreservación no es algo nuevo, sin embargo en los últimos años ha habido mejoras en cuanto al manejo de material vegetal para optimizar el proceso de almacenamiento usando nitrógeno líquido. Uno de los procesos principales de criopreservación que ha dado buenos resultados es el almacenamiento de explantes vitrificados.

Takagi y colaboradores (1997) criopreservaron exitosamente ápices vitrificados de *Colocasia esculenta*. El procedimiento de vitrificación consistió en cultivar yemas axilares en medio MS con diferentes concentraciones de sacarosa bajo condiciones de oscuridad a 25 °C por 16 h. Usaron PVS2 como crioprotector antes de ser sumergidas en nitrógeno líquido. Los ápices recuperados desarrollando brotes directamente sin pasar por fase de callo a los siete días de haber sido descongelados. El promedio de recuperación fue del 80% y el procedimiento de vitrificación mostró ser eficiente para la criopreservación de esta especie.

Lambardi y colaboradores (2000) criopreservaron ápices de brotes de *Populus alba*, bajo un solo paso de vitrificación, colocándolos en medio MS adicionado con 0.09, 0.3 y 0.7 M de sacarosa por dos días a 5°C bajo un periodo de 8 h, y glicerol, sacarosa y PVS2 como crioprotectores antes de sumergir los explantes en nitrógeno liquido. De los ápices recuperados se obtuvó un total de 60% de brotes enraizados, después de haber sido cultivados en medio MS adicionado con 3 μM de ácido indol butírico.

El único trabajo de criopreservación hasta el momento realizado en cactáceas ha sido el de Metz y colaboradores (2000) con polen de *Hylocereus undatus* e *Hylocereus polyrhizus,* el polen colectado fue deshidratado hasta un 5 a 10% de humedad y almacenado en varias temperaturas (+4,-18,-70 y -196°C) por 3 meses, tiempo después del cual el polen fue usado para polinización cruzada. Los autores observaron que el porcentaje del peso fresco de las frutas obtenidas fue afectado por la temperatura pero no por la duración de almacenamiento, a +4°C se disminuyó la producción del fruto en peso fresco, al igual que el número de semillas en comparación con el polen almacenado a temperaturas bajo cero. Por otro lado el porcentaje de germinación de las semillas obtenidas fue del 90%.

4. DESCRIPCIÓN.

Strombocactus disciformis **(De Candolle) Britton et Rose.**
Descripción según Helia Bravo-Hollis y Hernando Sánchez Mejorada, 1991.

Los individuos de esta especie presentan tallo simple, globoso-aplanado, discoide, a veces cortamente columnar de 3 hasta 8 cm de altura y diámetro o más, de color verde glauco muy claro hasta verde grisáceo; ápice redondeado, aplanado o algo hundido, con lana blanca y cubierto por espinas. Tubérculos dispuestos en 8 y 13 series espiraladas, combados o piramidales, de 10 a 18 mm de longitud, duros. Areolas pequeñas, desde circulares hasta elípticas, de 2 mm de longitud, los jóvenes con lana blanca y flocosa, después desnudas. Espinas de una sola clase, 4 o 5, setosas, hasta de 15 mm de longitud, rectas o encorvadas, la mayoría en los tubérculos jóvenes del ápice, pronto caducas. Las flores brotan de las areolas cercanas al ápice, infundibuliformes, de 2.5 a 3.5 cm de longitud, blancas con leve tinte rosado, pericarpelo con solo algunas escamitas circulares, cavidad del ovario elipsoidea; nectario pequeño en la base del estilo, tubo receptacular escamoso, segmentos exteriores del perianto desde lanceolados hasta espatulados, de color rosa con línea media rojiza; segmentos interiores del perianto espatulados, con la punta acuminada, amarillentos o blancos, con la base amarillenta; estambres primarios cortos, insertos hacia la base del tubo arriba de la muy corta cámara nectarial; filamentos blancos o purpúreos, anteras amarillas, estilo blanco, lóbulos del estigma 6 a 10, blancos hasta amarillentos. Fruto de 7 mm de longitud, una o dos veces mas largo que ancho, casi desnudo, con pocas escamas, de color castaño, dehiscente por una ranura longitudinal. Semillas muy pequeñas, globosas, de 0.3 mm de diámetro con arilo grande, testa tuberculada, de color castaño rojizo. Época de floración febrero o marzo.

La distribución de la especie es en los estados de Hidalgo y Querétaro. En Hidalgo ha sido detectada, por los miembros de la Sociedad Mexicana de Cactología, en la Barranca de Tolimán, Municipio de Zimapán, también se reporta su colecta en Ixmiquilpán y San Pedrito de los Ángeles; en Querétaro, población ubicada al N del Vizarrón e Higuerillas, en la Cuenca del Río Estórax.Esta planta crece en laderas muy inclinadas de arroyos, confundiendosé entre suelos calizos o de lutitas, en condiciones de sequía extrema, casi desprovistas de vegetación.

S. disciformis se encuentra dentro de la norma oficial mexicana (NOM-ECOL-1994) en la categoría de planta amenazada y colocada en el apéndice II del CITES (Hunt, 1992).

5. OBJETIVOS.

5.1 General

- Implementar un método adecuado de criopreservación de células, fracciones de planta o semillas obtenidas de material regenerativo de *Strombocactus disciformis*.

5.2 Particulares

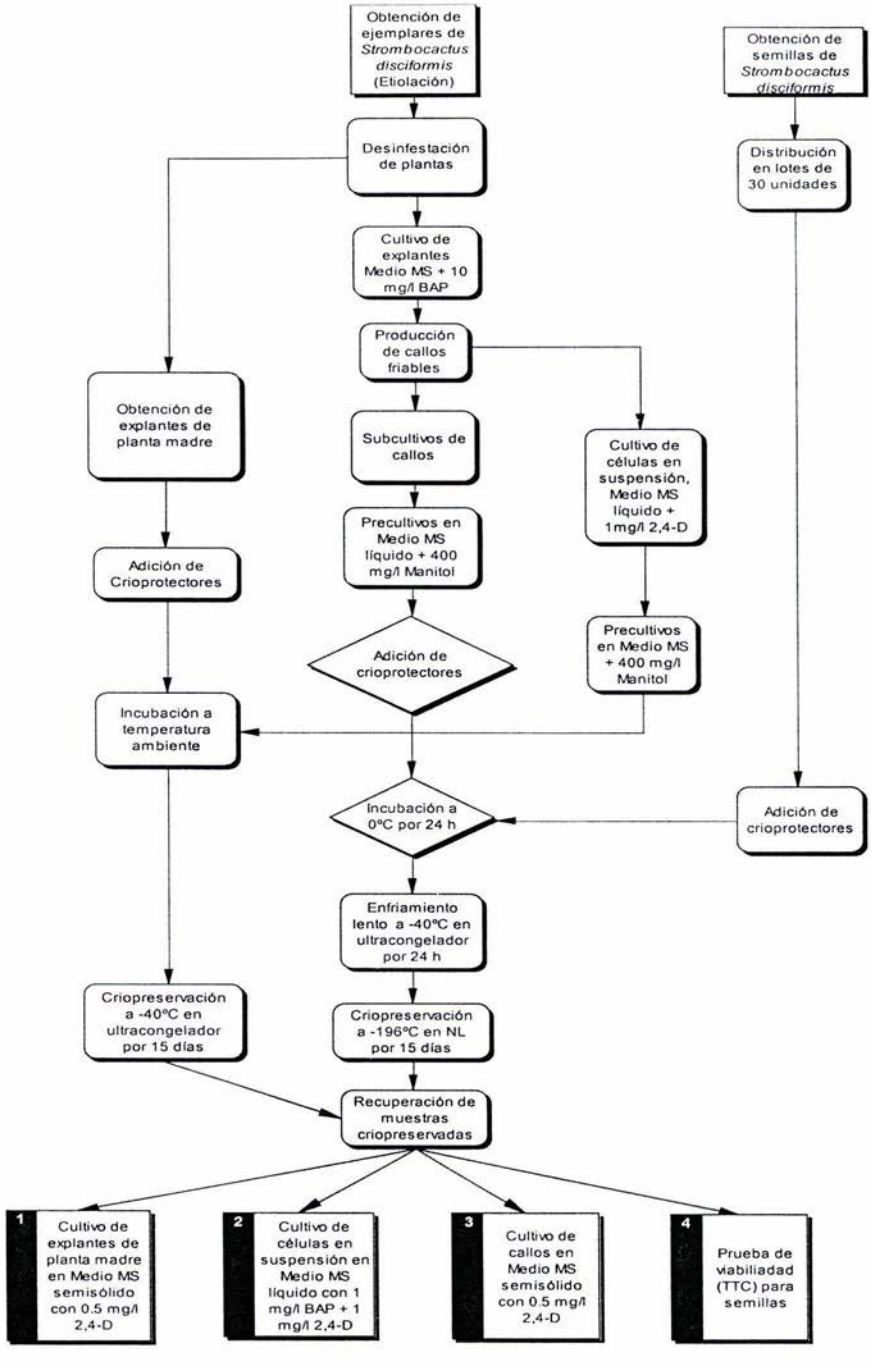
- Establecer la reproducción *in vitro* de *Strombocactus disciformis* a través de la activación areolar hacia la formación de callos embriogénicos.

- Determinar las condiciones adecuadas para la criopreservación de células en suspensión, callos friables, explantes de plantas madre y semillas de *S. disciformis*.

- Determinar las condiciones para la recuperación de estructuras criopreservadas.

- Determinar la viabilidad de semillas recuperadas.

6. Método de criopreservación de *Strombocactus disciformis*



7. MATERIAL Y MÉTODOS

Las plantas madre de *Strombocactus disciformis* (2 ejemplares) fueron donadas por el Jardín Botánico Exterior U.N.A.M., estos ejemplares permanecieron en oscuridad permanente con el fin de fomentar la acumulación de auxinas endógenas (etiolación), durante un periodo de 6 semanas, para activación de meristemos axilares de acuerdo a Flores y Ortiz (2001). Una vez etioladas las plantas, se eliminaron las espinas, dejando las aréolas descubiertas para evitar la contaminación de explantes por residuos de esporas de hongos o bacterias adheridos a estas estructuras.

Se fragmentó una parte de la planta madre para ser desinfestada colocándola en una solución de detergente líquido tween 20 durante 30 minutos, después en alcohol al 80% durante 1 minuto, posteriormente en hipoclorito de sodio al 3% durante 20 minutos, todo esto en constante agitación, por último se enjuagó con agua destilada estéril por 4 ocasiones.

A partir del fragmento desinfestado, se dividieron secciones de aproximadamente 0.5 cm con 2 a 3 areolas cada uno y se cultivaron en medio MS semi-sólido (Murashige y Skoog, 1962) adicionado con 30 g/l sacarosa, 100 mg/l mio-inositol, 1 ml/l solución de vitaminas (tiamina HCl 0.9 mg/l, piridoxina HCl 0.1 mg/l, ácido nicotínico 0.1 mg, glicina 0.65 mg/l), 7 g/l de agar bacteriológico y 6-bencilaminopurina (BAP) como único regulador de crecimiento en las siguientes concentraciones: 0.0 mg/l (testigo), 1.0 mg/l, 5.0 mg/l, 10.0 mg/l, 20.0 mg/l, ajustando el pH a 5.8, y colocando 25 ml en frascos de cristal, con tapa de aluminio y esterilizándolo en autoclave a 121 °C y 1.05 kg/cm^2.

El empleo de esta formula en el medio de cultivo se basa en que los explantes originalmente provienen de una planta madre etiolada, la cual ha producido una cantidad considerable de auxinas, las fracciones entonces poseen una carga considerable de esta fito-hormona dentro de su tejido y por lo tanto solamente necesita la adición de citocinina (BAP) en el medio de cultivo para estimular el desarrollo de callos.

Los cultivos permanecieron en condiciones controladas con un fotoperiodo de 16/8 h luz/oscuridad, una densidad de flujo fotónico de 50 μmoles/m^2/s y temperatura de 24-26 °C hasta observar el desarrollo de callos, una vez inducidas estas estructuras los explantes se transfirieron a medio MS semi-sólido sin hormonas de crecimiento para continuar con su desarrollo.

Los cultivos en medio líquido se realizaron en medio MS adicionado con 30 g/l sacarosa, 200 mg/l mio-inositol, 1 ml/l solución de vitaminas (Tiamina HCl 0.9 mg/l, Piridoxina HCl 0.1 mg/l, Ácido Nicotínico 0.1 mg, Glicina 0.65 mg/l) y 1 ml/l 2,4-D, al cual se inocularon fracciones de callos de 1-1.5 cm cultivados en MS semi-sólido (antes descrito).

Los cultivos permanecieron en condiciones controladas en un agitador de flujo continuo a 90 rpm, con un fotoperíodo de 16/8 h luz/oscuridad, una densidad de flujo fotónico de 50 μmoles/m^2/s y temperatura de 24-26 °C hasta observar disgregación de los callos.

7.1 Medios de Cultivos Líquidos para Criopreservación.

El cultivo de células en suspensión se realizó tomando inóculos de 1 ml (de células disgregadas del cultivo de callos en suspensión) en matraces de 250 ml adicionados con 30 ml de medio MS líquido adicionado con 30 g/l sacarosa, 200 mg/l mio-inositol, 1 ml/l solución de vitaminas (Tiamina HCl 0.9 mg/l, Piridoxina HCl 0.1 mg/l, Ácido Nicotínico 0.1 mg, Glicina 0.65 mg/l) y manitol 400 mg/l.

El cultivo de callos se realizó fraccionando callos madre en secciones de 0.4 cm (80-100 mg) inoculados en matraces de 250 ml, con 40 ml de medio MS líquido adicionado con 30 g/l sacarosa, 200 mg/l mio-inositol, 1 ml/l solución de vitaminas (Tiamina HCl 0.9 mg/l, Piridoxina HCl 0.1 mg/l, Ácido Nicotínico 0.1 mg, Glicina 0.65 mg/l) y manitol 400 mg/l.
Los cultivos permanecieron en condiciones controladas en un agitador de flujo continuo a 90 rpm, con un fotoperíodo de 16/8 h luz/oscuridad, una densidad de flujo fotónico de 50 μmoles/m^2/s y temperatura de 24-26 °C durante 48 h antes de emplearse para pruebas de criopresrervación para equilibrar potenciales osmóticos.

7.2 Crioprotectores

Una de las grandes dificultades fue la elección de las soluciones crioprotectoras adecuadas para los diferentes tipos de muestras y las concentraciones debidas para obtener resultados favorables. La mayor parte de los trabajos consultados mostraron el empleo de 5 soluciones crioprotectoras básicas, sacarosa 0.5-1M, sorbitol 1M, manitol 1M, glicerol 5-10%, dimetilsulfóxido 5-10%, etilenglicol 5-10% y PVS2 las cuales han sido empleadas principalmente para la criopreservación de meristemos axilares y células en suspensión (Takagi, *et al.* 1997, Lambardi, *et al.* 2000, Turner, *et al.* 2000A, Withers, 1990).

Los crioprotectores elegidos fueron Glicerol, Sorbitol, Manitol, Sacarosa y Dimetilsulfóxido. En ensayos previos (no reportados) estos componentes se diluyeron en agua destilada estéril, pero para posteriores ensayos y de acuerdo a bibliografía consultada (Withers, 1985 y 1990), fue más conveniente utilizar medio MS líquido como solvente adicionado con 30 g/l sacarosa, 200 mg/l mio-inositol y 1ml/l solución de vitaminas.

7.3 Criopreservación

7.3.1 Procedimiento 1

Se tomaron fragmentos de callo de peso fresco definido (80 mg) precultivados en medio MS líquido con manitol 400 mg/l, inóculos de células en suspensión precultivados en medio MS líquido con manitol 400mg/l y fragmentos de plantas madre de 0.5 cm con dos o tres aréolas cada uno (perfectamente desinfestadas), los cuales sirvieron como muestras de criopreservación. Este material se incluyó individualmente en crioviales de polipropileno de rosca externa Nalgene® de 2 ml de capacidad con soluciones crioprotectoras (figura 2).

El tratamiento previo se efectuó de la siguiente manera:

a) Se emplearon como crioprotectores soluciones de SAC 0.5 M, MAN 1 M, SOR 1 M, GLI 10%, DMSO 10%, diluidos en medio MS líquido adicionado con 30 g/l sacarosa, 200 mg/l mio-inositol, 1

ml/l solución de vitaminas. Todas estas soluciones previamente esterilizadas en autoclave a 121°C por 15 min.

b) Cada uno de los explantes se colocaron en las soluciones crioprotectoras dentro de crioviales (Tabla 1), en donde permanecieron por 48 h a temperatura ambiente, después se introdujeron dentro de un recipiente tipo "Mr. Frosty" Nalgene® (Simione, 1998), (con modificaciones en cuanto a material y diseño) Figura 1. Tal recipiente permitió fijar cada uno de los crioviales por la parte superior mientras que por la parte inferior permanecieron en contacto con isopropanol, posteriormente este dispositivo se cerró herméticamente y se colocó en ultracongelador a –40 °C por 15 días.

TIPO DE EXPLANTES	CRIOPROTECTORES				
	SACAROSA	**MANITOL**	**SORBITOL**	**GLICEROL**	**DMSO**
Fragmentos de callos	0.5 M	1.0 M	1.0 M	10 %	10 %
Fragmentos de plantas madre	0.5 M	1.0 M	1.0 M	10 %	10 %
Inóculos de células en suspensión	0.5 M	1.0 M	1.0 M	10 %	10 %

Todos los crioprotectores diluidos en medio MS liquido adicionado con 30 g/l sacarosa, 200 mg/l mio-inositol, 1 ml/l sol. vitaminas (Tiamina HCl 0.9 mg/l, Piridoxina HCl 0.1 mg/l, Ac. Nicotinico 0.1 mg, Glicina 0.65 mg/l).
Se montaron 10 repeticiones de cada tratamiento.
La criopreservación se realizó en ultracongelador a –40 °C por 15 dias

Tabla 1. **Tipos de explantes y concentración de crioprotectores empleados en la criopreservación de** *Strombocactus disciformis* **en ultracongelador a –40 °C.**

Las muestras criopreservadas se retiraron del ultracongelador e inmediatamente se descongelaron en agua corriente a 40 °C, en este momento se tomó la velocidad promedio de descongelación de las muestras. Después se retiraron los crioprotectores de las muestras criopreservadas y se lavaron con medio MS líquido, posteriormente se cultivaron callos y explantes de plantas madre en medio MS semi-sólido con 0.5 mg/l 2,4-D para inducir la propagación de callos; los inóculos de cultivo de células en suspensión en medio MS líquido con 1mg/l BAP y 1mg/l 2,4-D.

Todas las muestras se colocaron bajo un fotoperiodo de 16/8 h luz/oscuridad, con una densidad de flujo

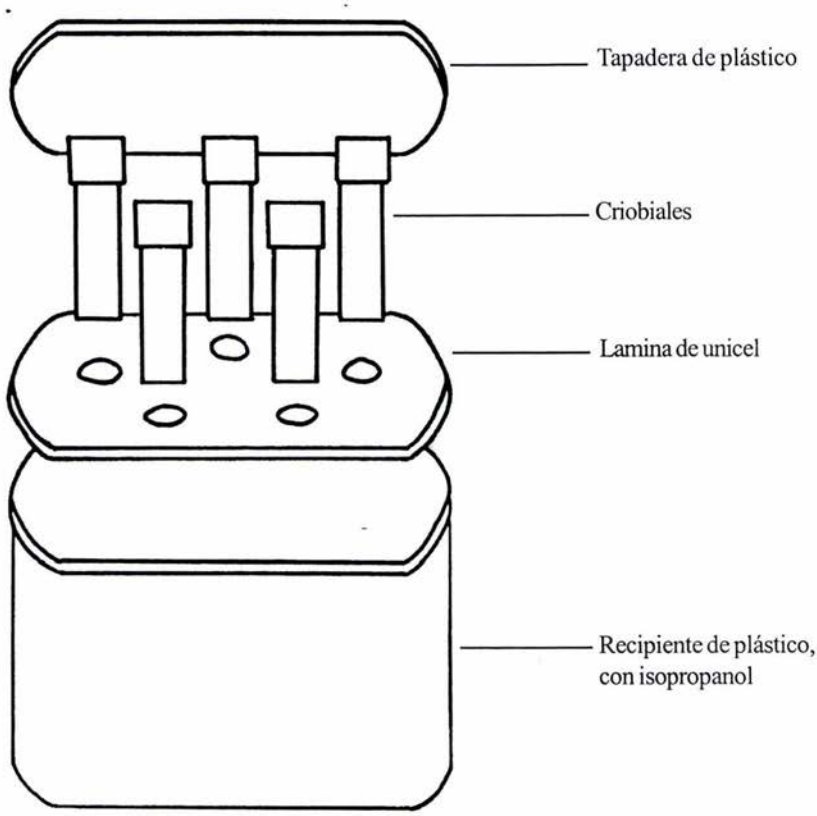


Figura 1. Recipiente tipo Mr. Frostry

IZT.

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSIDAD
U.N.A.M CAMPUS

fotónico de 50 µmoles/m²/s y temperatura de 24-26 °C hasta observar crecimiento de callos. Los cultivos de células en suspensión se mantuvieron además en rotación permanente en un agitador orbital de flujo continuo a 90 rpm (Tabla 2).

Tipo de explantes	MS líquido	MS semisólido
** **Fragmentos de callos**	_____	0.5 mg/l 2,4-D
* **Fragmentos de plantas madre**	_____	0.5 mg/l 2,4-D
* **Inóculos de células en suspensión**	1 mg/l 2,4-D + 1 mg/l BAP	_____

El medio MS estuvo adicionado con 30 g/l sacarosa, 200 mg/l mio-inositol, 1 ml/l sol. de vitaminas (tiamina HCl 0.9 mg/l, piridoxina HCl 0.1 mg/l, ac. nicotínico 0.1 mg, glicina 0.65 mg/l) y 6 g/l agar bacteriológico.
Todas las muestras se colocaron bajo un fotoperíodo de 16/8 h Luz/oscuridad, con una densidad de flujo fotónico de 50 µmoles/m²/s y temperatura de 24-26 °C
Las células en suspensión se mantuvieron en medio MS líquido y en agitador flujo continuo a 90 rpm.
* Ultracongelador a –40 °C ** Nitrógeno líquido a –196 °C

Tabla 2. **Cantidades de BAP y 2,4-D adicionadas a medio MS (Murashige y Skoog, 1962) para recuperación de explantes criopreservados de *Strombocactus disciformis*.**

7.3.2 Procedimiento 2

Se tomaron fragmentos de callo de peso fresco definido (80 mg) precultivados en medio MS líquido con manitol 400 mg/l, los cuales sirvieron como muestras de criopreservación. Este material se incluyó individualmente en crioviales de polipropileno de rosca externa Nalgene® de 2 ml de capacidad con soluciones crioprotectoras.

El tratamiento previo se efectuó de la siguiente manera:

a) Se emplearon como crioprotectores combinaciones de las siguientes soluciones: DMSO 10% + SAC 1M, MAN 1M + SAC 1M, SOR 1M + MAN 1M, GLI 10% + SAC 1M, DMSO 10% + MAN 1M + SAC 1M, diluidos en medio MS líquido adicionado con 30 g/l sacarosa, 200 mg/l mio-inositol, 1/ml solución de vitaminas. Todas estas soluciones previamente esterilizadas en autoclave a 121°C por 15 min.

b) Cada uno de los explantes se sumergieron en las soluciones crioprotectoras dentro de los crioviales y se mantuvieron en congelador convencional por 24 h a 0 °C, para después ser introducidos dentro de un recipiente tipo "Mr. Frosty" Nalgene® (Simione, 1998), (con modificaciones en cuanto a material y diseño) Figura 1. Tal recipiente permitió fijar cada uno de los crioviales por la parte superior mientras que por la parte inferior permanecieron en contacto con isopropanol, posteriormente, este dispositivo se cerró herméticamente y se colocó en ultracongelador a –40 °C por 24 h más. Finalmente se sumergieron en nitrógeno líquido a –196 °C durante 15 días (Tabla 3).

TIPO DE EXPLANTES	CRIOPROTECTORES												
	DMSO+SAC		MAN+SAC		SOR+MAN		GLI+SAC		DMSO+GLI		DMSO+MAN+SAC		
Fragmentos de callos	10%	1M	1M	1M	1M	1M	10%	1M	10%	10%	10%	1M	1M

Todos los crioprotectores estuvieron diluidos en MS líquido adicionado con 30 g/l sacarosa, 200 mg/l mio-inositol, 1 ml/l sol. vitaminas (Tiamina HCl 0.9 mg/l, Piridoxina HCl 0.1 mg/l, Ac. Nicotínico 0.1 mg, Glicina 0.65 mg/l).
Se montaron 10 repeticiones de cada tratamiento.
La criopreservación se realizó en nitrógeno líquido a –196° C por 15 días

Tabla 3. **Tipos de explantes y concentración de crioprotectores empleados en la criopreservación de callos de *Strombocactus disciformis* en nitrógeno líquido a –196 °C.**

Las muestras criopreservadas se retiraron del nitrógeno líquido e inmediatamente se descongelaron en agua corriente a 40 °C, en este momento se tomó la tempeatura promedio de descongelación de las muestras. Después se retiraron los crioprotectores de las muestras criopreservadas y se lavaron con medio MS líquido, posteriormente se cultivaron los explantes en medio MS sólido con 0.5 mg/l 2,4-D para inducir la propagación de callos.

Todas las muestras se colocaron bajo un fotoperíodo de 16/8 h luz/oscuridad, con una densidad de flujo fotónico de 50 μmoles/m²/s y temperatura de 24-26 °C hasta observar crecimiento de callos (Tabla 2).

7.3.3 Procedimeiento 3

Se emplearon semillas de *Strombocactus disciformis*, colectadas a 4 diferentes tiempos, las cuales fueron separadas en 2 grupos de 30 unidades (el primero para ultracongelador a –40 °C y el segundo para nitrógeno líquido a –196 °C), se lavaron con solución de Benlate ® concentrada 200 mg/100 ml por 30 min. Estas muestras se incluyeron en crioviales de polipropileno de rosca externa Nalgene® de 2 ml de capacidad con soluciones crioprotectoras.

Con la finalidad de comparar el comportamiento entre diferentes especies de la misma familia se emplearon semillas de *Stenocereus pruinosus* (Otto) F. Buxb. y *Ferocactus latispinus* (Hawort) B. et R.var. *spiralis* (Karw. Pfeiff.) N.P. Taylor divididas en grupos de 30 semillas y tratadas de igual forma que las semillas de *S. disciformis* pero solo criopreservadas a -196 °C en N.L. (Tabla 4).

El tratamiento previo se efectuó de la siguiente manera:

a) Se emplearon como crioprotectores soluciones de SAC 0.5 M, MAN 1 M, SOR 1 M, GLI 10 %, DMSO 10 %, diluidos en medio MS líquido adicionado con 30 g/l sacarosa, 200 mg/l mio-inositol, 1 ml/l solución de vitaminas. Todas estas soluciones previamente esterilizadas en autoclave a 121 °C por 15 min.

b) Cada uno de los grupos de semillas se sumergieron en las soluciones crioprotectoras dentro de los crioviales y se mantuvieron en congelador convencional por 24 h a 0 °C, para después ser introducidos dentro de un recipiente tipo "Mr. Frosty" Nalgene® (Simione, 1998), (con modificaciones en cuanto a material y diseño) Figura 1. Tal recipiente permitió fijar cada uno de los crioviales por la parte superior para que por la parte inferior permanecieran en contacto con isopropanol, posteriormente este dispositivo se cerró herméticamente y se colocó en ultracongelador a –40 °C.

   El primer grupo de semillas de *S. disciformis* permaneció a –40 °C por 15 días.

   El segundo grupo de semillas de *S. disciformis* permaneció a –40 °C por 24 h y después fueron introducidas en nitrógeno líquido a –196 °C durante 15 días más.

Las semillas de *Stenocereus pruinosus* y *Ferocactus latispinus* var. *spiralis* permanecieron a -40 °C por 24 h y después fueron introducidas en nitrógeno líquido a -196 °C durante 15 días.

LOTE DE SEMILLAS	CRIOPROTECTORES					
	SAC	MAN	SOR	GLI	DMSO	MS
*A	0.5 M	1.0 M	1.0 M	10 %	10 %	**
*B	0.5 M	1.0 M	1.0 M	10 %	10 %	**
*C	0.5 M	1.0 M	1.0 M	10 %	10 %	**
*D	0.5 M	1.0 M	1.0 M	10 %	10 %	**
*E	0.5 M	1.0 M	1.0 M	10 %	10 %	**
*F	0.5 M	1.0 M	1.0 M	10 %	10 %	**

**Todos los crioprotectores fueron diluidos en MS líquido adicionado con 30 g/l sacarosa, 200 mg/l mio-inositol, 1 ml/l sol. vitaminas (Tiamina HCl 0.9 mg/l, Piridoxina HCl 0.1 mg/l, Ac. Nicotínico 0.1 mg, Glicina 0.65 mg/l). Todas las muestras se realizaron con 30 semillas. Ultracongelador a –40 °C y Nitrógeno líquido a –196 °C

A. Semillas de *Strombocactus disciformis* colectadas el 08-03-01
B. Semillas de *Strombocactus disciformis* colectadas el 16-04-99
C. Semillas de *Strombocactus disciformis* colectadas el 01-04-96
D. Semillas de *Strombocactus disciformis* colectadas el 03-05-92
E. Semillas de *Stenocereus pruinosus* colectadas el día 02-05-98 (solo N.L.)
F. Semillas de *Ferocactus latispinus var. spiralis* colectadas el día 20-02-01 (solo N.L.)

Tabla 4. **Tipos de semillas y concentración de crioprotectores empleados en la criopreservación de** *Strombocactus disciformis* **en ultracongelador a –40 °C y nitrógeno líquido a –196 °C.**

Las muestras criopreservadas se retiraron del ultracongelador y del nitrógeno líquido e inmediatamente se descongelaron en agua corriente a 40 °C, en este momento se tomó la temperatura promedio de descongelación de las muestras. Se retiraron los crioprotectores cuidadosamente con una pipeta pasteur de las muestras criopreservadas y se lavaron con medio MS líquido, para posteriormente realizar prueba de viabilidad.

7.3.4 Prueba de Viabilidad (Cloruro de trifeniltetrazolio TTC)

Se colocaron muestras de semillas en crioviales de polipropileno de rosca externa Nalgene® de 2 ml de capacidad y se agregó solución de TTC (0.1 %). Se dejó incubar en oscuridad permanente por 48 h a 30 °C. Posteriormente se removió la solución de TTC con una pipeta pasteur para lavar las semillas con agua destilada estéril (Cota 1984).

Finalmente se observaron las estructuras a microscopio estereoscopico, retirando cuidadosamente la testa manualmente, para finalmente contar el número total de semillas teñidas. Se consideraron como semillas viables aquellos embriones que presentaron tres cuartas partes del cuerpo teñidas. El resultado se presenta en porcentaje de semillas viables.

8. RESULTADOS.

La obtención de callos fue relativamente rápida para todos los cultivos de explantes de *Strombocactus disciformis*, en medio MS semi-sólido adicionado con BAP (1.0, 5.0, 10.0, 20.0 mg/l) e incluso sin regulador de crecimiento se observó la aparición de cúmulos celulares en forma de callo de 3 a 4 semanas después del cultivo de explantes, la respuesta fue favorable ya que el índice de contaminación fue menor al 20% y la producción de callos fue prácticamente del 100%. Los callos fueron de color verde intenso friables y con células turgentes, aparentemente fotosintetizadoras desde su formación, la oxidación solo se presentó en la base de los callos, mediante una coloración roja muy tenue que no fue crítica para la sobrevivencia de los mismos, ya que esta disminuyó continuamente al ir creciendo y aumentando el volumen de los callos. El aumento de tamaño fue considerablemente acelerado pero de forma irregular sin un patrón definido, con dos a tres diámetro cada 8 semanas en promedio, tiempo en el cual fue necesario subcultivarlos a medio MS fresco.

El transplante de los callos se realizó fragmentando el callo grande y resembrando las secciones obtenidas de él o bien transplantándolo integro si este no era demasiado grande. La mayoría de los callos ocupaban casi el total del frasco y consumían el medio de cultivo en su totalidad después de las ocho semanas de incubación, esto es importante recalcarlo, ya que el abastecimiento de material nunca fue problema para las pruebas correspondientes.

La coloración verde intensa de los callos se mantuvo constante hasta por 10 semanas en un mismo medio de cultivo pero comenzaba a desaparecer si se dejaba por mas tiempo dentro del frasco, comenzaban a tornarse amarillos o blancos gradualmente. Al realizar los subcultivos, los callos o fracciones de ellos se oxidaron por la base en la parte que estuvo en contacto con el medio, tornándose hacia un color rojo intenso que de igual forma que en los cultivos originales desaparecía conforme el callo crecía.

Prácticamente no hubo problema alguno con la producción de callos en medio de cultivo semisólido, los subcultivos cada 8 semanas ayudaron a conservar estas estructuras para obtener material para criopreservación.

Desafortunadamente no se logró estimular organogenesis a partir de estos callos, ni formación de embriones somáticos; aunque se probaron varias combinaciones de reguladores de crecimiento entre auxinas y citocininas como son: AIA 2mg/l + KIN 1mg/l, KIN 5 mg/l + ANA 1mg/l, KIN 5mg/l + ANA 1mg/l, 2ip 5mg/l + AIA 1mg/l, 2ip 5mg/l + ANA 1mg/l, en todos los casos el resultado fue el desarrollo y producción de callos, con cúmulos grandes de células friables color verde intenso con crecimiento rápido de volumen y morfología irregular.

Se realizaron ensayos en medios líquidos, utilizando como base la experiencia con las pruebas anteriores y se hicieron combinaciones con reguladores de crecimiento e incluso con diluciones en la concentración de solutos y con glutamina, de estos ensayos se obtuvieron observaciones importantes (que se mencionan adelante), necesarias para entender la importancia de preservar callos y células en suspensión en esta especie.
Los primeros ensayos en medio líquido se realizaron en MS adicionado con 30g/l sacarosa, 200 mg/l mio-inositol, 1 ml/l solución de vitaminas, y 1 ml/l 2,4-D, al cual se inocularon fracciones de callos cultivados en medio MS semi-sólido. Después de 4 semanas de cultivo las células de los callos comenzaron a disgregarse del cúmulo original, aún cuando algunos otros después de separarse invirtieron el proceso y se volvían a agregar formando agrupaciones celulares amorfas que en algunos casos llegaron a formar raicillas que conforme transcurría el tiempo degeneraban sin producir brote alguno. Las células disgregadas de los callos se observaron turgentes y con división continua, con escasas células colapsadas.

De este cultivo de células en suspensión se tomaron inóculos para ser transferidos en medio MS líquido. Los inóculos fueron de 3 ml y se tomaron después de homogeneizar el cultivo de células para obtener una muestra uniforme. La respuesta en este cultivo al principio resultó poco satisfactoria, debido a un alto índice de células colapsadas, al observar esta situación se adicionaron al medio líquido 5 ml de agua destilada estéril para disminuir la cantidad de solutos que probablemente afectaba directamente la estabilidad de las células.

Los cultivos se restablecieron después de 2 semanas, sin embargo al pasar 4 semanas de cultivo las células presentaron oxidación, que se manifestaba por una coloración rojiza intensa del medio de cultivo. Estas

células al microscopio se observaron turgentes y en buen estado, pocas plasmolizadas pero con una marcada coloración roja que incluso teñía el medio de cultivo. Del mismo modo se observaron algunos cultivos contaminados por bacterias, a pesar de este daño se presentaron células en buen estado, turgentes y muy pocas colapsadas, además la presencia de bacterias no afectó la división celular, tal parece que la oxidación es una respuesta de las células para mitigar y frenar la reproducción bacteriana, como un producto derivado del metabolismo que actúa en defensa de las células ante posibles patógenos. Los cultivos en suspensión se mantuvieron sin problemas durante más de 12 semanas, tiempo en el cual se subcultivaron en medio MS fresco, inóculos de 5 ml para mantener en buen estado las células y tener material para los ensayos de criopreservación.

Para la primera prueba de criopreservación se tomaron fracciones obtenidas directamente de callos cultivados en medio sólido. Se seleccionó un callo normal de amplias dimensiones casi en su totalidad verde, solo con ligera oxidación hacia los bordes, este callo se seccionó en partes de 0.5 cm y cada una de ellas fueron colocadas dentro de las soluciones crioprotectoras. Enseguida estas preparaciones fueron introducidas dentro de nitrógeno liquido a –196 °C por 15 días. Una vez transcurrido el tiempo de almacenamiento fueron retiradas las muestras y descongeladas a una temperatura de 40 °C; tomando la velocidad de descongelación para finalmente recuperar los explantes.

La recuperación consistió en retirar completamente las soluciones crioprotectoras y liberar de los crioviales las fracciones de los callos, durante este proceso los callos no mostraron cambios significativos en cuanto a su morfología original, se mantuvieron verdes, friables sin cambios de coloración aparente, solo las fracciones que presentaban oxidación se observaban afectadas en una pequeña proporción, pero en general sin anomalías. Estas fracciones de callos criopreservadas fueron cultivadas entonces en medio MS sólido adicionado con 30g/l sacarosa, 200 mg/l mio-inositol, 1 ml/l solución de vitaminas y 6 g/l agar bacteriológico para su restablecimiento y desarrollo normal. Las condiciones de incubación fueron intensidad luminosa de 50 µmoles/ m^2/s, fotoperíodo de 16-8 h y temperatura de 24-26 °C.

Las respuestas fueron casi inmediatas los callos que en general presentaban buen estado fueron perdiendo gradualmente su coloración verde, se tornaron al cabo de los primeros días verde pálido hasta llegar al café, los callos con partes oxidadas fueron los primeros en colapsarse siguiendo posteriormente los mejor conservados. Después de 7 días de cultivo estas fracciones se mostraban prácticamente colapsadas, el volumen original se encontraba considerablemente reducida (0.25 cm) y la pigmentación había desaparecido por completo, incluso en algunos explantes hasta llegar a translúcidos.

Fue necesario realizar diversos ensayos tomando en cuenta la mayor cantidad de factores que pudieran repercutir en el procedimiento pre y post criopreservación. Fundamentalmente se tomo como base la aclimatación de las fracciones de callo durante el cultivo original, así como el modo de incubación dentro de crioprotectores, eligiendo las soluciones más efectivas para este fin y por último el tiempo de enfriamiento y congelamiento de las muestras. A partir de los diferentes ensayos se presentan en este trabajo los tres procedimientos más efectivos para la criopreservación de *Strombocactus disciformis*.

8.1 Procedimiento 1

Este primer procedimiento se realizó con fracciones de callo, el peso de los explantes fue en función del tamaño de los crioviales para evitar daños en la manipulación que pudieran repercutir durante el proceso, tal es el caso de la oxidación por daño mecánico. La adición de manitol (400 mg/l) al medio de cultivo original fue necesaria para equilibrar los potenciales osmóticos dentro y fuera de las células de la fracción del explante de callo (Withers,1990), se procuró mantener durante 48 h estos cultivos en agitación constante para que las células pudieran asimilar el soluto y equilibraran en lo posible el potencial osmótico entre la parte interna de las células y el medio de cultivo.

Después de incubar las fracciones dentro de los criobiales con soluciones crioprotectoras y criopreservar en ultracongelador a –40 °C se observó que: La diferencia en cuanto a comportamiento de los explantes después de ser retirados de las condiciones de congelamiento es mínima, después de 2 semanas de incubación se observó que los callos permanecieron verdes sin cambio aparente en volumen, friables y con cierta vitalidad

que manifestaban una buena recuperación de los cúmulos celulares criopreservados, sin embargo al transcurrir 15 días de cultivo comenzaron los cambios morfológicos drásticos de los explantes, la tonalidad verde comenzó a degenerar gradualmente de verde intenso a café-rojizo en ciertas regiones y finalmente incoloros o blancuzcos. En algunos casos de color amarillo y muy pocos oxidados, además de reducir considerablemente el volumen hasta la mitad de lo original. La menor parte (menos del 10%) resultó contaminado (figura 3).

La influencia de las soluciones crioprotectoras no fue crítica y no hubo diferencia evidente entre muestras, observándose el mismo efecto para todos los explantes independientemente del crioprotector. A diferencia de los primeros ensayos, es de destacar que por primera vez se mantuvieron estables los cultivos criopreservados por más de 7 días, tiempo máximo de estabilidad antes de colapsarse completamente en ensayos previos.

Las fracciones de plantas madre a pesar de tener epidermis gruesa y células rígidas no pudieron resistir los cambios drásticos de temperatura y fueron degenerando lentamente, incluso algunos después de ser recuperados parecían estables al menos en morfología, pero después de 4 semanas el colapso llegó por completo, una vez mas las sustancias crioprotectoras no tuvieron diferencias, ya que el comportamiento de los explantes fue muy similar para todos los casos y no hubo ingerencia en los resultados (figura 4).

Los cultivos de células en suspensión parecían ser la opción más viable para criopreservar, debido al tiempo que permanecieron en incubación se pensaría que los niveles osmóticos estarían equilibrados, sin embargo las células recuperadas fueron las más sensibles al cambio y comenzaron a degeneran mas rápidamente que los demás tipos de explantes, la mayor parte de las células se encontraron plasmolizadas después de los primeros tres días de criopreservación, sin embargo se observaron pequeños agregados que en poco tiempo se tornaron translucidos . Mas del 80% se encontraban en malas condiciones y no había señales de mejoramiento, al contrario la oxidación se presentó en los cultivos recuperados y finalmente no hubo buenos resultados (figura 5). La velocidad promedio de descongelamiento fue de 21.6 °C por segundo para los tres casos.

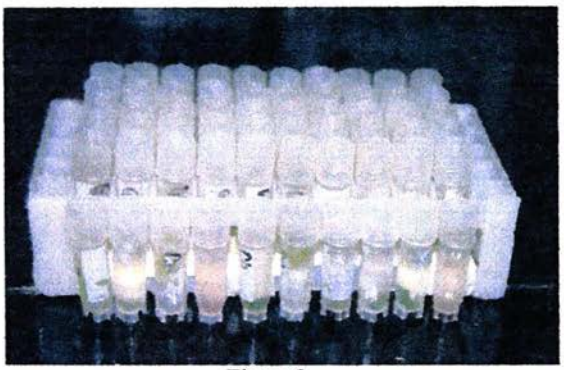


Figura 2

Explantes de callos, plantas madre y células en suspensión de *S. disciformis* colocados dentro de criobiales antes de ser introducidos en ultracongelador a -40 °C y nitrógeno líquido a -196 °C.

Callo de *S. disciformis* criopreservado a -40 °C por 15 días, usando crioprotectores individuales.
A callo antes de criopreservar, se muestra friable y fotosintetico
B callo a las 3 semanas de recuperación, se muestra con perdida de volumen, translucido y sin pigmento.

Figura 3

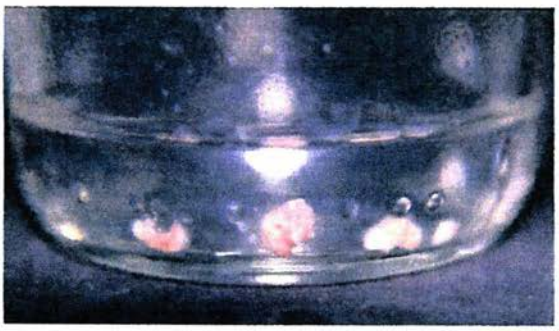


Figura 4

Células en suspensión de *S. disciformis* criopreservadas a -40 °C por 15 días, usando crioprotectores individuales. Pequeños agregados celulares que se tornaron translucidos y oxidados durante el cultivo después de su recuperación.

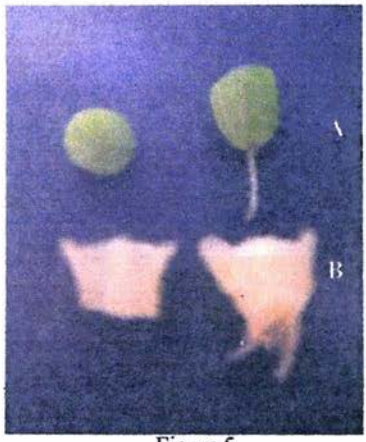


Figura 5

Fragmentos de planta madre de *S. disciformis* criopreservados a -40 °C por 15 días, usando crioprotectores individuales.

A Explantes antes de criopreservar, se muestran fotosinteticos
B Explantes después de 4 semanas de recuperación, se muestran sin pigmento, translucidos y algo oxidados.

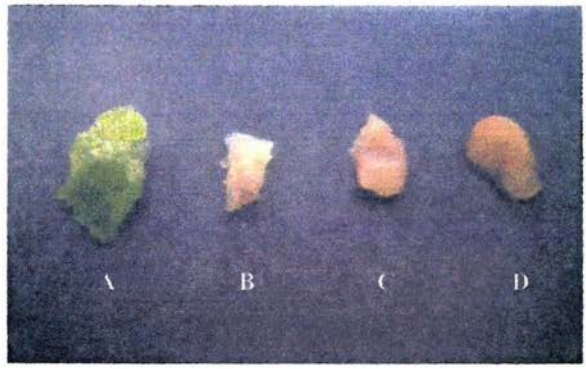


Figura 6

Callos de *S. disciformis* criopreservados a -196 °C por 15 días, usando como crioprotector DMSO+MAN+SAC.

A callo antes de criopreservar, se muestra friable y fotosintetico
B callo a las $4^{1/2}$ semanas de recuperación, se muestra con perdida de volumen y pigmento
C callo a las 5 semanas de recuperación, se muestra con oxidación
D callo a las 7 semanas de recuperación, se muestra con oxidación total y compactación de tejido

8.2 Procedimiento 2

El tamaño de explante de callo, de igual manera que en el proceso anterior se determinó de acuerdo a la capacidad de almacenamiento de los crioviales para tener la mayor precaución y evitar el daño mecánico durante la manipulación. El empleo de manitol (400 mg/l) en el cultivo original también fue necesario para equilibrar potenciales osmóticos entre al tejido vivo y el medio de cultivo. Después de criopreservar en nitrógeno líquido a –196 °C, se observó que:

La combinación de soluciones crioprotectoras manifestaron mejores resultados que usar soluciones individuales, se puede observar que la combinación de DMSO+SAC+MAN promueve la estabilidad de los explantes de callo después de criopreservados por mas de cuatro semanas, degenerando hacia la quinta semana en forma gradual sin crecimiento celular ni desarrollo de brotes. Afortunadamente la respuesta manifiesta una mejoría en comparación del empleo de soluciones individuales (Figura 6).

Las combinaciones de crioprotectores que resultaron con menos éxito pero no por ello menos eficientes fueron DMSO+SAC y MAN+SAC que desarrollaron sobre los explantes criopreservados una sobrevivencia de más de tres semanas después de ser retiradas del nitrógeno liquido y que gradualmente degeneraron hacia la cuarta semana sin crecimiento celular y sin producción de nuevos órganos, aun así, estas combinaciones de crioprotectores mostraron un efecto más eficiente que el empleo de crioprotectores individuales.

El empleo de SOR+MAN, manifestó un efecto modesto en la sobrevivencia de los explantes, manteniendo por 15 días la estabilidad de las fracciones de callo criopreservadas y degenerando a los próximos días sin ninguna respuesta favorable.

Las combinaciones menos efectivas fueron de GLI+SAC y DMSO+GLI que lograron mantener estables los explantes de callo criopreservados solo por una semana y degenerando rápidamente después de 10 días, aunque hay que resaltar que muchos de los explantes fueron contaminados por hongos, situación que repercutió directamente sobre las condiciones de sobrevivencia de las fracciones. La velocidad promedio de descongelamiento fue de 21.6 °C por segundo (Tabla 5).

CRIOPROTECTOR	SEMANAS DE CULTIVO						
	1	2	3	4	5	6	7
DMSO + SAC	+	+	+	+/-	-	-	-
MAN + SAC	+	+	+	+/-	-	-	-
SOR + MAN	+	+	+/-	-	-	-	-
GLI + SAC	+	-	-	-	-	-	-
DMSO + GLI	+	-	-	-	-	-	-
DMSO+MAN+SAC	+	+	+	+	+/-	-	-

\+ Desarrollo favorable, pigmentación verde, friabilidad y volumen original
+/- Perdida gradual de pigmentación verde y disminución de volumen
\- Perdida total de pigmentación verde, aparición de oxidación o tejido translucido, disminución a la mitad del volumen original y compactación de tejido.

Tabla 5. **Comportamiento de explantes de callo de *Strombocactus disciformis* criopreservados en nitrógeno líquido a –196 °C durante 15 días.**

8.3 Procedimiento 3

Las semillas empleadas para este ensayo fueron tratadas de igual manera antes y después de ser criopreservadas en nitrógeno líquido. El material fue desinfestado antes de aplicar soluciones crioprotectoras, una vez incluidas dentro de crioviales fueron introducidos en congelador convencional hasta 0 °C, e inmediatamente colocados en aparato tipo Mr. Frosty Nalgene®, bajo baño de isopropanol por 24 h a –40 °C, permaneciendo el primer lote en estas condiciones por 15 días y el segundo trasferido en nitrógeno líquido por 15 días.

La recuperación se realizó con agua corriente a 40°C, a todas las muestras se les retiró cuidadosamente las soluciones crioprotectoras y enjuagando con medio MS. El medio MS se mantuvó dentro de los crioviales por 10 minutos y se agitó ligeramente para asegurar que los restos de crioprotectores adheridos a las paredes de las semillas se eliminaran. El medio MS se retiró usando una pipeta Pasteur estéril, para evitar contaminación y daños mecanicos. Finalmente las semillas fueron sembradas en cajas petri con medio MS semi-sólido sin reguladores de crecimiento.

Se observaron respuestas favorables para semillas criopreservadas en ultracongelador a –40 °C. Hay que resaltar que para todos los cultivos de semillas recuperados del crioprotector SOR presentaron problemas de contaminación por hongos dentro de los cultivos en medio semisólido, lo que tuvo repercusión en el resultado final de sobrevivencia de semillas (excepto para semillas del lote D).

Los porcentajes de sobrevivencia se manifestaron de siguiente manera:

Para semillas del lote A, el mejor crioprotector fue GLI (33.33%) seguido de MAN(28.50%) y medio MS (26.00%) casi en la misma proporción.

Para semillas del lote B, el mejor crioprotector de igual manera fue GLI (47.33%), dejando en segundo término soluciones de SAC (23.00%), DMSO (22.72%) y medio MS (20.00%).

Para semillas del lote C, se obtuvo que el mejor crioprotector también fue GLI (36.36), seguido de SAC (12.12%) y DMSO (10.00%).

Para semillas del lote D, el medio MS (27.57%) fue el mejor crioprotector seguido de SAC (19.54%), SOR (18.64%) y GLI (15.86%) (Tabla 6), (Figuras 7 y 8). La velocidad promedio de descongelamiento fue de 21.6 °C por segundo.

CRIO-PROTECTORES	*S. disciformis* LOTE A	*S. disciformis* LOTE B	*S. disciformis* LOTE C	*S. disciformis* LOTE D
SAC	8.00	23.00	12.12	19.54
SOR	0.00	0.00	0.00	18.64
MAN	28.50	0.00	0.00	12.40
DMSO	6.25	22.72	10.00	13.74
GLI	33.33	47.33	36.36	15.86
MS	26.00	20.00	0.00	27.57
TESTIGO	80.00	66.66	38.88	36.84

Tabla 6. **Porcentaje de sobrevivencia de semillas criopreservadas en ultracongelador a –40 °C durante 15 días.**

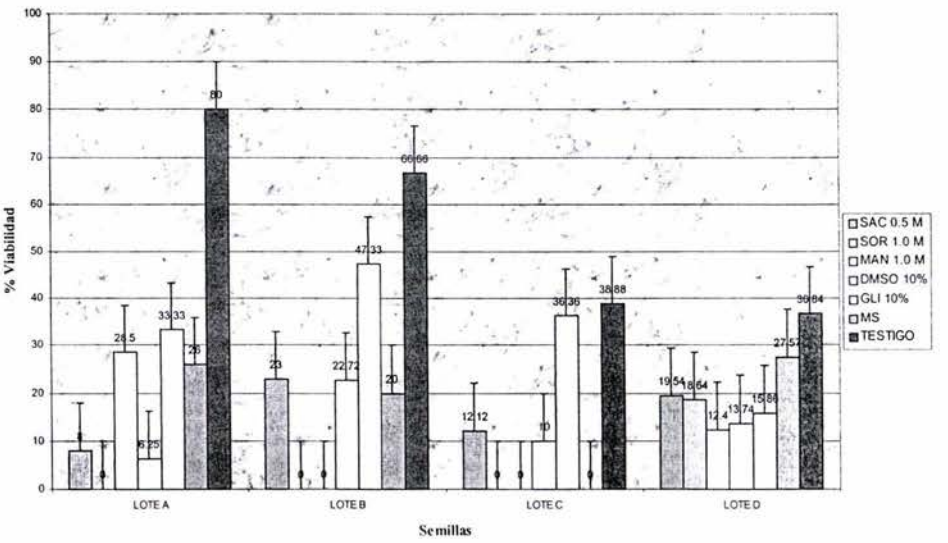


Figura 7. **Viabilidad de semillas de** *S. disciformis* **criopreservadas a -40 °C por 15 días. Las columnas muestran procentajes +/- sd.**

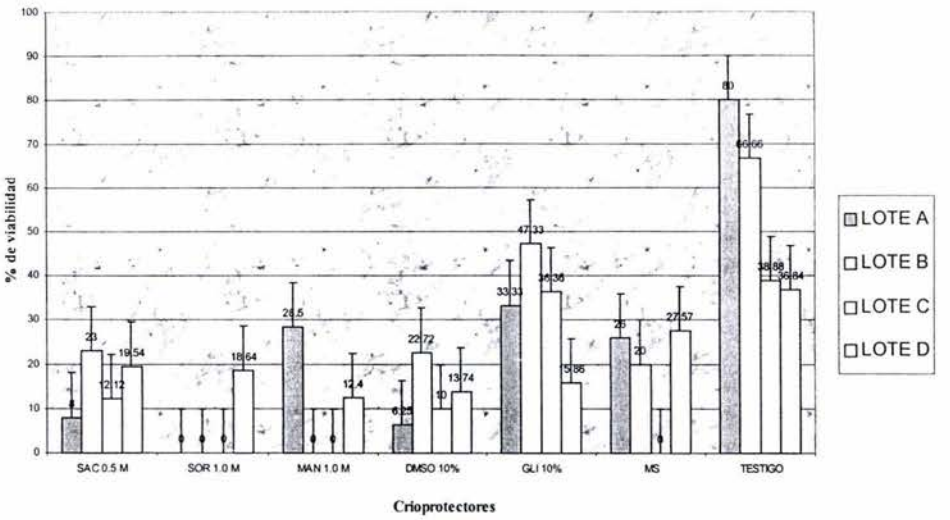


Figura 8. **Efectividad de crioproctectores sobre semillas de** *S. disciformis* **criopreservadas a -40 °C por 15 días. Las columnas muestran porcentajes +/- sd.**

Al igual que para muestras criopreservadas en ultracongelador, el proceso de descongelamiento para muestras introducidas en nitrógeno líquido a –196 °C se empleó agua corriente a 40 °C. Se retiraron cuidadosamente las soluciones crioprotectoras y se enjuagaron con medio MS líquido para retirar restos de crioprotector adheridos a las paredes de las semillas (guardando la debida precaución durante la manipulación y utilizando material estéril), la recuperación se realizó sembrando las semillas en cajas petri sobre medio MS semi-sólido sin reguladores de crecimiento. A partir de estos cultivos se obtuvieron las siguientes observaciones:

Para semillas del lote A, los mejores crioprotectores fueron GLI y medio MS con el mismo porcentaje de sobrevivencia (18.18%) y SOR en menor proporción (16.66%).

Para semillas del lote B, el mejor crioprotector de igual manera fue DMSO (22.22%) seguido de SAC (13.33%).

Para semillas del lote C, se obtuvo que DMSO y SOR fueron los mejores crioprotectores (36.36% y 33.33% respectivamente).

Para semillas del lote D, MAN (17.64%) fue el mejor crioprotector dejando en segundo termino a SOR (16.66%) y SAC (15.38%) (Tabla 7), (Figuras 9 y 10). La velocidad promedio de descongelamiento fue de 21.6 °C por segundo.

CRIO-PROTECTORES	*Strombocactus disciformis* LOTE A	*Strombocactus disciformis* LOTE B	*Strombocactus disciformis* LOTE C	*Strombocactus disciformis* LOTE D	*Stenocereus pruinosus* LOTE E	*Ferocactus latispinus var. spiralis* LOTE F
SAC	0.00	13.33	0.00	15.38	28.00	8.00
SOR	16.66	0.00	33.33	16.66	------	14.00
MAN	5.88	0.00	0.00	17.64	70.00	10.00
DMSO	------	22.22	36.36	12.00	48.00	------
GLI	18.18	0.00	0.00	5.88	80.00	2.00
MS	18.18	0.00	0.00	13.33	20.00	4.00
TESTIGO	80.00	66.66	38.88	36.84	100.00	78.04

Tabla 7. **Porcentaje de sobrevivencia de semillas criopreservadas en nitrógeno líquido a –196 °C durante 15 días.**

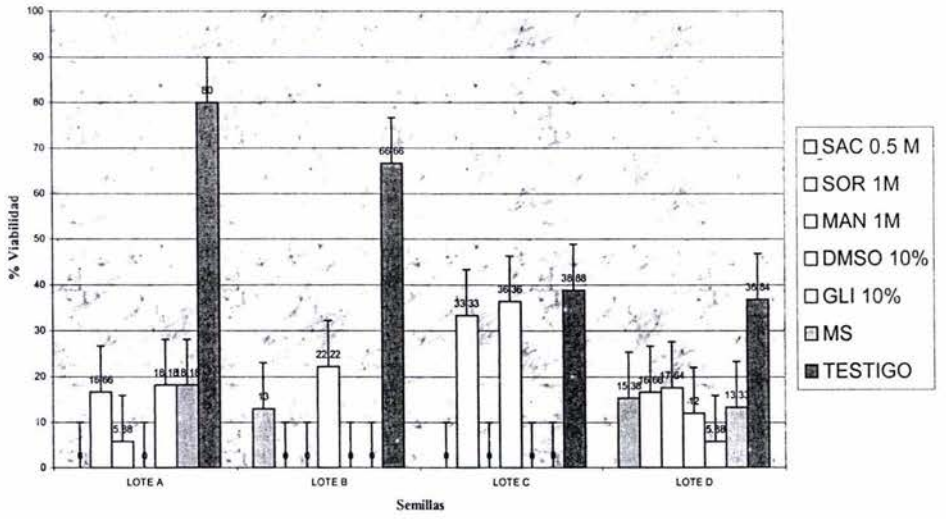
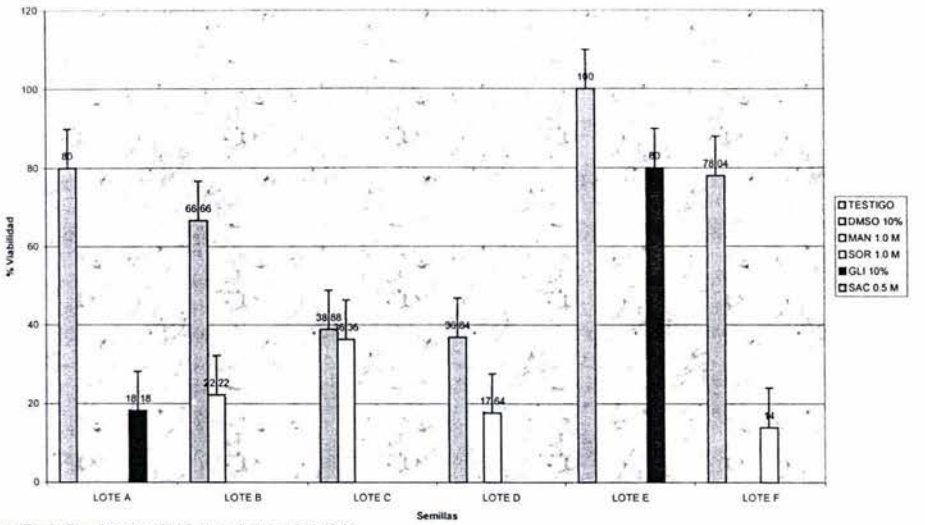


Figura 9. **Viabilidad de semillas de** *S. disciformis* **criopreservadas a -196 °C por 15 días. Las columnas muestran porcentajes +/- sd.**



A. Semillas de *Strombocactus disciformis* colectadas el 08-03-01
B. Semillas de *Strombocactus disciformis* colectadas el 16-04-99
C. Semillas de *Strombocactus disciformis* colectadas el 01-04-96
D. Semillas de *Strombocactus disciformis* colectadas el 03-05-92
E. Semillas de *Stenocereus pruinosus* colectadas el dia 02-05-98 (solo N.L.)
F. Semillas de *Ferocactus latispinus* var. *spiralis* colectadas el dia 20-02-01 (solo N.L.)

Figura 10. **Crioprotectores mas efectivos en la viabilidad de semillas de *Strombocactus disciformis* criopreservadas a -196 °C de tres especies de cactáceas después de su recuperación. Las columnas muestran porcentajes +/- sd.**

8.4 Prueba de viabilidad (Cloruro de trifeniltetrazolio TTC)

Para semillas de *S. disciformis* se obtuvieron porcentajes bajos de viabilidad en semillas de lotes A y D criopreservadas a -196°C (5.88% para MAN y GLI), al igual que para semillas de *F. latispinus var. spiralis* lote F (14% para SOR), en comparación con semillas de *S. pruinosus* lote E (donde el porcentaje de sobrevivencia alcanzó hasta 70% con MAN).

Las semillas de *S. disciformis* no criopreservadas (testigos Lote A y B) presentaron los porcentajes mas altos de viabilidad 80.00% y 66.66 % respectivamente, en comparación con las semillas de los mismos lotes criopreservadas a -40°C (33.33 % para GLI y 47.33 % para GLI) y -196°C (18.88 % para GLI y MS, y 22.22 % para DMSO), sin embargo esta viabilidad no fue tan sobresaliente para semillas de lotes C y D (semillas testigo), que presentaron porcentajes de viabilidad de 38.88% y 36.84% respectivamente, los cuales mostraron poca diferencia con semillas de los mismos lotes criopreservadas a -40°C (36.36% para GLI y 27.57% para MS) y -196°C (36.36% para DMSO y 17.64% para MAN).

9. DISCUSIÓN.

Los primeros ensayos de criopreservación para células de *S. disciformis* fueron realizados vía congelamiento rápido en nitrógeno líquido sin ningún paso de precultivo, se observó un claro choque en las células de los callos criopreservados, después de 48 h de ser recuperados los cambios en la morfología fueron evidentes, causando en corto tiempo la muerte de los explantes, las células no son resistentes al gran estrés por congelamiento que sufren al introducirse directamente a temperaturas inferiores a 0 °C. El congelamiento rápido resulta efectivo para algunas familias de plantas de interés comercial como solanáceas, para cactáceas esta efectividad no se presenta en callos criopreservados. Si bien, el congelamiento rápido previene el crecimiento de cristales de hielo intracelulares durante el periodo de enfriamiento (Thorpe, 1981), este sistema no muestra efectividad para células de callos de *Strombocactus disciformis*.

Después de diversas pruebas para el establecimiento de cultivos, previos a la inmersión de muestras en ultracongelador a -40 °C y nitrógeno líquido a -196 °C, se dispuso como vía efectiva de precultivo el medio MS líquido adicionado con manitol 400 mg/l, durante 48 h. El manitol actúa sobre la permeabilidad de la membrana celular para equilibrar la cantidad de solutos dentro y fuera de las células, provocando un ligero estrés osmótico (Towill, 1991), esto se realizó con la finalidad de obtener una tolerancia máxima adicional a la congelación (efecto que se atribuye para este caso) antes de agregar los crioprotectores definitivos (Withers, 1985)

Algunos trabajos sugieren el precultivo como parte fundamental de la sobrevivencia de células después de la criopreservación, por ejemplo en *Anigozanthos viridis* ssp. *viridis* se obtuvo el 67.0% de sobrevivencia en medio adicionado con sorbitol 0.2-0.6 M precultivado por 48 horas (Turner *et al*, 2000), y en *Doritaenopsis* cv. se obtuvo 85% de viabilidad en medio adicionado con sacarosa 0.056-0.4 M y/o ABA 1.0-5.0 mg/l precultivado por 14 días (Tsukazaki et al, 2000).

Una vez establecido el medio de precultivo, se consideró como segundo paso la adición adecuada de crioprotectores a cada una de las muestras y su efectividad en la sobrevivencia de las mismas. Generalmente

las sustancias crioprotectoras se utilizan diluidas en medio MS líquido, lo que aumenta la eficacia hasta en el doble si es diluida en el tiempo de aplicación (Withers, 1984 y 1985). La dilución de los crioprotectores en MS líquido cumple un paso necesario para lograr la efectividad requerida, ya que este minimiza las reacciones químicas tal es como la generación de calor, asegura una exposición uniforme hacia las células de los callos y reduce potencialmente el efecto tóxico sobre ellos (Simione, 1998).

En muestras de células en suspensión y fracciones de plantas madre no se obtuvieron resultados favorables; el precultivo con manitol tuvo un efecto poco representativo en la aclimatación antes de criopreservar, la concentración de manitol establecida para estos casos no logró equilibrar osmóticamente el ambiente interno y externo de las células, sin duda alguna es necesario ampliar el periodo de precultivo, utilizar otro crioprotector o mezclas de ellos para tal fin. También es necesario incluir un proceso de deshidratación celular con DMSO o PVS2 que pueda ayudar a disminuir la turgencia de las células de *S. disciformis*, en donde el mayor problema es la reserva tan grande de este líquido que limita fuertemente el proceso de criopreservación.

La gran cantidad de reserva de agua que bien representa la parte vital en la naturaleza para las cactáceas, se vuelve un obstáculo al realizar este tipo de procedimientos; la formación de cristales letales, es el procedimiento más difícil de prevenir debido a que se forman en regiones intracelulares más rápido que la nucleación externa, causando en poco tiempo la ruptura de las membranas y por consiguiente la muerte de las células (Zachariassen, *et al.* 2000). Incluso las células epidérmicas que poseen paredes celulares resistentes no son capaces de evitar el cambio repentino de temperatura en sistemas *in vitro*; caso contrario al de algunas cactáceas (género *Opuntia*) que sufren estrés térmico *in vivo* y que pueden tolerar temperaturas de congelación mediante la acción de mecanismos fisiológicos que se activan al interactuar con el ambiente (Goldstein, *et al.* 1994).

Los crioprotectores usados individualmente carecen de efectividad, ayudan en cierta medida en la estabilidad de explantes de callos recuperados después de permanecer en ultracongelador a –40 °C, pero tan solo por un corto tiempo (7 días), apoyados por una fase de precultivo y enfriamiento lento, la respuesta es favorable pero no contundente. Para *S. disciformis* se observa que aumenta el periodo de estabilidad de callos criopreservados en hasta 5 semanas vía enfriamiento lento con medio MS líquido adicionado con 400 mg/l manitol. Definitivamente el método de congelamiento mediante enfriamiento lento ha contribuido con resultados significativos en la estabilidad de células de callos de *S. disciformis*.

El empleo de combinaciones de crioprotectores para muestras de callos criopreservadas mostró una evidente diferencia que se manifiesta en el proceso de recuperación. Las muestras de callos mantenidas en nitrógeno líquido por 15 días muestran un tiempo de estabilidad significativamente mayor después de la recuperación en comparación con el empleo de crioprotectores individuales en ultracongelador (7 días); la estabilidad se mantuvo de 21 días (mínimo) a 35 días (máximo) para la combinación de crioprotectores DMSO+MAN+SAC. A pesar de que la toxicidad y la alta presión osmótica pueden ser un obstáculo grande al realizar combinaciones de crioprotectores, para muchas plantas de diferentes familias se han obtenido buenos resultados incrementando el índice de sobrevivencia y regeneración de explantes.

IZT.

Frecuentemente se han utilizado mezclas preparadas con más de dos crioprotectores, siendo el de mejores resultados el llamado PVS2, el cual ha favorecido la criopreservación de brotes apicales de *Anigozanthos viridis* ssp *viridis* (41.4%) (Turner, *et al.* 2000[b]), *Populus alba* (90%) (Lambardi, *et al.* 2000) y *Colocasia esculenta* (80%) (Takagi, *et al.* 1997), embriones somáticos de *Macropidia fuliginosa* (90.6%) (Turner *et al.* 2000B), células en suspensión de *Doritaenopsis* cv (64%) (Tsukazaki, *et al.* 2000), etc.

De acuerdo con la sensibilidad de las células es conveniente elegir la combinación adecuada de dos o más crioprotectores, pero entre los ampliamente recomendados se encuentran Dimetilsulfóxido y glicerol combinados con sorbitol, manitol, sacarosa, glucosa, prolina o polietinelglicol (Withers, 1985). Generalmente las soluciones preparadas por varios crioprotectores ofrecen una mejor respuesta y aumentan su eficacia, siempre y cuando el estado fisiológico del material vegetal lo permita. Para las muestras de callos de *S. disciformis* se eligieron como primer paso mezclas de dos crioprotectores que tuvieron menor efectividad, pero el de mejor influencia en la estabilidad de callos criopreservados fue DMSO+MAN+SAC. El dimetilsulfóxido es un crioprotector de permeabilidad rápida sobre la membrana celular y en combinación con glicerol y sacarosa que son crioprotectores de permeabilidad lenta, equilibran la acción sobre las células evitando el choque térmico y la toxicidad sobre todo de DMSO (Towill, 1991). Además la incubación de los explantes por 5 h en esta solución mas un enfriamiento lento resultan favorables para obtener una mejora en la recuperación de callos criopreservados en nitrógeno líquido.

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSIDAD
U.N.A.M CAMPUS

En cuanto al tiempo de inmersión de muestras, ya sea de explantes vegetativos o semillas en N.L. no existe un período estandarizado. La mayor parte de los procedimientos dependen del tipo de organismo a trabajar, aunque se sugiere que una muestra debe ser congelada por al menos 48 h para determinar entonces si las células permanecen viables (Simione, 1998). Sin embargo muchos de los estudios con herbáceas han sido mantenidas por periodos muy cortos a -196 °C en N.L. desde los 15 min *Doritaenopsis* (Tsukazaki *et al.* 2000), 30 min *Anigozanthos viridis* spp *viridis* (Turner *et al.* 2000B), hasta 1 h en *Populus alba* (Lambardi *et al.* 2000) y *Manihot esculenta* (Escobar *et al.* 1997), y el mayor tiempo de criopreservación ha sido para polen de *Hylocereus undatus* e *Hylocereus polyrhizus* manteniedo congeladas este tipo de estructuras por 3 meses (Metz *et al.* 2000). En base a estos trabajos de criopreservación, para *S. disciformis* se empleó 15 días como tiempo efectivo de congelamiento para todas las muestras incluyendo semillas, periodo que aseguró confiabilidad en los resultados, evitando ambiguedad sobre el comportamiento de las muestras.

La criopreservación de semillas de *S. disciformis* proporcionó datos importantes para comprender el comportamiento de semillas. Las diferencias entre los dos tipos de criopreservación (-40 °C y -196 °C) fueron mínimas, e incluso los porcentajes de sobrevivencia de acuerdo a las pruebas de viabilidad reflejan una similitud (entre 30-40% de sobrevivencia) para todos los crioprotectores utilizados en ambos procedimientos. Para el caso de semillas no hubo fase de precultivo pero sí fase de enfriamiento lento, además de emplear solamente crioprotectores individuales. Desafortunadamente es complicado obtener semillas de diferentes tiempos de colecta y por lo tanto la poca disposición de este material obligó a que los experimentos se reservaran a crioprotectores individuales, que finalmente manifestaron resultados favorables.

Para la especie en estudio las semillas colectadas y almacenadas a temperatura ambiente (no más de 25 °C) decaen en su porcentaje de viabilidad desde el 80% hasta el 40%, en los primeros cinco años, sin embargo conforme trascurre mas tiempo de almacenamiento esta cualidad se vuelve menos crítica y más bien se estabiliza, es decir existe una curva con una tendencia a la lenta reducción de la viabilidad, que si bien no es un porcentaje alto (30-40%) si es significativo para efectos de criopreservación, debido a que la constancia se mantiene en semillas de 6 a 9 años de almacenamiento (bajo temperatura ambiente), lo que permite una mejor resistencia

a las temperaturas criticas, por estar parcialmente deshidratadas. Y precisamente al hablar de criopreservación esta característica, impacta de manera directa sobre la resistencia del material a las temperaturas bajas. Como evidencia real tenemos que las semillas *S. disciformis* lote A reducen ampliamente su viabilidad de 80% (antes de criopreservar) a 33.33% (después criopreservar a -40 °C) y 18.18% (después criopreservar a -196°C), en cambio semillas lote D reducen muy poco su viabilidad de 36.84% (antes de criopreservar) a 27.57% (después a -40°C) y 17.64% (después de criopreservar a -196 °C) (Figuras 7 y 8).

Si se toma en cuenta que la cualidad recalcitrante u ortodoxa de una semilla no esta determinada por la reserva alimenticia, sino por el contenido de agua dentro de las células del embrión, y que la criopreservación es facilitada por la deshidratación celular (Towill, 1991, Wendell, 1999); entonces se deduce que un embrión que es parcial o casi completamente deshidratado, tiene mayor posibilidad de resistir un cambio brusco de temperatura y puede sobrevivir la fase critica de formación de cristales letales, a diferencia de embriones totalmente hidratados que a consecuencia de esta particularidad corren el riesgo de colapsarse bajo temperaturas menores a 0 °C.

Existen pocos ensayos de éxito limitado, en donde se involucran semillas con bajos contenidos de agua, Grout., *et al.* (1983) empleó procedimientos de deshidratación, enfriamiento y recuperación de embriones extraídos de semillas de *Elaeis guineenis*; Dereuddre, *et al.* (1995) empleó congelamiento de embriones de *Daucus carota* bajo congelamiento lento en presencia de crioprotectores y Pritchard, *et al.* (1995) empleó congelamiento rápido después de deshidratación parcial en soluciones osmóticas en semillas y embriones de *Araucaria hunsteinii*. Sin embargo el almacenamiento por periodos largos para semillas con limitadas reservas de agua sigue siendo una incógnita en los bancos de germoplasma, pero aun así se espera que la criopreservación pueda dar la solución (Ellis *et al.* 1985).

Otra observación importante es el porcentaje de viabilidad de las semillas después de ser criopreservadas bajo ambos procedimientos (independientemente del crioprotector) el rango se mantiene entre 30-40%, sensiblemente bajo pero que se puede tomar como un punto de partida para esta familia de plantas que ha sido poco trabajada a nivel de criopreservación. Esta uniformidad indica que la influencia del crioprotector no

es crítica para la criopreservación (exceptuando tal vez el efecto de GLI cuya acción se explica más adelante), la diferencia no es significativa y esto sin duda beneficia en dos direcciones, la primera es que se puede prescindir de las soluciones crioprotectoras, y emplear únicamente medio MS líquido, el cual puede sustituir sin dificultades la función crioprotectora con efectos positivos, y la segunda es que la criopreservación no necesariamente tiene que ser bajo inmersión en nitrógeno líquido, basta con temperaturas lo suficientemente adecuadas como las de ultracongelador que pueden ser desde –40 a –80 °C, lo que podría subsanar costos de inversión para almacenamiento masivo de germoplasma.

En el párrafo anterior sobresale la efectividad del glicerol como crioprotector, observando la gráfica de viabilidad para semillas de *S. disciformis* criopreservadas en nitrógeno líquido se muestra que el DMSO fue el mejor crioprotector aunque su eficiencia es relativa ya que solo las semillas tipo C rebasan el 40% mientras las demás se mantienen por debajo del 22.22%; caso contrario al que se observa en semillas criopreservadas en ultracongelador, donde el GLI mantuvo por arriba del 33.33 % la viabilidad de semillas de los lotes A, B y C (Figura 9).

El efecto del DMSO ha sido conocido desde hace varios años (Withers, 1985, Towill, 1991), sin embrago resalta la capacidad crioprotectora del glicerol que materia de estudio. El glicerol en precultivo incrementó la sobrevivencia en embriones somáticos de *Macropidia fuliginosa* (Turner, *et al.* 2000), usado en niveles relativamente bajos y en combinación con otros azúcares. Las propiedades crioprotectoras del glicerol parecen ser superiores gracias a su arreglo esteroquímico y tamaño. Su molécula se compone de tres esqueletos de carbono (es una molécula pequeña a diferencia de sorbitol (6), glucosa (6) o inositol (6)) y sus grupos OH están orientados a lo largo por un solo lado, no es de naturaleza cíclica como el inositol. Esto puede ser fundamental para una mejor crioprotección en la medida que se pueden formar mejores puentes de hidrógeno con fosfolípidos de la membrana y proteínas impartiendo una mejor estabilización a la membrana celular (Turner 2001).

Por último se realizó una prueba comparativa de criopreservación entre semillas de *S. disciformis* y dos especies diferentes de cactáceas *Stenocereeus pruinosus* (lote E) y *Ferocactus latispinus* var. *spiralis*

(lote F), solo se aplicó bajo el procedimiento mas critico (a –196 °C en N.L.) para conocer las diferencias, sobre todo de sobrevivencia entre especies de la misma familia.

Los mejores resultados fueron presentados por el columnar *S. pruninosus*, su porcentaje de viabilidad antes de criopreservar fue de 100% y después de criopreservar a -196 °C en N.L. se obtuvo viabilidad de hasta del 80% y en *Ferocactus latispinus* var. *spiralis* se obtuvo un porcentaje de viabilidad antes de criopreservar de 78.04% y después del N.L. 14.00% (Figura 10). Esto indica que el carácter viable de las semillas esta regido por la naturaleza misma de la especie, la fisiología de los diferentes tipos de semilla pueden ser definitorios para los procesos de sobrevivencia tanto *in vivo* como *in vitro*, y quizás el tiempo de almacenamiento no sea tan crítico como las condiciones en las que este se realice (Cronquist, 2000).

Básicamente las semillas de cactáceas presentan una reserva de nutrientes muy reducida y la mayor parte del cuerpo de semilla corresponden al embrión, por lo tanto el factor que influye en la viabilidad es la reserva de agua. Para la viabialidad de semillas en general se ha postulado la existencia de un tipo intermedio entre semillas ortodoxas y recalcitrantes (Wendell, 1999), esto puede ser aplicado al menos para *S. disciformis*, cuyas semillas después de 9 años de almacenamiento han mostrado una viabilidad baja pero constante que no cambia significativamente después de cinco años de colecta, obviamente se reduce el número de semillas viables pero el restante refleja una resistencia a los procesos de almacenamiento a temperatura ambiente y por debajo de los 0 °C. Además la resistencia a cambios fuertes de temperatura, tal como la inmersión en N.L. esta en función de la naturaleza de la semilla y de la especie misma, quizás intervenga la morfología pero no es totalmente determinante y asegurarlo es todavía incierto, así que la mejor opción es continuar con los estudios referentes a la relación estructura-funcionamiento-resistencia a bajas temperaturas de semillas de cactáceas.

10. CONCLUSIONES.

• La propagación de callos *in vitro* de *Strombocactus disciformis* resultó exitosa con medio MS adicionado con 10 mg/l BAP.

• Los callos obtenidos fueron friables, sin vitrificación, poco turgentes, fotosintéticos, con células en continua división y sin problemas al ser subcultivados, siendo estas características importantes para la manipulación durante la criopreservación.

• Para la criopreservación de callos el mejor método fue mediante una fase de precultivo en medio MS adicionado con 400 mg/l manitol, el empleo de Dimetilsulfóxido 10 % + Manitol 1 M + Sacarosa 0.5 M como crioprotectores, mas un proceso de enfriamiento lento y congelamiento en nitrógeno líquido a –196 °C por 15 días.

• El proceso de recuperación de explantes más eficiente fue con agua corriente a 40 °C y el empleo de medio MS adicionado con 0.5 mg/l 2,4-D, logrando que los explantes recuperados se mantuvieran estables por 5 semanas.

• Los resultados de criopreservación de células en suspensión y explantes de plantas madre muestran que el tiempo de precultivo, el empleo de medio MS adicionado con 400 mg/l y la acción de crioprotectores individuales, no influyen satisfactoriamente en la estabilidad del material al ser expuesto a nitrógeno líquido, por lo tanto se sugiere implementar un método viable de precultivo así como la adición de diferentes combinaciones de crioprotectores para garantizar la resistencia del material al ser expuesto a temperaturas menores a 0 °C.

• La criopreservación de semillas de *S. disciformis* manifiesta que el enfriamiento lento es de suma importancia y la adición de crioprotectores individuales, específicamente Glicerol 10 % para inmersión en ultracongelador a –40 °C y DMSO 10 % para inmersión en nitrógeno líquido a –196 °C favorecen la viabilidad del material durante el proceso de recuperación.

• Las semillas con mayor tiempo de almacenamiento presentan una mejor respuesta al ser criopreservadas en nitrógeno líquido disminuyendo muy poco su viabilidad, lo que evidencia que el porcentaje limitado de cantidad de agua en el embrión favorece la resistencia a las bajas temperaturas.

• Los resultados de este trabajo representan un primer paso para establecer un método efectivo de criopreservación de cactáceas, los ensayos con esta familia siguen siendo limitados; pero existen puntos importantes que son necesarios considerar, como la fase de precultivo, la combinación de crioprotectores, el enfriamiento lento e incluso uno o varios procesos de deshidratación celular, para lo cual es necesario dar continuidad a esta línea de investigación de gran importancia en la preservación de germoplasma de especies con riesgo de extinción como lo son las cactáceas.

11. LITERATURA CITADA.

Anderson, E. 2000. The Cactus Family. Timber Press, Cambridge UK 776 p

Arias, M. S. 1993. Cactáceas. Conservación y Diversidad en México. Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural, 44:109-115

Arias, M. S. 1997. Distribución General. En: Suculentas Mexicanas Cactáceas. CONABIO. México, pp 17-21

Arreola, N. H. 1997. Formas de Vida y Características Morfológicas. En: Suculentas Mexicanas Cactáceas. CONABIO. México, pp 27-35

Bravo-Hollis, H. 1978. Las Cactáceas de México Vol. I. Universidad Nacional Autónoma de México. México, 473 pp

Bravo-Hollis, H. y Sánchez-Mejorada, H. 1995A. Las Cactáceas de México Vol. II. Universidad Nacional Autónoma de México. México, 404 p

Bravo-Hollis, y Scheinvar, L. 1995B. El Interesante Mundo de las Cactáceas. Fondo de Cultura Económica. México, 233 p

Clayton, P. W., Hubstenberger, J. F. y Phillips, G. 1990. Micropropagation of Members of the Cactaceae Subtribe Cactinae. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 115(2):337-343

Cota, S. J. H. 1984. Influencia de la Luz, Temperatura y Sustancias Químicas sobre la Germinación de *Ferocactus latispinus* (Haw.) Rose (Cactaceae). Tesis de licenciatura. ENCB-IPN. México, pp 3-72

Cronquist, A. 2000. Introducción a la Botánica. Compañía Editorial Continental. México, 848 p

Embryogenic Clones of White Spruce (*Picea glauca* (Moench)Voss.). Plant Cell Reports. 18: 948-953

Dereuddre, J., Blandin, S. y Hanssen, N. 1991. Resístanse of Alginate-Coated Somatic Embryos of Carrot (*Daucus carota* L.) to Desiccation and Freezing in Liquid Nitrogen. I. Effects of Preculture. Cryoletters 12:125-134

Diario Oficial de la Federación, 16 de Mayo de 1994, Secretaria de Desarrollo Social NOM-059-ECOL-1994

Dirzo, R. y Gómez, G. 1996. Ritmos Temporales de la Investigación Taxonómica de Plantas Vasculares en México y una Estimación del Numero de Especies Conocidas. Ann. Missouri Bot. Gard., 83:396-403

Dirzo, R. y Raven, H. 1994. Un Inventario Biológico para México. Soc. Bot. México, 55:29-34

Dodds, H. J. 1991. In Vitro Methods of Conservation of Plant Genetic Resources. Chapren and Hall. Cambridge, 247 p

Ellis, R., Hong, R. y Roberts, E. Handbook of Seed Technology for Genebanks Vol. 2. International Board for Plant Genetic Resources, Roma.

Escobar, R. H., Mafla, G. y Roca W. M. 1997. A Methodology for Recovering Cassava Plants From Shoot Tips Mantained in Liquid Nitrogen. Plant Cell Reports, 16:474-478

Ezcurra, E. 1997. De Árboles Leñosos a Suculentas Espinosas. En: Suculentas Mexicanas Cactáceas. CONABIO. México 43-47

Flores, R. y Ortiz, G. 2000. In vitro Propagation of *Cephalocereus senilis* by etiolation plants. Haseltonia 7: 92 - 96

Goldstein, G. y Nobel, P. S. 1994. Water Relations and Low-Temperature Acclimation for Cactus Species Varying in Freezing Tolerance. Plant Physiology 104:675-681

Grout, B., Shelton, K. y Pritchard, H. 1983. Orthodox Behavior of Oil Palm Seed and Cryopreservation of the Excised Embryo for Genetic Conservation. Ann. Bot. 52:381-384

Hernández, M. H. y Gódinez, M. H. 1994. Contribución al Conocimiento de las Cactáceas Mexicanas Amenazadas. Act. Bot. Mex., 26:33-52

Hunt, D. 1992. CITES Cactaceae Checklist. Royal Botanical Gardens Kew. Surrey, 190 p

Jonson, J. L. y Emino, E. R. 1979. In vitro Propagation of *Mammillaria elongata*. Hort Science 14(5):605-606

Lambardi, M., Fabbri, A. y Caccavale, A. 2000. Cryopreservation of White Poplar (*Populus alba* L.) by Vitrification of In Vitro-Grown Shoot Tips. Plant Cell Reports 19:213-218

León de la L. J. y Valiente-Banuet, A. 1994. Las Cactáceas. Ciencia y Desarrollo. CONACYT. 117:58-65

Mauseth, J. D. 1977. Cactus Tissue Culture: A Potential Method of Propagation. Cactus and Succulent Journal (U.S.) 69:80-81

Metz, C., Nerd, A. y Mizrahi, Y. 2000. Viability of Pollen of Two Fruit Crop Cacti of the Genus Hylocereus is Affected by Temperature and Duration of Storage. Hortscience 35(1):22-24

Mittermeier, R. A. y Goettsch, de M. C. 1992. La Importancia de la Diversidad Biológica en México. En: Sarukhán J y Dirzo R. edr. México Ante los Retos de la Diversidad. CONABIO. México pp 63-73

Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassay with Tobacco Cultures. Physiology Plant 15:473-479

Pennycooke, J. C., y Towill, L. E. 2000. Cryopreservation of Shoot Tips from In Vitro Plants of Sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.)Lam.) by Vitrification. Plant Cell Reports 19:733-737

Pérez, M. B., Pérez, R. M., Villalobos, A. E., Meza, R. E., Morones, R. L. y Lizalde, V. H. 1998. Micropropagation of 21 Species of Mexican Cacti by Axillary Proliferation. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 34:131-135

Pritchard, H., Tompsett, P. y Smidt, W. 1995. Effect of Moisture Content on Low Temperature Responses of *Araucaria hunsteinii* Seed and Embryo. Ann. Bot. 76:79-88

Rubluo, A., Chávez, V., Martínez, A. P. y Martínez-Vázquez, O. 1993. Strategies for the Recovery of Endangered Orchids and Cacti Through In Vitro Culture. Biological Conservation 63:163-169

Rzedowski, J. 1978. Vegetación de México. Ed. Limusa. México, 432 p

Rzedowski, J. 1991. Diversidad y Orígenes de la Flora Fanerogámica de México. Act. Bot. Mex. 14:3-21

Sánchez-Mejorada, H. 1982. Some Prehispanic Uses of Cacti Among the Indians of México. Secretaria de Desarrollo Agropecuario. Gobierno del Estado de México. Toluca, México, 42 p

Simione, F. P. 1998. Criopreservation Manual. Nalge Nunc International Corporation, 8 pp

Stuppy, W y Nagl, W. 1992. Regeneration and Propagation of *Ariocarpus retusus* Scheidw. (Cactaceae) Via Somatic Embryogenesis. Bradleya 10:85-88

Takagi, H., Tien Thinh, N., Islam, O. M., Senboku y Sakai A. 1997. Cryopreservation of *In Vitro*-Grown Shoot Tips of Taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) by vtrification. Plant Cell Reports 16:594-599

Toledo, V. M. 1988. La Diversidad Biológica de México. Ciencia y Desarrollo. CONACYT, (14) 81:17-30

Thorpe, A. T. 1981. Plant Tissue Culture. Methods and Applications in Agriculture. Academic Press (U.S.) 379 p

Towill, L. E.1991. Cryopreservation. En: In Vitro Methods for Conservation of Plant Genetic Resources. Edited by John Dodds. Published by Chapman and Hall, London pp 41-70

Turner, S., Tan, B., Senaratna, T., Bunn, E., Dixon, K., Touchell, D. 2000A. Cryopreservation of the Australian Species *Macropidia fuliginosa* (Haemodoraceae) by Vitrification. Cryoletters 21:379-388

Turner, S., Touchell, D., Dixon, K., Tan, B. 2000B. Cryopreservation of *Anigozanthos viridis* spp *viridis* and Related Taxa From the South-West of Western Australia. Aust. J. Bot., 48:739-744

Turner, S., Senaratna, T., Touchell, D., Bunn, E., Dixon, K., Beng, T. 2001. Stereochemical Arrangement of Hydroxyl Groups in Sugar and Polyalcohol Molecules as an Important Factor in Effective Cryopreservation. Plant Science 160:489-497

Tsukazaki, H., Mii, M., Tokuhara, K., Ishikawa. 2000. Cryopreservation of *Doritaenopsis* Suspension Culture by Vitrification. Plant Cell Reports 19:1160-1164

Valiente-Banuet, A. y Arizmendi, M. 1997. Interacción entre Cactáceas y Animales: Polinización, Dispersión

de Semillas y Nuevos Individuos. En: Suculentas Mexicanas Cactáceas. CONABIO. México pp 61-67

Vystok, B, y Jara, Z. 1984. Clonal Propagation of Cacti Trhough Axillary Buds *in vitro*. Journal of Horticultural Science 59(3) 449-452

Wendell, Q. S. 1999. State and Phase Transition Behaviors of *Quercus rubra* Seed Axes and Cotyledonary Tissues: Relevance to the Desiccation Sensitivity and Cryopreservation of Recalcitrant Seeds. Cryobiology 38:372-385

Withers, L., A. 1984. Freeze Preservation of Cells. En: Cell Culture and Somatic Cells Genetics of Plants Vol. 1. Academic Press USA, pp 608-609

Withers, L., A. 1985. Cryopreservation and Storage of Germoplasm. En: Plant Cell Culture: a practical approach. IRL Press Limited, U.K. pp 169-191

Withers, L., A. 1990. Cryopreservation of Plant Cells. En: Methods in Molecular Biology, Vol. 6 Plant Cell and Tissue Cultures. Edited by Jeffrey W. Pollard and John M. Walker by Human Press p. 39-48

Wowk, B., Leitl, E., Rash, C., Mesbah-Karimi, Harris, S. y Fahy, G. 2000. Vitrification Enhancement by Synthetic Ice Blocking Agents. Cryobiology 40:228-236

Zachariassen, K. y Kristiansen, E. 2000. Ice Nucleation and Antinucleation in Nature. Cryobiology 41: 257-279

12. G L O S A R I O

Antinucleación.-Termino empleado para varios procesos que inhiben el congelamiento.

Callo.- Masa de células indiferenciadas que se forman de células o tejidos vegetales formando cúmulos amorfos de coloración verde, amarilla o blanca. Pueden ser de consistencia friable o compacta.

Crisis térmica.- La separación del punto de fusión y la temperatura de crecimiento de hielo.

Hiperhidratación o vitrificación.- Término empleado en cultivo de tejidos para designar a todo tejido vegetal, principalmente callos cuyas células presentan grandes cantidades agua almacenada, lo que morfológicamente se refleja como callos translucidos casi blancos y brotes turgentes.

Nucleación o Vitrificación.- Término empleado en criopreservación para designar la iniciación del congelamiento en una muestra de agua o una solución formando un núcleo con estructura parecida al hielo. El núcleo promueve la organización de las moléculas de agua dentro de un cristal de hielo.

Nucleación heterogénea.- Agregación de moléculas de agua cristalizadas por una sustancia diferente a las moléculas de agua.

Nucleación homogénea.- Cuando un núcleo grande es formado por agregación espontánea de las propias moléculas de agua.

Punto crítico de congelamiento.- Temperatura en la cual el crecimiento del hielo toma lugar.

Punto de supercongelamiento.-Temperatura en la cual la nucleación espontánea ocurre.

Punto de superenfriamiento o Temperatura de cristalización.- Fenómeno en el cual las soluciones acuosas permanecen en estado liquido cuando el enfriamiento esta por de bajo del punto de fusión.

Punto de fusión o punto de congelamiento.- Temperatura en la cual el ultimo cristal de hielo desaparece cuando una solución es lentamente calentada.

Recristalización.- Fenómeno en el cual los cristales de hielo grandes se vuelven mas grandes y los pequeños desaparecen y es adscrito a diferencias en la curvatura de la superficie (efecto kelvin).