

00345



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

3  
22j

FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EVALUACION DE LA SOBREVIVENCIA *in vitro* DE  
DIFERENTES ESPECIES VEGETALES SOMETIDAS A  
TEMPERATURAS SUPER-BAJAS.

T E S I S

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

P R E S E N T A :

ANA LAURA LOPEZ ESCAMILLA

DIRECTOR DE TESIS: DR. ABRAHAM RUBLUO ISLAS

MEXICO, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

EL PRESENTE TRABAJO DE INVESTIGACION FUE REALIZADO EN  
EL LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES DEL JARDIN  
BOTANICO DEL INSTITUTO DE BIOLOGIA, U.N.A.M., BAJO LA  
DIRECCION DEL DR. ABRAHAM RUBLUO ISLAS.

CON EL APOYO DE LA DIRECCION GENERAL DE ASUNTOS DEL  
PERSONAL ACADEMICO, U.N.A.M.

EN COORDINACION CON EL LABORATORIO DE CITOLOGIA Y EL  
LABORATORIO DE MICROSCOPIA ELECTRONICA DE LA FACULTAD DE  
CIENCIAS, U.N.A.M.

## CON AGRADECIMIENTO

A la Dra. Margarita Collazo Ortega, por su constante e invaluable apoyo a lo largo del desarrollo del presente trabajo.

Al Dr. Víctor Manuel Chávez Avila, por su amistad, apoyo y acertadas sugerencias al trabajo escrito.

Al Dr. Robert Bye Boettler por el apoyo que me brindó a lo largo de mis estudios.

Al Jardín Botánico del Instituto de Biología por las facilidades para el uso de sus instalaciones durante el desarrollo del presente trabajo.

A la Dra. Judith Márquez Guzmán, por su apoyo en la evaluación de los cortes histológicos.

A la Dra. Clara Esquivel, por compartir conmigo su gran experiencia y conocimientos.

Al Dr. Luis Felipe Jiménez, por brindarnos todas las facilidades para desarrollar el trabajo de microscopía electrónica.

Al Dr. Jesús Heiras Aguirre y al personal del Departamento de Estado Sólido y Criogenia, por toda la ayuda proporcionada.

Al Dr. Abraham Rubluc Islas por su apoyo en la realización del presente trabajo.

Al Campo Experimental "El Roque", Gto. del INIFAP, por el material biológico proporcionado.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) UNAM, por la beca proporcionada para realizar los estudios de maestría.

A la Dirección General de Preparatorias y a la Escuela Nacional Preparatoria No. 8 UNAM, por su apoyo para llevar acabo los estudios de maestría.

Agradezco especialmente a mis compañeros y amigos del Jardín Botánico y del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales por toda su ayuda, comprensión, apoyo y amistad.

**DEDICO EL PRESENTE TRABAJO A:**

**MIS PADRES, MI HERMANA Y HERMANOS, CON CARÍÑO**

**A MIS AMIGOS PATY, MARTÍN, VÍCTOR POR TODAS SUS ENSEÑANZAS,  
COMPAÑERISMO Y AMISTAD.**

**ESTA ES LA BUENA,**

**TU ECHALE...**

## INDICE

	Páginas
ABREVIATURAS	1
RESUMEN	2
I.- INTRODUCCION	3
1.- Conservación de los recursos genéticos	6
2.- Principios de un banco de germoplasma <i>in vitro</i>	13
3.- Crioconservación: aspectos básicos	15
4.- Congelación	18
1) Congelación rápida	20
2) Congelación lenta	20
5.- Agentes crioprotectores	23
6.- Vitrificación	25
7.- Recuperación del material crioconservado	27
8.- Evaluación del material crioconservado	29
1) Observación macroscópica y microscópica	31
2) Actividad enzimática	33

JUSTIFICACION	34
OBJETIVOS	35
II.- MATERIALES Y METODOS	36
1) Obtención del gradiente de temperatura y curvas de enfriamiento de las soluciones crioprotectoras	36
2) Material biológico	38
3) Técnicas de criopreservación y medios de recuperación	41
4) Obtención de las curvas de CTT	52
5) Técnicas para el análisis estructural y ultraestructural	53
III.- RESULTADOS Y DISCUSION	62
IV.- CONCLUSIONES	102
V.- ANEXO I	107
VI.- BIBLIOGRAFIA CITADA	111

## ABREVIATURAS

AIA	Acido indolacético
ANA	Acido naftalenacético
2,4-D	Acido 2,4 - Diclorofenoxiacético
CTT	Sal deshidrogenasa cloruro de 2,3,5 trifenil tetrazolio
DMSO	Dimetilsulfóxido
ID	Inmersión Directa
IBPGR	International Board of Plant Genetic Resources
GA <sub>3</sub>	Acido Giberélico
K	Kinetina, 6-Furfurilaminopurina
NAS	National Academy of Sciences
NL	Nitrógeno líquido
MS	Medio de cultivo Murashige y Skoog (1962)
MSD	Medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) adicionado con 2,4 - D
MSL	Medio de cultivo líquido Murashige y Skoog (1962)
S	Suspensión a 12 cm de la boca del termo
SSNL	Suspensión a 7 cm sobre el nivel del NL
Z	Zeatina, 4-hidroxi-3-metil-trans-2-butenilaminopurina



**RESUMEN**

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* ofrece una alternativa para el almacenamiento de germoplasma valioso de especies que se han conservado por los métodos tradicionales.

Esta técnica, aunada a las de crioconservación constituyen una posible vía para establecer bancos de germoplasma *in vitro*. En el presente trabajo se utilizaron los métodos de: enfriamiento a tasas lentas, enfriamiento rápido y la inmersión directa en Nitrógeno Líquido, seguidas del almacenamiento en Nitrógeno Líquido durante 15 ó 30 min, la descongelación rápida y recuperación *in vitro* de: **Allium sativum**, **Daucus carota**, **Lycopersicon esculentum** y **Dianthus caryophyllus**. La viabilidad del material congelado se estimó por: a) su aspecto macroscópico, b) la reducción de la sal deshidrogenasa cloruro 2,3,5 trifenil tetrazolio, c) la magnitud del daño celular, d) la capacidad de crecer ante diferentes tratamientos de reguladores del crecimiento y técnicas de cultivo para favorecer su recuperación postcongelación. Los resultados mostraron de manera general que: 1) el sistema propuesto requiere de mejoras de tipo técnico para lograr obtener un control en las tasas de enfriamiento lentas, 2) es posible determinar la actividad respiratoria postcongelación en **Allium sativum** y **Daucus carota**, 3) la membrana y estructuras celulares de **Allium sativum** y **Daucus carota** son dañadas considerablemente debido a su ruptura y una severa plasmólisis a lo largo del proceso de crioconservación, por lo que su recuperación total no es posible, 4) no se obtuvo la recuperación postcongelación en medios adicionados con reguladores del crecimiento en **Lycopersicon esculentum** y **Dianthus caryophyllus**.

## INTRODUCCION

Entre las cerca de 250,000 especies de plantas que existen en la naturaleza (NAS, 1975) aquellas que se reproducen vegetativamente, o no producen semillas, no se pueden almacenar por las vías tradicionales como se procede con las especies que forman semillas ortodoxas. De estas especies lo que se conservan son las estructuras vegetativas: bulbos, tubérculos y raíces. Las que después de cierto tiempo llegan a perder su viabilidad, por lo tanto antes de que esto ocurra, estas estructuras deben plantarse nuevamente para repetir el ciclo vital de la planta y generar un nuevo propágulo que será almacenado.

Existe otro gran grupo de plantas que producen semillas llamadas recalcitrantes, que se caracterizan por perder su viabilidad al reducir su contenido de humedad (Roberts, 1984) y que también presentan problemas para ser almacenadas. La conservación de su germoplasma se realiza en cultivos en el campo, lo que implica un alto costo de manutención, de labores de campo y el riesgo de su pérdida al estar expuestos a diversos factores adversos como son los cambios climáticos de la región, el ataque por patógenos así como la manipulación por el hombre.

Ante la imposibilidad de conservar colecciones en campo de todas las variedades vegetales de interés comercial que ha generado el hombre y de aquellas especies que se encuentran amenazadas de extinción, el establecimiento de bancos de

germoplasma *in vitro*, es una medida alternativa para afrontar parte del problema.

Las técnicas *in vitro* pueden proveer un alto potencial de tasas de multiplicación vegetativa a partir de tejidos aislados y cultivados asépticamente o bien poder almacenar germoplasma valioso en un espacio reducido.

Los bancos de germoplasma *in vitro* han sido denominados por el Consejo Internacional para los Recursos Genéticos Vegetales (IBPGR) en 1986, como colecciones activas para almacenamiento a corto plazo y colecciones base para almacenamiento a largo plazo.

La conservación a corto plazo comprende comúnmente el empleo de sustancias que retardan el crecimiento de los explantes y pueden permanecer bajo estas condiciones durante tiempos relativamente cortos; entre otros factores las modificaciones de luz y temperatura pueden favorecer este tipo de conservación.

En el almacenamiento a largo plazo, se utilizan las técnicas de criopreservación que consisten en el empleo de:

a) sustancias denominadas agentes crioprotectores que minimizan el daño por congelación y b) la aplicación de temperaturas muy bajas, que se alcanzan por medio de Nitrógeno Líquido (NL)  $-196^{\circ}\text{C}$ , para conservar las muestras por tiempo prolongado.

Dentro de las principales deficiencias en el conocimiento del proceso de criopreservación se encuentran los complejos cambios estructurales y fisiológicos que

ocurren como resultado de la congelación y descongelación (Wilkins y Dodds, 1983). Para conocer la situación que guardan los tejidos que fueron congelados se requieren llevar a cabo varias pruebas para confirmar su viabilidad. Este aspecto es importante debido a que el éxito o fracaso de la técnica de crioconservación está fuertemente ligado a los aspectos técnicos del equipo, crioprotectores, tasas de enfriamiento, etc., así como a las características del material biológico: especie, estado fisiológico de la planta madre, contenido de agua celular, tipo de tejido, etc.

Para evaluar la viabilidad de las células después de su congelación-almacenamiento y descongelación se han desarrollado varios métodos (Calkins y Swanson, 1990).

Entre ellos se contempla el análisis de los aspectos macroscópicos, estructurales y ultraestructural, con auxilio de la microscopía óptica y electrónica; así también se considera la condición fisiológica al examinar la tasa respiratoria con la sal deshidrogenasa cloruro 2,3,5 trifenil tetrazolio (CTT), o al promover la recuperación del material congelado en medios adicionados con reguladores del crecimiento. La conjunción de todos estos elementos permiten realizar la evaluación de los aspectos técnicos y capacidades biológicas de cada especie y realizar con éxito los procesos de crioconservación.

## ANTECEDENTES

### CONSERVACION DE LOS RECURSOS GENETICOS.

Desde épocas antiguas la diversidad vegetal ha sido preservada en sus hábitats naturales o en los campos cultivados. La riqueza genética de los cultivares se ha mantenido por los agricultores en tiempos más recientes, los cuales han guardado semillas o clones para la próxima siembra, las semillas son protegidas de insectos y mamíferos y los tubérculos son almacenados unos cuantos meses a bajas temperaturas, como las papas (*Solanum tuberosum*) en los Andes Peruanos (Plucknett y Smith, 1987).

Asimismo, la práctica de reunir y cultivar plantas de lugares lejanos o apartados, inicialmente con un sentido ornamental es una actividad antigua y conforma en parte lo que actualmente se denominan como Jardines Botánicos mismos que ahora también tienen sus funciones en investigación, educación y extensión; en la Edad Media los jardines europeos eran frecuentemente concebidos como una simulación del Jardín del Edén. En el siglo nueve los jardines en los monasterios eran comunes en Europa y en países del mundo Islámico se construían alrededor de mezquitas y palacios; eran lugares de relajación y contemplación de las cualidades de Alá.

Posteriormente los jardines se transformaron en centros de estudio, de los cuales se han derivado varias farmacopeas por lo que la medicina propició un impetu al estudio de las plantas (Plucknett y Smith, 1987).

Se considera que la necesidad de conservar los recursos genéticos vegetales y animales fue generada y puesta en marcha en China e India hace 700 años D.C. (Plucknett y Smith, 1987); no obstante, la conservación de la biodiversidad es practicada actualmente como algo relativamente nuevo, que si bien no lo es, es de urgente necesidad.

La conservación genética moderna tuvo sus bases en los estudios pioneros de Candolle en 1855, 1902 y Vavilov en 1940, 1957 (Plucknett y Smith, 1987).

Los estudios y expediciones que realizó Vavilov desde 1924 a 1940 revelaron la abundancia y la desconocida variación genética (Plucknett y Smith, 1987; Dodds, 1991), asimismo mostraron que los recursos genéticos, particularmente cultivares primitivos y especies afines a las cultivadas, se concentran en áreas definidas. Según Vavilov estas áreas son "centros de origen" o "áreas de diversidad genética". Dichas áreas están situadas generalmente en regiones de agricultura primitiva y conservadora, todas ellas se localizan en países subdesarrollados y son instituciones extranjeras las que se preocupan de su preservación y uso.

En los años sesenta se crearon diversas organizaciones que se avocaron al estudio de la conservación de los recursos genéticos.

No fue sino hasta 1964, que en el Programa Biológico Internacional (IBP por sus siglas en inglés) se creó un subcomité que estudiara las vías y formas de coleccionar y

conservar los recursos genéticos vegetales. En él se integraron los esfuerzos del IBP y de la Organización de Alimentación y Agricultura (FAO por sus siglas en inglés) para abordar este problema.

A raíz de la conferencia técnica celebrada en septiembre de 1967, se clasificaron cinco distintos tipos de germoplasma que requieren preservarse (Dodds, 1991):

- 1) Los cultivares de uso más frecuente.
- 2) Cultivares de uso poco frecuente pero que son importantes por su reserva genética.
- 3) Grupos genéticamente especiales por su resistencia a distintos factores ambientales.
- 4) Variedades primitivas.
- 5) Especies silvestres relacionadas con las cultivadas.

Otra propuesta fue que las colecciones de los bancos genéticos, contuvieran genotipos representativos de distintas regiones del mundo.

Se discutieron los métodos específicos aplicados a las diferentes especies cultivadas y fue propuesto el uso de bancos de semillas como un recurso para la conservación de ciertos cultivos. En 1972 se señaló como problema mundial la desaparición de la fuente genética y la necesidad de salvarla y preservarla en beneficio de futuras generaciones. Para ello, se logró el financiamiento para la exploración, conservación, documentación y entrenamiento, creándose el

Consejo Internacional para la Conservación de los Recursos Genéticos (IBPGR), como administrador de dichos fondos. En 1974 se discutieron aspectos de explotación, evaluación, conservación, almacenaje, documentación/información y aspectos técnicos de los centros de recursos genéticos. Una revisión realizada por Roberts (1975 citado por Dodds, 1991) de los principios y métodos para el almacenamiento de semillas y polen demostró que la conservación a largo-plazo de semillas era relativamente simple y tecnológicamente de bajo costo.

Actualmente el concepto de un banco de germoplasma ha cambiado dramáticamente. Si fuera posible medir en una hora un ciclo agrícola se observaría que: el germoplasma ha sido conservado en los Jardines Botánicos e invernaderos tan solo en los últimos minutos, y los bancos de genes no han sido considerados sino hasta los últimos segundos (Plucknett y Smith, 1987).

Para afrontar la actual e inminente pérdida del material vegetal en el campo, aunado a lo costoso que es realizar viajes para colectarlo y dado que en muchas ocasiones éstos no resultan exitosos, es necesario estimular el desarrollo de modernos bancos genéticos para mantener un constante y confiable suministro de germoplasma.

Los métodos para conservar el germoplasma varían en función de la especie y otros factores. Hasta el momento, la conservación mediante el almacenamiento de semillas ha resultado ser el procedimiento más económico y el que mejor



garantiza la preservación de la identidad genética del material (Braun, 1988).

Por otro lado, el germoplasma selecto cultivado en campo necesita de amplios espacios, altos costos y constantes cuidados. Se ha estimado que para tener una colección de especies silvestres, ecotipos y cultivares de pistache se requieren de 21 hectáreas (Wilkins y Dodds, 1983). Otro ejemplo claro es el que ocurre en la subestación de los Andes Peruanos en Huancayo, donde se destinan 4 hectáreas para sembrar 12,000 clones de papa cada año (Wilkins y Dodds, 1983).

Las limitaciones de la tecnología convencional han propiciado que en los últimos años la aplicación de las técnicas *in vitro* tomen importancia para almacenar el germoplasma de las especies recalcitrantes (Bajaj, 1979; Withers, 1980; Wilkins y Dodds, 1983; Henshaw et al., 1985; Kartha, 1985a; Rubluo, 1985; Grout, 1991) que han resultado benéficas particularmente para aquellas especies que se reproducen vegetativamente.

Los sistemas *in vitro* pueden aprovechar el alto potencial de tasas de multiplicación vegetativa de tejidos aislados cultivados asépticamente para así obtener, entre muchos otros beneficios, plantas libres de virus, o bien poder almacenar germoplasma valioso en un espacio reducido.

Un ejemplo fue el trabajo de Galzy en 1969 (citado por Wilkins y Dodds, 1983) que almacenó plantas de uva (*Vitis rupestris*) a 9°C por periodos de un año, trabajó con un total

de 800 cultivares, con seis repeticiones por cultivar, que ocuparon un área de 2 m<sup>2</sup>, lo que in vivo requeriría de una hectárea. Asimismo clones de yuca, camote, papa y café fueron almacenados como plántulas en tubos de ensayo por más de dos años (Kantha, 1981).

Si bien las técnicas in vitro son útiles para obtener altas tasas de multiplicación, esto puede no ser una característica deseable para preservar germoplasma ya que a mayor velocidad de micropropagación, corresponderá tener que realizar subcultivos periódicos más frecuentes del material almacenado. Asimismo una preocupación que surge con el uso del cultivo de tejidos en la preservación de germoplasma es la ocurrencia de variación somaclonal en callo y células en suspensión, y aún se ha registrado en tejidos organizados como meristemas (Walbot y Cullis, 1985 citados por Kantha, 1985a).

El cultivo de meristemas ha ocupado una posición única en términos prácticos, no sólo en la propagación clonal, sino en la producción de plantas libres de virus. Dentro de los procesos de crioconservación los meristemas de una cantidad considerable de especies han sido sometidos a múltiples variables como el tipo y concentración del agente crioprotector así como a diversas tasas de enfriamiento con resultados favorables (Seibert, 1976; Bajaj, 1977; Benson, 1979; Grout et al., 1978; Haskins y Kantha, 1980; Kantha, 1981, 1985b).

Grout (1991), menciona que hay algunos riesgos inherentes al almacenamiento en NL que están ampliamente asociados con los efectos de formación de radicales libres.

Esto puede provocar daño en macromoléculas como el DNA y comprometer la estabilidad genética, aunque estudios prospectivos basados en cultivos animales almacenados en frío sugieren que los riesgos pueden ser insignificantes a futuro.

#### PRINCIPIOS DE UN BANCO DE GERMOPLASMA *IN VITRO*.

Una de las alternativas propuestas para afrontar la problemática del almacenamiento de germoplasma valioso es la creación de bancos de germoplasma *in vitro* por medio de dos vías (Kantha, 1981):

- a corto-mediano plazo
- a largo plazo

Estas vías fueron denominadas por el Consejo Internacional para los Recursos Genéticos Vegetales (IBPGR) en 1986 como colecciones activas (Banco activo) y colecciones base (Banco Base), respectivamente.

#### Banco activo:

Consiste en el almacenamiento a corto-mediano plazo de la muestra vegetal al menos durante un año sin realizar subcultivos, el material debe fluir a través de un proceso cíclico, donde se multiplique y se controle su estabilidad genética. La colección es mantenida por sucesivos subcultivos, lo cual renueva el material conservado y provee muestras para su monitoreo y distribución, los riesgos de variación somaclonal pueden ser minimizados por la cuidadosa selección del explante inicial y sistemas de multiplicación.

El almacenamiento a corto plazo comprende comúnmente el empleo de sustancias que retardan el crecimiento, por lo cual el material vegetal puede permanecer bajo estas condiciones durante tiempos relativamente cortos, la aplicación de

variaciones de luz y temperatura pueden ser favorables para este tipo de conservación y la combinación de ellas puede mejorar los resultados.

**Banco base:**

Dentro de la vía a largo-plazo se encuentran la preservación a muy bajas temperaturas,  $-196^{\circ}\text{C}$  o cercanas a ésta, es comúnmente llamada **crioconservación**. Esta consiste en la utilización de NL ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) y de sustancias que minimizen el daño por congelación (crioprotectores) para almacenar muestras por lapsos prolongados sin realizar subcultivos periódicos, las muestras permanecen en una condición estática con escasa actividad biológica.

Grout (1990) señala que esto "es debido a que la energía molecular es muy baja para completar las convencionales reacciones químicas en el material biológico"; por lo tanto no pueden ocurrir cambios genéticos durante el almacenamiento. Un banco base será capaz de renovar las existencias de un banco activo, así como las propias.

El éxito de la crioconservación hace posible llegar a mantener la estabilidad genética del germoplasma preservado por ejemplo, de cualquier tipo de material agronómicamente valioso o tejidos de especies con semillas recalcitrantes ó que básicamente se propaguen vegetativamente.

La creación de un banco base ofrece las siguientes ventajas y usos (Henshaw, 1975; Bajaj, 1979; Rubluo, 1985):

- 1) Brinda la posibilidad de mantener tejidos somáticos por largos periodos sin problemas de contaminación, cambios ambientales o genéticos.
- 2) Se podrían generar y escoger líneas celulares o variaciones genéticas, las cuales se almacenarían y emplearían según las necesidades de la investigación.
- 3) El almacenamiento en frío al inhibir la división celular, evita la necesidad de realizar subcultivos.
- 4) Se almacenaría una gran cantidad de clones en un espacio reducido.
- 5) A bajas temperaturas, las células están en un estado metabólico bajo, por lo que el potencial morfogénico de los cultivos se conserva.
- 6) El germoplasma congelado y libre de patógenos podría intercambiarse a nivel internacional.
- 7) Puede proveer a los bancos activos de material o reservas cuando sea necesario.

#### **CRIOCONSERVACIÓN: ASPECTOS BÁSICOS.**

Almacenar a temperaturas muy bajas implica transferir células (individuales, en agregados, tejidos u órganos) de una condición de crecimiento a temperatura ambiente u óptima controlada, pasando por los puntos de congelación de los ambientes intracelulares y extracelulares hasta llegar a una temperatura lo suficientemente baja, generalmente a

temperatura de ebullición del NL ( $-196^{\circ}\text{C}$ ), para suspender su metabolismo, (Withers, 1980).

Los primeros estudios de la recuperación del tejido vegetal después de su exposición a temperaturas muy bajas (NL) fue realizado por Sun (1958 citado por Withers, 1980).

Estudios subsecuentes exploraron los mecanismos del daño por congelación y determinaron las relaciones entre las tasas de congelación y descongelación. Sin embargo no fue sino hasta 1973 cuando Nag y Street realizaron una verdadera criopreservación en nitrógeno líquido para lo cual emplearon células de *Daucus carota*.

Es común que a consecuencia de la congelación en forma inmediata ocurran daños celulares generalmente irreversibles, los cuales tienen una base físicoquímica, que se pueden englobar en dos mecanismos (Altamirano, 1985):

#### Físicos:

Involucran la formación de cristales de hielo, su nucleación y su subsecuente crecimiento. La molécula de agua cambia su disposición espacial al pasar de líquido a sólido lo que provoca la ruptura de estructuras celulares.

#### Físicoquímicos:

1.- La desnaturalización de una gran cantidad de compuestos celulares a consecuencia del aumento en la concentración de electrólitos modifican la estructura secundaria y terciaria de las proteínas lo que ocasiona un choque osmótico.

- 2.- Suspensión de reacciones catalizadas por enzimas que son inactivadas a bajas temperaturas.
- 3.- Deshidratación extrema; ésta provoca la precipitación de proteínas en solución.
- 4.- Cambios en el pH

Los cambios que ocurren dentro de la célula al ser enfriada dependen en cierta medida de la velocidad a la cual se enfría la muestra. Cada explante responde de forma diferente y no se puede establecer un procedimiento general de criopreservación, cada caso debe pasar por un ensayo experimental.



## CONGELACION

La congelación produce daños físicos en las células debido a la formación de cristales de hielo. La formación de hielo consiste en el paso del agua de un arreglo azaroso a un estado sólido ordenado. Es importante señalar que muchos líquidos, incluyendo el agua, no se congelan en un punto de fusión de la fase sólida; cada líquido puede ser sobrecongelado a distintos grados debajo del punto de fusión de la fase sólida y podrán congelarse por la formación espontánea o la adición de sustancias que actúan como catalizadores de la transición de la fase líquido-sólida. La catálisis de la transición de la fase agua-hielo se refiere a la nucleación del hielo (Finkle et al., 1985; Sakai, 1993).

El proceso de congelación involucra dos fenómenos diferentes, la formación de núcleos de hielo y el crecimiento del cristal.

La cristalización de una fase líquida a una sólida requiere la generación de núcleos en los cuales las moléculas puedan condensarse. Un núcleo efectivo consiste en un grupo de moléculas que pueden ser reconocidas por otras. Cada grupo de moléculas se forma espontáneamente de manera azarosa y la probabilidad de que los grupos puedan servir como un núcleo efectivo para la cristalización depende de su tamaño, vida media y a su vez de la temperatura.

Se conocen dos tipos de nucleación: a) La nucleación homogénea, que consiste en la formación de manera espontánea de núcleos en el líquido sin la intervención de cuerpos

extraños a una temperatura cercana a  $-40^{\circ}\text{C}$ , y b) La nucleación heterogénea es aquella que se lleva a cabo cuando hay impurezas, partículas de polvo o microcristales que se constituyen en núcleos.

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

Grout (1991), señala que una adecuada congelación es crítica para la exitosa recuperación del material que ha sido sometido al proceso de crioconservación y que por ello se requiere de un complejo equipo para cualquier operación a mediana o gran escala donde los protocolos hayan sido desarrollados, asegurando así la repetición de los tratamientos y resultados.

El tamaño y cantidad de cristales de agua que se forman al congelar dependen principalmente de la velocidad con que se extrae calor, por lo que se han establecido los siguientes métodos:

### 1.- Congelación rápida.

Consiste en la inmersión directa (ID) de las muestras en NL, este método provoca la formación de un gran número de cristales de hielo distribuidos en los tejidos de manera uniforme. La tasa de enfriamiento es muy elevada, de  $-50^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  hasta mayores de  $-1100^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ . Este método es recomendable para semillas, polen y meristemos de ciertas especies, por ejemplo se ha utilizado con éxito en *Dianthus caryophyllus* (Seibert, 1976), *Solanum tuberosum* (Bajaj, 1977), *Lycopersicon esculentum* (Grout et al., 1978).

### 2.- Congelación lenta.

Consiste en descender gradualmente la temperatura de la muestra de tal modo que la célula se enfriará relativamente despacio y en primera instancia se formará hielo fuera de ésta, la caída de la presión de vapor del agua traerá como consecuencia la eliminación del agua del protoplasma y un aumento en la concentración de solutos intracelulares. El punto de congelación intracelular se abate y en consecuencia la célula puede permanecer a una temperatura más baja a su punto de congelación sin que se forme hielo en el citoplasma.

Este proceso continúa hasta que se llega a un punto en el cual toda el agua intracelular congelable ha sido eliminada o ya no puede permanecer sin congelarse, entonces el contenido de agua se solidifica. Con este método se forman pocos cristales de hielo grandes (Franks, 1985; Kartha, 1985a; Meryman y Williams, 1985).

Cabe señalar que durante la congelación por el método lento las células pueden dañarse por el efecto que resulta de la concentración intracelular de solutos (Manzur, 1970; Meryman y Williams, 1985). Las tasas de enfriamiento recomendables son entre  $-0.5$  y  $-0.2^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , sin embargo se han reportado tasas del orden de  $-0.1$  a  $-10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ .

Los recipientes donde se llevan a cabo los métodos de congelación se conocen como Dewars o termos criogénicos; los hay de vidrio y de acero inoxidable. Estos recipientes utilizan el alto vacío como aislante y además están forrados con multicapas, pueden almacenar NL por largos períodos según su tamaño, volumen de almacenamiento y tamaño de su entrada (boca) (Heiras, 1988 comunicación personal).

Un determinado volumen de NL genera a partir de la superficie de éste un gradiente de temperatura hacia la boca del termo; para conocer este gradiente y calibrar el termo se requiere de sensores de temperatura con propiedades termoeléctricas (Jagodzinski, 1966).

Estos sensores son conocidos como termopares, y están constituidos por dos alambres de materiales distintos (Platino-Rodio, Cromo-Alumel, Cobre-Constantan) (Weast, 1984) unidos en un extremo, de tal modo que una diferencia de temperatura entre los extremos unidos provoca una diferencia de voltaje entre las puntas libres, estos cambios de voltaje son registrados por un multímetro o termómetro digital. El tipo de termopar más común es el de Cobre-Constantan que es

además el más económico, estable y con un amplio intervalo de sensibilidad, de 40 a -200°C (Jagodzinski, 1966).

Para lograr obtener velocidades de enfriamiento específicas se utilizan congeladores programables manufacturados por diferentes compañías como: Player Products Ltd. Windaill Road, Sunbury-on-Thames, England modelos Planer R201 y R202/101R minicongelador (Wilkins y Dodds, 1983), los cuales proporcionan tasas de enfriamiento controladas y requieren de un mínimo de cuidado cuando están operando.

También se puede lograr una velocidad de enfriamiento constante, aunque no lineal, al suspender la muestra en los vapores del NL (López, 1988). Este método ha sido efectivo para meristemas, cultivos en suspensión y protoplastos de *Daucus carota* (Nag y Street, 1973; Withers, 1979)

## AGENTES CRIOPROTECTORES

Un agente crioprotector es una sustancia que facilita el arreglo de la estructura molecular de los cristales de hielo, disminuye la tasa de formación de éstos y minimiza los daños que llevan a la destrucción celular durante los procesos de congelación.

Uno de los primeros en identificar estas sustancias fue Maximow (citado por Finkle et al., 1985) quien reportó los efectos crioprotectores a  $-196^{\circ}\text{C}$  en células de sangre de oveja tratadas con glucosa, en concentraciones del 5 al 8 %.

Los crioprotectores por su capacidad de entrar o no a la célula, se clasifican en penetrantes o no penetrantes (Meryman, 1962, 1971; McGann, 1978) y su velocidad de penetración a la célula dependerá en gran medida del tamaño de la molécula.

Los crioprotectores penetrantes son de bajo peso molecular, permiten que exista agua no congelada que actúa como agua estructural y como disolvente de las sustancias tóxicas que se encuentran intra y extracelularmente, reduciendo la presión osmótica causada por la congelación extracelular (Valenzuela, 1988).

Los crioprotectores no penetrantes son compuestos de alto peso molecular que no entran a la célula, la acción crioprotectora se da extracelularmente, pueden proteger en concentraciones molares bajas y generalmente requieren de tasas más rápidas de enfriamiento y descongelamiento para conferir protección (Valenzuela, 1988).

Se ha señalado que un agente crioprotector debe caracterizarse por evitar la formación de cristales de hielo, reducir la deshidratación celular por choque osmótico, y no ser tóxico. McGann (1978) comentó que la solubilidad de la sustancia crioprotectora debe ser considerada también como una característica.

Los crioprotectores más empleados han sido el glicerol ( $C_3H_5(OH)$ ) y el dimetilsulfóxido (DMSO) ( $(CH_3)_2 SO$ ), que son del tipo no penetrante y penetrante respectivamente. El primero es considerado un compuesto fuertemente electronegativo por presentar grupos funcionales  $OH$ , es poco tóxico a concentraciones altas y tiene una baja velocidad de difusión a través de la membrana, esto puede ocasionar daño celular por una diferencia de gradiente osmótico, es decir, antes de que pueda penetrar el glicerol el agua saldrá rápidamente de la célula (Mata, 1992).

El DMSO es un disolvente dipolar que fue sintetizado por primera vez por Alexander Saylzeff en 1866. Es un compuesto muy higroscópico y completamente miscible en agua; se prepara por oxidación en el aire del dimetilsulfuro en presencia de óxidos nitrogenados; comercialmente es extraído del petróleo y es un subproducto de la pulpa de la manufactura del papel e industrias relacionadas.

El DMSO está particularmente inclinado a participar como aceptor de átomos en uniones con el hidrógeno y compite con el agua por sitios de unión (Fernández, 1976). Generalmente se han utilizado los agentes crioprotectores sin combinarse

con otros, pero se ha observado que al utilizar mezclas de éstos la sobrevivencia de los explantes se ha incrementado (Chen y Kartha, 1987; Finkle y Ulrich, 1978; Finkle et al., 1985; Kartha, 1985b).

Los principales componentes que se utilizan para realizar las mezclas han sido el DMSO, glicerol, sacarosa, polietilenglicol (PEG) entre otros, se han realizado estudios con mezclas de ellos por ejemplo en células en suspensión de caña de azúcar (Chen et al., 1979; Finkle y Ulrich, 1978), células en suspensión de arroz (Sala et al., 1979) y células en suspensión de *Catharanthus roseus* (Chen et al., 1984b).

Las ventajas de usar mezclas crioprotectoras las señalan Finkle y Ulrich, 1978; Finkle et al. 1985:

- 1) Mayores efectos positivos sobre la viabilidad después de la congelación que los compuestos sencillos.
- 2) El efecto crioprotector se puede llevar a cabo al disminuir la concentración de los compuestos que pueden tener efectos perjudiciales ó tóxicos a la célula, además que el efecto crioprotector de los compuestos en combinación puede ser aditivo.

#### VITRIFICACION

Actualmente los trabajos de crioconservación se han enfocado a aquellos procedimientos que puedan eliminar la necesidad de controlar las tasas de enfriamiento y transferir las células directamente a NL. La condición que alcanzan las



células y el procedimiento mismo son denominados vitrificación, y ha sido propuesta como un método para la crioconservación de material biológico debido a que los efectos de la congelación extra e intracelular son minimizados. La técnica se basa en el proceso físico por el cual una solución altamente concentrada es sobrecongelada a muy bajas temperaturas y finalmente se solidifica en vidrio sin cristalizarse, este proceso permite congelar células y meristemas a  $-196^{\circ}\text{C}$  sin la formación de cristales de hielo (Sakai, 1993).

El éxito de los métodos de la crioconservación son explicados por la parcial o completa vitrificación de los líquidos intracelulares (Sakai, 1993).

Las soluciones que se emplean contienen diversos componentes, una de estas soluciones es la denominada como PVS2 que está compuesta de: Glicerol 30%, Etilén-Glicol 15%, DMSO 15% disuelto en MS dicionado de 0.4 M de sacarosa (Sakai y Kobayashi, 1990; Sakai et al., 1990 citados por Sakai, 1993), el método de vitrificación usando el PVS2 ha sido aplicado con éxito en la crioconservación de naranja, otros cítricos, así como meristemas apicales de pera y manzana (Niino et al., 1992). Asimismo (Niwata 1992, citado por Sakai 1993), reportó que ha logrado la crioconservación de ajo por esta técnica.

#### RECUPERACION DEL MATERIAL CRIOCONSERVADO.

Entre los problemas a los cuales se enfrentan las técnicas de criopreservación podemos señalar:

- a) el daño físico y fisicoquímico que se produce por la congelación del material.
- b) la recuperación del material que fue criopreservado.

Grout (1990, 1991), señala que el material criopreservado al regresar a su temperatura fisiológica normal puede presentar lesiones celulares que de algún modo intentará reparar para recuperar su estructura y función original. El tipo y grado de lesión estarán en relación a la especie y a las características de las estructuras y tejidos específicos congelados, así como al protocolo empleado. El restablecimiento de las actividades celulares puede ser favorecida al modificar las condiciones físicas y químicas del medio de cultivo. Dicha recuperación puede ser favorecida por la presencia de reguladores del crecimiento en el medio de cultivo empleado, no obstante ello son pocos los trabajos publicados que especifican el medio usado para la recuperación de los tejidos. Entre ellos están el de Bajaj (1977) que después de congelar explantes de papa, los cultivó en medio Murashige y Skoog (MS) (1962) adicionado con ácido indolacético (AIA) y Kinetina (K), utilizó dos métodos: en medio sólido inclinado y en puentes de papel filtro, obtuvo mejores resultados en este último donde el crecimiento fue más rápido debido posiblemente al "lavado" o dispersión de probables sustancias liberadas al medio que pudieran llegar a

ser inhibitorias, esto llega a ocurrir después de la muerte de algunas células dañadas por la congelación, mientras que en el medio con agar se acumulan dichas sustancias alrededor del inóculo.

Grout (1978), observó que las plántulas de jitomate obtenidas de explantes congelados y posteriormente sembradas en medio con ácido giberélico ( $GA_3$ ) tuvieron un mejor desarrollo que en el resto de las combinaciones ensayadas.

Benson (1979), logró regenerar brotes de *Solanum tuberosum*, después de congelarlos al incubarlos en medio MS con Zeatina (Z),  $GA_3$  y AIA.

Las auxinas de manera general incrementan el contenido osmótico de la célula y la permeabilidad al agua, reduciendo la presión de la pared celular (Bidwell, 1979), estos eventos se deben a la acidificación de la pared celular por la secreción de iones hidrógeno, que incrementa la extensibilidad o plasticidad de la pared (George y Sherrington, 1984; Armas et al., 1988). Se ha visto que bajos pH's inducen plasticidad en la pared celular y en consecuencia alargamiento (Armas et al., 1988). Rayle, (citado por Bidwell 1979) demostró que el alargamiento también se puede inducir en células que se han roto por haber sido congeladas y descongeladas. Por otro lado actúan aumentando la síntesis de RNA y proteínas específicas aún de la misma pared (Armas et al., 1988; Bidwell, 1979).

Las giberelinas actúan principalmente en la activación del crecimiento, y se ha determinado que la influencia

inhibitoria sobre el crecimiento vegetal de los retardadores en general puede ser contrarrestada con la adición de ácido giberélico (Bidwell, 1979). Así también, éste puede ser estimulador de la síntesis y actividad de enzimas específicas. De la Guardia y Benlloch (1980 citados por George y Sherrington, 1984), propusieron que el crecimiento promovido por el ácido giberélico es debido a un incremento en el transporte de iones potasio. Armas (1988), señala el efecto del ácido giberélico en la regulación de los polirribosomas y en la formación de retículo endoplásmico rugoso, que darán lugar a la formación de material membranoso.

Estos reguladores del crecimiento, por sus características, pueden ser promotores del restablecimiento de las estructuras dañadas por el proceso de congelación-descongelación.

#### **EVALUACION DEL MATERIAL CRIOCONSERVADO.**

Entre las principales deficiencias en el conocimiento del proceso de criopreservación se encuentran los complejos cambios estructurales y fisiológicos que ocurren como resultado de la congelación y descongelación (Wilkins y Dodds, 1983). Para percatarse del estado que guardan los tejidos que fueron congelados es necesario realizar diversas pruebas para corroborar su viabilidad. Inmediatamente después del congelamiento y descongelamiento, las células están en un

estado de crioshock y no muestran ninguna señal de vida (Calkins, 1990).

Sin embargo, es posible que después de un largo período de cultivo (más de 6 meses), ellos pueden responder. Desde el punto de vista práctico el mejor signo de sobrevivencia se basa en la capacidad de reasumir el crecimiento, que es prueba definitiva de su condición para seguir viviendo y si ocurrieron cambios, puede considerarse que éstos fueron compatibles con la vida. Esta condición puede ser juzgada por la capacidad del explante a incrementar su tamaño, tornarse verde, proliferar en callo, o desarrollar brotes y plántulas (Kantha, 1981; Wilkins y Dodds, 1983; Nietzsche, 1984; Bajaj, 1985; Kantha, 1985a).

La evaluación del material crioconservado es un aspecto fundamental ya que el éxito o fracaso del proceso de crioconservación ensayado está influenciado por los aspectos técnicos del equipo, los crioprotectores, las tasas de enfriamiento, etc., o bien las características del material biológico: especie, estado de la planta madre, contenido de agua celular y tipo de tejido. Nietzsche (1984) señala que el contenido de agua de las muestras es muy importante para decidir entre los dos métodos de crioconservación; para muestras pequeñas con poco contenido de agua el método rápido es el más apropiado.

Para determinar la viabilidad de las células después de su congelación-almacenamiento y descongelación se han desarrollado varios métodos que permiten evaluarla y conocer

áreas celulares que sufrieron cambios. Lyons et al. (1979) y Calkins (1990), señalan que es común que ocurran daños a las membranas durante el proceso de congelación. Ciertas pruebas de viabilidad se basan en reconocer el estado de estas estructuras. De acuerdo con Calkins (1990) algunas de las técnicas más comúnmente usadas para determinar la viabilidad son:

**1.- Observación macroscópica y/o microscópica:**

**Macroscópica:** Comprende la evaluación cualitativa visual a grandes rasgos, del desarrollo o apariencia del tejido; de tal modo que el desarrollo de un tejido suave, de apariencia acuosa, decolorada, atacado por hongos saprófitos, puede servir como indicador del daño por congelación.

Esta apariencia, señala Lyons (1979), puede ser el resultado del daño en la membrana plasmática como consecuencia de la exposición a bajas temperaturas.

**Microscópica:** Consiste en la evaluación del daño celular a nivel estructural y ultraestructural con base en cortes histológicos.

La desorganización mecánica, deshidratación y concentración del protoplasma causada por la congelación puede destruir el carácter semi-permeable de la membrana provocando la muerte de la célula (Calkins y Swanson, 1990).

Withers (1978) llevó a cabo el desarrollo de técnicas de congelación para la observación de células congeladas y descongeladas, las observaciones realizadas confirmaron las

teorías de la formación de hielo intracelular y la incidencia de la deshidratación en los callos de células de zanahoria, los cuales fueron congelados rápida o lentamente en presencia o ausencia de DMSO 5%, con descongelación rápida. Observó por medio de micrografías el daño celular que incluía la ruptura del plasmalema, la membrana nuclear y tonoplasto, plasmólisis y pérdida de ribosomas. Sólo en algunas células aisladas mantuvieron la densidad de su protoplasma, presentaron ligera plasmólisis y escasa pérdida de citoplasma. Haskins y Kartha (1980) realizaron la evaluación microscópica de cortes longitudinales de meristemos con un par de primordios foliares, de *Pisum sativum* que fueron tratados con DMSO, congelados y almacenados 1 hora en nitrógeno líquido, posteriormente fueron sembrados en medio B5, y de aquellos explantes que permanecieron viables se les realizaron cortes histológicos en diferentes tiempos de cultivo; observaron que la actividad celular se localizó en el tejido de los primordios foliares, en las yemas axilares y áreas meristemáticas. Señalan que el hecho de que más del 60% de los meristemos congelados y descongelados regeneraron plantas completas indicó que la sobrevivencia de células o grupos celulares identificados tenían la capacidad de activar su división celular y lograr una organización estructural para formar meristemos y posteriormente plantas completas.

## 2.- Actividad enzimática:

El daño por congelación puede resultar en la inactivación de las enzimas requeridas para continuar la síntesis de sustratos necesarios y cofactores como el ATP. La ruptura de la estructura de la membrana y el incremento de la permeabilidad causada por congelación llegan a disminuir la concentración y localización de sustratos en sitios específicos y con ello se reduce la actividad enzimática.

Una manera de cuantificar el daño por congelación es por medio de la reducción de la sal deshidrogenasa, cloruro 2,3,5 trifenil tetrazolio (CTT), que ha sido usada extensamente en el estudio de plantas leñosas congeladas (Steponkus y Lanphear, 1967). La solución en agua de CTT es incolora, se reduce por un sistema de enzimas de las células vivas formando el trifenil formazán, el cual es rojo e insoluble en agua (Oren, 1972). El tetrazolio es reducido por la intervención de una flavoproteína llamada diaforasa la cual puede ser reducida por varias deshidrogenasas las cuales incluyen a las deshidrogenasas unidas al NAD a través de la NAD diaforasa y deshidrogenasa succínica (Steponkus, 1971).

La correlación que hay entre el daño por congelación y el decremento de la capacidad de reducir CTT puede deberse a varios factores que incluyen la desnaturalización de las enzimas deshidrogenasas específicas, interrupción de la fosforilación oxidativa, pérdida de cofactores, de la continuidad de organelos y a la ruptura de membranas de la célula (Steponkus, 1971; Calkins y Swanson, 1990).



### JUSTIFICACION

Debido a que en nuestro país existen plantas que presentan serios problemas para el almacenamiento de su germoplasma por las vías tradicionales, es importante el desarrollo de técnicas adecuadas para resolver este problema.

En el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico del Instituto de Biología, de la U.N.A.M. se han desarrollado investigaciones (López, 1988; Valenzuela, 1988; Miranda, 1992; Mata, 1992, 1995) en torno a la conservación de germoplasma por sus dos vías: a corto-mediano plazo (Banco activo) y a largo plazo o crioconservación (Banco base).

En éste último, el empleo de agentes crioprotectores y la aplicación de muy bajas temperaturas, repercuten en la viabilidad del material crioconservado lo que provoca complejos cambios estructurales y fisiológicos durante los procesos de congelación y descongelación por lo que es necesario investigar los factores que favorecen o bloquean su viabilidad y lograr su eventual recuperación postcongelación.

Debido a que existen deficiencias en el conocimiento de los diversos aspectos de la crioconservación, como son los complejos cambios estructurales y fisiológicos durante los procesos de congelación y descongelación en la presente investigación se plantearon los siguientes:

## OBJETIVOS

### Objetivo general.

Utilizando explantes de *Allium sativum* var Taiwan (ajo), *Daucus carota* (zanahoria), *Dianthus caryophyllus* (clavel), *Lycopersicon esculentum* var Rutgers (jitomate), considerados como organismos modelo o especialmente problemáticos en su conservación, evaluar por medio de distintas técnicas las respuestas morfológicas y fisiológicas de los diferentes tejidos vegetales sometidos al proceso de crioconservación.

### Objetivos particulares.

1) Evaluar los diferentes métodos de crioconservación: tasas lentas, tasas rápidas e inmersión directa en las distintas especies ensayadas.

2) Evaluar la tasa de respiración del material congelado y no congelado.

3) Evaluar la viabilidad de los ápices con placa basal de ajo desde el punto de vista macroscópico, microscópico y fisiológico.

4) Analizar en callo de zanahoria los cambios estructurales que se presentan a lo largo del proceso de crioconservación.

5) Evaluar el efecto de los reguladores de crecimiento en el medio de cultivo para promover la recuperación postcongelación del material congelado.

## MATERIALES Y METODOS (DESARROLLO EXPERIMENTAL)

### 1.- Obtención del gradiente de temperatura y curvas de enfriamiento de las soluciones crioprotectoras.

El equipo de para llevar a cabo las pruebas de crioconservación fue el señalado por Mata (1992) y consta de un contenedor o Dewar con capacidad de 35 litros, en cuya parte superior se le adaptó un soporte de acero inoxidable constituido por dos estructuras; una de ellas fija con una escala en centímetros y la segunda que se puede desplazar dentro del interior del termo a distancias conocidas; una vez alcanzada la altura deseada sobre el NL se fijó al soporte con ayuda de un tornillo. El extremo de la varilla movable tiene una canastilla con capacidad para 5 viales, uno de ellos abierto que contenía la solución crioprotectora, a este vial se colocó el termopar de Cobre-Constantan conectado a un termómetro digital, para realizar las lecturas de temperatura. Los viales utilizados fueron de polipropileno CORNING (10 x 430 mm con tapa de rosca).

### 1a.- Establecimiento del gradiente de temperatura.

El contenido de NL en el Dewar siempre fue a una cuarta parte de su capacidad, y en su interior se generó un gradiente debido a la diferencia de temperaturas entre la superficie del NL (- 196°C) y la boca del termo (19°C).

Es importante determinar este gradiente en cada extremo para colocar las muestras a una misma altura y obtener la temperatura inicial deseada así como la tasa de enfriamiento requerida. El gradiente varía en relación a la cantidad de NL que contenga el Dewar.

Para determinar el perfil de temperatura, se suspendió el termopar dentro del Dewar a distintas alturas y se detectó la temperatura de los vapores del NL. Se estableció así una relación altura-temperatura y se tomó como 0 cm la boca del termo (López, 1988; Valenzuela, 1988; Mata, 1992).

Para llevar a cabo las pruebas de congelación los viales criogénicos que contenían el material biológico y la solución crioprotectora se suspendieron dentro del Dewar a la altura en la que los vapores de NL enfriaron lentamente el vial hasta llegar al punto de fusión de la solución para que esta se congelara. Por cada experimento, se colocaron 4 viales con el material biológico y el crioprotector en la canastilla y el quinto vial con el termopar y la solución crioprotectora para monitorear el descenso de la temperatura.

#### **1b.- Obtención de las curvas de enfriamiento.**

Las curvas de enfriamiento de cada solución se determinaron de la siguiente manera: al vial con 2 ml del agente crioprotector se le introdujo el termopar y se suspendió dentro del Dewar con ayuda de la canastilla a una altura de 12 cm con respecto a la boca del termo la cual se

consideró como 0 cm. Las temperaturas se registraron cada minuto y se elaboraron las gráficas correspondientes.

#### 1c.- Técnicas de congelación del material biológico.

Para congelar el material biológico se siguieron varias técnicas:

a) Suspender la muestra a 12 cm con respecto a la boca del termo (S) para tratar de obtener tasas de enfriamiento lentas ( $-0.1$  a  $-1.0^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ).

b) Suspender la muestra a 7 cm sobre el nivel del NL (SSNL), con tasas de enfriamiento por arriba de  $-50^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ .

c) Inmersión directa (ID) que consiste en introducir las muestras en NL rápidamente, registrando tasas de enfriamiento extremadamente rápidas, por arriba de  $-100^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ .

#### 2.- Material biológico.

El material biológico con el cual se desarrolló el presente trabajo experimental comprendió cuatro especies: *Allium sativum* var Taiwan (ajo), *Daucus carota* (zanahoria), *Dianthus caryophyllus* (clavel), *Lycopersicon esculentum* var Rutgers (jitomate).

##### a) *Allium sativum* var Taiwan

Se utilizaron bulbos de *A. sativum* procedentes del Centro de Investigaciones Agrícolas del Bajío "El Roque", Carretera San Miguel Allende, Gto. (INIFAP).

Los bulbos se separaron en sus unidades o bulbillos, se desechó la parte superior y a la inferior se le quitaron las hojas que la cubrían, se eliminó el exceso de tejido para obtener ápices de 0.5 a 1.0 cm de longitud aproximadamente.

Los ápices se lavaron durante 10 min en agua corriente, posteriormente en condiciones asépticas se introdujeron en alcohol etílico 90% (v/v) durante 1 min, seguido de alcohol etílico 70% (v/v) por 2 min, después en hipoclorito de Sodio (NaOCl) (blanqueador comercial) 33.3% (v/v) por espacio de 10 min, finalmente se realizaron tres enjuagues con agua destilada esterilizada. La siembra se efectuó en tubos de vidrio de 25 x 150 mm con 15 ml de medio de cultivo.

b) *Daucus carota*

Raíces de zanahoria adquiridas en un centro comercial fueron lavadas con detergente, se les eliminó la capa externa (epidermis y parte de corteza) y se cortaron segmentos de 6 a 7 cm de longitud, se descartaron los extremos de la raíz. En condiciones asépticas se desinfectaron con alcohol etílico 70% (v/v) 2 min, seguido de NaOCl al 10% (v/v) (blanqueador comercial) durante 20 min, posteriormente se enjuagaron tres veces con agua destilada esterilizada. Se eliminó el tejido dañado, se cortaron discos de la zona del cambium de 0.5 a 1 cm de espesor, se sembraron en el medio con  $0.99 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  de 2,4-D y se incubaron en obscuridad. La formación de callo se presentó entre los 3 y 4 meses. El callo generado fue mantenido con subcultivos periódicos tanto en medio líquido

como en sólido, ambos con 2,4-D. Al generar suficiente biomasa se dividió en dos lotes: a) callo cultivado en presencia de la auxina (MSD); b) callo transferido a medio MS sin la auxina (MS), esta última condición permite el desarrollo de callo a embriones somáticos (Nag y Street, 1973; Ammirato, 1983).

Para realizar las pruebas de crioconservación se tomaron fragmentos de callo de ambos tratamientos MSD y MS parte de estos se utilizaron para el análisis estructural por medio de la microscopía óptica.

c) *Dianthus caryophyllus*

De una planta completa de clavel, adquirida en el mercado de flores de Xochimilco, se cortaron fragmentos de tallo de 1 ó 2 cm con yemas axilares. En condiciones asépticas los tallos se introdujeron en alcohol al 70% (v/v) 2 min, posteriormente en NaOCl 6% (v/v) (blanqueador comercial) 10 min, por último se realizaron tres enjuagues con agua destilada esterilizada. Con ayuda del microscopio estereoscópico e instrumental adecuado se disectaron meristemas con dos primordios foliares de 0.1 a 0.5 mm de longitud aproximadamente.

d) *Lycopersicon esculentum* var Rutggers

Se utilizaron semillas procedentes de una comercializadora de productos agrícolas, se lavaron con agua corriente durante 10 min, posteriormente en condiciones

asépticas se introdujeron en NaOCl 3% (v/v) (blanqueador comercial) 15 min, se realizaron tres lavados con agua destilada esterilizada. Se colocaron las semillas en germinadores con papel filtro húmedo y se incubaron en obscuridad. Después de su germinación, se seleccionaron plántulas de 18 a 20 mm de longitud. Bajo el microscopio estereoscópico se disectaron los meristemas de 0.1 a 0.2 mm con dos primordios foliares.

En todas las especies trabajadas el medio utilizado fue el MS, adicionado con 3% de sacarosa y ajustado a pH 5.7, el cual se vertió en frascos de boca ancha con capacidad de 120 ml con 30 ml de medio de cultivo, con excepción del ajo.

La incubación de los explantes fue a  $26 \pm 2$  °C, el fotoperíodo de 16 horas de luz y la intensidad luminosa de 1200 lux. En cada uno de los ensayos de criopreservación realizados se contó con un grupo control.

### 3.- Técnicas de criopreservación y medios de recuperación.

Las técnicas de criopreservación utilizadas comprendieron en términos generales:

- a) La adición del agente crioprotector a los explantes.
- b) Diferentes tiempos de precultivo con el agente crioprotector.
- c) La exposición a los vapores del NL por:



i) La suspensión del material (S) dentro de viales criogénicos con 1.5 ml del crioprotector, a una altura entre 11 y 13 cm con respecto a la boca del termo, para obtener tasas de enfriamiento lentas.

ii) La suspensión a 7 cm sobre el nivel del NL (SSNL).

iii) La inmersión directa en NL (ID).

d) En el caso del punto i), al alcanzar la temperatura de  $-40^{\circ}\text{C}$  se realizó la inmersión en NL de los viales con el material biológico y el crioprotector.

En el caso de ii), los viales permanecieron unos minutos suspendidos y posteriormente se sumergieron en NL.

e) En todos los casos después del proceso de crioconservación el material biológico se descongeló rápidamente en un baño de agua a  $40^{\circ}\text{C}$ ,--se lavó con medio de cultivo líquido (MSL).

f) Los explantes se sembraron en medio MS sólido o líquido con puentes de papel filtro adicionado con diferentes reguladores de crecimiento  $\text{GA}_3$ , Acido naftalenacético (ANA) y K para promover su recuperación postcongelación. En la Tabla 1 se muestran los reguladores del crecimiento utilizados en los diferentes tipos de explantes.

TABLA 1.-- REGULADORES DEL CRECIMIENTO ADICIONADOS AL MEDIO (MS) UTILIZADOS PARA PROMOVER LA RECUPERACION POSTCONGELACION EN LAS DIFERENTES ESPECIES.

ESPECIE	REGULADOR DEL CRECIMIENTO Y CONCENTRACION UTILIZADA
<i>Allium sativum</i>	AIA 6 mg·l <sup>-1</sup> GA <sub>3</sub> 3 y 6 mg·l <sup>-1</sup>
<i>Daucus carota</i> (MSD) / (MS)	ninguno
<i>Dianthus caryophyllus</i>	ANA 1.0 mg·l <sup>-1</sup> / K 0.53 mg·l <sup>-1</sup>
<i>Lycopersicon esculentum</i>	GA <sub>3</sub> 0.96 mg·l <sup>-1</sup>

Estos procedimientos tuvieron características particulares para cada especie trabajada:

a) *Allium sativum* var Taiwan

En el Diagrama 1, se muestra la técnica empleada para llevar a cabo la crioconservación de ajo. Se colocaron 6 ápices con placa basal por vial y se aplicaron diferentes concentraciones y tiempos de precultivo de DMSO (Tabla 2), éstas se eligieron con base en resultados preliminares obtenidos por López, 1988.

Las mezclas se seleccionaron por tener puntos de fusión y tasas de enfriamiento similares al momento de congelarse (Mata, 1995).

En todos los casos la congelación fue por suspensión (8) para tratar de obtener tasas lentas de congelación, hasta llegar cerca de los -40°C y proceder a su inmersión en NL,

donde se almacenaron durante 30 min, la descongelación fue rápida en un baño de agua a 40°C. Los explantes después de descongelados fueron lavados en medio fresco (MSL) para ser recultivados en un lote en MS sin reguladores del crecimiento, un lote en medio MS adicionado 6 mg·l<sup>-1</sup> de AIA y otros dos lotes en medio MS adicionado con 3 y 6 mg·l<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> respectivamente. Cada lote fue de 12 explantes por tratamiento.

TABLA 2.- DIFERENTES CONCENTRACIONES DE DMSO Y MEZCLAS DE CRIOPROTECTORES, TIEMPOS DE PRECULTIVO UTILIZADOS PARA REALIZAR LAS TECNICAS DE CRIOCONSERVACION EN APICES CON PLACA BASAL DE AJO.

CRIOPROTECTOR	CONCENTRACION (%)	TIEMPO DE PRECULTIVO min
DMSO	5	30
	15	30
	30	30
DMSO/Sac/Gli (3)	5 - 10 - 20	15
DMSO/Sac/Gli (5)	10 - 20 - 15	15
DMSO/Sac/Gli (6)	15 - 20 - 20	15

DMSO = DIMETIL SULFOXIDO, Sac = SACAROSA, Gli = GLICEROL  
PARA FINES PRACTICOS LAS MEZCLAS SE DENOMINARON No.3, No.5,  
No.6 RESPECTIVAMENTE.

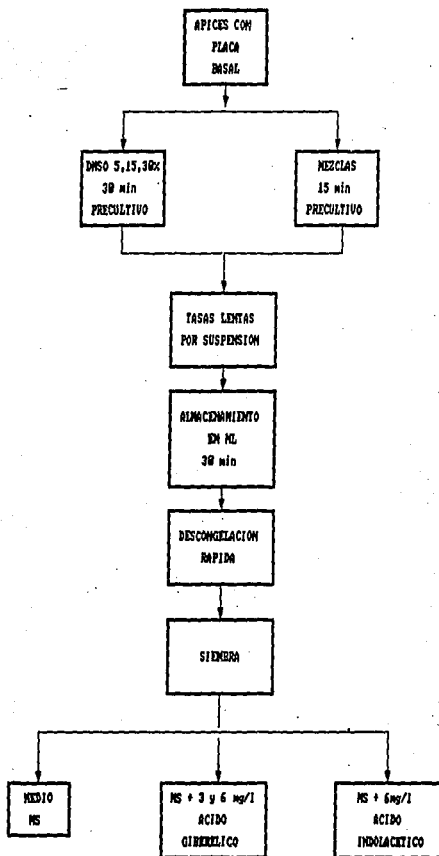


DIAGRAMA 1.- TECNICAS APLICADAS PARA LA CRIOPRESERVACION DE APICES CON PLACA BASAL

DE *Allium sativum*.

b) *Daucus carota*

En el Diagrama 2 se describe la técnica para la congelación de los dos tipos de callo generados: a) callo en constante división **MSD** y b) callo en el inicio del proceso de diferenciación a embriones somáticos **MS**.

Se colocaron entre 300 a 500 mg de callo en los viales, se les adicionó DMSO 5% a intervalos de 5 min hasta completar un volumen de 2 ml, se incubaron 15 o 30 min antes de su congelación, los viales se suspendieron a diferentes alturas para tratar de obtener la tasa de  $-1.8^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , que fue la de mayor éxito para Nag y Street (1973); posteriormente se introdujeron en NL y se almacenaron 15 min, se descongelaron rápidamente en un baño de agua a  $40^{\circ}\text{C}$ . Se lavaron con MSL fresco y se sembraron en MS para observar si el callo **MSD** originaría embriones somáticos y los callos **MS** ya en inicio de diferenciación continuarían su proceso hacia embriones somáticos.

Para realizar el análisis citológico de los dos tipos de callo a lo largo de las diferentes fases del proceso de crioconservación se realizaron dos ensayos:

a) Los viales con callo **MSD** se le adicionó DMSO 5%, se suspendieron en los vapores del NL para ser enfriados, posteriormente se almacenaron en NL por espacio de 8 y 30 min.

b) Los viales con callo **MS** se le adicionó DMSO 5% se suspendieron las muestras en los vapores del NL para ser

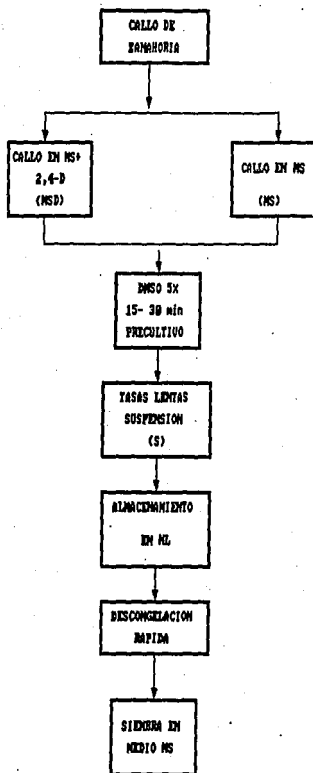


DIAGRAMA 2.- TÉCNICA PARA LA CONGELACION DE LOS DOS TIPOS DE CALLO GENERADOS: MS+ Y MS DE Bancos careta.

enfriados y posteriormente se almacenaron en NL por espacio de 8 y 30 min.

Ambos siguieron dos vías para ser incluidos en JB-4 y Epón 810 para su posterior análisis con microscopía óptica.

Para determinar inicialmente si el daño celular era ocasionado por el efecto del fijador o por el proceso de crioconservación, se realizó una prueba preliminar adicionando sacarosa (0.12 M) al fijador con la finalidad de evitar el choque osmótico que es provocado por el fijador, para posteriormente ser procesado por las dos vías señaladas.

#### c) *Dianthus caryophyllus*

Se colocaron de 10 a 15 meristemas en cada vial y se les añadió DMSO 5%, se incubaron durante 1 hora a 4°C, se enfriaron por suspensión (S) al colocar las muestras a una altura que permitiera obtener una tasa de enfriamiento de  $-0.5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  hasta llegar a  $-40^{\circ}\text{C}$ , enseguida se almacenaron en NL por 30 min; la descongelación fue rápida, se lavaron con MSL y se sembraron tanto en MS sólido como en MSL con puentes de papel filtro adicionados con ANA  $1.0\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  y K  $0.53\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  (Diagrama 3).

Se realizaron variaciones en el agente crioprotector modificando las concentraciones a 10 y 15% DMSO, así como con la altura al colocar las muestras 7 cm arriba del nivel del NL (SSNL) para obtener tasas rápidas como lo reporta Grout et al. (1978).

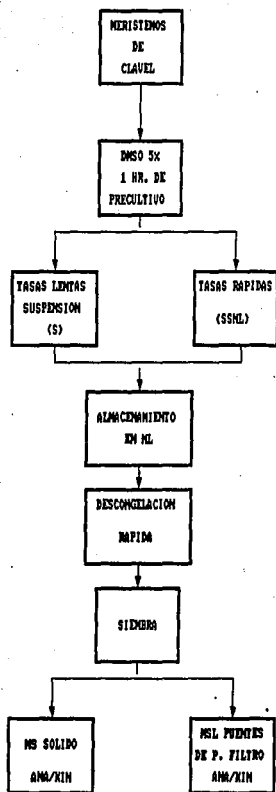


DIAGRAMA 3. TECNICAS DE CONGELACION DE MERISTEMOS DE

*Platanus caryophyllus*.



d) *Lycopersicon esculentum*

Se colocaron de 10 a 15 meristemos en los viales con 0.5 ml de medio MSL 3% de sacarosa (p/v) (Diagrama 4), posteriormente se añadió 0.5 ml de DMSO 30% disuelto en MS a intervalos de 20 min, hasta obtener la concentración final de 15%, con el fin de evitar el choque osmótico, se incubaron durante 2 horas a 4°C posteriormente la congelación se llevó a cabo por tres vías:

- 1.- Al suspender las muestras en el interior del Dewar a 12 cm de la boca (S).
- 2.- Al suspender las muestras 7 cm arriba de la superficie del NL (SSNL).
- 3.- Por inmersión directa en NL (ID).

En todos los casos se almacenaron durante 15 min, la descongelación fue rápida en un baño de agua a 40°C, se lavaron en MS con 3% de sacarosa y se sembraron en puentes de papel filtro con MSL y 3% de sacarosa adicionado con  $0.96 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  de  $\text{GA}_3$  (Grout et al., 1978).

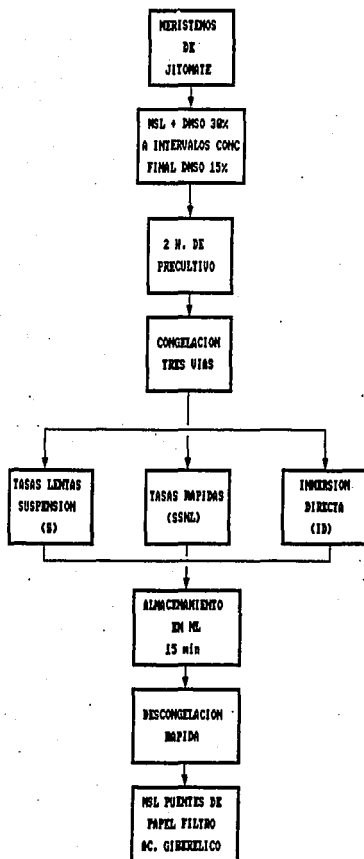


DIAGRAMA 4.- TRES TÉCNICAS DE CONGELACION EMPLEADAS EN MEXISTEMOS

DE *Lycopersicon esculentum*.

#### 4.- Obtención de las curvas de CTT

Para determinar la viabilidad de las muestras congeladas y del grupo control (no congeladas), en el presente trabajo se aplicó la técnica de CTT.

Se empleó una solución al 0.6% (p/v) de CTT disuelta en una solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M, pH 7.4 y 0.05% (v/v) de un agente humectante (Tween 80).

Se colocó el material en un vaso de precipitado de 5 ml de capacidad y se añadió 3 ml de la solución de CTT con el agente humectante en una relación 1:1, se introdujeron los vasos en un matraz Kitasato y se les aplicó vacío durante 30 min (el agente humectante y la presión aplicada por el aire provocaron la infiltración de la solución al tejido de una manera uniforme).

Las muestras se incubaron durante 15 horas a 26°C en oscuridad, al finalizar el tiempo se eliminó el CTT y se lavó el tejido con agua destilada, se agregaron 4 ml de etanol 95% y se colocó en un baño de agua a 60°C durante 15 min con el fin de extraer el rojo de formazán. Al enfriarse la muestra se filtró y se llevó a un volumen de 10 ml con etanol al 95%, la absorbancia de la solución obtenida se registró en un espectrofotómetro (Spectronic 601 de Bausch & Lomb), en un rango de 400 a 600 nm. De este modo se determinó la longitud de onda que presentó la máxima absorbancia del grupo control y la del material que fue congelado.

Esta técnica fue empleada para los ápices de ajo y el callo de zanahoria.

La tasa de respiración se calculó en porcentaje por medio de la siguiente ecuación (Steponkus, 1971):

$$\frac{A}{Ax \text{ Testigo}} \times 100$$

A= absorbancia máxima alcanzada de los explantes congelados.  
 Ax= absorbancia máxima alcanzada de los explantes no congelados.

#### 5.-Técnicas para el análisis estructural y ultraestructural.

##### a) Microscopía óptica.

Se llevó a cabo en el Laboratorio de Citología de la Facultad de Ciencias de la U.N.A.M., bajo la asesoría de la Dra. Judith Márquez y la Dra. Clara Esquivel.

Se evaluó el callo de zanahoria congelado y su respectivo control, ambos en dos fases de desarrollo:

- a) callo cultivado *in vitro* en MS adicionado con 2,4-D (MSD)
- b) callo cultivado *in vitro* transferido en medio MS basal (MS), en etapas iniciales de diferenciación a embriones somáticos.

Ambas etapas fueron congeladas y fijadas, para ser procesadas para su inclusión en Epón y JB-4.

Se colocaron fragmentos de callo embriogénico de color amarillo-paja en los viales para ser sometidos al proceso de crioconservación; al concluir cada fase se fijaron lo más pronto posible. Estas fases comprendieron (Diagrama 5):

- 1.- La adición de DMSO 5% al material (Experimento 1).
- 2.- El material con DMSO 5%, suspendido en los vapores del NL hasta alcanzar una temperatura de  $-40^{\circ}\text{C}$  (Experimento 2).
- 3.- El material con DMSO 5%, suspendido en los vapores del NL hasta  $-40^{\circ}\text{C}$  y posteriormente sumergido en NL por espacio de 8 min (Experimento 3).
- 4.- El material con DMSO 5%, suspendido en los vapores del NL hasta  $-40^{\circ}\text{C}$  y posteriormente sumergido en NL por espacio de 30 min (Experimento 4).

La técnica de fijación y deshidratación se muestra en el Diagrama 6 y consistió: En la fijación con glutaraldehído-paraformaldehído (3-1.5 %) disuelto en una solución amortiguadora de Collidina 0.2 M pH 7.4. adicionado con sacarosa (0.12 M) para evitar el choque osmótico. Las muestras permanecieron en el fijador por espacio de 24 hrs.

Posteriormente se enjuagó con la solución amortiguadora diluida en agua destilada (1:1), y se llevó a cabo la deshidratación:

- a) Con alcoholes graduales 30, 50, 70, 80, 96%, absoluto (tres cambios), cada uno de 15 min cada uno para posteriormente realizar tres cambios con óxido de propileno de 20 min cada uno.

b) Con acetonas graduales 30, 50, 70, 80, 96%, absoluto (tres cambios), cada uno de 15 min para incluir en JB-4.

Se realizó la preinclusión con:

a) Epón y óxido de propileno (1:1) en el caso de que finalmente se incluya con Epón.

b) Para JB-4 se colocan las muestras en una solución constituida con la solución A y el catalizador.

En ambos casos el tiempo del tratamiento fue de 72 hrs.

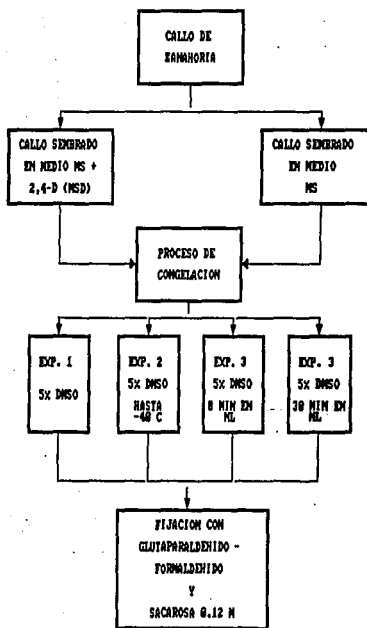
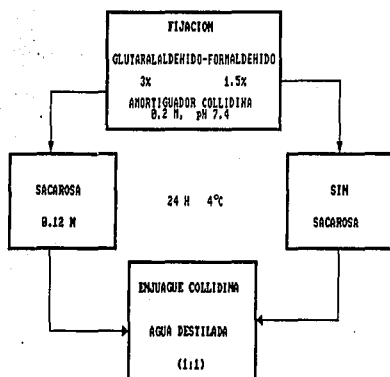


DIAGRAMA 5.- CONGELACION Y FIJACION DE CALLO DE EAMHORIA MSD Y MS, DURANTE EL PROCESO DE CONGELACION.



**D E S H I D R A T A C I O N**

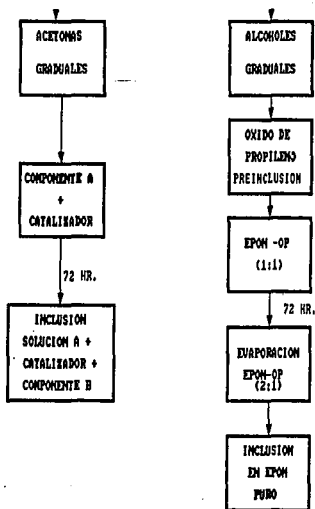


DIAGRAMA 6.- TECNICAS DE FIJACION, DESHIDRATACION E INCLUSION PARA  
CELLO DE Bancus careta CONGELADO Y NO CONGELADO PARA



### Inclusión en Epón.

Previamente se preparó el Epón (Anexo I) en las proporciones necesarias para obtener una buena dureza y lograr mejores cortes. Los componentes se mezclaron con un aplicador de madera, hasta que adquirió una coloración amarillo intenso. Para realizar la preinclusión, las muestras y el epón-óxido de propileno (1:1) se llevaron a temperatura ambiente, posteriormente se destaparon ligeramente y se colocaron sobre la estufa, para que el óxido de propileno se evaporara y la resina tuviera una proporción de 2:1 (epón:óxido de propileno); así la resina adquirió una consistencia más densa y espesa a manera de miel. Con una pipeta Pasteur se distribuyó el Epon en tabletas para inclusión, cada una con el número de registro correspondiente y en los extremos se depositaron los fragmentos de callo.

Para que polimerizara la resina se colocaron las tabletas de inclusión en la cámara de polimerización a una temperatura de 60°C, por espacio de 18 a 24 h.

Los cortes histológicos se realizaron en un ultramicrotomo manual y automático, MT-28 Sorvall; se utilizaron cuchillas de vidrio con barquillas con agua, los cortes se tomaron de la barquilla con ayuda de una asa bacteriológica y se colocaron en un portaobjetos, para fijar los cortes se calentaron ligeramente en una platina caliente y se tñeron con azul de toluidina 15 seg (Anexo I), para quitar el exceso de colorante se enjuagaron con agua destilada.

Se seleccionaron las mejores preparaciones y se montaron con Bálsamo de Canadá. Las tomas microfotográficas se realizaron en un fotomicroscopio Zeiss.

#### Inclusión en JB-4.

El JB-4 está constituido por tres componentes denominados: solución A, catalizador y componente B (Anexo I). De la mezcla compuesta de la solución A y el catalizador se agregó 1 ml del componente B. Se homogeneizó la solución con un aplicador de madera; previamente se prepararon las cápsulas Been tamaño 00 con su respectiva etiqueta de identificación, se colocó el fragmento de tejido y se añadió la mezcla con una pipeta Pasteur, esta operación se debe realizar rápidamente debido a que la solución solidifica aproximadamente en 20 min, se cierran las cápsulas ya que la falta de oxígeno promueve la polimerización de la resina.

Los cortes se realizaron en seco en un ultramicrotomo, debido a que la resina es altamente hidrofílica, los cortes quedaron adheridos a la cuchilla de vidrio y con ayuda de unas pinzas de relojero se colocaron en una caja petri con agua destilada, en donde los cortes se hidratan y se extienden, posteriormente con una asa bacteriológica se colocaron en un portaobjetos; otra forma de realizarlo es al colocar una gota de agua destilada en el portaobjetos y se deja caer el corte en él. En ambos casos los cortes se fijaron con calor y se tificaron con azul de toluidina.

Las mejores preparaciones se montaron con Bálsamo de Canadá y se fotografiaron en un fotomicroscopio Zeiss.

#### b) Microscopía electrónica

Se llevó a cabo en el Laboratorio de Microscopía electrónica de la Facultad de Ciencias, U.N.A.M., bajo la asesoría del Dr. Luis Felipe Jiménez.

Se evaluaron explantes congelados de ajo para determinar el daño a nivel de membrana por el efecto de la técnica de criopreservación aplicada.

La evaluación se realizó al final del proceso y se comparó con la del grupo control (no congelado).

El material fue cortado en pequeños fragmentos de  $1 \text{ mm}^3$ , inmersos en una gota de solución fijadora (glutaraldehído al 2.5% disuelto en una solución amortiguadora de fosfatos, pH 7.2, 0.16 M, los fragmentos se colocaron en viales de 3 ml de capacidad, se agregó 1.0 ml de fijador donde permanecieron 16 hrs, posteriormente se realizaron tres cambios de 10 min cada uno de la solución amortiguadora de fosfatos, se realizó una post-fijación con tetraóxido de osmio ( $\text{OsO}_4$ ) durante 24 horas a temperatura ambiente, se lavaron las muestras con la solución amortiguadora, tres cambios de cinco minutos cada uno y se efectuó la deshidratación con alcoholes graduales para realizar la preinclusión, se efectuaron tres cambios de cinco minutos cada uno de óxido de propileno, la inclusión se realizó en epón-óxido de propileno, con una proporción entre 1:1 y 1:2. Las muestras se colocaron en tabletas de inclusión

con su número de registro correspondiente, se dejó polimerizar la resina en la estufa a 60°C. Para efectuar los cortes ultrafinos fue necesario realizar primeramente un tallado del bloque en el microscopio estereoscópico para obtener una pirámide trunca, los cortes se realizaron en un ultramicrotomo los cuales se depositaron en una balsa de agua adherida a la cuchilla de vidrio y con ayuda de una asa bacteriológica se colocaron en rejillas de cobre adosadas con membranas de Formvar, posteriormente se contrastaron dentro de una cámara húmeda, para evitar la precipitación del acetato de uranilo y citrato de plomo, 15 y 5 min respectivamente. Las correspondientes observaciones y toma de placas electrográficas se realizaron en un microscopio electrónico de transmisión EM-10.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### I.- TASAS DE ENFRIAMIENTO

En las Tablas 3 y 4 se muestran las tasas de enfriamiento y puntos de fusión de las tres diferentes concentraciones de DMSO utilizadas así como de las mezclas de los agentes crioprotectores (DMSO-Sacarosa-Glicerol), los datos registrados comprenden desde que se colocó la muestra suspendida en el interior a 12 cm de la boca del Dewar en contacto con los vapores del NL, hasta el momento que se registró el punto de fusión del crioprotector.

TABLA 3.- TASAS DE ENFRIAMIENTO Y PUNTOS DE FUSION DE TRES CONCENTRACIONES DE DMSO ENFRIADAS Y CONGELADAS CON LOS VAPORES DE NL, SUSPENDIDAS EN EL INTERIOR 12 CM DE ALTURA DE LA BOCA DEL DEWAR.

DMSO	*TASA DE ENFRIAMIENTO °C·min <sup>-1</sup>	D.E. °C·min <sup>-1</sup>	PF °C	D.E. °C
5%	-1.4 -1.28 -1.21 -0.48	0.41	-2.9 -4.6 -10.4 -7.5	3.41
15%	-0.86 -0.45 -0.73	0.20	-7.0 -10.6 -7.5	1.95
30%	-0.85 -0.95 -0.42	0.28	-18.1 -20.0 -12.7	3.78

D.E.= DESVIACION ESTANDAR, PF= PUNTO DE FUSION

\* = DESDE LA TEMPERATURA INICIAL HASTA EL PUNTO DE FUSION

TABLA 4.- TASAS DE ENFRIAMIENTO Y PUNTOS DE FUSION DE TRES MEZCLAS DE CRIOPROTECTORES (DMSO-SACAROSA-GLICEROL) ENFRIADAS Y CONGELADAS CON LOS VAPORES DE NL, SUSPENDIDAS EN EL INTERIOR A 12 CM DE ALTURA DE LA BOCA DEL DEWAR.

MEZCLAS (DMSO-SAC-GLI)	No.	*TASA DE ENFRIAMIENTO °C·min <sup>-1</sup>	D.E. °C·min <sup>-1</sup>	PF °C	D.E. °C
15%-10%-20%	3	-1.44 -1.12 -0.89	0.27	-23.2 -23.8 -23.2	0.34
10%-20%-15%	5	-0.86 -0.82 -1.86	0.41	-13.4 -13.6	0.11
15%-20%-20%	6	-1.47 -1.62 -1.23	0.36	-23.8 -23.4	0.28

D.E. = DESVIACION ESTANDAR, PF = PUNTO DE FUSION  
Comunicación personal Mata 1995.

\* = DESDE LA TEMPERATURA INICIAL HASTA EL PUNTO DE FUSION

Es importante señalar que la tasa de enfriamiento no fue constante sino que lo hizo en forma de pequeños cambios de velocidad. Por esta razón en las Tablas anteriores se presenta el valor promedio de la tasa obtenida en cada una de las repeticiones.

En la Tabla 3 se observa que el DMSO en cada concentración y en las distintas repeticiones registraron diferentes tasas de enfriamiento y puntos de fusión (aún a la misma concentración), lo cual se pudo observar en la desviación estandar de las curvas y en mayor medida en los puntos de fusión de las concentraciones de DMSO, al aumentar la concentración 15 y 30% las tasas de enfriamiento fueron más lentas, esto es debido a que al incrementar la

concentración de solutos se abate el punto de fusión y se reduce la cantidad de agua disponible que es capaz de congelarse (Franks, 1985).

Las mezclas de crioprotectores (Tabla 4) proporcionaron puntos de fusión bajos y muy similares entre ellas mismas, Franks (1985) señala que las relaciones entre temperatura, tasa de enfriamiento y concentración son complejas; pero se pueden determinar algunos aspectos básicos. La temperatura de nucleación (punto de fusión de la solución) alcanza temperaturas más bajas por la presencia de los solutos debido a que la competencia con los componentes ocasiona un retraso en la congelación (Luyet, 1966; Franks, 1985). Este fenómeno se pudo apreciar en las mezclas No. 3 y 6 de la Tabla 4, probablemente debido a las altas concentraciones de glicerol (20%) en combinación con la sacarosa 10 y 20% que permitieron puntos de fusión similares ( $-23^{\circ}\text{C}$ ); es posible atribuirle al glicerol el dominio del punto de fusión ya que al modificar su concentración, como se observa en la mezcla No. 5, el punto de fusión de elevó considerablemente ( $-13.6^{\circ}\text{C}$ .)

El análisis detallado del comportamiento de las diferentes concentraciones de DMSO-sacarosa-glicerol lo realizó Mata (1995) en brotes de *Opuntia robusta*.

Por otro lado, las diferencias registradas entre las sustancias utilizadas pudieron deberse a que la cantidad de NL en cada experimento no fue exactamente la misma, debido a que los vapores escapan al ambiente y el nivel de NL va modificándose, por lo tanto se alteró el gradiente de

temperatura generado por los vapores. Otro factor pudo ser que el crioprotector se preparó con medio MS líquido como solvente y éste contiene sales, al transcurrir el tiempo en días entre ensayos, el agua de la solución es posible que se consumiera y se tornara más concentrada, por lo tanto contendría más solutos provocando el mayor abatimiento del punto de fusión.

Estos factores, aunados a errores de medición no controlables al colocar la muestra a la altura requerida, repercutieron en las tasas de enfriamiento que se obtuvieron y por lo tanto no fue posible repetir con exactitud los ensayos. Esta es una problemática que se ha presentado en otros trabajos (López, 1988, Valenzuela, 1988, Mata 1992).

La falta de precisión, repetibilidad y control en las tasas de enfriamiento se reflejan en la poca viabilidad del material congelado, y son aspectos importantes dentro del proceso de crioconservación. Nag y Street (1973), Heszky et al., (1990) realizaron varios experimentos en los cuales modificaron las tasas de enfriamiento en *Daucus carota* y *Puccinellia distans* observaron las diferentes respuestas de sobrevivencia que se manifestaron en una mayor o menor respuesta en el material congelado. Pudieron estimar en que condiciones se presentó la máxima sobrevivencia. Asimismo, diversos estudios han logrado determinar tasas de enfriamiento muy específicas que ofrecen altos porcentajes de sobrevivencia (Nag y Street 1973; Braun, 1988; Kobayashi et al., 1990).



Lo anterior promueve el uso necesario de equipo automatizado de congelación para tener reproducibilidad y control de las tasas de enfriamiento, y obtener porcentajes de respuesta altos (Nitzsche, 1984; Grout, 1991).

Por otro lado se han realizado ensayos en los que se colocan las muestras suspendidas en los vapores del NL (Bajaj, 1977; Grout, 1978; Chen et al., 1979, 1984 a,b) en los que no hay un control ni estimación de la tasa de enfriamiento. Asimismo también se han realizado ensayos con la técnica de inmersión directa de los explantes a NL (Bajaj, 1977; Seibert, 1976). En todos estos casos se ha reportado la viabilidad del material y su recuperación. Por lo tanto otros factores que también intervienen en el éxito de la criopreservación son:

a) La variedad, cultivar o línea celular con la que los autores realizan sus experimentos. Bajaj, 1977; Chen et al., 1979 y Braun, 1988 han demostrado que existen diferencias en la respuesta de recuperación entre diferentes variedades de una misma especie aún cuando se les sometió al mismo proceso de criopreservación o vitrificación, igual concentración y tipo de crioprotector, tasa de enfriamiento y almacenamiento (Niino et al., 1992).

b) El desarrollo y actividad del material inicial. Grout (1990, 1991) señala que es importante conocer la etapa de

desarrollo en que se encuentra el material a congelar y considerar su actividad celular.

c) El estado fisiológico de la especie. Dereuddre et al. (1988) determinaron la resistencia a la congelación de brotes axilares y apicales de clavel en función al estado fisiológico del explante aunado al crioprotector utilizado.

d) El agente crioprotector utilizado. Nag y Street (1973); Chen et al. (1979, 1984b); Chiung-Chi y Lineberger (1985), han realizado diversos ensayos con crioprotectores solos o en combinación y evaluado su eficiencia en el proceso de crioconservación.

Es claro que las diferentes técnicas de crioconservación no son independientes del tipo y concentración del crioprotector, del material biológico, explante utilizado y de los protocolos que anteceden a la congelación como son el precultivo en medio adicionado con el crioprotector o su previo enfriamiento sino que están en estrecha correlación entre ellos (Chiung-Chi y Lineberger, 1985; Braun, 1988; Kobayashi et al., 1990). El mayor conocimiento y la adecuada combinación de todos estos elementos determinarán el empleo o no de tasas lentas de enfriamiento, descongelación rápida y por lo tanto la exitosa recuperación del material congelado (Grout 1990, 1991; Withers, 1979).

## II.- TASAS DE ENFRIAMIENTO EN EL MATERIAL BIOLÓGICO

### CRIOPRESERVADO

#### a) *Allium sativum* var Taiwan.

Para el ajo no hay reportes previos que propongan tasas de enfriamiento. En el presente trabajo las tasas de enfriamiento para ápices con placa basal de *Allium sativum* se obtuvieron al modificar la altura a la cual se suspendió la muestra, el tipo y concentración del crioprotector.

Al aplicar DMSO 5, 15 y 30% las tasas de enfriamiento registradas en una sola ocasión fueron de  $-1.95$ ,  $-0.75$  y  $-0.87^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  respectivamente (Tabla 5).

Las mezclas con los agentes crioprotectores proporcionaron en todos los casos tasas de enfriamiento lentas  $-0.57$ ,  $-0.59$ ,  $-0.85^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  respectivamente (Tabla 5).

La respuesta de sobrevivencia pudo ser favorecida por el empleo de la mezclas de los crioprotectores, que abaten el punto de fusión hasta  $-23^{\circ}\text{C}$  (Tabla 4), por lo tanto la formación de cristales de hielo se realiza lentamente y se evita en gran medida el daño por congelación, como es la ruptura de estructuras celulares principalmente.

#### b) *Daucus carota*

De los diversos ensayos realizados en callo de zanahoria MSD se obtuvieron diferentes tasas de enfriamiento (Tabla 5) que oscilaron entre  $-0.43$  a  $-1.29^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ . Para callo MS las tasas registradas fueron ligeramente más rápidas al modificar la altura, de este modo se obtuvo una tasa de  $-1.8^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ,

reportada por Nag y Street (1973) como exitosa. Para el callo congelado MSD a una tasa de  $-0.43^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  se manifestó después de su almacenamiento, descongelamiento y siembra en el medio adecuado la sobrevivencia del explante.

c) *Dianthus caryophyllus*

De acuerdo a Seibert (1976) la tasa empleada para la crioconservación con éxito de meristemos para esta especie fue de  $-0.5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ . En el presente trabajo se realizaron modificaciones en la altura a la cual se suspendieron las muestras y se expusieron a los vapores del NL, no fue posible alcanzar la tasa propuesta y no hubo signos de recuperación del material congelado (Tabla 5).

Se aplicaron las técnicas de: suspensión del material a 12 cm de altura de la boca del termo con DMSO 10% (S), y a 7 cm sobre la superficie del NL con DMSO 15% (SSNL).

La dificultad técnica consistió en mantener los meristemos de clavel a una temperatura de  $-40^{\circ}\text{C}$  el tiempo suficiente antes de introducir las muestras al NL, esta situación se debió a que la solución por sí misma continuó enfriándose rebasando la temperatura que se requería de tal forma que a los 15 min se registró una temperatura de  $-132^{\circ}\text{C}$ , estimando así una tasa de enfriamiento de  $-6.9^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ . No hubo sobrevivencia en ningún tratamiento.

d) *Lycopersicon esculentum* var Ruttger.

Se realizó la suspensión del material por medio de las dos técnicas descritas: en el interior del termo a 12 cm de altura de la boca (S) y a 7 centímetros por arriba de la superficie del NL (SSNL) con dos concentraciones diferentes de DMSO, las tasas registradas fueron de  $-6.9^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  en el primer caso y de  $-17.6^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  para el segundo (Tabla 5). Asimismo se realizó la congelación lenta a una tasa de  $-0.82^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , en ninguno de los casos hubo sobrevivencia.

Las tasas de enfriamiento obtenidas con las diferentes técnicas empleadas, se muestran en la Tabla 5.

TABLA 5.- TASAS DE ENFRIAMIENTO OBTENIDAS CON LOS DIFERENTES CRIOPROTECTORES Y TECNICAS UTILIZADAS EN LAS ESPECIES CONGELADAS EN EL EQUIPO DE ENFRIAMIENTO.

ESPECIE	EXPLANTE	CRIOPR	TECNICA	ALTURA cm	TASA OBT °C.min <sup>-1</sup>
<b>Allium sativum</b>	ACPB	5%	S	12	-1.95
		15%	S	12	-0.75
		30%	S	13	-0.87
		No. 3	S	12	-0.57
		No. 5	S	12	-0.59
		No. 6	S	13	-0.85
<b>Daucus carota</b>	CALLO (MSD)	5%	S	11	-0.67
			S	11	-0.43
			S	12	-0.83
			S	12	-0.82
			S	13	-1.29
<b>Daucus carota</b>	CALLO (MS)	5%	S	13	-1.6
			S	13	-1.8
<b>Dianthus caryophyllus</b>	MERIS	5%	S	11	-0.43
			S	12	-0.83
		10%	SSNL		-6.9
		15%	SSNL		-15.2
<b>Lycopersicon esculentum</b>	MERIS	5%	S	12	-0.82
			SSNL		-6.9
			ID		
		10%	SSNL	-17.6	
			15%	ID	

ACPB= APICES CON PLACA BASAL

MERIS = MERISTEMOS

MSD = CALLO DE MS+ 2,4-D

MS= CALLO DE MS.

S= SUSPENSION EN EL INTERIOR A 12 cm DE LA BOCA DEL TERMO.

SSNL= SUSPENSION A 7 cm SOBRE EL NIVEL DE NL.

ID= INMERSION DIRECTA EN NL.

EN NEGRITAS TASAS DE ENFRIAMIENTO DONDE SE MANIFESTO SOBREVIVENCIA.

**III.- PRUEBAS DE VIABILIDAD APLICADAS EN LAS DIFERENTES  
ESPECIES CONGELADAS**

Dentro de las diversas pruebas de viabilidad que existen para evaluar el material congelado se aplicaron las que se señalan en la Tabla 6, para cada una de las especies trabajadas.

**TABLA 6.- DIFERENTES CRITERIOS DE EVALUACION UTILIZADOS PARA CADA ESPECIE CONGELADA.**

ESPECIE	TIPO DE EVALUACION APLICADA					
	MACROSCO PICA	MICROSCOPICA		CTT	MEDIO	
		OPT	ELEC		SOLIDO	PPF
<b>Allium sativum</b>	*	-	*	*	*	*
<b>Daucus carota (MSD)</b>	*	*	-	*	*	-
(MS)	*	*	-	*	*	-
<b>Dianthus caryophyllus</b>	*	-	-	-	*	*
<b>Lycopersicon esculentum</b>	*	-	-	-	*	*

\* = PRUEBA APLICADA.

- = PRUEBA NO APLICADA.

PPF = PUENTES DE PAPEL FILTRO

a) **Allium sativum** var Taiwan

1) **Evaluación macroscópica:**

Los ápices después de su congelación, mostraron un color blanco y una consistencia blanda. Al respecto Prillieux (1869 citado por Levitt, 1980) sugiere que esto se debe a que al

descongelarse el tejido el hielo formado en los espacios intercelulares se transforma en agua y al fluir deja estos espacios vacíos y las células se tornan flácidas pero aún con vida. Si los tejidos no son dañados, el agua intercelular es rápidamente reabsorbida por el tejido que recupera su turgencia y pierde la apariencia húmeda. La cuantificación de la respuesta de sobrevivencia se señala en la Tabla 7.

TABLA 7.- SOBREVIVENCIA POSTCONGELACION EN NL (30 MIN) DE APICES CON PLACA BASAL DE *Allium sativum* var Taiwan TRATADOS CON DISTINTOS CRIOPROTECTORES<sup>(a)</sup>. RESULTADOS DESPUES DE 7 DIAS EN MEDIOS DE RECUPERACION MS Y MS + ACIDO GIBERELICO, 26 ± 2°C, 16 HRS DE LUZ Y 1200 LUX DE INTENSIDAD LUMINOSA.

NUMERO DE EXPLANTES QUE RESPONDIERON POR TRATAMIENTO	CRIOPROTECTORES				
	DMSO		MEZCLAS		
	15%	30%	3	5	6
1/12			AG2*		
1/12			AG1*		
1/12		MS**			
1/12	MS*	MS*	MS*	MS**	
1/12					AG2*

(<sup>a</sup>) = VER TABLA 2.

AG1= MEDIO MS+ 3mg/l DE ACIDO GIBERELICO.

AG2= MEDIO MS+ 6mg/l DE ACIDO GIBERELICO.

\* COLOR DEL EXPLANTE AMARILLO-CREMA.

\*\* COLOR DEL EXPLANTE VERDE CLARO.

De los ápices sembrados en medio MS a los 7 días solo en un solo ensayo se observaron inicios de sobrevivencia, que consistió en presentar una coloración amarillo-crema en la zona media del explante, que posteriormente se tornó verde pálido. En un trabajo previo, López (1988) observó una respuesta similar que precedió la formación de una hoja que



se abrió paso entre las hojas externas (que presentaban un color blanco), lo cual se consideró como una respuesta definitiva de sobrevivencia y capacidad de desarrollo.

Los explantes congelados con DMSO 15% y 30% respectivamente presentan un inicio de respuesta (coloración amarillo-crema).

En el caso de la concentración al 30% al transcurrir dos días más se manifestó una respuesta más evidente de sobrevivencia de un explante al tornarse a un tono verde claro. Esta respuesta fue similar a la que reportó López (1988) quien observó una mayor sobrevivencia en aquellos explantes que fueron sometidos a altas concentraciones de DMSO y tiempos de exposición prolongados.

Los explantes congelados en el mes de agosto, con la mezcla número 3 a una tasa de  $-0.57^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  (Tabla 5), solo un explante en cada medio de recuperación, mostraron signos de vida tanto en el medio MS basal así como en medio MS con las dos concentraciones de ácido giberélico ensayadas, en el caso del medio adicionado con AIA no se manifestó respuesta alguna. Los ápices congelados con la mezcla 5 que fueron sembrados en MS basal, se observó que un explante manifestó una respuesta más clara de sobrevivencia, en cambio en los explantes sembrados en medio con  $\text{GA}_3$  y AIA no hubo respuesta.

Los explantes congelados con la mezcla 6 sólo se sembraron en medio con ácido giberélico en la concentración más alta y generó una respuesta inicial. Sin embargo los explantes no prosperaron, gradualmente perdieron su

coloración hasta tornarse blancos y no lograron desarrollo alguno. En la tabla 7 se observa que la mayor respuesta de sobrevivencia fue al inocular los ápices en medio MS, asimismo se detecta que los explantes congelados con la Mezcla No. 3 dan indicios de respuesta en los tres medios ensayados.

Lo que pudiera indicar que la influencia del agente crioprotector, con el equipo de congelación ensayado, es importante para la obtención de tasas de enfriamiento adecuadas y minimizar el daño por congelación, de este modo su recuperación postcongelación es favorable al inocularlo en un medio adicionado con reguladores del crecimiento o no.

Es probable que la mezcla No. 3 sea favorable para ápices con placa basal de ajo y pueda promover su recuperación postcongelación. Sin perder de vista que entran en juego el estado fisiológico del explante, la tasa de enfriamiento, concentración y tipo de crioprotector utilizado de tal forma que los indicios de sobrevivencia se pudieron dar por algunos de estos factores.

## **2) Tasa de respiración:**

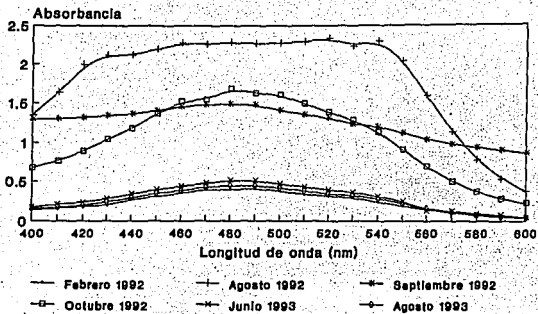
### **a) Explantes no congelados.**

En la Gráfica 1, se presentan las curvas de absorbancia obtenidas en algunos meses de 1992 y 1993; con excepción de agosto de 1992, en el resto de los casos la máxima absorbancia se presentó a los 480 nm. La curva de agosto es la más irregular en su construcción, en una muestra procesada

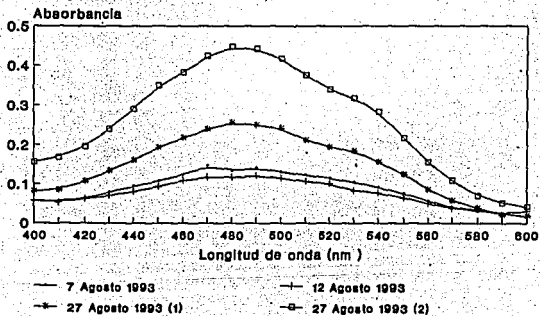
lo cual pudo deberse a un error de técnica al momento de realizar la extracción del rojo de formazán ya que la solución no fue filtrada y portaba impurezas (pequeños fragmentos de material biológico), lo que provocó lecturas muy similares en las distintas longitudes de onda.

Las curvas de agosto, septiembre y octubre de 1992 presentaron valores mayores (2.28, 1.48, 1.67 respectivamente) que las de febrero 92 y junio y agosto 93 (0.39, 0.51, 0.44 respectivamente). Las curvas de los meses de septiembre y octubre, son mas definidas y es clara la diferencia que hay con la curva del mes de febrero, donde los valores de absorbancia son muy bajos. Para analizar la respuesta en un mismo mes, se realizaron lecturas durante varios días en agosto de 1993 (Gráfica 2). El rango de absorbancia osciló entre 0.117 a 0.447, se esperaba que al transcurrir los días se incrementara la tasa de respiración, pero al comparar la curva del día 7 de agosto con la obtenida el 12 ésta última se ubicó por debajo de la primera, asimismo fue clara la diferencia en las curvas obtenidas de dos muestras procesadas el mismo día.

Gráfica 1. Curvas de CTT de ápices con placa basal de ajo sin congelar en diferentes meses



Gráfica 2. Curvas de CTT de ápices con placa basal de ajo sin congelar, en el mes de agosto.



Miranda (1992), propuso una serie de etapas fisiológicas para caracterizar a los ápices con placa basal de ajo, las cuales señaló de la siguiente manera:

**A0** metabolismo atenuado o basal en ajos de reciente cosecha.

**A1** metabolismo en fase de inicio de la germinación.

**A2** metabolismo acelerado en pleno proceso de germinación.

Es importante señalar que el ajo se cosecha entre abril y mayo y por lo tanto en los meses subsecuentes a su cosecha se va modificando su fisiología. Con base en lo anterior es posible tratar de establecer una correlación entre las etapas fisiológicas propuestas por Miranda y las curvas de CTT obtenidas en el presente estudio (Tabla 8).

La primera etapa señalada por Miranda como **A0**, cuya altura promedio de los ápices fue de 1.2 cm, y su correlación con las curvas obtenidas por medio de la prueba de CTT, permitió a través de la absorbancia registrada en junio (0.512) ratificar niveles bajos de actividad metabólica (respiración).

Al evaluar la siguiente etapa (**A1**) que correspondería a los meses de septiembre y octubre, se observó una mayor actividad respiratoria de 1.4 de absorbancia para el mes de septiembre y de 1.6 para el mes de octubre, ambas lecturas corresponden a los 480 nm de longitud de onda y los ápices tienen una altura promedio de 2.3 cm; casi el doble de los

registrados en la etapa A0, y el triple respecto al incremento respiratorio.

En la última fase (etapa A2) el material se encontró en una fase de germinación activa, en los meses de noviembre y diciembre, posteriormente a esta fase el material es susceptible a la contaminación por hongos para su manejo *in vitro* así como para realizar las pruebas de CTT.

Se cuantificó la absorbancia en el mes de febrero y la prueba de CTT indicó una baja actividad respiratoria (absorbancia 0.407 nm).

Es importante señalar que aquellos ápices con placa basal que sobrevivieron al proceso de crioconservación, fueron congelados en el mes de agosto que corresponde a la etapa de una probable fase de transición que conduce al material a la fase de metabolismo activo (A1), estos resultados nos indicarían que probablemente en este mes y en combinación con la tasa de enfriamiento obtenida ( $-0.57^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ) con la mezcla No. 3 se lograrían buenos resultados. Aunque no hay que dejar de contemplar que es posible encontrar diferentes etapas en un mismo bulbo y sus respuestas sean distintas.

Probablemente si se congelara el ajo en las mismas condiciones anteriormente señaladas en una etapa de mayor actividad metabólica (respiración) de 1.4 a 1.6 nm, en los meses de septiembre y octubre que corresponden a la etapa (A1) se podría esperar una mayor respuesta de sobrevivencia.

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

TABLA 8.- CORRELACION DE LAS PROBABLES ETAPAS FISIOLÓGICAS PROPUESTAS POR MIRANDA (1992) Y LAS ABSORBANCIAS REGISTRADAS CON LA PRUEBA DE CTT EN APICES CON PLACA BASAL DE AJO SIN CONGELAR.

MES	ACTIVIDAD FISIOLÓGICA PROPUESTA	ALTURA PROMEDIO DE LOS APICES (cm)	ABSORBANCIA (nm)
FEBRERO-92			0.407
JUNIO-93			0.512
JULIO	ETAPA A0. METABOLISMO ATENUADO	1.2	
AGOSTO-92	PROBABLE ETAPA DE TRANSICION		
SEPTIEMBRE-92			1.4
	ETAPA A1	2.3	
OCTUBRE-92	INICIA FASE DE METABOLISMO ACTIVO		1.6
NOVIEMBRE		2.8	
	ETAPA A2. METABOLISMO ACELERADO EN PROCESO DE GERMINACION		
DICIEMBRE			
ENERO	MATERIAL NO DISPONIBLE, PROPENSO A CONTAMINARSE		

**b) Explantes congelados**

Al analizar las diferentes curvas obtenidas con el material crioconservado se mostraron francas diferencias con el grupo control, el material crioconservado con DMSO al momento de ser procesado presentó una ligera tinción, la cantidad de rojo de formazán para su posterior evaluación en el espectrofotómetro resultó ser insuficiente y las lecturas obtenidas fueron pobres e irregulares, por lo que no fue posible la construcción de una gráfica y poder confrontarla con una curva patrón.

En cambio en aquellos explantes que fueron congelados en las mezclas 3,5,6 fue posible extraer suficiente rojo de formazán y evaluar la respiración (Gráfica 3). Se observó que la mezcla 3 presentó una absorbancia (0.172) superior a la del control (0.121), ambos a 480nm. Es este caso fue posible aplicar la fórmula para determinar el porcentaje de respiración que dio un alto valor de respiración en los ápices congelados con la mezcla 3 (142%), seguido por los resultados en la mezcla 6 (48%) y por último de la mezcla 5 (5.2%).

Con base en los resultados se pueden plantear dos hipótesis:

- 1.- Es posible que las mezclas resultaron más efectivas que el DMSO solo, debido a que proporcionaron tasas lentas de enfriamiento y una mejor crioprotección contra el daño por congelación.

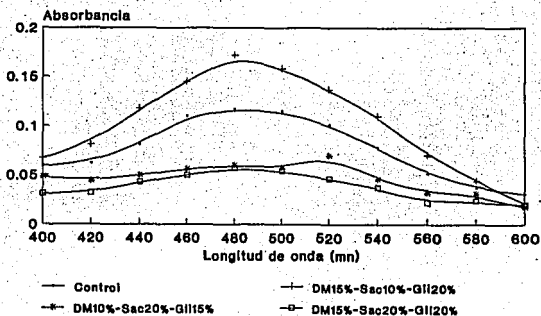


2.- Al realizar las pruebas de CTT las mediciones de la absorbancia realizadas fueron irregulares debido a que los ápices con placa basal tomados al azar pudieron estar en un nivel metabólico bajo, en una etapa fisiológica favorable o con una mayor o menor biomasa.

Fue posible observar que aún en una cabeza de ajo hubieron diferentes manifestaciones de desarrollo *in vitro*, las cuales comprendieron desde el franco y vigoroso desarrollo de plántulas, hasta la ausencia de crecimiento.

Por lo anterior, es importante determinar los motivos por los cuales los ápices no lograron reasumir completamente su crecimiento:

Gráfica 3. Curvas de CTT de ápices con placa basal de ajo congelados con mezclas crioprotectoras.



DM-DMSO, Sac-Sacarosa, Gli-Glicerol

### 3) Evaluación ultraestructural:

Las células meristemáticas de ajo no congeladas presentaron un núcleo grande reticulado y heterocromático, en el cual se aprecia la doble membrana nuclear y el espacio perinuclear así como poros (Lámina I, Fig 1). El citoplasma es granular, se observan mitocondrias, vacuolas y dictiosomas (Lámina I, Fig 2).

En el material congelado se aprecia una severa contracción del citoplasma y queda un espacio entre él y la pared celular (Lámina I, Fig 3), esta característica es denominada "plasmólisis de congelación", Levitt (1980) explica que es debido a la contracción celular (pared celular así como protoplasma) durante la formación de hielo extracelular y la incapacidad del protoplasma a reabsorber el agua de los espacios intercelulares al descongelarse el hielo extracelular. Después cuando la pared celular regresa a su forma y posición originales hace muy evidente que el protoplasma permanece contraído (deshidratado).

Se observaron rupturas en la membrana nuclear y su contenido esparcido (Lámina I, Fig 4), Lyons et al., (1979), y Sing y Miller (1985), sugieren que las membranas son el sitio de daño por congelación en las células vegetales, han observado rupturas en la membrana por la exposición al estrés por congelación letal o subletal. Tales observaciones incluyen plasmólisis celular o de los protoplastos, pérdida de electrólitos, otros constituyentes celulares y rompimiento de estructuras finas. Sing y Miller (1985) determinaron a

nivel de membrana estructural en centeno y trigo, alteraciones irreversibles que ocurren en la congelación y que son frecuentemente acompañadas por la pérdida de la estructura en la bicapa de la membrana celular.

En la Lámina I, Fig 5 no se aprecian organelos, al parecer han sido destruidos, lo que indica que las funciones celulares no se podrán realizar y su recuperación postcongelación es poco probable.

L A M I N A I

**FIG 1.-** Célula de *Allium sativum* var Taiwan, sin congelar. Fijada con glutaraldehído 2.5%, en una solución amortiguadora de fosfatos.

N = Núcleo, n = nucléolo, V = Vacuola, C = Citoplasma  
P = Pared celular, po = poro de la membrana nuclear.

**FIG 2.-** Detalle de célula de *A. sativum* var Taiwan, sin congelar. Se aprecian algunas estructuras celulares.

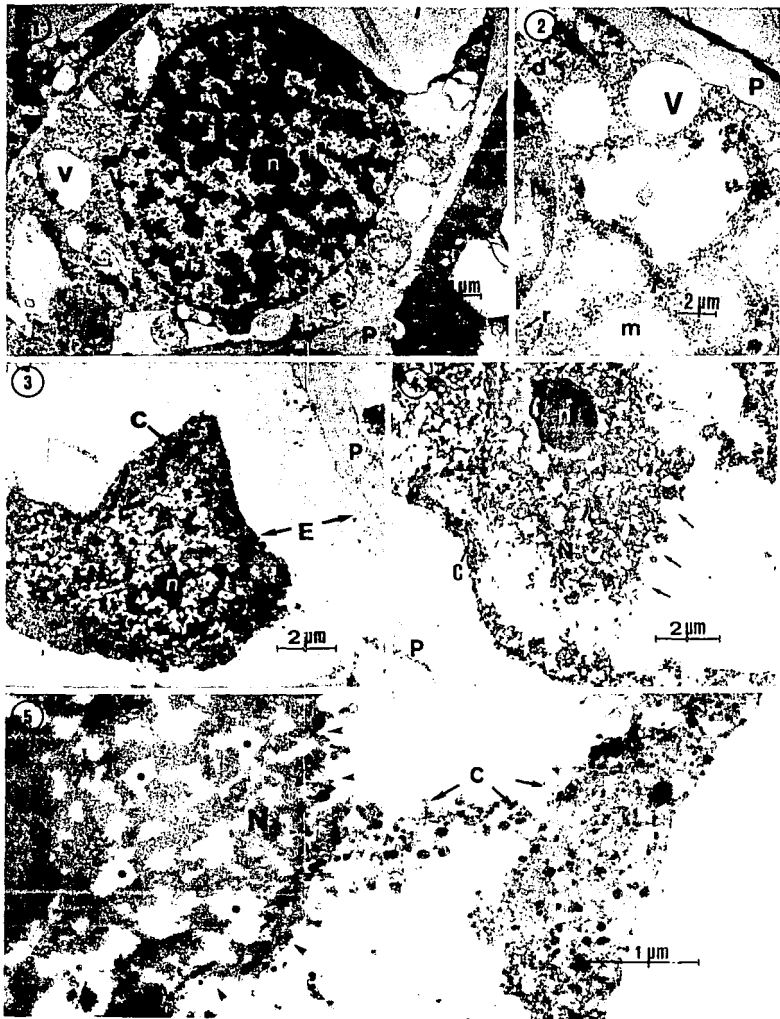
N = Núcleo, V = Vacuola, m = mitocondria,  
d = dictiosoma, r = ribosomas, P = Pared celular.

**FIG 3.-** Célula de *A. sativum* var Taiwan, después de ser sometido el tejido al proceso de criopreservación.

Se observa el citoplasma contraído (C) alrededor del núcleo (N), separado de la pared (P) y dejando un espacio (E).

**FIG 4.-** Célula de *A. sativum* var Taiwan, después de ser congelado el tejido. Se observa la ruptura en la membrana nuclear (→) y el citoplasma (C) contraído.

**FIG 5.-** Detalle de *A. sativum* var Taiwan, después de congelado el tejido. Se observan rupturas de membrana nuclear (→) y la ausencia de ribonucleoproteínas (\*) en el núcleo (N). Contracción del citoplasma (C).



b) *Daucus carota*

1) **Evaluación Macroscópica:**

Posteriormente al proceso de congelación-descongelación, no se observó un cambio severo de manera inmediata en los tejidos, sino que se hizo manifiesto a los 15 días posteriores a su cultivo, el tejido se secó, se tornó café oscuro. Se hicieron presentes algunos casos de contaminación por bacterias. Calkins y Swanson (1990) mencionan que dos autores, Tumanov y Khavalin observaron que en raíces de manzana dañadas por la congelación el color café no representó la muerte de dicho material ya que posteriormente se manifestó la formación de brotes. Esta situación fue semejante en el callo de zanahoria debido a que después de presentar una aparente necrosis, ésta no fue letal y se manifestó el crecimiento de callo nuevo. Withers (1978, 1979) reportó que callos de zanahoria pueden tener una apariencia normal cuando están en el medio de recuperación y presenta periodos de latencia (crioshock).

A los callos congelados se les realizaron observaciones periódicas bajo el microscopio para detectar algún cambio, el callo del medio MS persistió en presentar una coloración blanca con algunas zonas de color crema pálido y los callos del medio MSD no manifestaron ninguna modificación.

**2) Tasa de respiración:****a) Explantes no congelados:**

Las curvas de CTT se realizaron con callo del medio MSD y callo de MS. Para obtener la curva patrón se tomó un fragmento de cada tipo de callo, se extrajo el rojo de formazán y se registró una absorbancia máxima de 480 nm, posteriormente se observó que el callo MSD presentó una absorbancia de 1.111 y de 1.124 el callo de MS a 480 nm de longitud de onda (Gráfica 4). La obtención de estas curvas fue más sencilla que en el caso del ajo, una alta tinción así lo permitió y siempre se tuvo la certeza de que el material estaba en iguales condiciones metabólicas, esto se determinó con el continuo incremento de biomasa de manera cualitativa.

**b) Explantes congelados:**

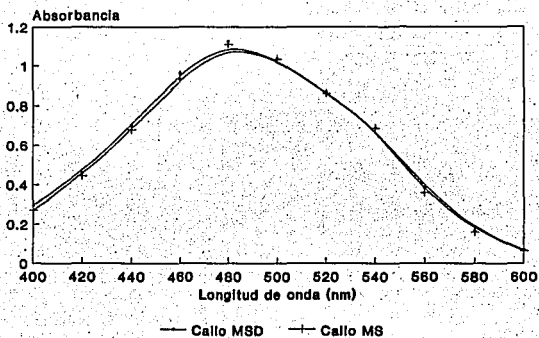
Las absorbancias registradas a 480 nm fueron los siguientes:

Los callos del medio MSD : 0.699 para una primera muestra y de 0.634 para la segunda

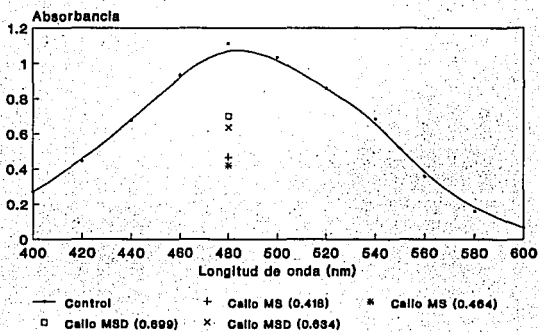
Los callos del medio MS: 0.464 para la primera muestra y de 0.418 para la segunda.

Si situamos estos puntos en las curvas patrón se observa que están por debajo del valor obtenido por el control (Gráfica 5).

Gráfica 4. Cuvas patrón de CTT de callos de zanahoria (MSD) y (MS) sin congelar



Gráfica 5. Absorbancias máximas de callo zanahoria (MS) y (MSD) congelados





Estos valores al ser transformados a porcentajes para interpretar la tasa de respiración aplicando la fórmula descrita en el desarrollo experimental fueron: para callo MSD: 56 y 62% y para el callo MS: de 37 y 56%

El porcentaje de respiración más alto se registró en callo MSD en una de las muestras y el más bajo en el callo MS. Asimismo se registró un mismo porcentaje de respiración (52%) para los tipos de callo.

La tasa baja de respiración presupone que parte del callo fue severamente dañado durante el proceso de congelación o que durante la incubación de CTT se encontraba en un estado de crioshock con su metabolismo parcialmente inhibido.

Es importante señalar que la prueba de CTT nos indica si se esta efectuando o no el proceso de la respiración en las mitocondrias, su inhibición pudo haberse debido a la desnaturalización de enzimas o proteínas que intervienen en el proceso, Steponkus 1967 y Steponkus y Lanphear 1971 señalan que aunque hay una alta correlación entre el daño por congelación y la reducción de CTT en un sistema en donde no se han adicionado sustratos y cofactores exógenos, esta no es debido a la inactivación por frío de las deshidrogenasas sino a las limitaciones del cofactor y el sustrato. Dichas limitaciones pueden ser causadas por la inactivación de otras enzimas deshidrogenasas que requieren de la continua síntesis de sustratos y cofactores. Esto es debido en gran medida a que ha sido difícil demostrar las enzimas específicas del

tetrazolio en tejido fresco debido a que la reducción del tetrazolio no es específica (Steponkus y Lanphear 1971).

A las tres semanas después del tratamiento de crioconservación y sembrados en medio de recuperación los callos MSD en una ocasión respondieron continuando el proceso de embriogénesis y desarrollaron embriones somáticos, con la característica de mostrar un suspensor alargado que presupone una división celular alta en esta zona. Se pudo estimar bajo el microscopio que la mayor parte del callo congelado generó estas respuestas morfogénicas.

Debido a la dificultad de lograr repetir las tasas de enfriamiento no fue posible reproducir las mismas condiciones de congelación y no se lograron realizar las repeticiones mínimas necesarias para evaluar el efecto de la congelación por medio de esta técnica.

Solo se logró una aproximación cuando callo congelado con DMSO 5% a una tasa de enfriamiento de  $-0.43^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , y posterior a un estado de crioshock, reasumió su crecimiento e incrementó su volumen celular pero no se diferenció en embriones. Es posible que esto se deba a una lenta y continua pérdida de la viabilidad. Withers y Street (1977, citados por Withers, 1978), observaron que en células de zanahoria que se recultivaron en medio después de ser congeladas y descongeladas no respondieron rápidamente, ello les indicó que la reparación de daños y reactivación del desarrollo no siempre son exitosos y cuando ocurre puede tardar mucho tiempo.

### 3) Análisis estructural:

Con el fin de evaluar el efecto del dispositivo empleado para llevar a cabo la congelación de material biológico, se realizaron pruebas de crioconservación y fijación en callos de zanahoria MS y MSD Diagrama 7.

#### ETAPAS DEL PROCESO DEL CRIOCONSERVACION EN Daucus carota

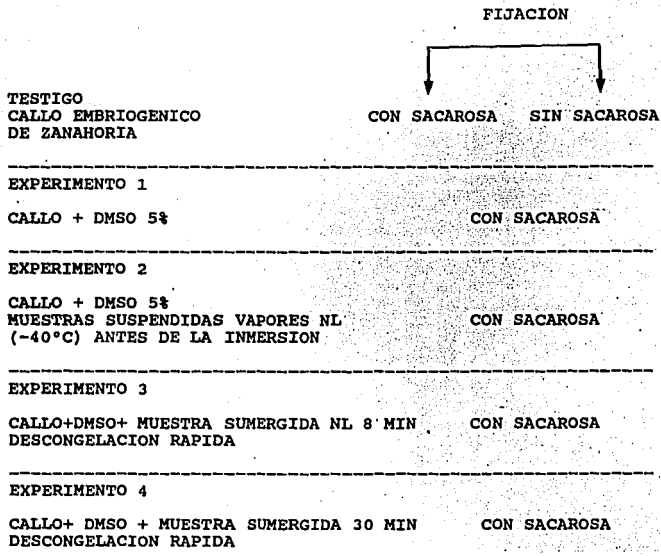


DIAGRAMA 7. CONGELACION Y FIJACION DE CALLO DE ZANAHORIA MS Y MSD DURANTE LAS DIFERENTES ETAPAS DEL PROCESO DE CRIOCONSERVACION.

El callo de zanahoria ha sido un modelo muy utilizado en este tipo de estudios (Nag y Street, 1973; Withers 1978, 1979).

Es importante realizar la fijación correcta del tejido para evitar alteraciones en éste. La fijación se llevó con glutaraldehído-paraformaldehído (3%-1.5%) sin sacarosa y con sacarosa; la sacarosa actuó como un regulador de la presión osmótica y evitó el choque osmótico de las células al interaccionar con el fijador.

Al adicionar o no sacarosa al fijador con el cual se fijó el callo de zanahoria se observó lo siguiente:

a) Callo de zanahoria fijado con glutaraldehído-paraformaldehído con sacarosa (testigo 1): se observaron células con buena preservación del tejido, sin signos de plasmólisis, se encontraron vacuolas grandes e integridad celular (Lámina II, Fig 1).

b) En el caso que no se adicionó sacarosa en el fijador (Testigo 2), se observó una fuerte contracción del citoplasma, pero no hay ruptura ni separación celular. (Lámina II, Fig 2).

Al analizar los resultados en la serie de tratamientos (Diagrama 7) de callo MS de zanahoria procesados a lo largo de la técnica de crioconservación a una tasa de  $-1.6^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  y fijados añadiendo sacarosa al fijador se observó lo siguiente:

a) Callo de zanahoria con DMSO 5%, (Experimento 1). Se presentó plasmólisis pero en menor grado que en el Testigo 2. Ocurrió la ruptura de la membrana plasmática y la salida de citoplasma (Lámina II, Fig 3).

b) Callo de zanahoria con DMSO 5% enfriada y llevada la muestra hasta  $-40^{\circ}\text{C}$ , (Experimento 2), la plasmólisis ocurrió en menor grado, se observó una aparente recuperación del tejido, y vacuolas pequeñas (Lámina II, Fig 4).

c) Callo de zanahoria con DMSO 5%, enfriada y almacenada 8 min en NL (experimento 3) hubo plasmólisis, con distorsión de la membrana plasmática. Se pudo observar que el contenido citoplasmático se preservó y no hubo ruptura celular. (Lámina II, Fig 5).

d) Callo de zanahoria con DMSO 5%, enfriada y almacenada 30 min en NL (Experimento 4) después de este ensayo se observaron células que se rompieron, hay separación de algunas células (separación intercelular), el citoplasma es de aspecto granuloso con plasmólisis similar a la que se presentó en el Experimento 3 (Lámina II, Fig 6).

Con base en lo anterior podemos señalar que el DMSO provocó plasmólisis, sin embargo el contenido citoplasmático se conservó en buenas condiciones.

Al exponer las muestras a los vapores del NL y continuar el proceso de crioconservación incrementó la plasmólisis y sus efectos; ocurrieron rupturas y distorsiones de la membrana, espacios dentro del citoplasma e intercelulares.

L A M I N A II

FIG. 1.- Callo de zanahoria sin congelar fijado con glutaraldehído-paraformaldehído (3%-1.5%) adicionado con sacarosa 0.12 M. Células íntegras.

V = Vacuolas, C = Citoplasma.

1400 X

FIG. 2.- Callo de zanahoria sin congelar fijado con glutaraldehído-paraformaldehído (3%-1.5%) sin sacarosa, se observan efectos de un choque osmótico (→), (P) Pared celular.

1400 X

FIG. 3.- Callo de zanahoria (MS) adicionado con DMSO 5%, se observa plasmólisis, ruptura de membrana (→) y citoplasma (C) fuera de algunas células, (P) Pared celular.

1400 X.

FIG. 4.- Callo de zanahoria (MS) con DMSO 5% y enfriado a -40°C, hay plasmólisis (→), vacuolas pequeñas (V) y ruptura de membrana (→), (P) Pared celular.

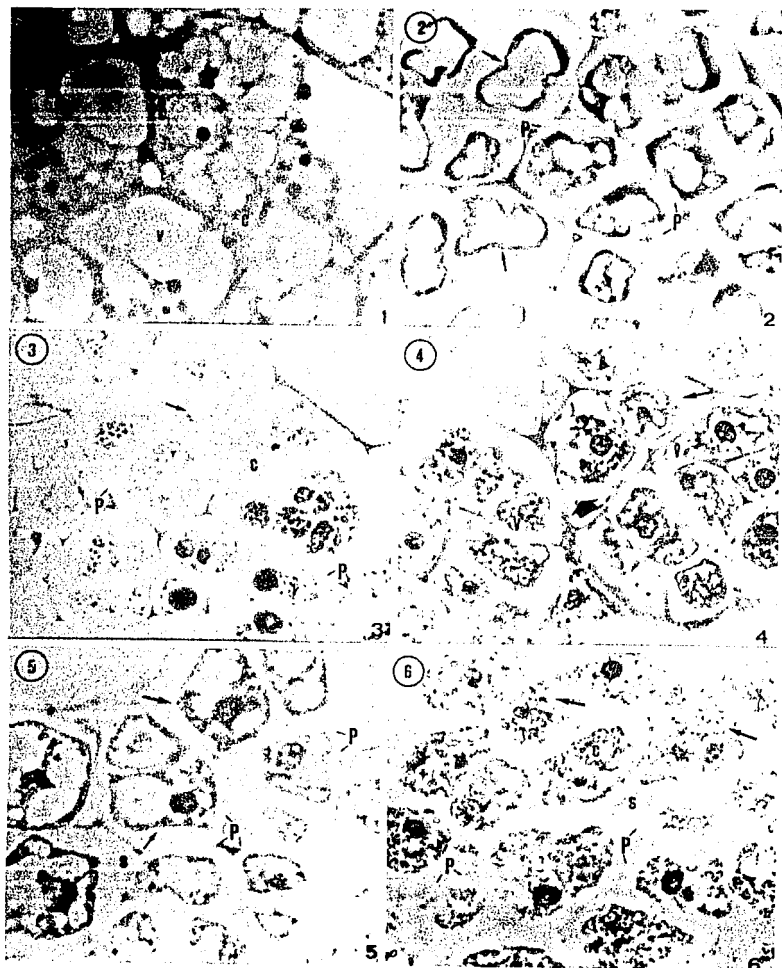
1400 X

FIG. 5.- Callo de zanahoria (MS), sumergido en nitrógeno líquido (NL) 8 min, se observa plasmólisis (→), separación intracelular (s), (P) Pared celular.

1400 X

FIG 6.- Callo de zanahoria (MS), sumergido en NL 30 min, se observan células que estallaron (→), separación intracelular (S), el citoplasma (C) es granular, (P) Pared celular.

560 X





De la serie de tratamientos (Diagrama 7) de callo MSD de zanahoria procesados a lo largo de la técnica de criopreservación, congelados a una tasa de  $-1.29^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  y fijados añadiendo sacarosa al fijador se observó lo siguiente:

a) Callo de zanahoria con DMSO 5%, (Experimento 1): Se observó en la mayoría de las células integridad celular y presencia de vacuolas, aunque ocurrió plasmólisis en algunos grupos celulares (Lámina III, Fig 1).

b) Callo de zanahoria con DMSO 5% enfriada y llevada la muestra hasta  $-40^{\circ}\text{C}$  (Experimento 2), la plasmólisis pareció ser menos severa que en el callo MS, la mayoría de las células se observaron completas con numerosas y pequeñas vacuolas en proceso de fusión (Lámina III, Fig 2).

c) Callo de zanahoria con DMSO 5% enfriada y almacenada 8 min en NL (Experimento 3) los efectos de la plasmólisis no fueron tan marcadas, no se detectó distorsión en la membrana plasmática, ni ruptura celular (Lámina III, Fig. 3).

d) Callo de zanahoria con DMSO 5% enfriada y almacenada 30 min en NL (Experimento 4), algunas células presentaron el citoplasma disperso, fue notorio que en las células de mayor tamaño tuvieron una ligera plasmólisis, su citoplasma no tuvo aspecto granular y conservó sus vacuolas (Lámina III, Fig. 4).

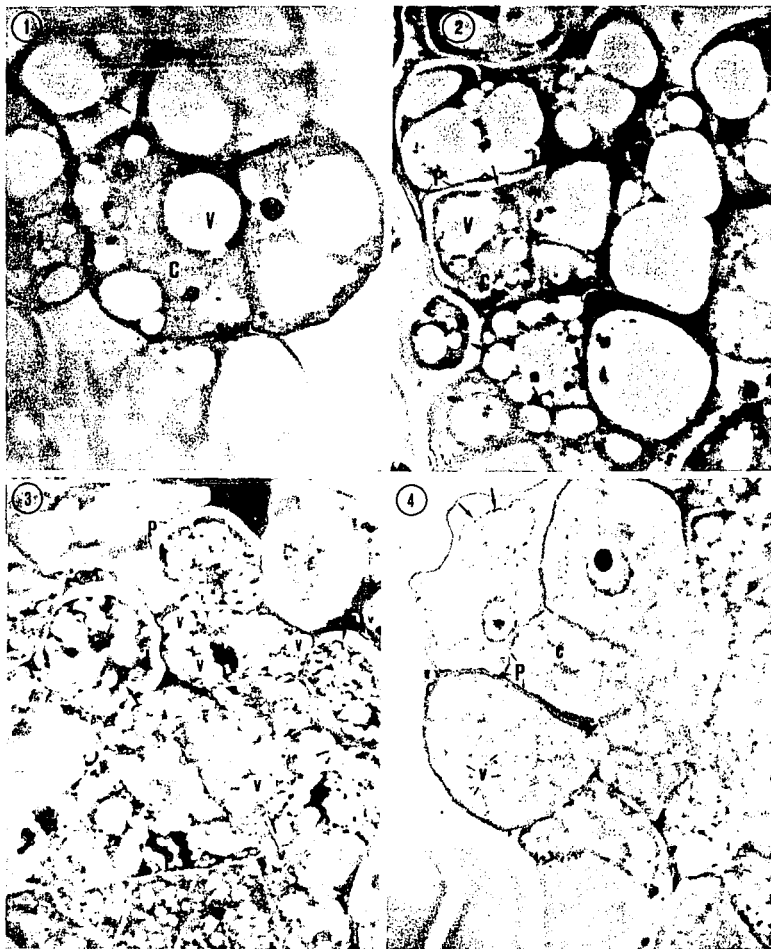
L A M I N A III  
CALLO DE ZANAHORIA MSD

FIG. 1.- Callo de zanahoria MSD adicionado con DMSO 5%, se observa buena preservación con algunos grupos celulares plasmolizados (→); V = Vacuolas, C = Citoplasma, P = Pared celular.  
1600 X

FIG. 2.- Células sometidas a -40°C. La plasmólisis (→) es menos severa que en el callo MS, la mayoría de las células están completas, V = Vacuolas, C = Citoplasma, P = Pared celular.  
1600 X

FIG. 3.- Células almacenadas 8 min en NL, no hay distorsión de la membrana, ni ruptura celular. Se observan numerosas y pequeñas vacuolas (V), ligera plasmólisis (→), (P) Pared celular.  
1600 X

FIG 4.- Células almacenadas 30 min en NL, plasmólisis ligera (→), se observan vacuolas (V), citoplasma (C), Pared celular (P), la gran mayoría de las células se conservaron en buen estado.  
1600 X



En el tipo de células MSD la plasmólisis se observó en menor proporción y se conservaron en buen estado la mayoría de ellas, al exponerlos a los vapores e introducirlos al NL la plasmólisis fue menor que en el callo MS, en cuyas células el citoplasma no fue granular ni presentó espacios intercelulares.

Estudios histológicos realizados en cultivos en suspensión criopreservados de *Musa*, mostraron que las células embriogénicas sobreviven a la congelación y aquellas que pierden su viabilidad presentan un citoplasma contraído granular e irregular debido probablemente a una excesiva deshidratación celular (Panis et al. 1992).

Estas diferencias se deben al estado fisiológico del callo. En el callo MS las células son de mayor tamaño con grandes vacuolas y son más susceptibles de ser deshidratadas, Nag y Street (1973 citado por Sakai y Sugawara 1978) observaron una reducción en el porcentaje de sobrevivencia en células en suspensión de zanahoria durante la congelación y descongelación en aquellas células que presentaban grandes vacuolas.

Por el contrario el callo MSD posee células en constante división, de menor tamaño con pequeñas y numerosas vacuolas que se fusionarán. Grout (1991) señala que células pequeñas con un número mínimo de vacuolas presentes, son frecuentemente utilizadas para tratamientos de estrés y presentan una mayor resistencia a las bajas temperaturas y deshidratación.

Estas características también pueden tener una relación con una tolerancia a la congelación en relación a la tensión mecánica. Sutcliffe (1979) señala que al ser menor el tamaño de las células es mayor su resistencia a las heladas, su razonamiento se apoya en las relaciones tamaño, unidad de superficie y las fuerzas que se ejercen en la estructura.

Otro factor que se relaciona es el grado de deshidratación del protoplasma, si éste se deshidrata se dice que se endurece y la vía probable de daño es por tensión mecánica.

Withers (1978) realizó un estudio estructural de callo de zanahoria que había congelado por varios métodos. Observó una reducción en el volumen celular durante la congelación lenta en presencia del crioprotector, esto es considerado uno de los pocos cambios estructurales que pueden ser atribuidos solamente a la congelación y el cual es reversible con la descongelación.

Es posible que aquellas células que sobrepasen el estado de crioshock, podrían reasumir su actividad, crecimiento y generar nuevas células, Withers (1978), menciona que muchos cambios pueden presentarse durante la postcongelación, algunos de ellos son degenerativos y sólo la minoría de las células contribuyen al crecimiento de la población. Esto fue señalado también por Haskins y Kartha (1980) para meristemas con primordios foliares de *Pisum sativum*, en los que posterior a su congelación la actividad celular se localizó en el tejido de los primordios foliares, yemas axilares y

áreas meristemáticas las cuales fueron capaces de recuperarse y formar nuevas plántulas.

Las diferencias que se manifestaron entre el callo MSD y el callo MS en proceso de diferenciación se debe, como ya se ha señalado, en gran medida a la etapa fisiológica en la que se encuentra el material biológico (Dereuddre et al. 1988).

Al conjuntar los resultados de las pruebas de CTT con los cortes realizados, se observó que las células de callo MS en una muestra, presentó un bajo porcentaje de respiración (37%) con respecto a la curva patrón y al callo MSD, (62%) pues sus células han sufrido a lo largo del proceso una severa plasmólisis, en cambio en callo MSD presentó en una muestra un porcentaje de respiración alto (62%), debido a que son células en constante división, no presentaron plasmólisis ni daños celulares severos irreversibles ya que pudieron mostrar su capacidad para recuperarse y más aún, su totipotencialidad al generar embriones somáticos y plántulas.

#### *Dianthus caryophyllus* y *Lycopersicon esculentum*

##### a) Evaluación macroscópica:

Se realizó en meristemas de clavel y jitomate la evaluación a nivel macroscópico, los cuales al disectarlos se observaron verdes y turgentes; después de someterlos a las distintas técnicas de congelación y después de 7 días de cultivo en medios para su recuperación, se tornaron de color

café y no presentaron signos de sobrevivencia en ninguno de los tratamientos.

No se observó ninguna diferencia entre el uso de medio sólido o medio líquido con puentes de papel filtro para promover la eliminación de sustancias nocivas para el explante y tratar así de evitar la muerte celular.

Debido a las pequeñas dimensiones de los meristemos para su manipulación así como la escasa cantidad de biomasa que representan para proporcionar suficiente rojo de formazán y fuese posible realizar las lecturas en el espectrofotómetro no fue factible aplicar la técnica del CTT y por lo tanto no se obtuvieron las curvas correspondientes.

Asimismo por la falta de respuesta en los meristemos congelados no se realizaron cortes histológicos.

**CONCLUSIONES.**

Con los elementos y parámetros que se evaluaron es posible llegar a varias conclusiones

**FISICO Y TECNICO:**

Con el equipo empleado para llevar a cabo los procesos de crioconservación:

- Fue posible observar el comportamiento de las diferentes soluciones crioprotectoras solas o en combinación y tener estimaciones no constantes de la velocidad de enfriamiento de cada una de ellas.

- No es posible tener un control de las tasas lentas de enfriamiento que se requieren para llevar con éxito la crioconservación, debido a que las tasas de enfriamiento están sujetas al tipo y concentración del agente crioprotector, la cantidad de NL contenido en el termo y la altura a la cual se coloque la canastilla con las muestras, factores de difícil control.

- El equipo empleado requiere de mejoras de tipo técnico para que puedan solventarse estas dificultades y sea posible repetir con un menor rango de error aquellas tasas de enfriamiento requeridas para obtener una sobrevivencia exitosa.



**FISIOLOGICO Y ESTRUCTURAL:**

- Es importante conocer la etapa de desarrollo, estado fisiológico de la especie así como la variedad a trabajar, debido a que ejercen una fuerte influencia en la capacidad de sobrevivencia.

- La evaluación de la tasa de respiración por medio del CTT, resultó ser un método útil de análisis gráfico de un proceso fisiológico y reconocer las muestras que sobrevivieron, mucho tiempo antes de que se manifieste un evento morfo-genético.

- Por medio de la prueba de CTT es posible tener una estimación relativamente rápida de que técnica de congelación o tasa de enfriamiento fue favorable y realizar un mayor número de ensayos dentro de un rango determinado.

- El ajo no pudo ser crioconservado con éxito debido a que su fisiología influye fuertemente en la respuesta.

- Las pruebas de CTT mostraron diferencias muy amplias en las lecturas espectrofotométricas en el ajo *in vivo* encontrándose que no fue posible determinar una tasa de respiración uniforme a lo largo de las diferentes etapas post-cosecha.

- Asimismo los ápices con placa basal de ajo que fueron sometidos al proceso de criopreservación y se les aplicó las pruebas de CTT mostraron lecturas espectrofotométricas no cuantificables por lo que no fue posible estimar su tasa de respiración.

- Estas consideraciones sirven para señalar la importancia de lograr lotes de material biológico en un estado fisiológico semejante y nos indica la gran dificultad de lograrlo.

- La evaluación microscópica demostró que la membrana celular de las células de meristemo de ajo sufre daños irreversibles durante la criopreservación: como son la ruptura de las membranas plasmática y nuclear así como la destrucción de organelos. Señal de que el daño es irreversible y por lo tanto las probabilidades de recuperarse son escasas.

- Con base a los indicios de sobrevivencia que mostró el ajo, podemos suponer que es posible que pueda resistir el congelamiento en un sistema computarizado con tasas de enfriamiento que oscilen entre  $-0.16$  a  $-0.24^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  con DMSO 30% y de  $-0.59$  a  $-0.85^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  con la mezcla No. 3. (DMSO 15% - Sacarosa 10% - Glicerol 20%) y sea colocado en un medio de recuperación MS basal o adicionado con Acido Giberélico en un rango de 3 a 6  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ .

- Las respuestas de sobrevivencia obtenidas con el equipo de enfriamiento utilizado: existieron para la zanahoria y fueron nulas para el clavel y el jitomate.

- El callo de zanahoria fue posible crioconservarlo en una ocasión a una tasa de  $-1.8^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , lograr su recuperación en medio MS hasta plántula pasando por los diferentes estados somáticos embrionarios.

- Fue posible observar la importancia e influencia de la etapa fisiológica del callo de zanahoria en la que se encuentre el material a congelar para obtener respuesta de sobrevivencia favorables.

- Al realizar la evaluación estructural de los cortes histológicos de callo de zanahoria en sus dos fases (MSD y MS), se observó la ruptura de membrana y salida de citoplasma, mostrándose más severa estas lesiones en el callo MS que en el MSD.

- Se observó que aquella fase de constante división, con células y vacuolas pequeñas (MSD), fue más favorable para resistir el proceso de congelación y manifestarse en una respuesta de sobrevivencia, que el callo en un estado más avanzado, con vacuolas grandes (MS).

- Esto fue corroborado al aplicar las pruebas de CTT en ambas etapas y se determinó una tasa de respiración mayor en el callo MSD (62%), que en el callo MS (37%).

- La aplicación de reguladores de crecimiento en medio sólido y medio líquido en puentes de papel filtro no fue favorable para los meristemas de clavel y jitomate congelados.

- Las referencias bibliográficas señalan técnicas de crioconservación que no requieren tasas de enfriamiento lentas en meristemas de clavel, estas fueron aplicadas en ellos pero no se observó ningún tipo desarrollo. Es muy probable que la falta de sobrevivencia se haya debido a la variedad y estado fisiológico de la planta madre.

Los resultados presentados contribuyen al conocimiento de las técnicas aplicadas para estimar la sobrevivencia del material crioconservado y algunos de los efectos que se manifiestan en las células que repercuten en su recuperación postcongelación.

## ANEXO I

Para realizar el estudio de estructuras finas de las células, es necesario contar con secciones delgadas de 0.5 a 3.0  $\mu\text{m}$ , que es posible obtener al incluir el material en plástico.

Los plásticos deben ser líquidos compuestos por monómeros, se emplean dos tipos principales: los metacrilatos y las resinas epóxicas, en ésta última se encuentra el Epón

Son adecuados por su estabilidad térmica con poca o ninguna contracción al polimerizarse, y presentan buenas características para su corte.

La mezcla de Epón está constituida por los siguientes compuestos:

Epón	Glicídico de éter 100	(polímero)
DDSA	Anhidro dadocenilsuccínico	(endurecedor)
NMA	Anhidro metil ná dico	(plastificante)
DMP	Tris-dimitilamino fenol	(catalizador)

Para obtener diferentes grados de dureza se varían las proporciones de los componentes, en el presente estudio se requirió de una dureza del tipo 1 (Curtis, 1986)

Las cantidades que se utilizaron para preparar la mezcla de Epón para la microscopia fotónica fueron:

Epón	5.07 ml
DDSA	3.12 ml
NMA	2.78 ml
DMP	0.17 ml

para preparar 10 ml de resina.

Las cantidades que se utilizaron para preparar la mezcla de Epón para la microscopia electrónica fueron las siguientes:

Epón	10.13 ml
DDSA	7.4 ml
NMA	2.78 ml
DMP	0.33 ml

para preparar 20 ml de resina.

Otra resina que se utilizó fue la denominada JB-4, es un plástico que preserva detalles estructurales del material, que no es posible obtener con la técnica de parafina. El JB-4 presenta distintas ventajas para la fijación entre ellas: no se requiere de una completa deshidratación del material y se polimeriza rápidamente.

El JB-4 está constituido por la solución A, componente B y el catalizador. Los compuestos deben almacenarse de la siguiente manera:

La solución A debe mantenerse en refrigeración  
El componente B debe mantenerse a temperatura ambiente y el catalizador se almacena en frasco ámbar con sílica gel a temperatura ambiente.

La solución A antes de utilizarla debe alcanzar la temperatura ambiente.

Para la impregnación del material se preparó una mezcla de la Solución A, con el catalizador. Las cantidades requeridas fueron:

0.225 g de catalizador, al cual se le agregan 25 ml de la Solución A, estos componentes se agitaron constantemente hasta que se logró una solución homogénea. Se debe almacenar en refrigeración.

Para realizar la inclusión se prepara una solución 25:1 de la solución de impregnación y el componente B, posteriormente se homogeneiza la mezcla con un aplicador de madera.

La inclusión se debe realizar rápidamente ya que solidifica en aproximadamente 20 min, las muestras se colocan en las cápsulas Been y con una pipeta Pasteur se llenan hasta el borde, las cápsulas se cierran para que polimerice la mezcla en ausencia de oxígeno (PolySciences, 1976).

**PREPARACION DEL COLORANTE AZUL DE TOLUIDINA**

Azul de Toluidina	1 g
Bórax (tetraborato de sodio)	1 g
Agua destilada	aforar a 100 ml

Los reactivos se disuelven por separado con calor y en agitación, se mezclan y esta mezcla se hierve de 10 a 20 min, posteriormente se deja enfriar y reposar 24 h, se filtra, el filtrado se almacena en botella ámbar.



## BIBLIOGRAFIA CITADA

ALTAMIRANO, D. M. 1985. Ensayo sobre congelación y descongelación de embriones de rata. Tesis de Licenciatura (Biólogo). Facultad de Ciencias. U. N. A. M. México, D. F. 47 p

AMMIRATO, P.V. 1983. Embryogenesis. En: D.A: Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato and Y. Yamada (Eds). McMillan, New York 87-123.

ARMAS, R., E.ORTEGA y R. GARCIA. 1988. Fisiología Vegetal. Editorial Pueblo y Educación. La Habana, Cuba. pp. 247-301.

BAJAJ, Y.P.S. 1977. Initiation of shoots and callus potato-tuber sprouts and axillary buds frozen at  $-196^{\circ}\text{C}$ . Crop Improv 4(1):48-53.

BAJAJ, Y.P.S. 1979. Establishment of germplasm banks through freeze-storage of plant tissue culture and their implications in agriculture. En: W.R. Sharp, P.O. Larsen, E.F. Paddock and V. Raghavan (Eds.). Plant Cell and Tissue Culture Principles and Applications. Ohio State University: Columbus. pp: 745-774

BAJAJ, Y.P.S. 1985. Cryopreservation of embryos En: K. Kartha (Ed.). Cryopreservation of Plant Cells and Organs. CRC Press, Boca Raton. 227-242

BENSON, E. 1979 Variation in recovery of cryopreserved shoot-tips of *Solanum tuberosum* exposed to different pre- and post-freeze light regimes. Cryo Letters 10: 323-344

BIDWELL, R. G. S. 1979. Fisiología Vegetal. A.G.T. Editor México, D. F. pp. 599-625.

BRAUN, A. 1988. Cryopreservation of sugarbeet germplasm. *Plant Cell, Tissue Organ Culture*. 14: 161-168.

CALKINS, J. B. Y B.T. SWANSON. 1990 The distinction between living and dead plant tissue-viability cold hardiness research. *Cryobiology* 27:194 -211.

CURTIS, P.J. 1986. *Microtecnia Vegetal*. Universidad Autónoma de Chapingo. Ed. Trillas. México, D. F. 39-47

CHEN, W. H., W. COCKBURN, AND H.E. STREET. 1979. Preliminary experiments on freeze preservation of sugarcane cells. *Taiwania*, 24:70-74.

CHEN, T.,K. KARTHA, N. LEUNG, AND W. KRUZ. 1984a. Cryopreservation of Alkaloid-Producing cell cultures of Periwinkle (*Catharanthus roseus*) *Plant Physiol*. 75:726-731.

CHEN, T., K. KARTHA, F. CONSTABEL, AND L. GUSTA. 1984b. Freezing characteristics of cultured *Catharanthus roseus* (L).G. Don cells treated with dimethylsulfoxide and sorbitol in relation to cryopreservation. *Plant Physiol*. 75:720-725.

CHEN, T. AND K. KARTHA. 1987. Cryopreservation of woody species. En: J.M. Bonga and D.J. Durzan (Eds.). *Cell and Tissue Culture in Forestry*, Vol 2. Martinus Nijhoff Publisheirs, Boston. 305-319.

CHIUNG-CHI K. AND R. D. LINEBERGER. 1985. Survival of in vitro cultured tissue of "Jonathan" apples exposed to -196°C. *HortScience* 20(4):764-767.

DEREUDDRE, J., J. FABRE, AND C. BASSAGLIA. 1988. Resistance to freezing in liquid nitrogen of carnation (*Dianthus caryophyllus* L. var Eolo) apical and axillary shoot tips excised from different aged in vitro plantlets. *Plant Cells Reports* 7:170-173.

DODDS, J.H. 1991. Introduction. En: J. H.Dodds (Ed.). *In vitro Methods for Conservation of Plant Genetic Resources*. Chapman and Hall, Cambridge. 1-9.

FERNANDEZ, SAN MARTIN. 1976. Acción del DMSO sobre leucocitos humanos. Tesis de Licenciatura (Químico). Escuela de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Puebla, México. 46 p.

FRANKS, F. 1985. *Biophysics and Biochemistry at low temperatures*. Cambridge University Press. 37-61, 148-166.

FINKLE, B.J. AND J. ULRICH. 1978. Effects of combinations of cryoprotectants on the freezing survival of sugarcane cutered cells: En: P.H. Li and A. Sakai. (Eds.). En: *Plant cold hardiness and freezing strees*. Academic Press. 378-388.

FINKLE, B. J., M. ZAVALA, AND J. ULRICH. 1985. Cryoprotective compounds in the viable freezing of plant tissues. En: K. Kartha (Ed.). *Cryopreservation of Plant Cells and Organs*. CRC Press, Boca Raton. 75-114.

GEORGE, E. F. AND P.D. SHERRINGTON. 1984. *Plant propagation by tissue culture. Handbook and Directory of commercial laboratories*, Exegetics, Limited, Great Britain, 690 p

GROUT, B. W. W., T. WESTCOTT, AND G. HENSHAW. 1978. Survival of shoot meristem of tomato seedlings frozen in liquid nitrogen. *Cryobiology*, 15: 478 - 483.

GROUT, B. W. W. 1990. Genetic preservation in vitro. En: A. J. J. Nijkamp, L. H. van der Plas, and J. van Nartijk (Eds.) Progress in plant cellular and molecular biology. Kluwer Academic Publishers Dordrecht. Netherlands. 13-22.

GROUT. B. W. W. 1991. Conservation in vitro. En: J. Mascherpa, and C. Moncousin (Eds.) International Symposium on plant Biotechnology and its contribution to the improvement, the multiplication and the development of plants. Geneva, Switzerland. 171-178.

HASKINS. R. H. AND K.K.KARTHA. 1980. Freeze preservation of pea meristems: cell survival. Canadian Journal of Botany 58(8):832-840.

HESZKY, L., Z. JEKKELE, AND A. ALI. 1990. Effect of cooling rate, cryoprotectant and holding time at different transfer temperatures on the survival of cryopreserved cell suspension culture (*Puccinellia distans* (L.) Parl.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 21: 217-226.

HENSHAW, G. 1975. Technical aspects of tissue culture storage for genetic conservation. En: Frankel and Hawken (Eds.). In Crop Genetic Resources for today and tomorrow.

HENSHAW. G.G., J. O'HARA. AND J. STAMP. 1985. Cryopreservation of potato meristems. En: K. Kartha (Ed.). Cryopreservation of Plant Cells and Organs. CRC Press, Inc. Boca Raton. 159-170.

IBPGR. 1986. Design, planning and operation of in vitro genebanks. Rome.

JAGODZINSKI, R.V. 1966. Obtaining the time-temperature profile. Cryobiology. 2(4):193-197.

KARTHA, K.K. 1981. Meristem culture and cryopreservation methods and applications. En: T. A. Thorpe (Ed.). Plant tissue culture methods and applications in agriculture. Academic Press U.S.A. 181-211.

KARTHA, K.K. 1985a. Meristem culture and germplasm preservation En: K. Kartha (Ed). Cryopreservation of Plant Cells and Organs. CRC Press, Inc. Boca Raton.115-134.

KARTHA, K.K. 1985b. Cryopreservation of plants cells and organs. Newsletter. International Association of Plant Tissue Culture. No.45,2-15.

KOBAYASHI, S. A. SAKAI, AND I. OIYAMA. 1990. Cryopreservation in liquid nitrogen of cultured navel orange (*Citrus sinensis* Obs.) nucellar cells and subsequent plant regeneration. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 23:15-20.

LEVITT, J. 1980. Responses of plants to environmental stresses. Vol I, Chilling, Freezing and High Temperature Stresses. Academic Press U.S.A. 1- 101.

LOPEZ, E.A.L. 1988. Acción del DMSO en ápices con placa basal de *Allium sativum* sometidos a nitrógeno líquido. Tesis de Licenciatura (Biólogo). Facultad de Ciencias, U. N. A. M. México, D.F. 112 p.

LUYET, B.J. 1966. An attempt at systematic analysis of the notion of freezing rates and at evaluation of the main contributory factors. Cryobiology Vol 2, No. 4 198-205.

LYONS, J.M., J. RAISON, AND P. STEPONKUS. 1979. The plant membrane in response to low temperature: an overview. En: J.M. Lyons, D. Graham, and J. Raison (Eds.). Low temperature stress in crop plants. The role of the membrane. Academic Press U.S.A. 1-24.

MANZUR, P. 1970. Cryobiology: The freezing of biological systems. Science. 168:939-949.

MATA, R.M. 1992. Efecto de la mezcla de crioprotectores (DMSO-Glicerol) sobre ápices con placa basal de *Allium sativum* in vitro congelados a  $-196^{\circ}\text{C}$ . Tesis de Licenciatura (Biólogo). Facultad de Ciencias, U. N. A. M. México, D.F. 102 p.

MATA, R.M. 1995. Crioconservación de germoplasma in vitro de especies vegetales de interés económico: Análisis de la eficiencia de un sistema sencillo de congelación. Tesis de Maestría (Biología Vegetal). Facultad de Ciencias, U.N.A.M. México D.F.

McGANN, L. 1978. Differing actions of penetrating and nonpenetrating cryoprotective agents. Cryobiology 15: 382-390

MERYMAN, H. T. 1962. Freezing of living cells: Biophysical considerations. En: Sylverton Memorial Symposium Atlantic Cell Culture. April, National Cancer Institute. Monograph No.7. 7-14.

MERYMAN, H. T. 1971. Cryoprotective agents. Cryobiology 8:173-183.

MERYMAN, H.T., AND R. WILLIAMS. 1985. Basic principles of freezing injury to plant cells; natural tolerance and approach to cryoprotection. En: K. Kartha. (Ed). Cryopreservation of Plant Cell and Organs. CRC Press. Boca Raton. 13-48.

MIRANDA, L. 1985. Propagación in vitro de dos cultivares de *Allium cepa* L..Tesis de Licenciatura (Biólogo). Facultad de Ciencias. U.N.A.M. 65 p.

MIRANDA, L. 1992. Análisis preliminar para bancos activos de germoplasma de *Allium sativum* L. in vitro. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. U.N.A.M. 142 p.

MURASHIGE, T AND F. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15:473-494.

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. 1975. Underexploited tropical plants with promising economic value, National Academy of Science, Washington, D.C. 189 p.

NAG, K., AND H. STREET. 1973. Carrot embryogenesis from frozen cultured cells. *Nature.* 24:170

NITZSCHE, W. 1984. Germplasm preservation. En: D. Evans, W. Sharp, and P. Ammirato. (Eds.) Handbook of plant cell culture. Vol 1. McMillan. N.Y. 782-805.

NIINO, T., A. SAKAI, H. YAKUWA AND K. NOJIRI. 1992. Cryopreservation of in vitro-grow shoot tips of apple and pear by vitrification. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 28:261-266.

OREN, L. J. 1972. Essentials of seed testing. En: Seed Biologogy (Ed.). T. T. Kozlowski. Vol III. Insects, and seed collection, storage, testing and certification. Academic Press. N. Y. p 351-532.

PLUCKNETT, D., AND SMITH, N. 1987. Gene banks and the world's food. Princeton University Press. N.J.

POLYSCIENCES. 1976. JB-4 Embedding kit. Paul Valley industrial park. Datasheet 123

ROBERTS, E. 1984. Recalcitrant seeds: their recognition and store. En: E. Holden and T. Williams (Eds.). Crop Genetics Conservation and Evaluation IBPGR, Rome.

RUBLUO, A. 1985. Estrategias para la preservación de germoplasma in vitro. En: M. Robert, M. y V. M. Loyola (Compl). El Cultivo de tejidos vegetales en México. CICYCONACYT. 35- 53

SALA, F., R. CELLA, AND F. ROLLO. 1979. Freeze-preservation of rice cells grown in suspension culture. *Physiol. Plant.* 45:170-176.

SAKAI, A. AND Y. SUGAWARA. 1978. Survival of plant germplasm in liquid nitrogen. En: P.H. Li and A. Sakai (Eds.). Plant cold hardiness and freezing stress. Academic Press. New York. 345-359.

SAKAI, A. 1993. Cryogenic Strategies for survival of Plant Cultured Cells and Meristems Cooled to  $-196^{\circ}\text{C}$ . Reprint for JICA GRP REF No.6 21 p.

STEPONKUS, P.L. AND LANPHEAR, F. 1967. Refinement of the triphenyl tetrazolium chloride method of determining cold injury. *Plant Physiology.* 42:1423-1426.

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

SEIBERT, M. 1976. Shoot initiation from carnation shoot apices frozen to  $-196^{\circ}\text{C}$ . *Science* 191:1178



SING, J. AND R. MILLER. 1985. Biophysical and ultrastructural studies of membrane alterations in plant cells during extracellular freezing: molecular mechanism of membrane injury. En: K. Kartha. (Ed). Cryopreservation of plants and organs. CRC Boca Raton. 61-75.

SUTCLIFFE, J. 1979. Las plantas y la temperatura. Cuadernos de Biología. Ediciones Omega. Barcelona. 61 p

VALENZUELA, M.L. 1988. Respuesta in vitro de ápices de *Allium sativum* sometidos a nitrógeno líquido en presencia de glicerol. Tesis de Licenciatura (Biólogo) Facultad de Ciencias, U. N. A. M. México, D. F. 108 p.

WEAST, R. 1984. CRC Handbook of chemistry and physics CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. 93-95

WILKINS, W. AND J. DODDS. 1983. The application of tissue culture techniques to plant genetic-conservation SCI, Prog, OXF. 68:259-284.

WITHERS, L. 1978. A fine-structural study of the freeze-preservation of plant tissue cultures II. The thawed state. Protoplasma 94:235-247.

WITHERS, L. 1979. Freeze Preservation of somatic embryos and clonal plantlets of carrot (*Daucus carota* L.). Plant Physiol. 63:460-467

WITHERS, L. 1980. Tissue culture storage for genetic conservation. IBPGR. Technical Report, Rome. AGP: IBPGR/80/8