

Encuentros en la Biología



Director:
Salvador Guirado

Editor jefe:
M. Gonzalo Claros

Comité editorial:
Ramón Muñoz-Chápuli,
Antonio de Vicente,
José Carlos Dávila,
Francisco Cánovas,
Francisca Sánchez

Editado con la financiación del
Vicerrectorado de Investigación y
Doctorado de la Universidad de Málaga.

Diseño de la portada:
M. Gonzalo Claros

Correspondencia a:
Encuentros en la Biología,
M. Gonzalo Claros (Editor jefe),
Depto. Biología Molecular y Biquímica,
Facultad de Ciencias,
29071 Málaga
Tfno.: 952 13 72 84
email: claros@uma.es

Dirección de internet:
<http://www.encuentros.uma.es/>

D.L.:MA-1.133/94

ÍNDICE

3 **Aplicación de las metodologías moleculares en el estudio de la evolución humana: SNP**

Geovani López-Ortiz y Héctor Serrano

4 **Desarrollo folicular**

*José Antonio Velázquez Domínguez y
Enrique Mendieta Márquez*

7 **Crioconservación de plantas**

Nieves Westendorp y Carlos L. Encina

Instrucciones para los autores

La revista Encuentros en la Biología es una publicación mensual durante el curso académico español que pretende difundir, de forma amena y accesible, las últimas novedades científicas que puedan interesar tanto a estudiantes como a profesores de todas las áreas de la biología. Además de la versión impresa, la revista también se puede consultar en línea en <http://www.encuentros.uma.es/>. Cualquier persona puede publicar en ella siempre que cumpla las siguientes normas a la hora de elaborar sus originales:

1. Todos los manuscritos deberán ser inéditos o contarán con la autorización expresa del organismo que posea los derechos de reproducción. Además, deben tener alguna relación el objetivo de la revista —los que simplemente reflejen opiniones se rechazarán directamente—.
2. El formato del documento puede ser RTF, SXW (OpenOffice), DOC (Microsoft Word) o ABW (AbiWord). Debido a las restricciones de espacio, la extensión de los mismos no debe superar las 1.600 palabras; en caso contrario, el editor se reserva el derecho de dividirlo en varias partes que aparecerán en números distintos.
3. Cada contribución constará de un título, autor o autores, y su filiación (situación académica; institución u organismo de afiliación; dirección postal completa; correo electrónico; teléfono). Para diferenciar la afiliación de diferentes autores utilice símbolos (*, #, ¶, †, ‡) después del nombre de cada autor.
4. Los nombres de las proteínas se escribirán en mayúsculas (ABC) o redondilla (Abc). Los de los genes y las especies aparecerán en cursiva (ABC, Homo sapiens). También se pondrán en cursiva aquellos términos que se citen en un idioma que no sea el castellano.
5. Las tablas, figuras, dibujos y demás elementos gráficos serán en blanco y negro puros, y deberán ir colocados en su posición, dentro del archivo. Las figuras, las fórmulas y las tablas deberán enviarse en formato GIF o JPG, a una resolución mínima de 150 dpi, máxima de 300 dpi y al menos 8 bits de profundidad.
6. Cuando sean necesarias, las referencias bibliográficas se citarán entre paréntesis dentro del propio texto indicando el apellido del primer autor (se escribirá «y cols» en caso de ser más), el año, la revista o libro donde aparece, el volumen y las páginas.
7. Envío de contribuciones: el original se enviará por correo electrónico al editor jefe (claros@uma.es) o a cualquier otro miembro del comité editorial que consideren más afín al contenido de su contribución. Aunque lo desaconsejamos, también se pueden enviar por correo ordinario (Departamento de Biología Molecular y Bioquímica, Universidad de Málaga, 29071 Málaga, España) acompañados de un disquete o CD. No se devolverá ningún original a los autores.
8. Los trabajos serán leídos al menos por un editor y/o un revisor externo para asesorar sobre la conveniencia de publicar el trabajo; también se podrán sugerir al autor las mejoras formales o de contenido que harían el artículo más aprovechable. En menos de 30 días se enviará la notificación al autor por correo electrónico.

APLICACIÓN DE METODOLOGÍAS MOLECULARES EN EL ESTUDIO DE LA EVOLUCIÓN HUMANA: SNP

Geovani López-Ortiz* y Héctor Serrano§

*Estudiante de la Licenciatura en Biología Experimental. §Catedrático de Biología y Genética Molecular. Depto. de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México, DF, México.

Los primeros estudios en los que se determinaron variaciones genéticas entre los grupos humanos se encaminaron a la detección de los grupos sanguíneos ABO y la presencia de variantes alélicas que determinan el tipo de sangre. La importancia de estas investigaciones se acentuó aun más cuando Fisher mostró que podía trazarse la historia evolutiva, a través de estudios realizados, atendiendo a la expresión genotípica de diversos cromosomas presente en poblaciones, donde dicha expresión se perpetúa a través de mecanismos hereditarios.

Cuando se compara la secuencia de aminoácidos de la albúmina o el citocromo c en diversos animales, se puede observar que entre más cercanas sean dos especies, más parecidos son sus proteínas. Se pueden obtener medidas cuantitativas del parecido de unas especies con otras de acuerdo con las alteraciones que sufren sus proteínas en regiones o residuos específicos. Se ha determinado que existe un cambio del 0,6 % cada millón de años. Así pues, cuando se compara la secuencia de aminoácidos de la albúmina humana y del chimpancé se obtiene una diferencia del 5 %, lo cual indica la presencia de un ancestro común hace 4 millones de años.

Este tipo de estudios permitió el establecimiento de un conocimiento medio de las bases moleculares del proceso evolutivo. Pero hasta que no se desarrollaron de manera adecuada las metodologías de la Ingeniería Genética y la Biología Molecular, principalmente en proyectos plurinacionales como el del Genoma Humano, la aplicación de ellas en estudios de evolución no pudo encontrar un campo fértil. Al igual que en el caso de los relojes proteínicos, las diferencias comparativas en las secuencias de nucleótidos se convierten en distancias genéticas y establecen relaciones entre especies emparentadas.

Al determinar las divergencias que se presentan en el ADN de mitocondrias, se ha determinado que todos los grupos humanos actuales descendieron de un pequeño grupo que habitó África hace 130 000 años aproximadamente, aunque existen también investigadores que manifiestan que la escisión de los grupos humanos fue apenas hace 60 000 años. Se ha llegado a determinar que los orígenes de la población europea estuvo en un grupo escindido que salió de África hace aproximadamente 40 000 años. Conjuntamente con los análisis del ADN mitocondrial, se han utilizado marcadores del cromosoma Y que han probado tener un inestimable valor en la generación de modelos utilizados para delinear cómo fue la evolución humana

[Cavalli-Sforza y Feldman, *Nature Genetics* 33 Suppl 266-275. (2003)].

Además del uso de las herramientas anteriores, utilizadas para tratar de identificar los orígenes y la filogenia de los seres humanos, existe otra técnica muy eficiente para trazar su evolución; esta técnica está relacionada con la identificación de los llamados SNP (*single nucleotide polymorphisms*) o «polimorfismos en un nucleótido». Los SNP son el reflejo de los cambios que pueden presentarse en el material hereditario a lo largo de la historia evolutiva de una especie. Estos cambios pueden identificarse en las secuencias del ADN y proveen información acerca de la historia evolutiva de las poblaciones humanas. Un SNP se presenta cuando existe la sustitución de un solo nucleótido por otro en una región específica del material genético que puede pertenecer a un gen, el cual codificará una cadena polipeptídica con características diferentes a la cadena original y, a su vez, presentará un posible cambio en el fenotipo. Este tipo de variaciones puede formar parte de la región no codificante del gen como podría ser un intrón o un espacio intergénico pero cuya presencia puede asociarse con una característica específica. Cabe mencionar también que los SNP tienen una gran importancia en el avance de las nuevas metodologías médicas, así como en la identificación y etiología de diversas enfermedades.

El material genético puede presentar cambios en sus constituyentes. Los nucleótidos de adenina (A), guanina (G), citosina (C) y timina (T) presentes en una secuencia cualquiera pueden variar constituyendo esencialmente una mutación. En la secuencia AGTGACTTAC puede presentarse la variante AGTGACTTCA en la cual el nucleótido resaltado muestra ese cambio. Si al comparar varias muestras con la misma secuencia general se encuentra que este cambio es frecuente, es posible utilizarlo como un marcador genético. Esta es la forma más común en que se presentan los SNP. Para ser considerado un SNP debe implicar la alteración de un nucleótido determinado dentro de una región específica a nivel poblacional mayor al 1 %.

Se ha estimado la existencia de 1,4 millones de SNP a lo largo del genoma humano, lo que representa un SNP cada 1,9 kilopares de bases (kpb). La cantidad de SNP presentes en el genoma refleja en cierto grado las diferencias entre los seres humanos. La forma a través de la cual los investigadores se apoyan en los SNP para establecer relaciones filogenéticas en común está ligada a demostrar que las mutaciones pasadas han sido acumuladas a lo largo de la historia evolutiva de las especies y podrían conformar un rasgo único.

A pesar de que la presencia de SNP a lo largo del

genoma es totalmente aleatoria, la existencia de SNP adicionales en la vecindad permite asociarlos a regiones específicas, con lo que ahora esta región delimitada por SNP puede servir como marcador y, si se encuentra asociada a alguna característica específica, entonces su presencia determinaría la misma característica en otra muestra del ADN. Obviamente, el grado de variación entre regiones que sirven como marcadores y que están delimitadas por SNP específicos permite su uso como reloj evolutivo. Con base en estas aseveraciones, se han construido mapas de identificación de SNP. Las características de historia evolutiva humana se pueden obtener usando estos mapas, los cuales caracterizan la diversidad del haplotipo (combinación específica de 2 o más SNP) a través del genoma.

Ciertos rasgos coheredados de los alelos en los SNP pueden llevar a distintas asociaciones entre dichos alelos en determinada población. A este hecho se le conoce como desequilibrio en las proporciones de agrupamiento o LD, del inglés *linkage disequilibrium*. Por lo regular, los SNP más comunes en una población determinada tienden a ser más viejos que los SNP particulares; los patrones de LD reflejan la mayoría de las veces recombinaciones a lo largo de la filogenia, aunque también muestran escisiones demográficas. Algunos acontecimientos en la recombinación ocurren repetidamente en puntos preferentes. Se han registrado datos donde los haplotipos y los patrones de LD son compartidos por cromosomas que no tienen relación alguna dentro de las poblaciones y generalmente entre poblaciones. Este fenómeno indica que los cromosomas actuales son mosaicos de las regiones ancestrales de esos cromosomas.

Gracias a los SNP se puede determinar que los genes humanos están relacionados con migraciones del *Homo sapiens* en África. El conocimiento de estos datos es de gran ayuda ya que a través de los mismos se puede obtener información de las migraciones llevadas a cabo por poblaciones humanas hasta constituir las diferentes poblaciones actuales. Tal es el caso de la colonización de la Polinesia y América. Las migraciones han jugado un papel muy importante en la evolución del *Homo sapiens*, debido a éstas se han generado los diversos fenotipos presentes en los grupos humanos. Las poblaciones africanas muestran ligeras variaciones de SNP en comparación con los europeos y asiáticos, lo cual indica la existencia

de presiones selectivas que actúan directamente sobre mutaciones y sugiere que diferentes factores evolutivos son relevantes en continentes distintos.

La combinación de SNP que posee un individuo puede determinarse a través de microarreglos. Los microarreglos son superficies preparadas para mantener sobre ellas cadenas pequeñas de nucleótidos capaces de formar dobles hélices (hibridar, en el lenguaje técnico de la Biología Molecular) de tal suerte que con ellos se pueden detectar en un solo ensayo los 30 000 genes humanos tomados como referencia, ordenados en filas y columnas. Su funcionamiento se basa en la propiedad de los genes de pegarse entre sí sólo cuando son complementarios. Cuando el ADN de una persona se hibrida con el biochip, se puede observar que sus genes tienen una alteración de una letra respecto a los genes de referencia. Cuando no existe una compatibilidad pueden rastrearse escisiones a partir de diferencias presentes en individuos o poblaciones.

Los estudios realizados en el gen *FOXP2*, uno de los factores determinantes que controla una serie de mecanismos responsables de la evolución del lenguaje y, por lo tanto, de la humanidad, está relacionado directamente con un SNP presente en este gen. El gen *FOXP2* muestra una diferencia de sólo 2 aminoácidos en contraste con el que se presenta en primates. El SNP del gen *FOXP2*, además de diferir con los del gorila y el chimpancé, difiere en 3 aminoácidos con el del orangután y en 4 con el del ratón. Lo anterior es un claro ejemplo de cómo la expresión de un aminoácido relacionado con el estudio de los SNP, puede formar parte de un conjunto determinante en la filogenia de una especie. A partir de este tipo de estudios se puede incrementar el conocimiento acerca del pasado evolutivo del ser humano y responder de manera más exacta a una de las interrogantes que durante siglos han surgido en la mente humana y que es: «¿de donde venimos?».

Cada día surgen nuevas técnicas, las cuales tratan de sondear las profundidades del tiempo, con la finalidad de develar los misterios de la evolución. La potencialidad de los SNP como marcadores evolutivos se verá favorecida en el futuro cercano, cuando nuevos investigadores se conviertan en cronistas de la historia molecular del ser humano.

DESARROLLO FOLICULAR

José Antonio Velázquez Domínguez y Enrique Mendieta Márquez

Departamento de Ciencias de la Salud, Laboratorio de Biología Molecular y Fisiología Gonadal, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, UAM-Iztapalapa, 09340 México, DF, México

I.- Introducción

El ovario es una glándula con funciones gametogénicas y endocrinas, que se encuentran reguladas a través del eje hipotálamo-hipófisis-ovario. Las neuronas peptidérgicas hipotalámicas del núcleo arcuato son las encargadas de

la síntesis y secreción pulsátil de la hormona liberadora de gonadotropinas, la cual regula la síntesis y la liberación de las gonadotropinas (hormonas estimulante del folículo [FSH] y luteinizante [LH]), que viajan a través de la circulación sistémica hasta unirse a sus receptores

específicos en las gónadas femeninas. En el ovario, la FSH induce la maduración folicular así como la biosíntesis de estrógenos y progesterona, en tanto que la LH estimula la secreción de andrógenos y la luteinización de los folículos posovulatorios [Parrot & Skinner, *Encyclopedia of Reproduction* III: 483-490 (1999)].

Anatómicamente, el ovario consiste en tres regiones: una corteza externa que contiene al epitelio germinal que origina a los folículos, una médula central constituida por un estroma de tejido conectivo laxo y fibroso, y un hílum, que se encuentra alrededor de la zona de unión del ovario al mesovario, a través del cual se insertan en la gónada las fibras nerviosas y los vasos sanguíneos.

El ovario se encuentra dividido funcionalmente en dos compartimentos: el intersticial, conformado por células del estroma y de la teca externa, y el folicular, que contiene el ovocito, las células de la granulosa y las células de la teca interna, que interactúan entre sí durante las diversas etapas de la maduración folicular.

De acuerdo a su organización estructural, pueden definirse cinco fases del desarrollo folicular: folículos primordiales, primarios, secundarios, terciarios y de Graaf o preovulatorios, si bien es común clasificar los folículos en preantrales (desde primordiales hasta secundarios) y antrales (desde terciarios hasta preovulatorios). Una vez llevada a cabo la ovulación, la estructura folicular evoluciona hacia la formación de un cuerpo lúteo, considerado como la fase final de maduración del folículo.

Normalmente el desarrollo folicular en el ovario se mantiene detenido en la fase de folículos primordiales hasta que se inicia la pubertad. De aquí en adelante, y dependiendo de la especie estudiada, uno o más folículos considerados dominantes lograrán terminar su desarrollo y sus ovocitos se liberarán al término de los correspondientes ciclos estrales. Los folículos que no llegan a terminar su desarrollo degenerarán, convirtiéndose en atrésicos [Van Voorhis, *Encyclopedia of Reproduction* II: 376-389 (1999)].

II.- Diferenciación ovárica durante el desarrollo embrionario

En el embrión del mamífero, el rudimento gonadal puede diferenciarse indistintamente en un ovario o un testículo. Durante su etapa indiferenciada, la gónada se aprecia inicialmente como un engrosamiento del epitelio celómico y una evaginación del mesénquima en el lado medial de la cresta mesonéfrica. Conforme el tejido engrosado se distingue del mesonefros, la cresta genital se forma durante las semanas 4 y

5 de la gestación en el humano y en el día 9 en el ratón. Las células del epitelio celómico en la cresta genital proliferan y migran hacia el tejido mesenquimático laxo adyacente en el reborde de la gónada indiferenciada, la cual ya es reconocible durante la semana 6 del desarrollo embrionario en el humano y el día 11 en el ratón.

Los conductos de Wolff aparecen en el mesonefros durante la semana 4 en el humano y en el día 10 en el ratón, mientras que los müllerianos aparecen en la semana 6 en el desarrollo del humano y en el día 11 en el ratón. En etapas posteriores del desarrollo de la hembra, los primeros sufrirán una regresión debido a la falta de andrógenos, mientras que los müllerianos darán origen al oviducto, útero y la parte superior de la vagina, sin que el desarrollo del tracto reproductivo femenino sea dependiente de los estrógenos [Kalthoff, *Analysis of biological development*, McGraw-Hill, NY, USA, 687-692 (1996)].

El número de células germinales primordiales es relativamente pequeño y éstas proliferan durante su migración, alcanzando un número final de 2500 a 5000 ovogonias en la gónada. Estas se organizan posteriormente en grupos y continúan su proliferación hasta entrar a la profase meiótica, disponiéndose en la periferia de la corteza del futuro ovario.

Los ovocitos primarios no avanzan su división meiótica más allá de la fase de diploteno I, completándola finalmente en la etapa pospuberal. Sin embargo, no todas las ovogonias entran en la meiosis simultáneamente, por lo que las ovogonias y los ovocitos primarios pueden encontrarse presentes en los ovarios embrionarios al mismo tiempo.

La proliferación temprana de las ovogonias en el embrión establece su abundancia en las hembras adultas, si bien algunas células germinales degeneran durante el desarrollo embrionario. En el humano, por ejemplo,

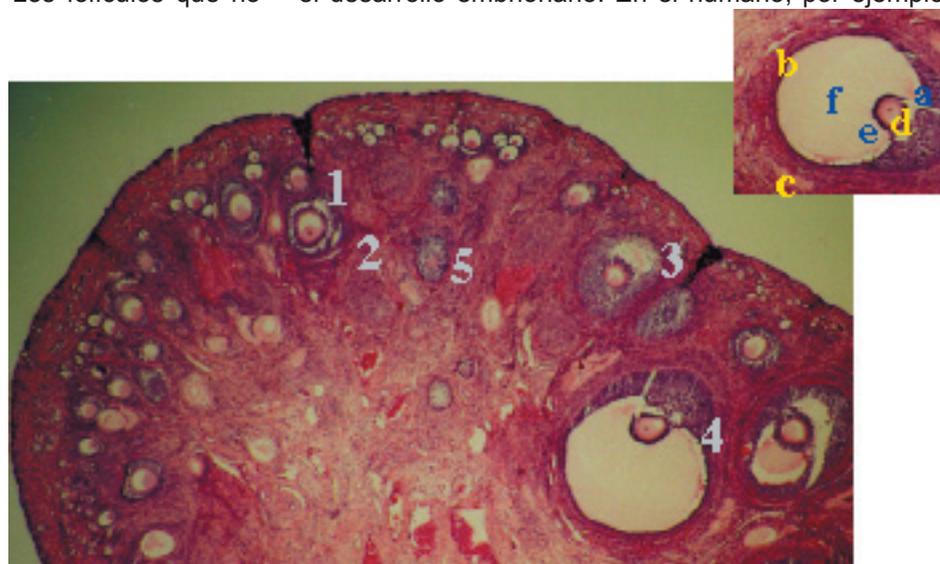


Fig 1. Corte transversal del ovario de perro (25 X) donde se muestran las diferentes etapas del desarrollo de los folículos ováricos. 1.- Folículo primario, 2.- Folículo secundario, 3.-Folículo terciario, 4.- Folículo de Graaf, 5.- Cuerpo lúteo, Inserto: Folículo preovulatorio. a.- Células de la granulosa, b.- Células de la teca interna, c.- Células de la teca externa, d.- Ovocito, e.- Corona radiada, f.- Antrum

el número de ovogonias aumenta hasta llegar a 6 o 7 millones en el séptimo mes y sufre una reducción a 2 millones al momento del nacimiento, hasta finalmente disminuir a unas 400 000 al llegar a la pubertad.

III.- Desarrollo folicular en el ovario pospuberal (fig. 1)

Las ovogonias que han iniciado la meiosis comienzan a organizar a las células estromáticas cercanas a ellas, las cuales darán origen a células de tipo escamoso (pregranulosa) que en número de 6 o 7 constituyen, junto con el ovocito, un folículo primordial. Posteriormente, estas células se diferencian hacia células de la granulosa (CG), que proliferan hasta formar una capa de células cuboidales que circundarán totalmente el ovocito, formando el folículo primario.

Hacia el final de esta etapa, el ovocito inicia la síntesis de las glucoproteínas que formarán la zona pelúcida que terminará rodeándolo. Ambas estirpes celulares inician el desarrollo de extensiones citoplásmicas que atraviesan la zona pelúcida para mantener una comunicación intercelular a través de uniones de tipo gap; además, se inicia una regulación continua de tipo paracrina que involucra productos, tanto del ovocito como de las CG, que son secretados hacia el espacio intercelular [Albertini y cols, *Reproduction* 121: 647-653 (2001)].

La transición a folículo secundario se ha identificado como la etapa crítica de este proceso, ya que las CG proliferan hasta completar de 2 a 3 capas que rodean el ovocito, iniciándose la formación de la lámina basal y la diferenciación de las células estromáticas próximas a ésta, para dar origen a las que serán las células de la teca (CT). Las CG expresan en esta etapa el receptor de la FSH y, en presencia de esta gonadotropina, incrementan su actividad estrogénica, la cual será fundamental para continuar con el desarrollo del folículo.

A partir de esta etapa, la esteroidogénesis folicular es dependiente de ambas gonadotropinas [Lovekamp-Swan & Davis, *Environ. Health Perspect.* 111: 139-145 (2003)]. Así, la LH incrementa la esteroidogénesis *de novo* a partir del colesterol en las CT, produciendo andrógenos (principalmente androstendiona) como producto final. Estos difunden a través de la lámina basal y se convierten en estradiol en las CG por la acción del complejo enzimático de la aromatasa, estimulado por la FSH (fig. 2).

Además de sus múltiples efectos sistémicos, los estrógenos actúan en forma sinérgica con las gonadotropinas promoviendo el crecimiento ovárico, la formación de los receptores de LH y FSH y la actividad misma de la aromatasa, lo que explicaría el aumento preovulatorio de los niveles circulantes de estradiol. Algunos autores consideran que estas hormonas también podrían desempeñar un papel central en el proceso de selección y dominancia folicular [Richards, *Endocrinology* 142: 2184-2193 (2001)].

Al inicio de la etapa de folículo terciario, la capa de CG

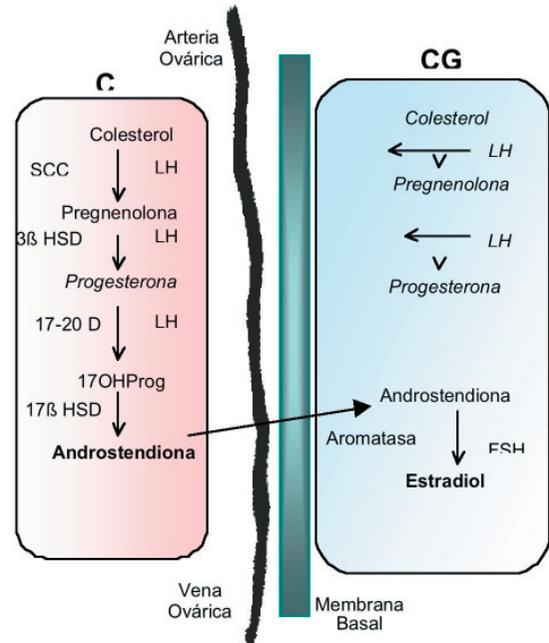


Fig.2 Esteroidogénesis en las células de la granulosa (CG) y de la teca (CT) en folículos antrales. SCC = C20,22 demolasa dependiente de cyto P450_{SCC}. 3β HSD = 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa. 17-20 D = C17,20 desmolasa dependiente de cyto P450_{C17}. 17β HSD = 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa

que se encuentra rodeando directamente al ovocito dará origen a las células del cúmulo, mientras que las células alejadas de éste comenzarán la formación de los cuerpos de Colexner, espacios que coalescerán para dar origen al antrum y, a partir de este momento, los folículos antrales seguirán creciendo hasta alcanzar su máximo tamaño, mientras que las CT gradualmente se irán diferenciando en una capa interna y otra externa (fig. 1).

Los folículos antrales completamente desarrollados se denominan preovulatorios o de Graaf. Las CG que los conforman se encuentran diferenciadas regionalmente, y en esta fase la presencia del pico preovulatorio de LH iniciará la rediferenciación de las CG y las CT hacia células lúteas, la cual se completará una vez que se haya liberado el ovocito del folículo.

La etapa final del desarrollo folicular es la formación del cuerpo lúteo o amarillo. En éste, las células lúteas producirán principalmente progesterona, aunque pueden sintetizar también progestinas 20-α-hidroxiladas o 5-α-reducidas, andrógenos y estrógenos.

Este cuerpo lúteo se considerará funcional mientras la producción de progesterona se mantenga constante, lo que variará de acuerdo a cada especie. La disminución de la esteroidogénesis promoverá la etapa luteolítica o de regresión lútea, a menos que la presencia de la gonadotropina coriónica de origen placentario pueda mantener o rescatar un cuerpo lúteo en proceso de degeneración [Devoto y cols, *Mol. Cell. Endocrinol.* 186: 137-141 (2002)].

CRIOCONSERVACIÓN DE PLANTAS

Nieves Westendorp* y Carlos L. Encina§

*Licenciada. §Científico Titular del CSIC. Estación Experimental La Mayora. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Finca La Mayora. 29750. Algarrobo-Costa. Málaga

La criopreservación, que describimos a continuación, puede ser aplicada ventajosamente a la conservación de especies y variedades vegetales silvestres o cultivadas como alternativa a las colecciones y bancos de germoplasma clásicos (bancos de semillas, colecciones en campo). La criopreservación de plantas es un proceso consistente en la preparación, mantenimiento y preservación a largo plazo de un material vegetal, en unas condiciones de temperatura ultra bajas de $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, obtenidas mediante nitrógeno líquido (NL). Este método de conservación de material vegetal presenta una serie de ventajas frente a otros sistemas de preservación de recursos filogenéticos: es un método rápido, sencillo, no altera la estabilidad genética del material y reduce sustancialmente el esfuerzo y los costes que representan el mantenimiento de colecciones de germoplasma vegetal *in vivo* o *in vitro*, al eliminar casi por completo la mano de obra y evitar los riesgos fitopatológicos y fisiológicos que habitualmente aparecen en el mantenimiento de los bancos de germoplasma vegetales. Hay que señalar el importante ahorro de espacio que supone mantener una colección de especies hortícolas o leñosas en pocos metros cuadrados en vez de en plantaciones de cientos o miles de metros cuadrados.

El elemento fundamental de la criopreservación es el NL que se almacena y mantiene en tanques especiales herméticos que permiten que se mantenga en estado líquido y se evapore muy lentamente, manteniendo una temperatura de $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. El NL es incoloro, inodoro y no combustible y está a una temperatura de $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ a presión atmosférica, por lo que el contacto con los tejidos provoca el congelamiento del área. Es de fácil manejo pero, teniendo en cuenta que desplaza el oxígeno del aire, hay que tener cuidado al manipularlo, lo que se debe hacer en lugares bien ventilados.

El material vegetal a utilizar puede proceder de cualquier parte de la planta: meristemas, yemas, ápices, tallos, callos, embriones somáticos, etc. Debe ser seleccionado de plantas sanas y, en el caso de proceder de material de cultivo *in vitro*, los parámetros de cultivo se deben optimizar antes de la criopreservación, ya que el éxito de éste proceso de conservación va a depender tanto de los tratamientos utilizados antes de someter al material al NL, como de los utilizados una vez recuperado el material del NL. Por lo tanto, es de extrema importancia poner especial atención en la composición de los medios de cultivo donde se incuba el material vegetal antes y después de introducirlo en NL para su conservación [Sakai y cols., 1993, *Cryopreservation of Plant Genetic Resources* 6: 5-26].

Para la manipulación del material es necesario utilizar recipientes de materiales resistentes a las bajas temperaturas, como los crioviales de polipropileno, donde el material vegetal que queremos conservar se deposita antes de introducirlo en el NL. Estos crioviales, con capacidades entre 1,2 y 15,0 ml, tienen un sistema de cierre a rosca especialmente diseñado para soportar la rápida conversión del NL a gas, que tiene lugar a temperatura ambiente, conversión que de otro modo produciría la explosión del contenedor. Debido a la facilidad con que se evapora el NL, es necesario controlar su nivel dentro de los tanques donde se almacena, para reponer las pérdidas y mantener estable la temperatura a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ y así asegurar la perfecta conservación del material.

Según la bibliografía, existen dos métodos de congelación. Podemos hablar de un *método de congelación lento*, y un *método de congelación rápido*.

El método de congelación lento, también llamado método convencional de precongiamiento [Sakai y cols., 1991, *Plant Physiology* 137: 465-470], consiste en someter el material a un descenso gradual de temperatura desde $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ó $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ antes de introducir el material en el NL. Esto puede realizarse bajando la temperatura a saltos térmicos relativamente amplios ($5\text{ }^{\circ}\text{C}/5\text{ min}$), o bien a saltos térmicos muy pequeños ($0,5\text{ }^{\circ}\text{C}/5\text{ min}$), siendo este último sistema mucho más lento y dando lugar a una bajada de temperatura aparentemente continua. En el método de congelación rápido o simple, el material vegetal se congela inicialmente a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, para pasarlo posteriormente al NL.

En general, conviene disminuir el contenido de agua del material vegetal para reducir los efectos de la formación de hielo en la congelación. Para ello el material se deshidrata parcialmente antes de la congelación. Esta deshidratación previa se puede realizar con sustancias como el gel de sílice o medios con altos contenidos en glicerol o sacarosa. Así, se elimina un gran porcentaje del agua contenida en el material, teniendo en cuenta que la mayoría de los materiales mantienen su viabilidad si conservan entre el 16,5 % y el 20 % del agua existente inicialmente en fresco [Uragami y cols., 1990, *Plant Cell Reports* 9:328-331], siendo la determinación de la tolerancia a la deshidratación y los métodos que permiten alcanzarla uno de los objetivos más importantes en el estudio de la criopreservación.

Por lo tanto, el método de congelación, la deshidratación y la utilización de sustancias crioprotectoras, de las que hablaremos más adelante, son los recursos existentes para reducir al máximo los daños que se pueden producir en la célula durante el proceso de congelación. De forma

resumida, aunque al formarse el hielo, ya causa por sí mismo daños celulares, estos daños se agravan debido a que se produce el fenómeno de recristalización, que consiste en que los cristales de hielo que se forman en el interior celular durante el proceso de congelación, se derriten y vuelven a formarse dando lugar a estructuras termodinámicamente más estables, es decir, cristales más grandes, con un efecto sumamente dañino ya que provoca una extensa destrucción de estructuras protoplasmáticas y la lisis celular.

En el sistema de congelación lenta, el hielo comienza a formarse desde el exterior hacia el interior celular. El agua sale hacia el exterior desde el citoplasma y la vacuola, lo que provoca una diferencia de potencial osmótico que causa un aumento de la concentración de soluto en el interior celular, y esto va en detrimento de la posibilidad de supervivencia de la célula. Desarrollar este sistema requiere un equipo complejo y de gran coste que controle la disminución gradual y exacta de la temperatura y el tiempo de permanencia del material en cada estadio térmico programado en el protocolo. En el caso del sistema de congelación rápida ocurre lo contrario: se forma hielo desde el interior celular al exterior. El agua entra y la diferencia de potencial osmótico provocada es menor que en el método lento, por lo que los daños celulares que ocasiona una alta concentración de solutos no son tan críticos, si bien los daños por formación de hielo persisten.

Aunque los métodos de congelación son variados, curiosamente casi todos los autores coinciden en que el proceso de descongelación debe realizarse de forma rápida para evitar la recristalización, siendo el método más habitual la inmediata introducción del material congelado en agua caliente a 38 °C.

Para evitar los daños celulares se recurre generalmente al uso de crioprotectores. Los crioprotectores son sustancias de diferente composición (DMSO, glicerol o etilenglicol) que van a embeber y cubrir el material a conservar, protegiéndolo, al facilitar el paso de agua a través de la célula. Es decir, van a estimular la deshidratación celular antes de la congelación intracelular. Entran en la célula retrasando el proceso de congelación celular, disminuyendo los efectos

osmóticos negativos de los solutos intracelulares. En los procedimientos en que se utilizan crioprotectores, el material se somete frecuentemente a pretratamientos como son la encapsulación-deseccación o la vitrificación. El método de encapsulación-deseccación fue desarrollado por primera vez por Fabre y cols. [1991, *Cryoletters* 11: 413-426] para ápices de *Solanum plureja* y consiste básicamente en envolver el material en una cuenta de alginato y, posteriormente, someterlo a desecación, como por ejemplo, usando gel de sílice, antes de introducirlo en el NL. En el método de vitrificación [Sakai y cols., 1990, *Cryobiology* 27: 657; Sakai y cols., 1991, *Plant Physiology* 137: 465-470; Sakai y cols., 1991, *Plant Science* 74: 243-248] se utilizan combinaciones de agentes protectores, como DMSO, glicerol y etilenglicol, a diferentes concentraciones para proteger el material, ya que las combinaciones de agentes protectores son más eficaces que la utilización de cualquier agente en solitario. Una de las mezclas más utilizadas es: DMSO al 1 %, etilenglicol al 1 %, y glicerol al 30 %, o bien, DMSO al 5 o 10%, glicerol al 5 o 10 % y sacarosa.

Para incrementar los efectos de la utilización de los crioprotectores, el material vegetal puede precultivarse en un medio que contenga altas concentraciones de azúcar. Los azúcares, reducirían el contenido hídrico de la célula disminuyendo así la formación de hielo intracelular. Por ello, el trabajo preliminar para la conservación en cada especie es determinar su tolerancia a la deshidratación y ajustar los sistemas o protocolos de congelación para obtener una elevada supervivencia y viabilidad del material crioconservado.

Con esta técnica pretendemos contribuir a la preservación de un valioso recurso fitogenético de Andalucía: las variedades autóctonas andaluzas de espárrago originarias de Huétor-Tájar en la Vega del río Genil en Granada. Estas variedades autóctonas están protegidas por una Denominación Específica de Calidad por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación [BOE, 17 de Abril de 1997], pero la realidad es que están en peligro de desaparición por la competencia de variedades híbridas foráneas, ya que en la actualidad ocupan menos de un 10 % de la superficie cultivada de espárrago en la zona de Huétor-Tájar.